

Universidade do Minho
Escola de Ciências

André Manuel Gomes Lopes

Síntese e determinação da atividade biológica de novos heterociclos de nitrogénio contra *L. infantum* e *T. brucei*



Universidade do Minho

Escola de Ciências

André Manuel Gomes Lopes

**Síntese e determinação da atividade
biológica de novos heterociclos de
nitrogénio contra *L. infantum* e *T. brucei***

Dissertação de Mestrado
Química Medicinal

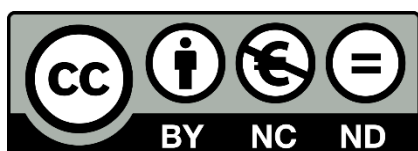
Trabalho efetuado sob a orientação da
Doutora Maria Alice Carvalho
e da
Doutora Anabela Cordeiro da Silva

janeiro de 2021

DIREITOS DE AUTOR E CONDIÇÕES DE UTILIZAÇÃO DO TRABALHO POR TERCEIROS

Este é um trabalho académico que pode ser utilizado por terceiros desde que respeitadas as regras e boas práticas internacionalmente aceites, no que concerne aos direitos de autor e direitos conexos. Assim, o presente trabalho pode ser utilizado nos termos previstos na licença abaixo indicada. Caso o utilizador necessite de permissão para poder fazer um uso do trabalho em condições não previstas no licenciamento indicado, deverá contactar o autor, através do RepositóriUM da Universidade do Minho.

Licença concedida aos utilizadores deste trabalho:



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

Agradecimentos

Em primeiro lugar gostaria de agradecer à Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT), ao Centro de Química da Universidade do Minho (CQ-UMinho), ao Instituto de Investigação e Inovação na Saúde (I3S) e ao Centro de Engenharia Biológica (CEB) da UMinho pela disponibilização dos seus espaços e de todos os seus colaboradores que contribuíram direta e indiretamente para a concretização deste trabalho.

Gostaria de agradecer às minhas orientadoras, Professora Maria Alice Carvalho do CQ-Uminho e Professora Anabela Cordeiro da Silva do grupo “Parasite Disease” do I3S por todo o tempo dedicado, sabedoria partilhada e informação disponibilizada ao longo da tese. Um agradecimento especial ao Nuno Santarém e à Carla pela formação intensa em ensaios biológicos *in vitro* e condutas de trabalho laboratorial (Biosafety 2).

Também gostaria de agradecer aos meus colegas Vítor e Sofia do Lab15 do DQ pela doação de compostos para testes biológicos permitindo assim obter informações preliminares que facilitaram a otimização “hit to lead”.

Não seria justo não agradecer a todos pelo bom ambiente dentro e fora do laboratório quer no DQ quer no I3S. Por esse motivo agradeço aos meus colegas do DQ, mais especificamente do Lab15, Vítor, Sofia, Joana, Fábio e Filipe e aos meus colegas do “Parasite Disease”, Carlos, Carla, Ricardo, Sílvia e Glória. Um agradecimento especial aos meus fantásticos colegas de mestrado Diana, Teresa, Diogo, Carolina e Rodrigo pelos momentos inesquecíveis pré e pós aulas.

À Teresa Pereira pela paciência adquirida e por todos as fotos tiradas durante o almoço. E já agora à Diana por ter partilhado a frustração conjunta de ter de conviver com a indivíduo mencionada acima ao longo destes intensos 2 anos.

@officialsoff – Sigam no Instagram para mais conteúdo

Ao Vítor Lobo por todos os momentos passados a destilar veneno para as inimigas e pelos momentos interessantes passados naquele laboratório que nunca serão mencionados publicamente.

Por último agradeço a todos os meus familiares, especialmente aos meus pais, que sempre me apoiaram em todo o meu percurso académico culminando aqui neste trabalho que, espero eu, me abra um caminho para um futuro promissor. Esta tese é dedicada a todos que dizem que o esforço não é recompensado.

“If you do what you love, you'll never work a day in your life.”

Marc Anthony

Menção do apoio financeiro

Este trabalho foi apoiado por fundos da Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT)/Ministério da Educação e Ciência (MEC) cofinanciados pelo Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER) ao abrigo do Acordo de Parceria PT2020, através da Unidade de Investigação.

Este trabalho recebeu ainda financiamento do projeto POCI-01-0145-FEDER-031013 financiado pelo Portugal 2020, ao abrigo do Programa Operacional Competitividade e Internacionalização (COMPETE 2020), Norte-01-0145-FEDER-000012 - Programa Estruturado de Terapias Bioengenharia para Infeciologia, regeneração de tecidos e doenças, apoiado pelo Programa Operacional Regional do Norte de Portugal (NORTE 2020), ao abrigo do Acordo de Parceria PORTUGAL 2020, através do FEDER e do projeto estratégico UID/QUI/00686/2018 e da Rede Nacional de RMN (PINFRA/22161/2016).

DECLARAÇÃO DE INTEGRIDADE

Declaro ter atuado com integridade na elaboração do presente trabalho académico e confirmo que não recorri à prática de plágio nem a qualquer forma de utilização indevida ou falsificação de informações ou resultados em nenhuma das etapas conducente à sua elaboração. Mais declaro que conheço e que respeitei o Código de Conduta Ética da Universidade do Minho.

Resumo

A leishmaniose e a doença do sono são doenças provocadas por parasitas protozoários do género *Leishmania* e *Trypanosoma*, respetivamente, que afetam um elevadíssimo número de pessoas em todo o mundo. Apesar de haver tratamento, o aparecimento de resistência aos tratamentos disponíveis e a variedade genética dos parasitas representam enorme perigo para a humanidade. A descoberta de novas moléculas para combater essas doenças foi considerada pela Organização Mundial de Saúde uma necessidade urgente.

Este trabalho apresenta a síntese, avaliação biológica em parasitas *L. infantum* e *T. brucei* e análises SAR de novos derivados de 4-hidrazonopirimidopirimidinas.

As 4-hidrazonopirimidopirimidinas a testar foram sintetizadas usando métodos de síntese desenvolvidos anteriormente no grupo de investigação. A partir de reagentes comerciais foram sintetizadas 9-aril-6-cianopurinas em quatro passos sequenciais. Estas fizeram-se reagir com agentes alquilantes e acilantes gerando novos derivados. O tratamento das cianopurinas com hidrazina permitiu gerar dihidropirimidopirimidinas que se converteram em 4-hidrazinopirimidopirimidina por reação com um nucleófilo. As 4-hidrazonopirimidopirimidinas foram obtidas a partir das 4-hidrazinopirimidopirimidinas, por reação com aldeídos em meio ácido, ou a partir das dihidropirimidopirimidinas por reação com aldeídos na presença de uma base nucleofílica. Deu-se ainda início ao estudo das condições de reação para gerar pirimidopirimidinas fundidas com triazinas.

A atividade antiparasitária das hidrazonopirimidopirimidinas foi determinada em formas promastigotas de *L. infantum* e formas sanguíneas de *T. brucei* através da determinação do IC₅₀. A citotoxicidade foi avaliada na linha celular de macrófagos THP1. Foram identificados vinte e quatro compostos com IC₅₀ < 10 µM (*L.i* promastigotas) que se selecionaram para serem testados em amastigotas de *L. infantum* intramacrofágicos. Dos compostos testados, treze mostraram-se ativos a 10 µM. Três dos compostos ativos em amastigotas de *L. infantum* intramacrofágicos foram ainda avaliados numa estirpe multirresistente de *L. infantum* (M200.5), sendo todos eles ativos.

Identificaram-se cinco compostos promissores para estudos mais avançados em *L. infantum*, com índice de seletividade (SI) superior a 40, e três compostos promissores para estudos mais avançados em *T. brucei*, com SI superior a 100.

Abstract

Leishmaniasis and sleeping sickness are diseases caused by protozoan parasites of the genus *Leishmania* and *Trypanosoma*, respectively, which affect many people worldwide. Although there are many types of treatment, the increasing resistance and parasite variability makes these issues threatening. The discovery and research of new antiparasitic molecules is considered an urgent necessity by The World Health Organization.

This manuscript presents the synthesis, biological evaluation in parasites *L. infantum* and *T. brucei* and SAR studies of new 4-hydrazonepyrimidopyrimidines.

These compounds were synthesized by an already optimized method developed by the research group. In four sequential steps, 9-aryl-6-nitrilepurines were synthesized from commercial reagents. These were treated with alkyl halides and acyl chlorides originating new compounds. The reaction of the nitrilepurines with hydrazine allowed the synthesis of dihydropyrimidopyrimidines which were then converted in 4-hydrazinylpyrimidopyrimidines by reacting with a nucleophile. The new 4-hydrazonepyrimidopyrimidines were synthesized from 4-hydrazinylpyrimidopyrimidines, by reaction with aldehydes in acid medium or from dihydropyrimidopyrimidines by reaction with aldehydes in the presence of a basic nucleophile. Also, a new study was initiated to determine the conditions for synthesizing a new class of tricyclic compounds bearing a pyrimidopyrimidine moiety coupled to a triazine.

The antiparasitic activity of 4-hydrazonepyrimidopyrimidines was measured in the promastigote form of *L. infantum* and in *T. brucei* bloodstream and the cytotoxicity was measured in a THP1 macrophage cell-line.

A total of 24 compounds showed activity (*L.i* promastigotes) bellow 10 μ M being then selected for testing in the intramacrophagic amastigote form of *L. infantum*. From this assay 13 compounds showed activity bellow 10 μ M and 3 of them were selected and tested in a resistant strain of *L.i* promastigotes (M200.5). All the compounds previously selected were highly active in this strain.

In total, 5 promising compounds were identified and selected for further studies in *L. infantum* bearing a selective index over 40, and 3 compounds were identified and selected for further studies in *T. brucei* bearing a selective index over 100.

Abreviaturas

am. – Amastigotas

am* - Amastigotas axénicos (extracelulares)

CC₅₀ - Concentração à qual se verifica 50% de citotoxicidade

CDCl₃ – Clorofórmio deuterado

d – Duplete

DCM - Diclorometano

dd – Duplete de dupletos

ddd – Duplo duplete de dupletos

Dec. – Degradação

DMSO - Dimetilsulfóxido

DMSO_{d6} – Dimetilsulfóxido deuterado

DRC – “Dose Response Curve”

dt – Duplete de tripletos

Esq - Esquema

f – Fraco

Fig - Figura

FTIR – “Fourier Transformed Infrared Spectroscopy”

h – Hora(s)

HMBC – “Heteronuclear Multiple Bond Correlation”

HMQC – “Heteronuclear Multiple Quantum Coherence”

Hz - Hertz

i - Intenso

IC₅₀ – Concentração à qual se verifica 50% de inibição biológica

IV - Infravermelho

J – Constante de acoplamento

L.i. – *Leishmania infantum*

m – Médio

m - meta

m – Multiplete

min. – minuto(s)

σ – orto

OMS – Organização mundial de saúde

p - para

PBS – “Phosphate-buffered saline”

PMA – “Phorbol 12-myristate 13-acetate”

pro. – Promastigotas

q - Quarteto

quint - Quinteto

RMN - Ressonância Magnética Nuclear

s – Singleto

SAR – “Structure-Activity Relationship”

SD – “Single Dose”

SI – Índice de seletividade

sl - Singleto largo

t.a. – Temperatura ambiente (20-30°C)

Tab. - Tabela

T.b. – *Trypanosoma brucei*

Índice

AGRADECIMENTOS	iii
MENÇÃO AO APOIO FINANCEIRO	iv
RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
ABREVIATURAS	viii
ÍNDICE	x
1. Introdução	1
1.1. Leishmaniose	1
1.1.1. Tratamento	3
1.2. Tripanosomíase	4
1.2.1. Tratamento	6
1.3. “Kala-azar” e doença do sono: O problema continua... ..	7
1.4. Novos compostos em desenvolvimento pré-clínico.....	7
1.4.1. Compostos com atividade antileishmanial.....	7
1.4.1.1. Derivados de Cromenos, cumarinas e calconas.....	8
1.4.1.2. Derivados de Quinolina	9
1.4.1.3. Derivados de Quinazolina	10
1.4.1.4. Outros compostos.....	13
1.4.2. Compostos com atividade antitripanosomal	14
1.4.3. Considerações finais.....	16
2. Objetivos	17
3. Discussão	18
3.1. Síntese química.....	18
3.1.1. Síntese e caracterização de reagentes de partida.....	18

3.1.1.1.	Síntese de reagentes alquilantes 54	18
3.1.1.1.1.	Mecanismo reacional	19
3.1.1.1.2.	Caraterização física, analítica e espectroscópica (¹ H e ¹³ C RMN)	20
3.1.1.2.	Síntese de Imidato 57	23
3.1.1.2.1.	Mecanismo reacional	23
3.1.1.3.	Síntese de Amidinas 59 e Imidazoles 60	23
3.1.1.3.1.	Mecanismo reacional	24
3.1.1.3.2.	Caraterização física, analítica e espectroscópica de 60i	25
3.1.1.3.	Síntese de 6-cianopurinas 61 e 63	27
3.1.1.3.1.	Síntese de 6-cianopurinas 61	27
3.1.1.3.1.1.	Mecanismo reacional	29
3.1.1.3.2.	Síntese de 6-cianopurinas 63	31
3.1.1.3.2.1.	Mecanismo reacional	32
3.1.1.3.3.	Caraterização física, analítica e espectroscópica	33
3.1.1.4.	Síntese de Dihidropirimidopirimidinas 65	41
3.1.1.4.1.	Mecanismo reacional	42
3.1.1.4.2.	Caraterização física, analítica e espectroscópica	43
3.1.1.5.	Síntese de 4-Hidrazinopirimidopirimidinas 67	51
3.1.1.5.1.	Mecanismo reacional	52
3.1.1.5.2.	Caraterização física, analítica e espectroscópica	52
3.1.2.	Síntese e caraterização de 4-Hidrazonopirimidopirimidinas 69-82	58
3.1.2.1.	Síntese de 4-Hidrazonopirimidopirimidinas a partir de 68	58
3.1.2.1.1.	Mecanismo reacional	60
3.1.2.2.	Síntese de 4-Hidrazonopirimidopirimidinas a partir de 65	60
3.1.2.2.1.	Mecanismo reacional	63
3.1.2.3.	Caraterização física, analítica e espectroscópica	65

3.1.3. Estudos preliminares para a síntese de Triazinopirimidopirimidinas 84	113
3.1.3.1. Mecanismo reacional.....	117
3.1.3.2. Caracterização física, analítica e espectroscópica	128
3.2. Avaliação biológica.....	122
3.2.1. Avaliação biológica em formas promastigotas de <i>L. infantum</i> , <i>T. brucei</i> e macrófagos da linha celular THP1	123
3.2.1.1. 1ª Seleção	124
3.2.1.1.1. Atividade antileishmanial: Estudos de relação estrutura-atividade.....	131
3.2.1.1.2. Atividade antitripanosomal: Estudos de relação estrutura-atividade.....	132
3.2.1.2. 2ª Seleção	135
3.2.1.2.1. Atividade antileishmanial: Estudos de relação estrutura-atividade.....	140
3.2.1.2.2. Atividade antitripanosomal: Estudos de relação estrutura-atividade.....	142
3.2.1.3. 3ª Seleção	143
3.2.1.3.1. Atividade antileishmanial: Estudos de relação estrutura-atividade.....	147
3.2.2. Seleção de candidatos para estudos intracelulares.....	149
3.2.3. Avaliação biológica em formas de amastigotas de <i>L. infantum</i> intramacrofágicos	149
3.2.4. Avaliação biológica em formas promastigotas de <i>L. infantum</i> multirrestentes (M200.5). 155	
3.2.5. Identificação de compostos “lead”	157
4. Conclusões e perspectivas futuras	158
5. Procedimentos experimentais	161
5.1. Síntese química.....	161
5.1.1. Reagentes alquilantes 54	161
5.1.2. Imidazoles (60i).....	162
5.1.3. 6-cianopurinas 61 e 63	162
5.1.4. Dihidropirimidopirimidinas 65	167
5.1.5. 4-Hidrazinopirimidopirimidinas 67	171

5.1.6. 4-Hidrazonopirimidopirimidinas 68-82	173
5.1.7. Triazinopirimidopirimidinas 84	193
5.2. Avaliação biológica.....	194
5.2.1. Ensaio de rastreio de moléculas em formas promastigotas de <i>L. infantum</i> e formas sanguíneas de <i>T. brucei</i>	194
5.2.2. Ensaio de citotoxicidade em macrófagos da linha celular THP1	195
5.2.3. Ensaio de rastreio de moléculas em formas de amastigotas de <i>L. infantum</i> intramacrofágicos	196
6. Referências Bibliográficas	198

1. Introdução

1.1. Leishmaniose

As leishmanioses são um conjunto de doenças tropicais e subtropicais provocadas pelas várias espécies do género *Leishmania* (género de parasitas protozoários intracelulares da família Trypanosomatidae). Estas apresentam várias manifestações clínicas: Leishmaniose visceral (fatal na ausência de tratamento); Leishmaniose cutânea e mucocutânea para as quais ainda não existe terapia segura atualmente. Os parasitas do género *Leishmania* causam uma larga variedade de doenças afetando cerca de 12 milhões de pessoas mundialmente, surgindo cerca de 1,5 a 2 milhões de casos anualmente [1,3].

Em relação à leishmaniose cutânea, esta é a mais comum em países em desenvolvimento sendo registados anualmente cerca de 0,6 a 1 milhão de casos. Tem a particularidade de apresentar uma epidemiologia bastante complexa, com variações nos ciclos de transmissão, nos hospedeiros, nos insetos vetores, nas manifestações clínicas e na resposta ao tratamento. A leishmaniose mucocutânea está associada à destruição parcial das mucosas do nariz, boca e garganta. Cerca de 90% dos casos ocorrem na Bolívia, Brasil, Etiópia e Peru. A leishmaniose visceral, também conhecida por kala-azar, está associada a cerca de 50.000 a 90.000 novos casos por ano, em que 95% desses casos, quando não são tratados, são fatais [1].

Cerca de 21 de 30 espécies destes parasitas são capazes de infetar humanos [2]. Realça-se o complexo *Leishmania donovani* com 2 espécies (*Leishmania donovani*, *Leishmania infantum* ou *Leishmania chagasi*) responsável pela forma mais agressiva de leishmaniose, a leishmaniose visceral, mais conhecida por “kala-azar” (Fig.1).

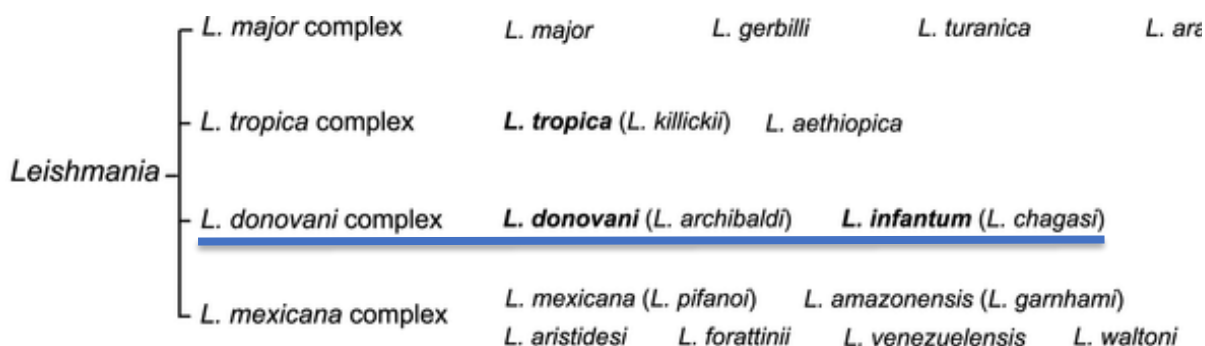


Figura 1 – Árvore filogenética do género *Leishmania*

A pessoa é infectada quando um flebotomíneo inocula formas promastigotas na corrente sanguínea do hospedeiro (A). Estas formas são fagocitadas por macrófagos teciduais (B) e diferenciam-se intracelularmente em amastigotas (forma intracelular do parasita no hospedeiro vertebrado) (C). Estas depois reproduzem-se por divisão binária (D), até que a célula hospedeira fique repleta de parasitas e se rompa (E). Com a destruição da célula, inúmeros amastigotas são libertados e fagocitados por outros macrófagos, dando continuidade aos ciclos de reprodução assexuada (F). O vetor, por sua vez, recebe o parasita por hematofagia quando ingere células parasitadas por amastigotas (G). Estas, quando chegam ao intestino do vetor, adquirem a sua forma promastigota invadindo as porções do estômago do flebotomíneo (H e I), sendo inoculadas no hospedeiro vertebrado após a próxima picada (J) [1,4 e 5] (Fig.2).

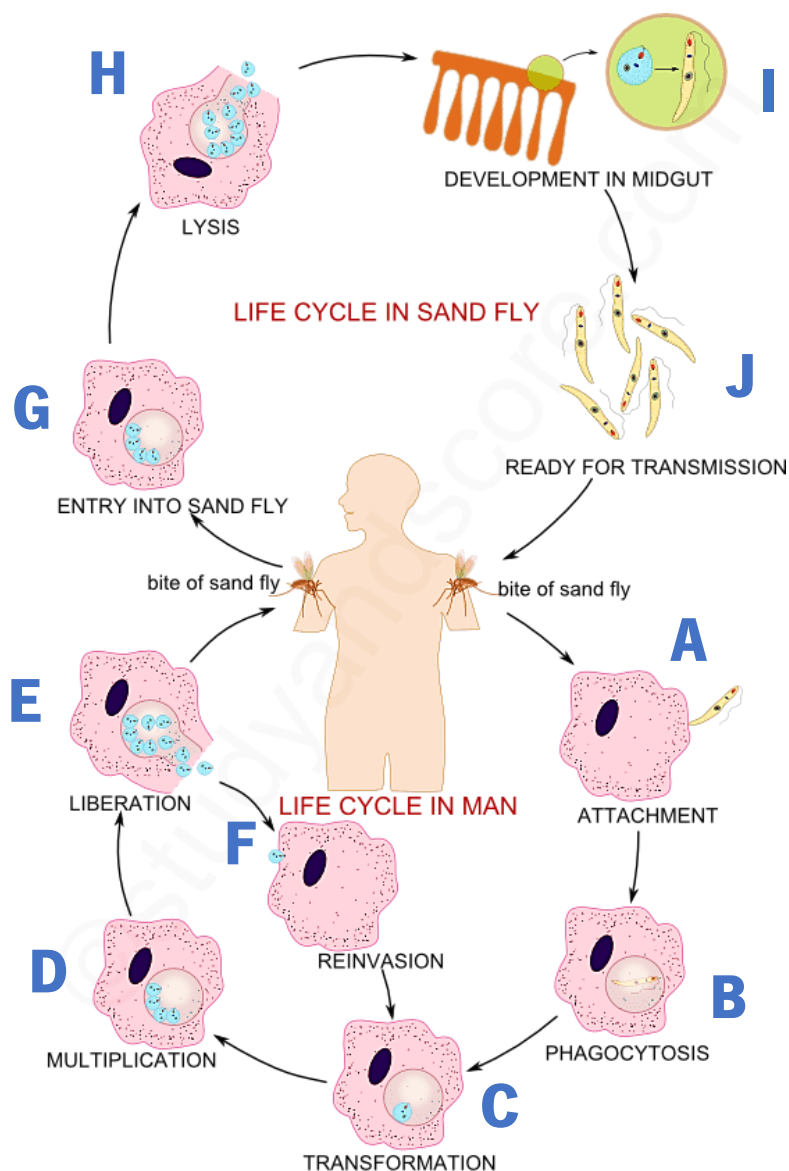


Figura 2 – Ciclo de vida completo de parasitas *L. donovani* (@studyandscore.com)

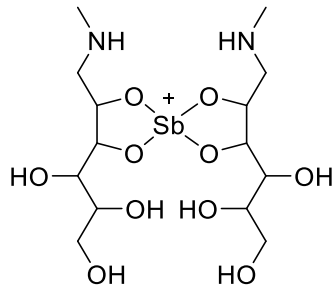
Existe uma epidemia recorrente de leishmaniose visceral na África Oriental (Etiópia, Sudão e Quênia), conseqüentemente aumentando a taxa de mortalidade das comunidades afetadas. Da mesma forma, a maioria das epidemias de leishmaniose cutânea têm atingido diferentes zonas do Afeganistão, Algéria, Brasil, Colômbia, Paquistão, Peru e as repúblicas da Síria e Arábia [1,6].

Em 2014, mais de 90% dos novos casos registados pela OMS (Organização Mundial da Saúde) provinham de cinco países (Brasil, Etiópia, Índia, Somália e Sudão). A leishmaniose cutânea antrópica (Humanos como portadores do parasita) é predominantemente urbana e demonstra padrões de agrupamento espacial semelhantes à leishmaniose visceral antrópica, presente no sudeste asiático. A doença é normalmente assinalada por vastos surtos em cidades densamente povoadas, especialmente em zonas de conflitos/guerras, campos de refugiados e onde predominam migrações populacionais de larga escala. Isto deve-se ao facto de predominarem/circulararem várias espécies do género *Leishmania* na mesma área geográfica. Cerca de 90% dos casos registados de Leishmaniose mucocutânea ocorrem no estado multinacional da Bolívia, Brasil e Peru [1,6].

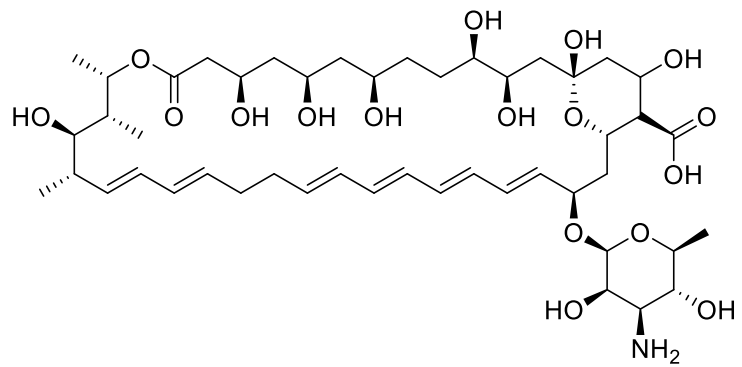
A procura/pesquisa ativa de novos casos é uma componente fundamental para a estratégia de eliminação da leishmaniose visceral na Índia. Esta poderá ajudar a reduzir a transmissão da doença diminuindo o período de infeção dos doentes, e quanto mais cedo for diagnosticada melhor será a eficiência do tratamento.

1.1.1. Tratamento

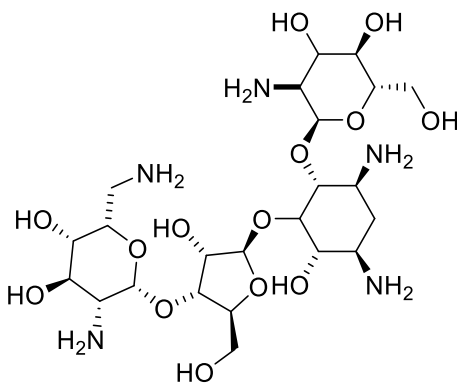
Sem nenhuma vacina para o Homem disponível atualmente, o controlo de parasitas deste tipo (*Leishmania*) depende maioritariamente de tratamentos que normalmente requerem longos períodos de administração parenteral e que são maioritariamente dispendiosos (quimioterapia). Durante muitos anos o tratamento primário antileishmanial, na maior parte dos países em desenvolvimento, foi o Antimónio. No entanto, a resistência a derivados de antimónio pentavalente tem vindo a aumentar, e conseqüentemente foi sendo substituído por outras alternativas [7,8,10,11]. Atualmente, o aumento da resistência a este tipo de compostos, em zonas altamente endémicas, fez com que se recorresse a terapias alternativas, entre as quais, a utilização de anfotericina B (**2**), aminosidina (paromomicina **3**) e miltefosina (**4**), no entanto estes fármacos apresentam elevada biotoxicidade, assim com baixa disponibilidade no mercado (Fig. 3). Para além disso, as novas formulações de anfotericina B (AmBisome®), apesar de muito eficientes, são extremamente difíceis de obter devido ao seu elevado custo de produção [7-11].



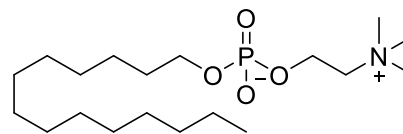
Antimoniato de meglumina **1**



Anfotericina B **2**



Paromomicina **3**



Miltefosina **4**

Figura 3 – Fármacos atuais antileishmaniais

Uma outra componente que dificulta o tratamento é a coinfeção com HIV. Este, sendo um vírus, cujo alvo são células do sistema imunitário, é de prever que haja um efeito sinérgico no processo de infecção. O enfraquecimento do sistema imunitário aumenta a eficiência do processo de contágio e esta particularidade tem vindo a alterar a epidemiologia apresentando problemas para o diagnóstico e para o tratamento desses casos [10, 11].

1.2. Tripanosomiase

A tripanosomiase Africana humana ou doença do sono é uma doença causada por duas subespécies de *Trypanosoma brucei*, *T. b. rhodesiense* e *T. b. gambiense*. Os parasitas vivem e multiplicam-se extracelularmente no sangue e fluidos intersticiais do seu hospedeiro humano e são transmitidos via a picada de um inseto vetor infetado (mosca tsetse, “*Glossina spp.*”) (Fig. 4).

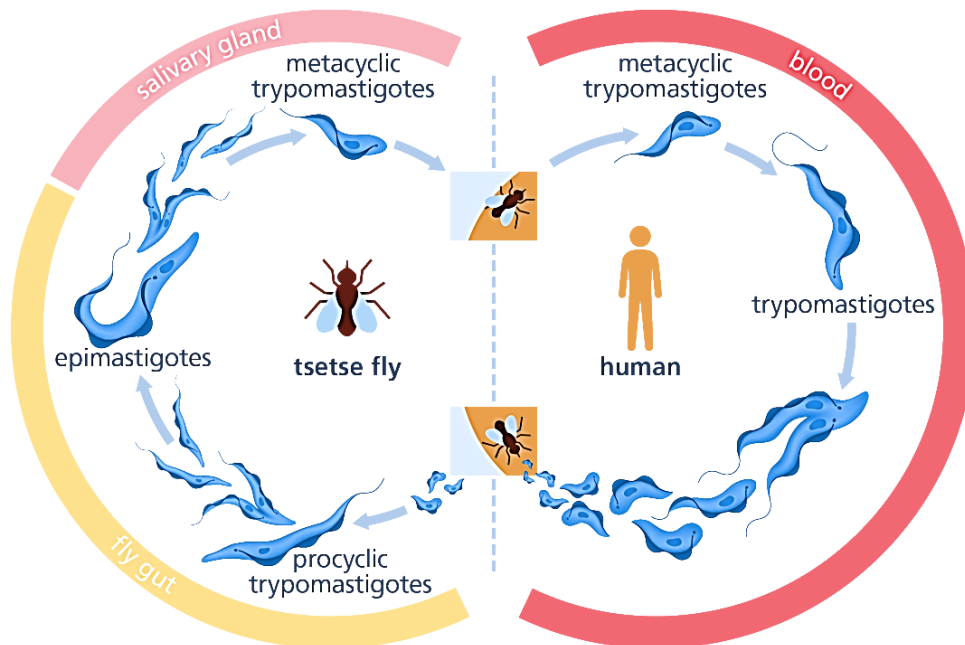


Figura 4 – Ciclo de vida de parasitas do género *Trypanosoma* (Genome Research Limited)

A epidemiologia desta doença centra-se exclusivamente em zonas subsaarianas de África [13]. As zonas rurais são as mais endémicas sendo que, atualmente 250 zonas, distribuindo-se por 36 países, encontram-se ativas [14]. A subespécie *Trypanosoma b. rhodesiense* é encontrada nas zonas este e sul de África ao passo que, a *T. b. gambiense* aparece na zona oeste e centro de África.

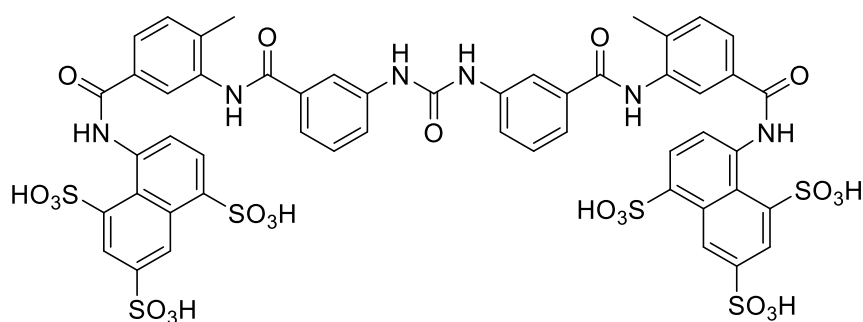
A gravidade da doença do sono depende da subespécie em questão. Infeções com *T. b. gambiense* levam a uma forma aguda da doença, ao passo que, infeções com *T. b. rhodesiense* conduzem a uma infeção crónica. Os sintomas da primeira fase da doença, associada à restrição dos parasitas ao sangue e sistema linfático, apresentam-se sob a forma de febre, dor de cabeça, dores articulares e comichão [15,16]. A segunda fase da doença desencadeia-se assim que os parasitas invadem o sistema nervoso central e caracteriza-se clinicamente pelo aparecimento de distúrbios neurológicos e endócrinos [15,16]. Sem tratamento, a doença do sono, para pacientes infetados com *T. b. rhodesiense* é mortal em poucos meses. Para pacientes infetados com *T. b. gambiense* a morte tende a ocorrer passados vários anos.

No final do século XIX, foram detetadas várias epidemias de doença do sono no continente africano. Destas, a mais destrutiva foi entre 1896-1906, com cerca de 300,000 a 500,000 mortes registadas, afetando o Congo, Uganda e Quênia [17]. Estas epidemias persuadiram a comunidade científica a encontrar uma cura para a doença do sono. Na altura, o campo da quimioterapia encontrava-se subdesenvolvido, porém começou-se a usar novos métodos de identificação e síntese de novas estruturas para uso terapêutico. Aliás, os primeiros avanços para o desenvolvimento de novas drogas

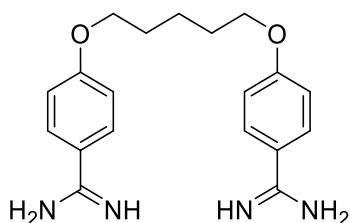
antiparasitárias surgiram desta iniciativa [18,19].

1.2.1. Tratamento

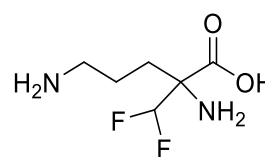
O tratamento atual da doença do sono depende do estágio/fase da doença e do tipo de infecção, que pode ser crónica (*T. b. rhodesiense*) ou não (*T. b. gambiense*). Para a primeira fase, o tratamento administrado é Suramina **5** e Pentamidina **6**, para *T. b. rhodesiense* e *T. b. gambiense*, respetivamente. No segundo estágio da doença, para *T. b. gambiense*, administra-se Eflornitina **7** seguida de NECT (Eflornitina-Nifurtimox **8**, uma terapia combinada). Caso a doença persista é administrado Melarsoprol **9** (altamente tóxico). Este último é usado logo à partida quando a doença do sono crónica atinge o seu segundo estágio (Fig. 5) [20].



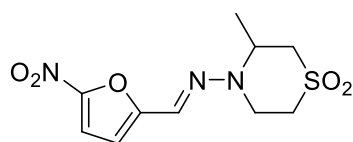
5 Suramina



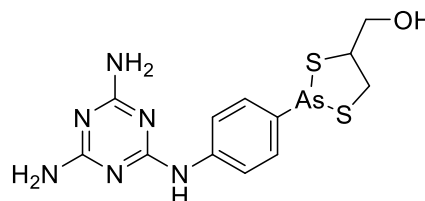
6 Pentamidina



7 Eflornitina



8 Nifurtimox



9 Melarsoprol

Figura 5 – Fármacos atuais antitripanosomiais

1.3. “kala-azar” e doença do sono: o problema continua...

Apesar de existirem alguns medicamentos para o tratamento destas doenças, o acesso a eles é problemático em países pobres com elevada afluência de infetados. Apesar de a OMS (Organização Mundial de Saúde) e a DNDi (Drugs for Neglected Diseases initiative) já terem empregado esforços para melhorar o acesso aos medicamentos o problema ainda persiste. Isto encontra-se diretamente relacionado com os fracos sistemas de saúde destes países endémicos [1 1].

Alguns fatores que impossibilitam o acesso a tratamentos adequados são, por exemplo, o facto de os medicamentos serem caros, os protocolos de tratamento nacionais não se encontrarem a par dos mais recentes avanços científicos, os fármacos serem vistos pelas empresas produtoras como “não rentáveis” e o fornecimento de medicamentos não ser contínuo. Além disso a elevada toxicidade dos fármacos disponíveis e o aparecimento de resistência aos tratamentos é uma ameaça à vida humana. Assim, é imperativo que se descubram novas moléculas com atividade contra os parasitas responsáveis por estas doenças e que simultaneamente sejam não tóxicos para o ser humano. A comunidade científica tem vindo a trabalhar ativamente na descoberta de novas moléculas para o desenvolvimento de novos medicamentos. A seguir apresenta-se a pesquisa efetuada para identificar as novas moléculas, recentemente descobertas, que apresentam atividade antileishmanial e/ou antitripanossomial.

1.4. Novos compostos em desenvolvimento pré-clínico

O número de compostos descritos na literatura com atividade antileishmanial e antitripanossomial é considerável, mas nesta pesquisa apresentam-se apenas os compostos mais ativos ($IC_{50} < 10 \mu M$), menos tóxicos e que se mostraram ativos nas várias formas de parasitas *Leishmania* e *Trypanosoma*. Este estudo foi dividido em 3 partes: compostos com atividade antileishmanial, compostos com atividade antitripanossomial e considerações finais.

1.4.1. Compostos com atividade antileishmanial

Ao longo desta seleção de compostos com atividade antileishmanial, foram agrupados de acordo com o núcleo estrutural dos compostos: cromenos, cumarinas, quinolinas, quinazolininas, indoles e piridinas. Analisaremos os derivados de cada grupo estrutural com base nos valores de IC_{50} , CC_{50} , SI e eventuais testes *in vivo*.

1.4.1.1. Derivados de Cromenos, Cumarinas e calconas

Combes et al. sintetizaram uma série 4-arilcumarinas usando o método de síntese de Suzuki-Miyaura. Dos derivados sintetizados, o composto **10** exibiu boa atividade contra a forma amastigota de *L. donovani* ($IC_{50} = 1,1 \mu M$). Atendendo ao CC_{50} , obtido em linhas celulares THP1 ($CC_{50} \geq 292 \mu M$), o índice de seletividade (SI) é de, pelo menos, 265 [21].

Foroumadi et al. descobriram derivados de 6-cloro-2H-cromeno capazes de inibir a forma promastigota de *L. major*. Desta série sintetizada, 2 novos compostos com grupos 2-clorofenil (**11**) e 2-bromofenil (**12**) mostraram-se os mais interessantes com IC_{50} de $1,22 \pm 0,31 \mu M$ e $1,33 \pm 0,52 \mu M$, respectivamente [22]. Shafiee et al. sintetizaram compostos semelhantes tendo identificado o composto **13** como o mais potente da série sintetizada ($IC_{50} = 0,7 \pm 0,3 \mu M$) [23].

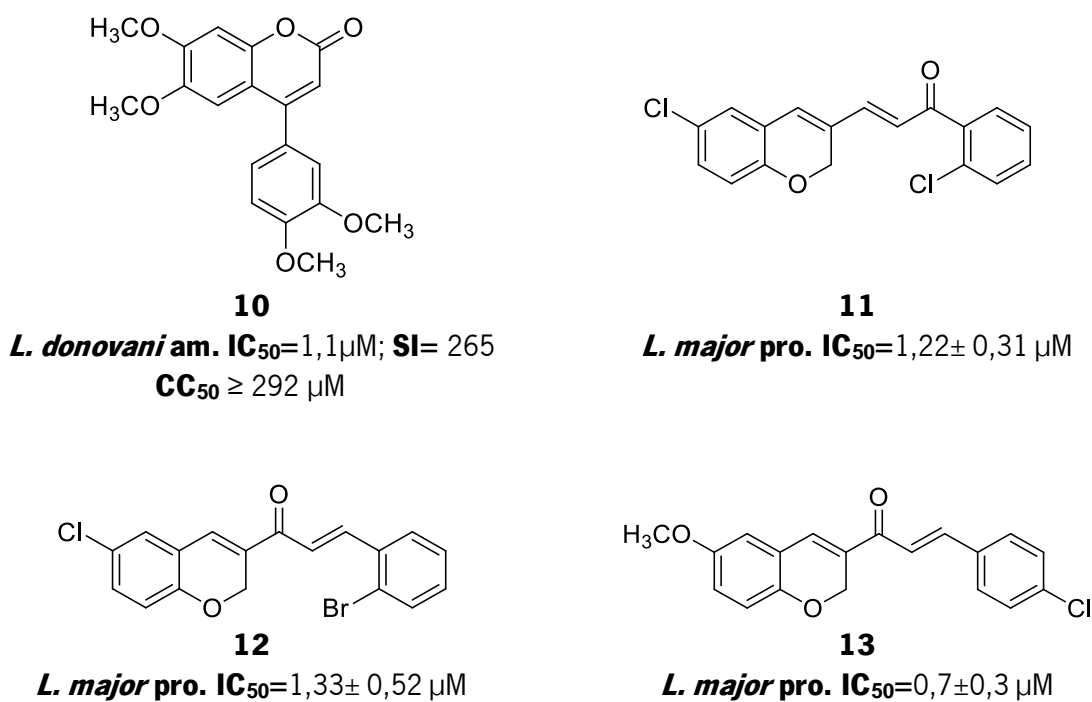
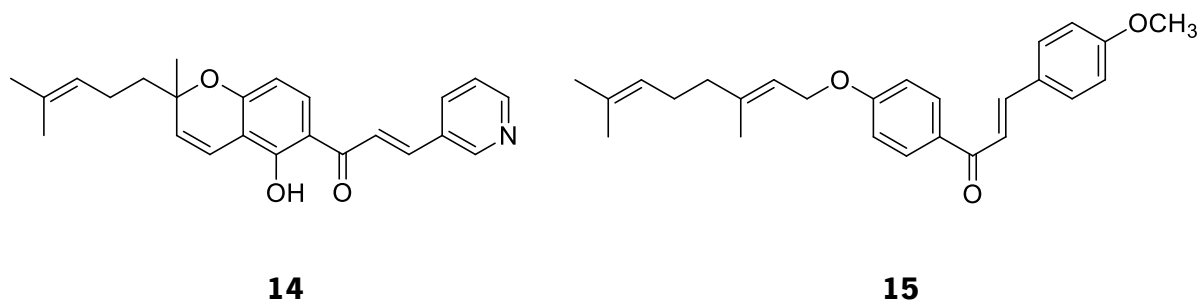


Figura 6 – Compostos ativos identificados por Combes et al., Foroumadi et al. e Shafiee et al.

Alguns derivados de cromeno e calcona, como os compostos **14** e **15**, também se mostraram ativos *in vivo*. Gupta et al. identificaram o composto **14** como ativo contra as formas promastigota e amastigota de *L. donovani* com $IC_{50} = 0,78$ e $5,4 \mu M$, respectivamente, e SI = 7,5. O mesmo composto **14** mostrou inibição do parasita *in vivo* superior a 87%, por administração oral de 100mg/Kg, por dia, ao final de 5 dias, em modelos “hamster” [24]. O composto **15** também foi reportado pelo mesmo autor com atividade *in vivo* inibindo 83,32 % dos parasitas a uma dose diária de 50mg/Kg, ao longo de 10 dias, no mesmo modelo biológico [25].



***L. donovani* pro.** IC₅₀= 0,78 μM; SI= 7,5

***L. donovani* am.** IC₅₀= 5,4 μM

***in vivo*:** Inibição parasitária superior a 87% a 100mg/Kg/dia ao longo de 5 dias

***in vivo*:** 83,32 % de inibição parasitária a 50mg/Kg/dia ao longo de 10 dias

Figura 7 - Compostos ativos identificados por Gupta et al.

1.4.1.2. Derivados de Quinolina

Dos derivados de quinolina, o mais conhecido atualmente, no tratamento contra leishmaniose visceral (LV) causada por *L. chagasi*, é sitamaquina (**16**), análogo WR6026 da primaquina (**17**). No entanto, em estudos clínicos de fase II, revelou falta de potência contra kala-azar brasileiro e um aumento de toxicidade que não estava reportada em estudos anteriores [26]. Recentemente a procura de análogos de **16** e **17** tem sido uma das abordagens mais apetecíveis no “design” de novos fármacos antileishmaniais [27].

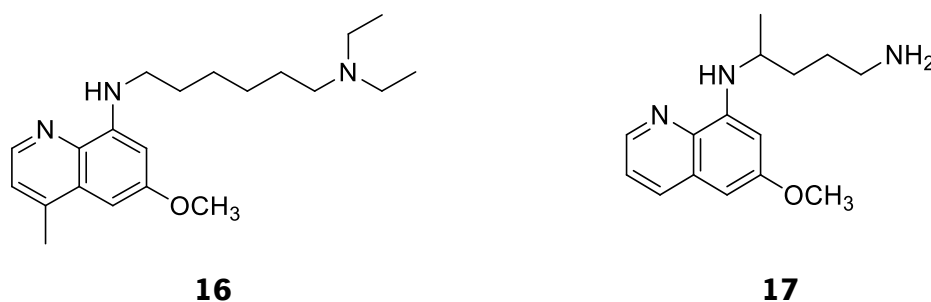


Figura 8 – Derivados de quinolina ativos

Estudos efetuados por Azas et al. identificaram nitroquinolinas com propriedades antileishmaniais. O composto 2-hidroxi-8-nitroquinolina (**18**) mostrou-se ativo contra as formas promastigota e amastigota de *L. donovani* e promastigota de *L. infantum* (IC₅₀= 6,6; 6,5; 7,6 μM, respetivamente) [28]. Silva et al. avaliaram a atividade de derivados 4-amino-7-cloroquinolina e descobriram o composto **19** ativo contra a forma promastigota de *L. infantum* com IC₅₀= 0,01 μM [29]. Neste estudo Silva et al. enfatizaram que a presença de uma amina livre era essencial para a atividade do composto.

De uma seleção de, cerca de, 150 compostos avaliados por Loiseau et al. surgiram 2 novos derivados de quinolina com atividade *in vitro* e *in vivo*. Os compostos **20** e **21** mostraram, na forma amastigota intracelular de *L. donovani* valores de $IC_{50}= 4,1$ e $IC_{50}= 1,2 \mu M$, respectivamente. Devido ao índice de seletividade de 122 apresentado pelo composto **21**, este foi selecionado como candidato para o estudo *in vivo* em modelo de “hamster” pela DNDi (Drugs for Neglected Diseases initiative) [30]. A DNDi também reportou, em conjunto com Gupta et al., a descoberta do composto **22** com atividade *in vitro* contra amastigotas de *L. donovani* ($IC_{50}= 0,22 \pm 0,06 \mu M$; $SI=187,5$) e ainda eficácia *in vivo* com inibição parasitária de $84.26 \pm 4.44\%$ [31]. Este estudo foi expandido de maneira a obter novos análogos de **22**, mais ativos contra a forma intracelular do parasita, sendo que o análogo mais potente, com $IC_{50}= 0,17 \mu M$, foi o composto **23** [32].

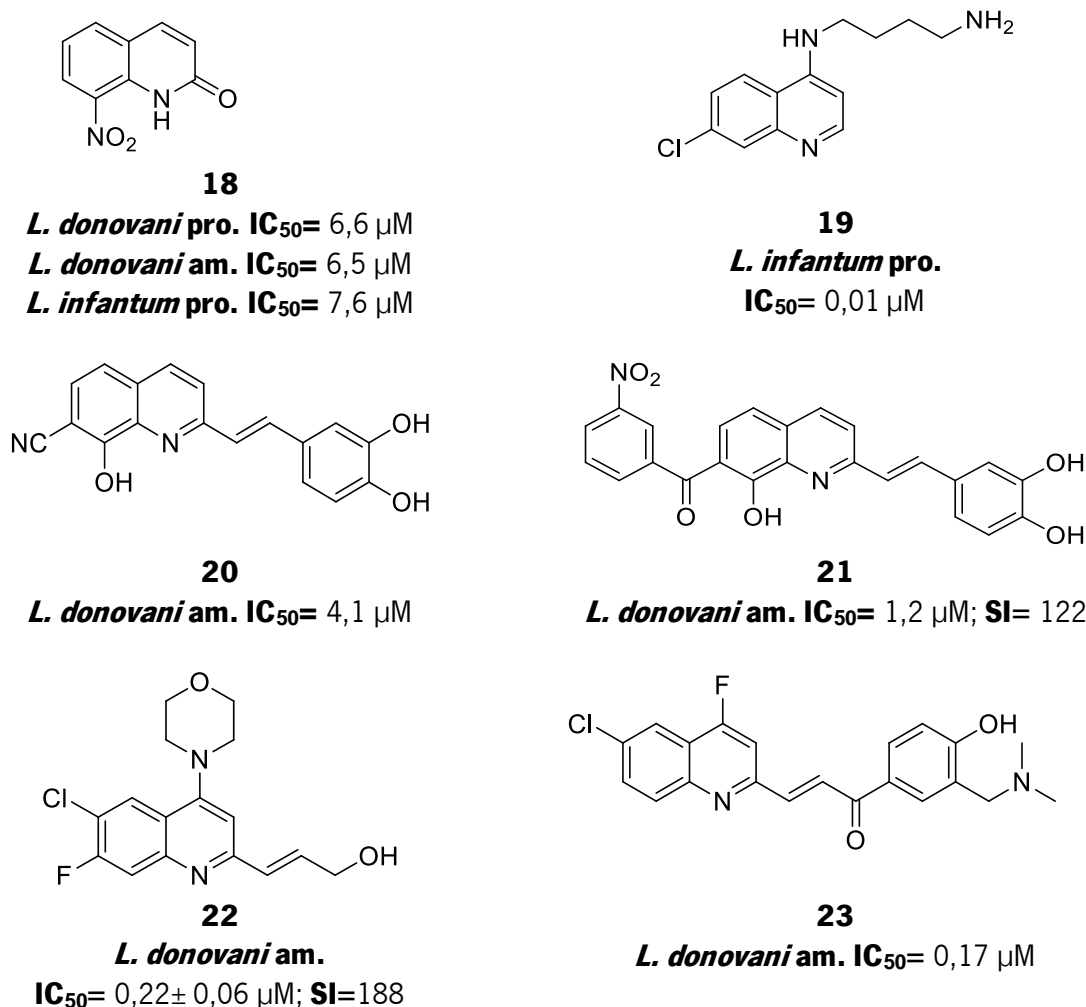


Figura 9 - Compostos ativos identificados por Azas et al. Silva e et al. Gupta et al.

1.4.1.3. Derivados de Quinazolina

Sahu et al. reportaram a síntese de uma nova classe de 4-(hetero)aril-2-piperazinoquinazolininas cuja

atividade foi determinada *in vitro* contra promastigotas de *L. donovani*. De entre os compostos testados, realçou-se o composto **24**, cuja atividade foi avaliada contra amastigotas de *L. donovani*, que mostrou ser o mais ativo e menos tóxico ($IC_{50}= 3,16 \mu\text{M}$, $CC_{50}= 25,38 \mu\text{M}$, $SI= 8,03$) [33]. Berma et al. também reportaram resultados interessantes quando avaliaram 2,4-diaminoquinazolininas contra a forma amastigota de *L. major*. Identificaram o composto **25** como sendo o mais potente, com $IC_{50}= 0,00365 \mu\text{M}$, $CC_{50}= 1,52 \mu\text{M}$ e $SI= 416$. Acrescentaram ainda que a amina terciária presente na estrutura é importante para a atividade [34].

Dos derivados de quinazolina encontrados, nenhum se aproximou da potência do composto **26**. Este foi descoberto por Bhattacharjee et al. e mostrou-se dos mais ativos contra a forma amastigota de *L. donovani* com $IC_{50}= 0,13 \text{ nM}$ [15]. O problema associado a este derivado é a concentração à qual o mesmo é tóxico para linhas celulares J774 e NG-108-15. O melhor valor de CC_{50} obtido nestas linhas celulares ronda $0,88 \text{ nM}$. Isto sugere um índice de seletividade de apenas 69, que torna o composto **26** pouco desejável como “lead” [35]. No entanto, a informação obtida neste estudo pode desencadear a síntese de análogos que permitam manter a potência e diminuir a toxicidade.

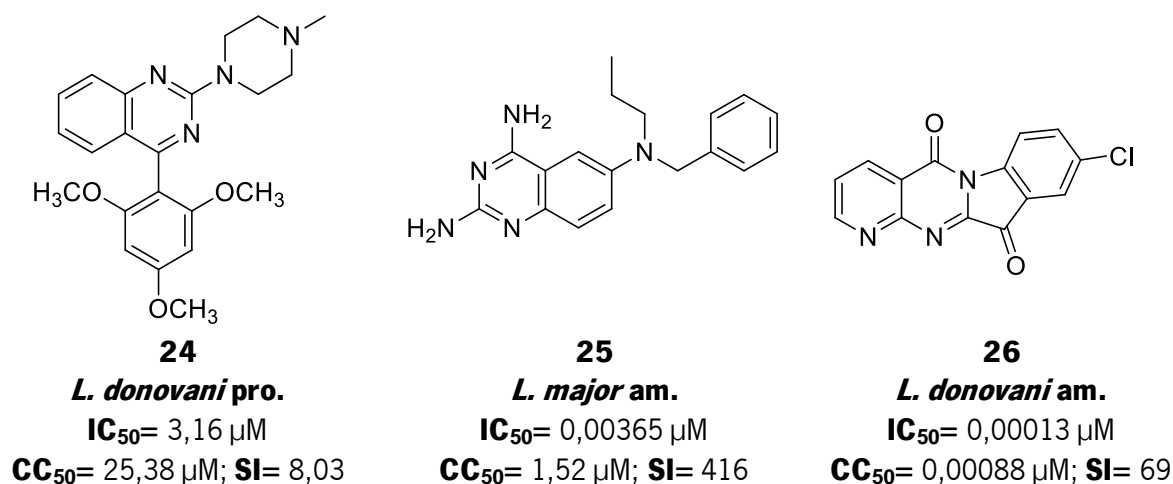
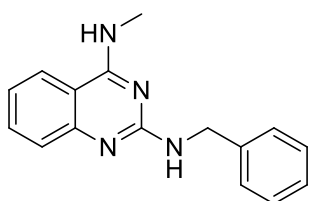


Figura 10 - Compostos ativos identificados por Sahu et al. e Berma et al. Bhattacharjee et al.

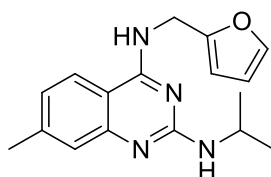
Manetsch et al. avaliaram a atividade biológica de derivados de 2,4-diaminoquinazolininas *in vitro* e descobriram que o composto **27** era o mais potente contra amastigotas intracelulares de *L. donovani* e *L. amazonensis* ($IC_{50}= 0,15 \pm 0,02 \mu\text{M}$ e $0,90 \pm 0,27 \mu\text{M}$, respetivamente). No entanto o derivado **27** não produziu quaisquer resultados de interesse *in vivo* usando o modelo murino de Leishmaniose visceral. Destaca-se o composto **28** que, apesar de ser menos potente *in vitro* contra *L. donovani* e *L. amazonensis* ($IC_{50}= 0,83 \pm 0,32$ e $4,1 \pm 1,2 \mu\text{M}$), conseguiu inibir 37% dos parasitas *in vivo*, quando administrado 15mg/Kg/dia intraperitonealmente, ao longo de 5 dias [36]. Recentemente, Mary Ann McDowell et al. testaram vários derivados de quinazolina contra amastigotas axénicos e intracelulares de

L. donovani e levaram a cabo estudos SAR. Destacaram-se os compostos **29-34** que mostraram melhor atividade em amastigotas axénicas ($IC_{50} < 3 \mu M$). No entanto, somente os compostos **30-34** tiveram atividade significativa em amastigotas intracelulares ($IC_{50} < 3 \mu M$). Destes, o único composto que mostrou atividade significativa *in vivo* foi o derivado **30** [37].



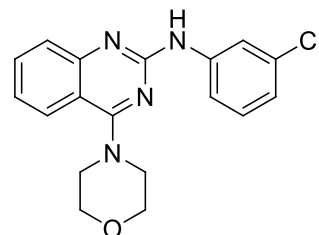
27

L. donovani am.
 $IC_{50} = 0,15 \pm 0,02 \mu M$
L. amazonensis am.
 $IC_{50} = 0,90 \pm 0,27 \mu M$



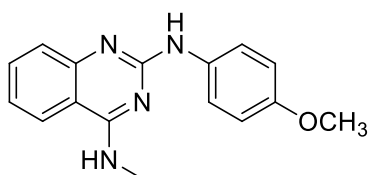
28

L. donovani am.
 $IC_{50} = 0,83 \pm 0,32 \mu M$; **SI** > 40
L. amazonensis am.
 $IC_{50} = 4,1 \pm 1,2 \mu M$; **SI** > 8
CC₅₀ > 33 μM



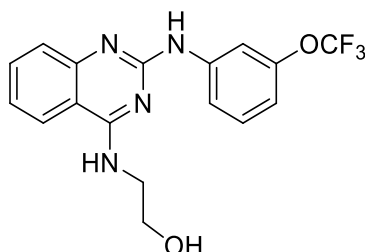
29

L. donovani am.*
 $IC_{50} = 1,97 \mu M$; **SI** = 37,36
CC₅₀ = 73,60 μM



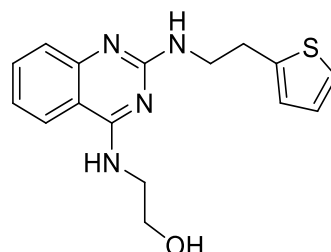
30

L. donovani am.*
 $IC_{50} = 2,32 \mu M$; **SI** = 4,27
L. donovani am.
 $IC_{50} = 0,54 \mu M$; **SI** = 18,37
CC₅₀ = 9,92 μM



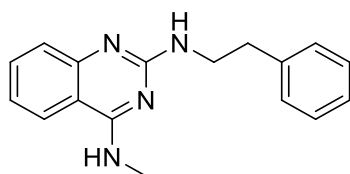
31

L. donovani am.*
 $IC_{50} = 1,38 \mu M$; **SI** = 4,36
L. donovani am.
 $IC_{50} = 2,85 \mu M$; **SI** = 2,11
CC₅₀ = 6,01 μM



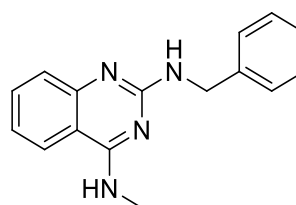
32

L. donovani am.*
 $IC_{50} = 1,43 \mu M$; **SI** = 1,35
L. donovani am.
 $IC_{50} = 1,50 \mu M$; **SI** = 1,39
CC₅₀ = 1,93 μM



33

L. donovani am.* $IC_{50} = 0,37 \mu M$; **SI** = 8,3
L. donovani am. $IC_{50} = 0,68 \mu M$; **SI** = 4,53
CC₅₀ = 3,08 μM



34

L. donovani am.* $IC_{50} = 1,45 \mu M$; **SI** = 5,85
L. donovani am. $IC_{50} = 0,57 \mu M$; **SI** = 14,89
CC₅₀ = 8,49 μM

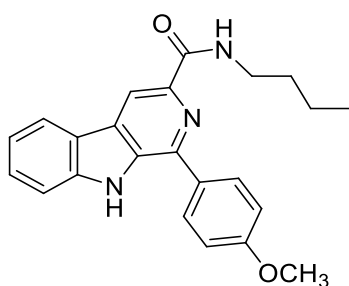
Figura 11 - Compostos ativos identificados por Manetsch et al. e McDowell et al.;

*Forma amastigota axénica ou extracelular.

1.4.1.4. Outros compostos

Sarragiotto et al. descobriram um derivado de indole extremamente promissor para o tratamento de leishmaniose. Este composto, **35** mostrou-se muito ativo contra a forma promastigota de *L. amazonensis* ($IC_{50} = 0,25 \pm 0,07 \mu M$). Porém a sua característica mais atraente é o seu índice de seletividade de 2084, fruto de um valor de CC_{50} em THP1 de $521 \pm 6,36 \mu M$ [38]. Em 2009 Agarwal et al. testaram uma série de novos compostos tricíclicos, contendo o núcleo de quinazolina, e o composto **36**, possuidor do substituinte 2-piperazinopiridina, destacou-se ao apresentar inibição de cerca de 100% de promastigotas de *L. donovani* a $2,19 \mu M$. O estudo foi aprofundado, tendo-se obtido um valor de IC_{50} de $0,58 \mu M$ para a forma amastigota de *L. donovani* [39].

Algumas hidrazonas revelaram-se também interessantes como agentes antileishmaniais. Taha et al. identificaram o composto **37** que apresentou $IC_{50} = 1,95 \pm 0,04 \mu M$ em promastigotas de *Leishmania* (espécie não referida). Os autores destacaram ainda que o grupo metoxilo na posição *para* do anel aromático é essencial para a atividade [40]. Rando et al. reportaram atividade para estruturas semelhantes. O composto **38** mostrou ser o mais ativo, dos vários compostos testados em promastigotas de *L. donovani*. Os autores atribuíram a atividade à presença do grupo nitrotiofeno e à presença de dois átomos de cloro presentes no anel aromático ($IC_{50} = 0,41 \mu M$) [41].

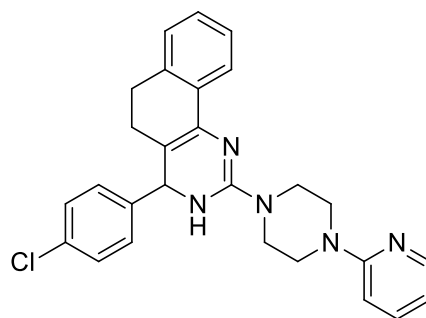


35

L. amazonensis pro.

$IC_{50} = 0,25 \pm 0,07 \mu M$; $SI = 2084$

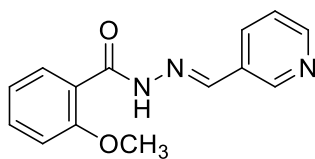
$CC_{50} = 521 \pm 6,36 \mu M$



36

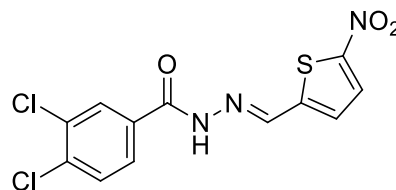
L. donovani pro. $IC_{90} = 2,19 \mu M$

L. donovani am. $IC_{50} = 0,58 \mu M$



37

$IC_{50} = 1,95 \pm 0,04 \mu M$



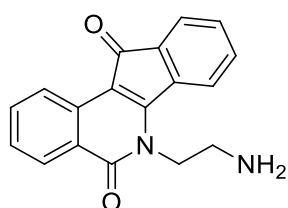
38

$IC_{50} = 0,41 \mu M$

Figura 12 - Compostos ativos identificados por Sarragiotto et al., Taha et al. e Rando et al.

Recentemente, Yolanda et al. testaram a atividade de novas estruturas tetracíclicas contendo o núcleo de quinolina, e descobriram os compostos **39** e **40** que mostraram atividade em promastigotas e amastigotas de *L. infantum*. Apesar da elevada atividade, o baixo valor de CC_{50} confere-lhes um SI abaixo de 30 [42].

O composto **41**, reportado por Gupta et al., é um derivado de pirimidina que apresenta elevada atividade em *L. donovani* amastigotas ($IC_{50}=2,0\pm 0,1 \mu M$) e baixa toxicidade em células Vero ($CC_{50}=375,9\pm 5,1 \mu M$) o que lhe confere um índice de seletividade de 188 [23]. *In vivo* este composto mostrou 88,4% de inibição parasitária por administração de 50mg/Kg/dia durante 5 dias [43].



39

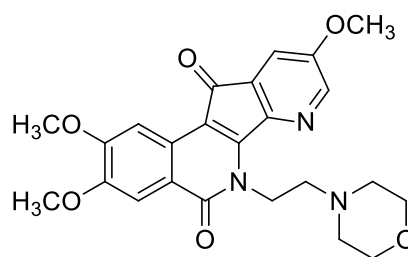
L. infantum pro.

$IC_{50}= 0,94\pm 0,03 \mu M$; **SI**= 1,17

L. infantum am.

$IC_{50}= 0,04\pm 0,09 \mu M$; **SI**= 24,4

$CC_{50}= 1,10\pm 0,06 \mu M$



40

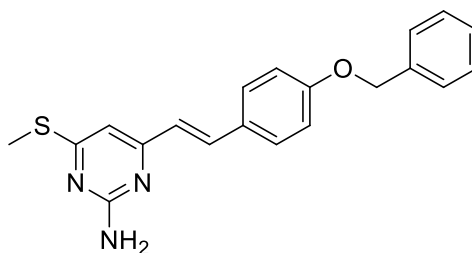
L. infantum pro.

$IC_{50}= 0,53\pm 0,07 \mu M$; **SI**= 7,19

L. infantum am.

$IC_{50}= 0,13\pm 0,01 \mu M$; **SI**= 29,3

$CC_{50}= 3,81\pm 0,51 \mu M$



41

L. donovani am. $IC_{50}= 2,0\pm 0,1 \mu M$; **SI**= 188

$CC_{50}= 375,9\pm 5,1 \mu M$

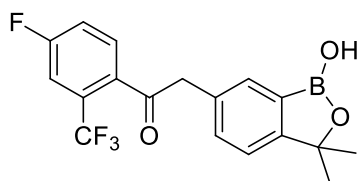
In vivo: 88,4% de inibição parasitária 50mg/Kg/dia durante 5 dias

Figura 13 - Compostos ativos identificados por Yolanda et al. e Gupta et al.

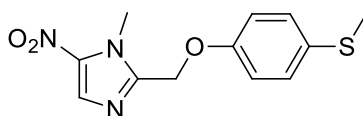
1.4.2. Compostos com atividade antitripanosomial

Atualmente, na procura de novos fármacos antitripanosomiais, foram identificados dois núcleos de interesse (Oxaborazoles e nitroimidazoles). Dentro destes, realçam-se três compostos que se encontram neste momento em estudos de fase clínica: Acoziborole (SCYX-7158 **42**), fexinidazole (**43**) e fexinidazole

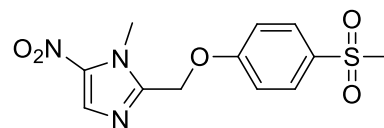
sulfona (**44**) [44].



42
Acoziborole (SCYX-7158)
T. b. brucei **427**
 $IC_{50} = 0,29 \pm 0,019 \mu\text{g/ml}$;
SI=172
 $CC_{50} > 50 \mu\text{g/ml}$



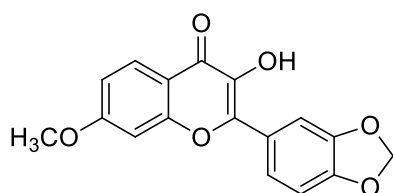
43
Fexinidazole
T. b. brucei **BS221**
 $IC_{50} = 2,38 \pm 0,88 \mu\text{M}$
T. b. rhodesiense **STIB900**
 $IC_{50} = 2,17 \pm 0,29 \mu\text{M}$
T. b. gambiense **STIB930**
 $IC_{50} = 1,84 \pm 1,1 \mu\text{M}$



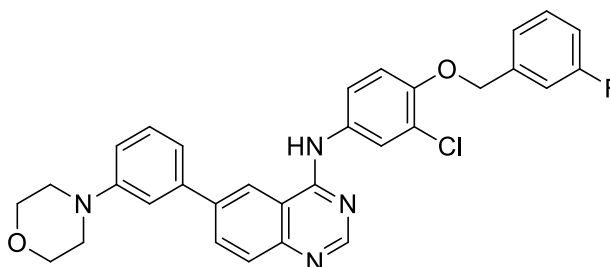
44
Fexinidazole sulfona
T. b. brucei
 $IC_{50} = 1.63 \pm 0.92 \mu\text{M}$
T. b. rhodesiense
STIB900
 $IC_{50} = 1.44 \pm 0.22 \mu\text{M}$
T. b. gambiense **STIB930**
 $IC_{50} = 0.91 \pm 0.27 \mu\text{M}$

Figura 14 – Compostos antitripanosomiais em estudo de fase clínica

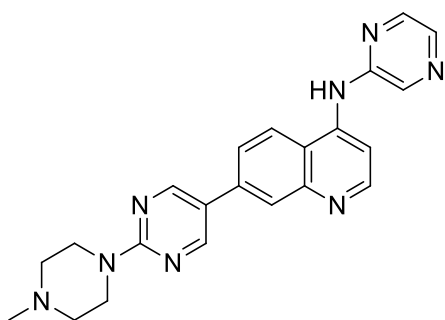
Contudo, recentemente, surgiram novos estudos nos quais se reportou atividade antitripanossomial em compostos com estruturas policíclicas. Costi et al. testaram a atividade de derivados de cromeno contra *T. brucei*. O derivado **45**, mostrou ser o mais interessante devido ao seu SI elevado (250) [45]. Pollastri et al. iniciaram os seus estudos testando a atividade biológica de tienopirimidinas e descobriram os compostos **46** e **47** como novos “scaffolds”, análogos do lapatinib **48**, para o design de novos fármacos antitripanosomiais. O derivado **46** mostrou elevada atividade contra *T. b. brucei* ($IC_{50} = 0,042 \mu\text{M}$) e um valor de CC_{50} superior a $35 \mu\text{M}$. O lapatinib **48** mostrou também atividade contra *T. b. brucei* com $IC_{50} = 1,54 \mu\text{M}$, $CC_{50} > 35 \mu\text{M}$ e $SI > 22,7$ [46,47].



45
T. brucei
 $IC_{50} = 0,4 \pm 0,1 \mu\text{M}$, **SI= 250**
 $CC_{50} > 100 \mu\text{M}$

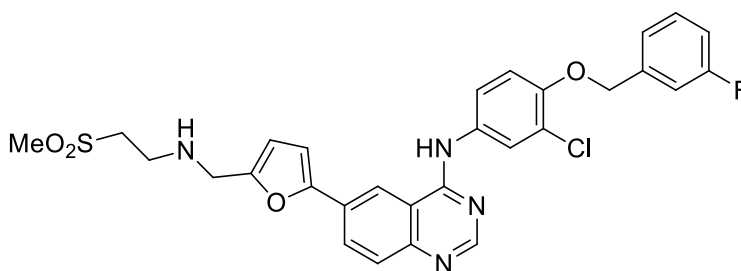


46
T. b. brucei $IC_{50} = 0,042 \mu\text{M}$, **SI > 833**
 $CC_{50} > 35 \mu\text{M}$



47

T. b. brucei IC₅₀ = 0,043 μM



48 (Lapatinib)

T. b. brucei IC₅₀ = 1,54 μM, SI > 22,7

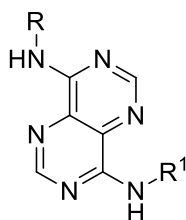
CC₅₀ > 35 μM

Figura 15 – Compostos ativos identificados por Costi et al. e Pollastri et al.

1.4.3. Considerações finais

Em suma, a análise da literatura permitiu identificar compostos com atividade anti-*Leishmania*, onde a presença de núcleos bicíclicos de seis membros é recorrente. Estes núcleos, encontram-se associados a grupos aromáticos substituídos por halogénios, hidroxilos e metoxilos. A posição destes substituintes varia consideravelmente, contudo as posições *meta* e *para* são as mais usadas e parecem ser as mais favoráveis à atividade. No que toca aos derivados antitripanosomiais, dos que foram mencionados, destaco os oxaborazoles e nitroimidazoles por se encontrarem já em estudos de fase clínica.

Recentemente, no nosso grupo de investigação, provou-se o interesse do núcleo de pirimidopirimidina como um potencial ponto de partida para design de novos fármacos antileishmaniais e antitripanosomiais uma vez que foram identificados alguns compostos com atividade elevada quer em *L. infantum* quer em *T. brucei* e, que simultaneamente, apresentaram toxicidade muito reduzida em macrófagos da linha celular THP1 [62]. Os compostos mostraram, contudo, baixa solubilidade em meio aquoso.



“Hit” 49

Figura 16 – Estrutura do “hit” descoberto pelo grupo de investigação

2. Objetivos

Com este trabalho, pretende-se otimizar o composto “Hit” anteriormente identificado, sintetizando novos compostos ativos e não tóxicos contra as diversas formas de *L. infantum* e *T. brucei*. Os novos compostos terão como base o núcleo de pirimidopirimidina e deverão ter características estruturais que lhes confirmem solubilidade adequada para serem testados, futuramente, *in vivo*. No âmbito deste projeto, a avaliação da atividade biológica dos compostos será efetuada em formas promastigotas e amastigotas de *L. infantum*, formas sanguíneas de *T. brucei* e a toxicidade será determinada usando macrófagos da linha celular THP1.

A metodologia a seguir para a otimização da estrutura do composto “hit” está representada na figura seguinte (Fig. 17). Atendendo a que os resultados anteriores mostraram que a atividade dos compostos dependia dos grupos substituintes presentes em torno do heterociclo, a otimização vai ser efetuada alterando esses grupos substituintes. Inicialmente será sintetizado um conjunto de compostos que serão testados. A análise SAR deverá permitir identificar o padrão de substituição e os substituintes mais interessantes para potenciarem a atividade, a solubilidade e simultaneamente reduzirem a toxicidade. Após esta análise seguir-se-á a síntese de novos compostos e um segundo rastreio. Espera-se que a segunda análise SAR permita identificar um composto “lead” para estudos *in vivo*.

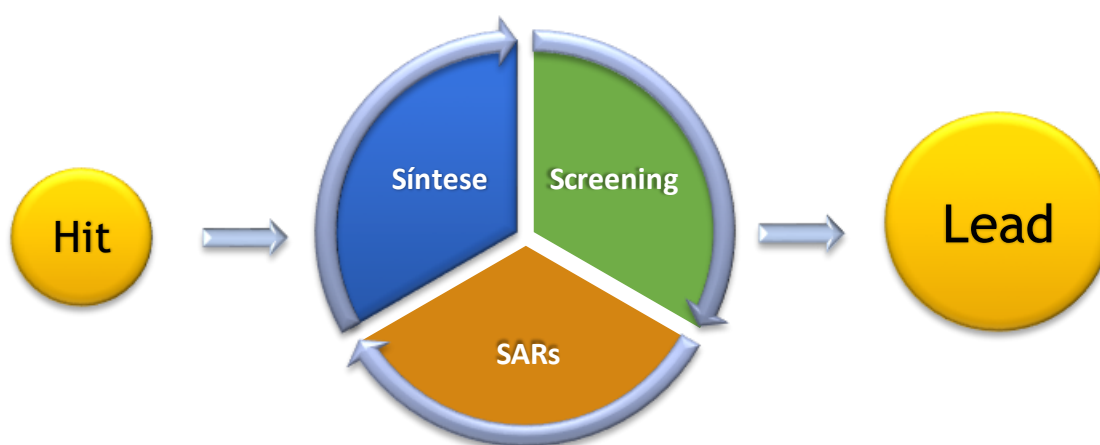
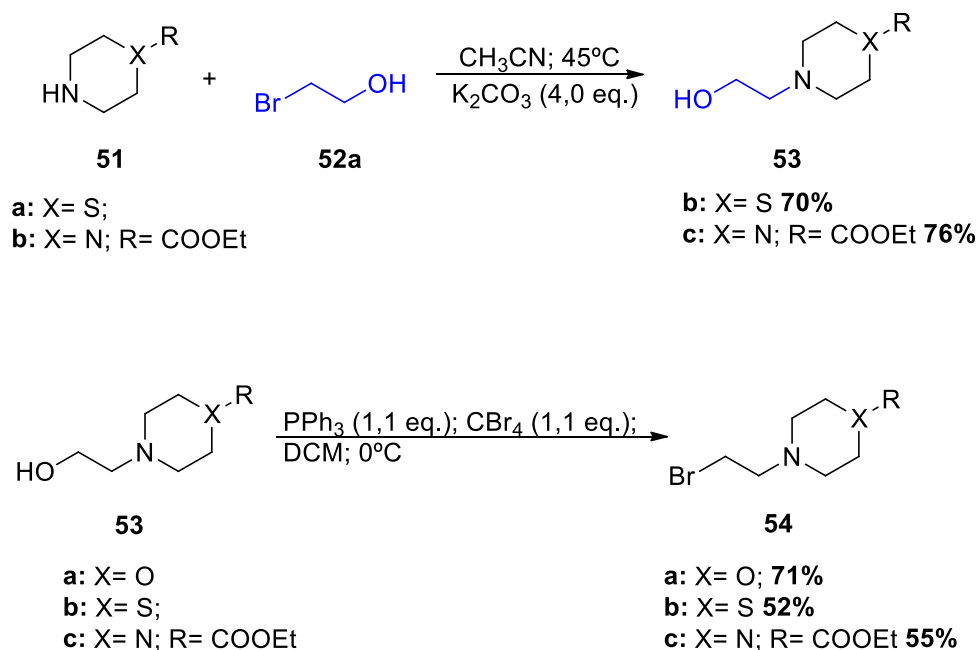


Figura 17 – Metodologia de otimização “hit to lead”

3. Discussão
 - 3.1. Síntese química
 - 3.1.1. Síntese e caracterização de reagentes de partida
 - 3.1.1.1. Síntese de agentes alquilantes **54**

Os agentes alquilantes **54** foram sintetizados a partir de álcoois primários **53** pelo método de Appel [48 e 49]. O álcool **53a** foi obtido comercialmente, ao passo que os restantes, **53b** e **53c**, foram sintetizados.

Os compostos **53b-c** estão disponíveis comercialmente, a preços elevados, e encontram-se reportados na literatura [50 e 51]. Estes, são sintetizados a partir de precursores não cíclicos como a dietanolamina (método de síntese não especificado) [50 e 51]. Todavia, e considerando os reagentes disponíveis no laboratório, os álcoois **53b-c** foram sintetizados a partir das aminas secundárias cíclicas **51** e do correspondente álcool halogenado **52a**.



Esquema 1 – Síntese de novos agentes alquilantes **54** por método de Appel

Os derivados **53b-c** foram obtidos puros e com bons rendimentos ao fim de 18h, por tratamento de **51a-b** com 2 equivalentes de bromoetanol, **52a**, e 4 equivalentes K_2CO_3 em CH_3CN a 45°C , em sistema fechado (Esq. 1). Estes compostos já se encontram publicados na literatura [50 e 51] contudo não se conseguiu encontrar a sua caracterização espectroscópica. Por essa razão **53b,c** foram caracterizados por ^1H e ^{13}C RMN.

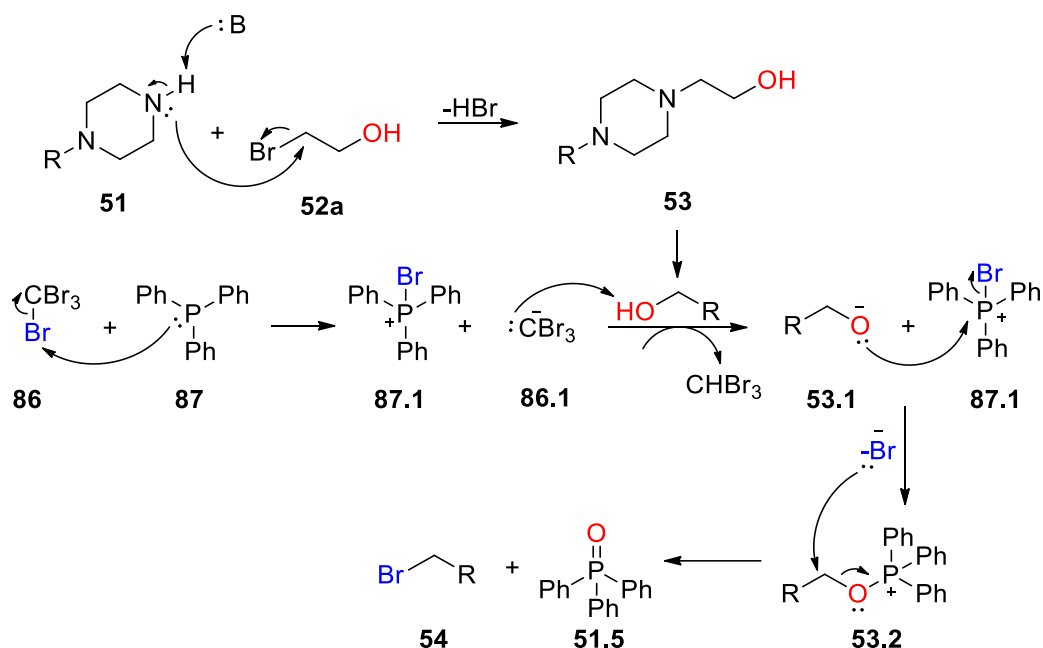
As condições de reação para gerar os produtos **54** foram estabelecidas usando inicialmente o

reagente comercial **53a**. O álcool **53a**, em DCM, a 0°C, foi tratado com um ligeiro excesso de trifetilfosfina (PPh₃) e tetrabromometano (CBr₄). A reação estava terminada após 2h, de acordo com o TLC, pelo que o solvente foi removido, até se formar um óleo. Após adição de n-hexano ao óleo precipitou óxido de trifetilfosfina, (POPh₃), que se eliminou por filtração. A posterior eliminação do solvente deu origem a um óleo que mostrou ser constituído pelo composto **54a**, PPh₃ e bromofórmio (CHBr₃), numa proporção (7:1:2). A reação foi repetida nas mesmas condições, mas a eliminação do óxido de trifetilfosfina só foi efetuada após arrefecimento da solução a 5°C durante 17h. O composto **54a** foi obtido, com bom rendimento (71%), juntamente com CHBr₃ numa proporção (6:4).

O procedimento foi aplicado aos restantes derivados **53b-c** obtendo-se os respetivos produtos **54b-c** com rendimentos moderados, ≈50%. Os baixos rendimentos obtidos podem ser consequência da perda de produto durante a eliminação do solvente da reação ou devido à baixa solubilidade dos produtos **54** em n-hexano. Para contornar o problema pode-se aumentar o volume de n-hexano usado. Desta forma, obter-se-á uma maior quantidade de produto desejado **54**. É necessário assinalar que os haletos **54** mostraram-se bastante sensíveis à humidade do ar, degradando com facilidade, e consequentemente regenerando o respetivo álcool **53**. Contudo, verificou-se que estes, quando em solução de CHBr₃, aparentavam ser estáveis por mais tempo e por esse motivo foram usados diretamente nas sínteses seguintes como soluções de CHBr₃. Os novos compostos **54a-c** foram caracterizados por ¹H e ¹³C RMN (Tab 1 e 2).

3.1.1.1.1. Mecanismo reacional

A reação de halogenação (reação de Appel) tem início quando um átomo de bromo do CBr₄ **86** é atacado nucleofílicamente pelo átomo de fósforo da PPh₃ **87**. Este ataque gera um carbanião **86.1** altamente instável e uma espécie de fosfónio **87.1**. O carbanião **86.1**, desprotona o álcool primário **53**, gerando bromofórmio como subproduto e um ião alcóxido **53.1**. Este ataca nucleofílicamente o ião fosfónio **87.1** provocando uma substituição nucleofílica do átomo de bromo formando o intermediário **53.2**. Deste ataque liberta-se Br⁻ que ataca rapidamente o carbono alfa, gerando o subproduto PPh₃ **51.5** e o haleto de alquila **54** (Esq. 2).



Esquema 2 – Mecanismo da reação de síntese dos haletos de alquilo por reação de Appel

3.1.1.1.2. Caracterização física, analítica e espectroscópica (^1H e ^{13}C RMN) dos compostos **53** e **54**

Apesar de os haletos **54** se mostrarem sensíveis à humidade foi possível caracterizá-los por ^1H RMN e ^{13}C RMN, em solução de clorofórmio. Os dados físicos (Tab. 1) indicam que todos os compostos **53** são líquidos à t.a. O p.f. dos derivados **54** não foi determinado uma vez que estes foram isolados como soluções de bromofórmio. Na tabela apresentam-se também os valores analíticos previstos para os compostos, uma vez que durante o período regular não foi possível obter os valores experimentais.

Tabela 1 - Dados físicos e analíticos dos compostos 53 e 54				$\text{HO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{R}$ 53		$\text{Br}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{R}$ 54	
R	N^o	η (%)	P.f. (°C)	Fórmula Molecular	Massa molar	C; H; N; S % Esperado* (obtido)	
	53b	70	< -20	$\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NOS}$	147,24	48,94; 8,90; 9,51; 21,78	
	53c	76	< -20	$\text{C}_9\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_3$	202,25	59,68; 9,52; 6,96;	
	54a	71	N.d.	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{BrNO}$	194,07	37,13; 6,23; 7,22;	
	54b	52	N.d.	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{BrNS}$	210,14	34,29; 5,76; 6,67; 15,26	

	54c	55	N.d.	C ₉ H ₁₇ BrN ₂ O ₂	265,15	45,47; 6,87; 5,30;
--	------------	----	------	--	--------	--------------------

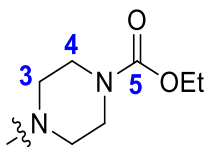
N.d. – Não determinado; *Valores retirados do ChemDraw Ultra (12.0.2.1076)

¹H RMN

Por análise dos espectros de ¹H RMN (Tab 2) foi possível comprovar as estruturas **53**. Os prótons **H1** e **H2**, do grupo etanol surgem a valores característicos de $\delta \approx 3,6$ e $2,6$ ppm, respetivamente. Realça-se ainda que o sinal dos prótons **H4** surge a desvio químico variável, dependendo do átomo/grupo adjacente. Este quando adjacente a um carbamato (**53c**) surge a $\delta = 3,48$ ppm, ao passo que no derivado **53b** encontra-se mais protegido surgindo a $\delta = 2,8$ ppm.

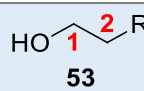
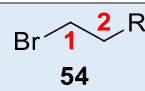
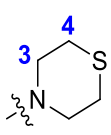
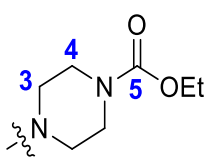
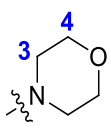
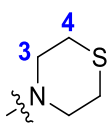
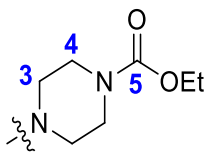
A estrutura dos derivados **54** foi confirmada, principalmente pelo efeito da transformação do grupo funcional sobre o desvio químico a que surge o sinal dos prótons **H1**. Não se verificou nenhuma alteração significativa nos restantes sinais em relação aos correspondentes precursores **53**. Os prótons **H1**, dos haletos **54**, surgem como tripletos ($J = 7,2$ Hz) a valores de $\delta = 3,4$ - $3,5$ ppm, ao passo que os mesmos, nos álcoois **53**, surgem como tripletos ($J = 5,2$ Hz) a valores de δ superiores ($\approx 3,6$ Hz).

Tabela 2 – Dados espectroscópicos de ¹ H RMN (400 MHz, CDCl ₃) dos compostos 53 e 54			
R	Nº	H1/H2	R
	53b	3,61 (t, 2H, J= 5,2 Hz, H1) 2,57 (t, 2H, J= 5,2 Hz, H2)	2,80 (t, 4H, J= 4,8 Hz, H3) 2,70 (t, 4H, J= 4,8 Hz, H4)
	53c	3,63 (t, 2H, J= 5,2 Hz, H1) 2,55 (t, 2H, J= 5,2 Hz, H2)	4,12 (q, 2H, J= 7,2 Hz, OEt) 3,48 (t, 4H, J= 4,8 Hz, H4) 2,47 (t, 4H, J= 4,8 Hz, H3) 1,25 (t, 3H, J= 7,2 Hz, OEt)
	54a	3,55 (t, 2H, J= 7,2 Hz, H1) 2,95 (m, 2H, H2)	3,84 (t, 4H, J= 4,4 Hz, H4) 2,72 (m, 4H, H3)
	54b	3,41 (t, 2H, J= 7,2 Hz, H1) 2,82 (m, 2H, H2)	2,82 (m, 4H, H3) 2,69 (t, 4H, J= 4,4 Hz, H4)

	<p>54c</p> <p>3,51 (t, 2H, J= 7,2 Hz, H1) 2,55 (sl, 2H, H2)</p>	<p>4,14 (q, 2H, J= 7,2 Hz, OEt) 3,58 (sl, 4H, H4) 2,60 (sl, 4H, H3) 1,27 (t, 3H, J= 7,2 Hz, OEt)</p>
---	--	--

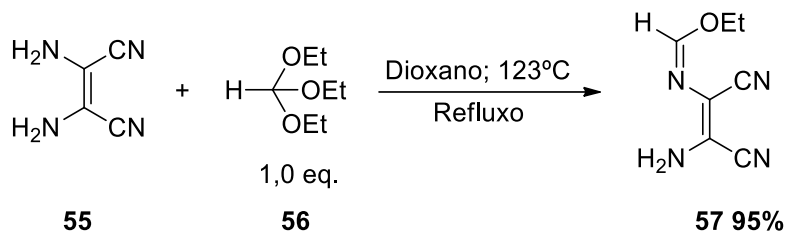
¹³C RMN

A análise dos dados de ¹³C RMN (Tab. 3) ajudou a comprovar a estrutura dos compostos **53** e **54**. O número de sinais registado para cada composto estava de acordo com o número de sinais esperados. A comparação dos valores de δ de **C1** dos derivados **53** e **54** também foi essencial para provar a existência de um álcool ou um halogénio ligado a **C1**. Nos álcoois **53**, **C1** surge a δ entre 57 e 58 ppm, contudo nos haletos **54** o mesmo surgia a $\delta \approx 27$ ppm. Os restantes sinais de carbono dos derivados **54** não variaram significativamente em relação aos precursores **53**.

Tabela 3 – Dados espectroscópicos de ¹³ CRMN (100 MHz, CDCl ₃) de compostos 53 e 54		 53	 54
R	Nº	C1/C2	R
	53b	59,97 (CH ₂ , C2) 57,44 (CH ₂ , C1)	54,86 (CH ₂ , C3) 27,90 (CH ₂ , C4)
	53c	59,39 (CH ₂ , C2) 57,71 (CH ₂ , C1)	155,4 (C5) 61,33 (CH ₂ , OEt) 52,59 (CH ₂ , C3) 43,57 (CH ₂ , C4) 14,58 (CH ₃ , OEt)
	54a	59,74 (CH ₂ , C2) 26,69 (s, CH ₂ , C1)	65,92 (CH ₂ , C4) 53,08 (CH ₂ , C3)
	54b	60,28 (CH ₂ , C2) 27,36 (CH ₂ , C1)	54,68 (CH ₂ , C3) 27,36 (CH ₂ , C4)
	54c	59,41 (CH ₂ , C2) 26,85 (CH ₂ , C1)	155,2 (C5) 61,64 (CH ₂ , OEt) 52,70 (CH ₂ , C3) 42,76 (CH ₂ , C4) 14,61 (CH ₃ , OEt)

3.1.1.2. Síntese de imidato **57**

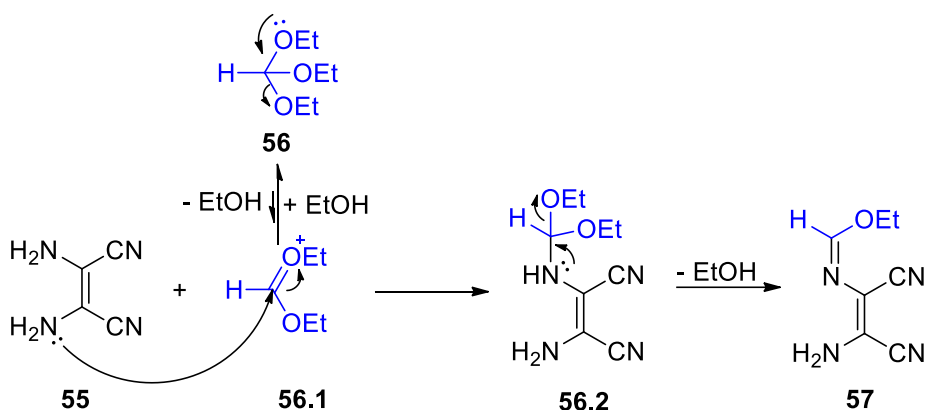
O imidato **57** foi obtido pela reação entre o diaminomaleonitrilo **55** (DAMN) e o ortoformiato de trietilo **56** (TEOF) sob condições de refluxo por um procedimento já reportado e otimizado [52]. Neste, o balão com a mistura reacional encontra-se acoplado a um sistema de destilação, para remoção gradual de EtOH da mistura reacional. O imidato **57** foi obtido puro e com excelente rendimento (Esq. 3).



Esquema 3 – Síntese de imidato **57**

3.1.1.2.1. Mecanismo reacional

A proposta mecanística da síntese do imidato já se encontra reportada [52]. Nesta proposta, refere-se que a amina primária do DAMN **55** ataca nucleoficamente o carbono da espécie acetal ativada **56.1**, que se encontra em equilíbrio com **56** (TEOF). Este ataque gera a estrutura **56.2** que evolui para **57** por saída de EtOH (Esq. 4).

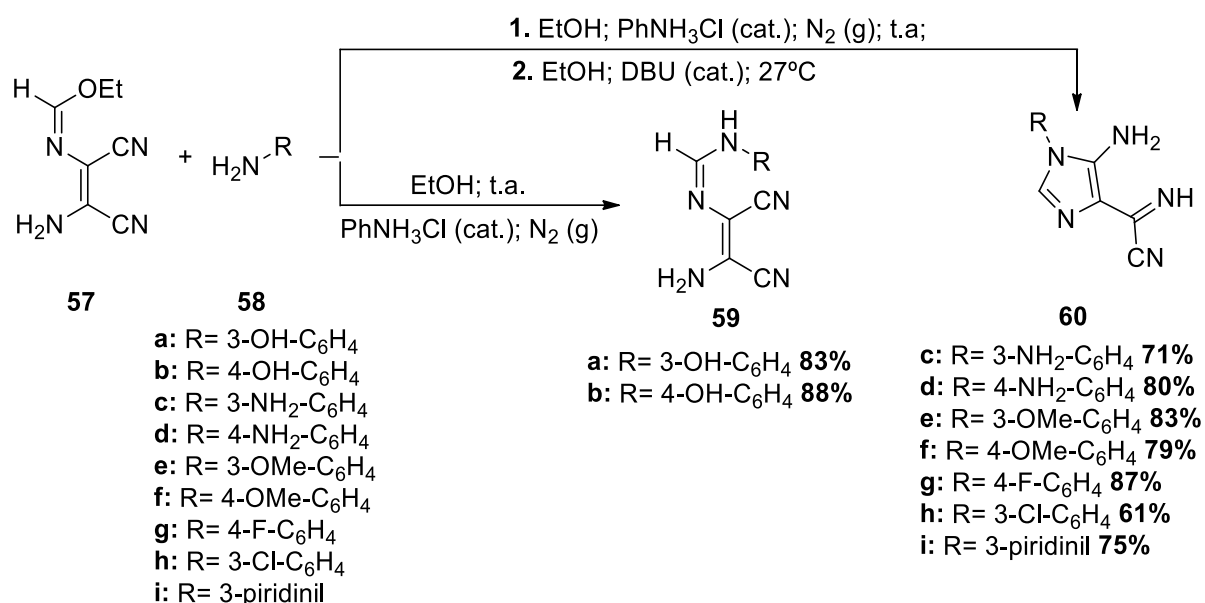


Esquema 4 – Mecanismo reacional da síntese de imidato **57**

3.1.1.3. Síntese de amidinas **59** e imidazoles **60**

Os imidazoles **60** foram sintetizados a partir do imidato **57** por reação com várias aminas primárias aromáticas **58**, em atmosfera inerte, catálise ácida e posterior catálise básica por um procedimento já publicado [52-61,65] (Esq. 5). Durante a síntese formaram-se os intermediários **59** que foram isolados em 2 casos (**59a,b**). Nos outros casos, **59c-i**, a sua presença foi verificada por TLC e os respectivos

produtos **60c-i** foram isolados.



Esquema 5 – Síntese amidinas **59** e imidazoles **60**

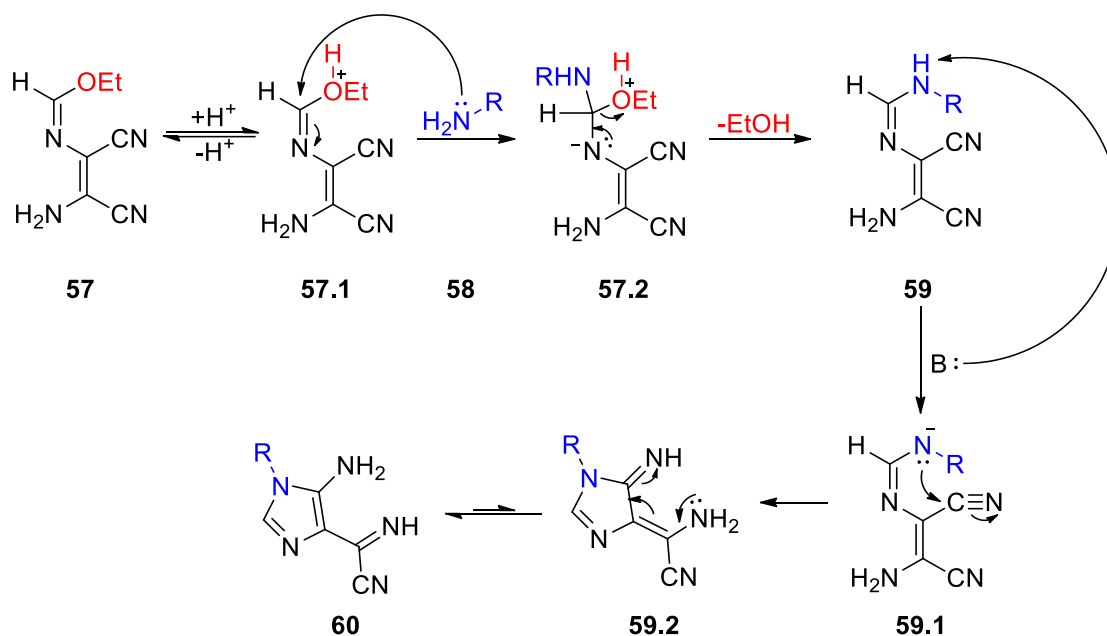
As amidinas **59a** e **59b** foram isoladas puras com rendimentos acima de 80% ao fim de 24h por simples filtração da mistura reacional após término da reação (assegurada por TLC). Os imidazoles **60c-h** foram isolados puros com rendimentos maioritariamente acima de 70% ao final de 17-24h. Nestes casos, ao fim de 16-19h, quando TLC mostrou ausência de **57**, as misturas foram diluídas e tratadas com DBU a 27°C . Ao final de 1-3h os produtos **60c-h** foram isolados por filtração. O produto **60h** foi o único que foi isolado com rendimento moderado (61%). Isto pode dever-se ao facto de não se ter isolado o produto após término da reação (17h). Neste caso particular, a mistura reacional foi reservada no congelador e filtrada somente no dia seguinte, ficando um total de 24h a -20°C o que pode ter contribuído para a degradação do produto. Em conjunto, a pureza dos produtos previamente caracterizados **61a-h** foi assegurada por TLC.

A síntese do novo imidazole **60i**, ao contrário dos restantes derivados **60**, precisou de 66h para completar a primeira fase da reação. Nessa altura, quando o TLC mostrou ausência de **57** tratou-se a mistura com DBU. Ao fim de 1h foi possível isolar o produto **60i** puro, com um bom rendimento (75%).

3.1.1.3.1. Mecanismo reacional

A proposta mecanística da síntese de amidinas **59** e imidazoles **60** já se encontra reportada [52-61,65]. Nessa proposta, refere-se que a amina primária ataca nucleofilicamente o carbono da função imidato da estrutura **57.1** que se encontra em equilíbrio com **57**. Este ataque gera **57.2** que evolui

para a amidina **59**. Este, por sua vez, pode ser desprotonado por uma base, ativando a amina secundária para um ataque intramolecular no grupo nitrilo mais próximo (**59.1**). Esta ciclização 5-Exo-Dig gera o imidazole **59.2**. Este intermediário encontra-se em equilíbrio tautomérico e pode aromatizar gerando o composto **60**. O equilíbrio encontra-se deslocado para **60**, visto que esta é uma estrutura aromática e conseqüentemente mais estável (Esq. 6).



Esquema 6 – Mecanismo reacional de síntese de amidinas **59** e imidazoles **60**

3.1.1.3.2. Caracterização física, analítica e espectroscópica do derivado **60i**

A estrutura e pureza do composto **60i** foi confirmada por métodos físicos e espectroscópicos uma vez que é o único composto **60** que não foi previamente reportado [52-61,65]. Os dados físicos e analíticos encontram-se na tabela 4. Os dados analíticos teóricos foram obtidos por software ChemDraw, contudo os dados experimentais não se conseguiram obter durante o período regular deste trabalho.

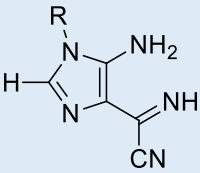
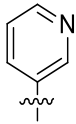
Tabela 4 – Dados físicos e analíticos do composto **60i**

R	Nº	η (%)	P.f. (°C)	Fórmula Molecular	Massa molar	C; H; N; S % Esperado* (obtido)
	60i	75	135-140	C ₁₀ H ₈ N ₆	212,21	56,60; 3,80; 39,60

*Valores retirados do ChemDraw Ultra (12.0.2.1076)

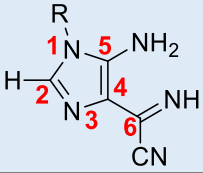
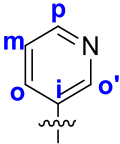
IV

A análise do espectro de IV (Tab. 5) permitiu identificar um conjunto de bandas intensas nas zonas entre 3600-3000 cm^{-1} correspondentes aos grupos amina do derivado **60i**. Além disso, detetou-se a banda característica do grupo CN a 2215 cm^{-1} .

Tabela 5 – Dados espectroscópicos de FTIR do composto 60i (cm^{-1})			
R	Nº	3600-3000 cm^{-1}	2300-1500 cm^{-1}
	60i	3375 (m); 3290 (i); 3202 (f); 3109 (m); 3042 (m);	2215 (CN, f); 1635 (i); 1585 (i); 1550 (i); 1511 (m);

^1H RMN

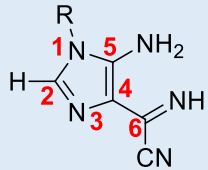
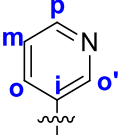
Pela análise dos dados de ^1H RMN (Tab. 6), foi possível identificar o H2 característico dos produtos **60** a $\delta = 7,51$ ppm, como um singlete, e os grupos NH_2 e NH ligadas a C5 e C6 a $\delta = 6,74$ e 11,1 ppm, respetivamente. Também de detetou a presença do grupo **R** piridina ligado a N1 por aparecimento de sinais correspondentes aos prótons aromáticos de **R** a δ entre 7,6 a 8,8 ppm.

Tabela 6 – Dados espectroscópicos de ^1H RMN (400 MHz, DMSO_{d6}) do composto 60i			
R	Nº	$\text{NH}_2/\text{NH}/\text{H}_2$	R
	60i	11.1 (sl, 1H, NH) 7,51 (s, 1H, H2) 6,74 (sl, 2H, NH2)	8,74 (d, 1H, $J= 2,4$ Hz, Ho') 8,69 (dd, 1H, $J= 1,2; 4,8$ Hz, Hp) 7,97 (ddd, 1H, $J= 1,2; 2,4; 8,4$ Hz, Ho) 7,61 (dd, 1H, $J= 4,8; 8,4$ Hz, Hm)

^{13}C RMN

A análise dos dados de ^{13}C RMN (Tab 7) permitiu confirmar a estrutura heterocíclica **60** por aparecimento de sinais correspondentes a C2, C5 e C6. O sinal C2 a $\delta = 132$ ppm é característico das estruturas **60** assim como o sinal de CN a $\delta = 113$ ppm. A deteção destes sinais associados ao

aparecimento de sinais correspondentes ao grupo **R** prova em grande parte a estrutura de **60i**.

Tabela 7 – Dados espectroscópicos de ^{13}C RMN (100 MHz, DMSO-d_6) do composto 60i			
R	Nº	C5/C6/C2/C4/CN	R
	60i	144,1 (C5)	149,6 (CH, Cp)
		143,0 (C6)	146,0 (CH, Co')
		132,1 (CH, C2)	133,1 (CH, Co)
		116,4 (C4)	130,8 (Ci)
		113,3 (CN)	124,6 (CH, Cm)

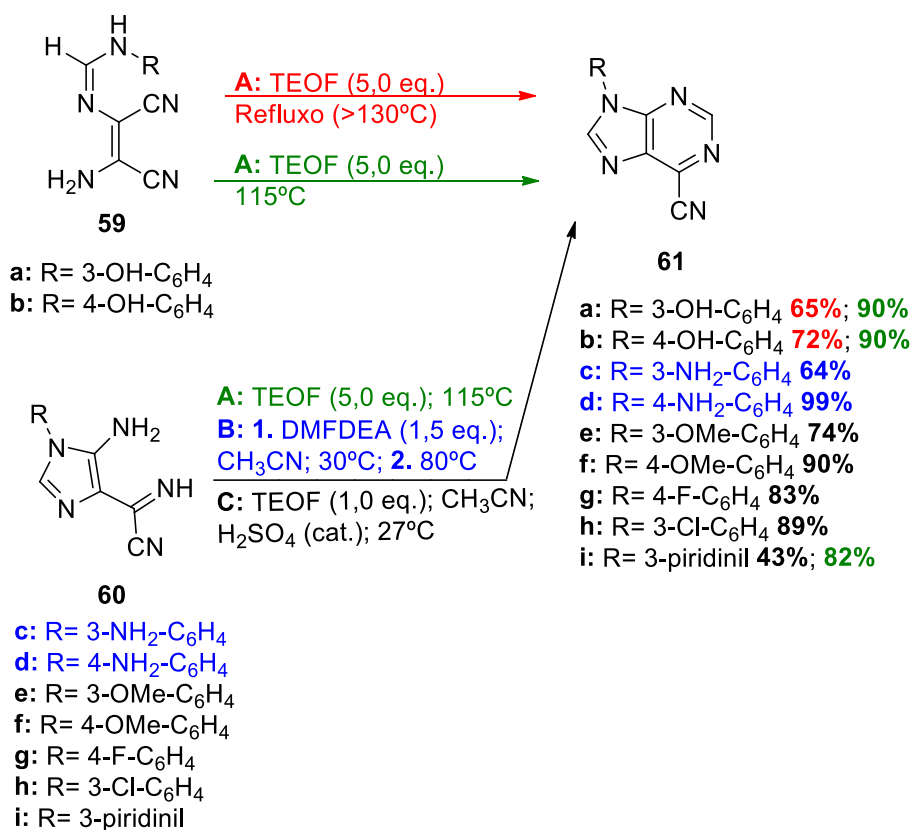
3.1.1.4. Síntese de 6-cianopurinas **61** e **63**

3.1.1.4.1. Síntese de 6-cianopurinas **61**

A síntese de 6-cianopurinas **61** foi efetuada a partir de **59** e **60** por três métodos distintos (Esq. 7). Por um lado, para gerar **61** a partir **59**, é necessário usar TEOF **56** como solvente da reação e condições de temperatura que rondam os 115°C (Método A). Por outro, para sintetizar **61** a partir **60**, podem ser aplicados dois métodos (B ou C) que dependem da reatividade do grupo **R**.

Quando **R** é $\text{H}_2\text{NC}_6\text{H}_4$ é necessário o uso de DMFDEA para iniciar a reação e posteriormente aplicar temperaturas que rondam os 80°C , em ambiente seco, para que esta termine (Método B). Porém, quando **R** não é $\text{H}_2\text{NC}_6\text{H}_4$ é possível gerar **61** por reação de **60** com TEOF **56**, em catálise ácida, à t.a. (Método C).

Estes três métodos já se encontram reportados pelo grupo de investigação [53-62,65], sendo que, a pureza dos produtos previamente caracterizados (**60a-h**) foi confirmada por TLC. Acrescenta-se que, durante as sínteses de **61** a partir de **59**, procedeu-se a uma otimização do procedimento já estudado [62], com o intuito de melhorar o rendimento e pureza dos produtos **61a-b**.



Esquema 7 – Síntese de 6-cianopurinas **61**

As 6-cianopurinas **61a-b** foram obtidas por reação de **59** com TEOF **56** com excelentes rendimentos, quando a mistura foi sujeita a uma temperatura estável de 115°C durante 18-32 min. Quando se segue o procedimento [62], em que se usa condições de refluxo (T > 130°C), geram-se os produtos **61a-b** com uma cor escura, fruto da sua polimerização (não detetável por ¹H RMN). Porém, quando o novo procedimento é aplicado, verifica-se um aumento não só do rendimento, mas também da pureza.

Pelo método tradicional C [53-62,65], foi possível obter os produtos **61e-i** com rendimentos acima de 70% por reação de **60e-i** com TEOF **56** em catálise ácida ao final de 30-90 min. Contudo, destaca-se o produto **61i** como exceção, uma vez que foi o único que foi obtido com um rendimento inferior aos restantes (43%).

Para estas reações (método C) é necessária a solubilização total do reagente **60** nas condições reacionais. Contudo, durante a síntese de **61i** pelo método C, devido à baixa solubilidade do reagente **60i**, foi necessário usar bastante solvente e consequentemente mais ácido para que a reação decorresse. A presença de ácido dificultou o isolamento do produto que, após remoção do solvente, apresentou bastante dificuldade em precipitar da mistura. Contudo, após a neutralização da mistura com uma solução aquosa de NaHCO₃ (1M), foi possível precipitar o produto **61i** com 43% de rendimento.

Perante este resultado, experimentou-se aplicar as condições do método A (otimizado) para obter **61i** a partir de **60i** por tratamento com TEOF a 115°C. Ao fim de 1h e 30min, foi possível obter **61i** com 82% de rendimento por simples filtração da mistura arrefecida.

Por fim, como foi referido no início, as 6-cianopurinas, cujo **R** é H₂NC₆H₄ (**61c-d**), foram obtidas pelo método B, com bons a excelentes rendimentos, por reação com DMFDEA ao final de 4-6h. O procedimento foi recentemente reportado e otimizado pelo grupo de investigação [61] pelo que a pureza dos produtos **61c-d** foi assegurada por ¹H RMN quando comparado com um padrão.

3.1.1.4.1.1. Mecanismo reacional

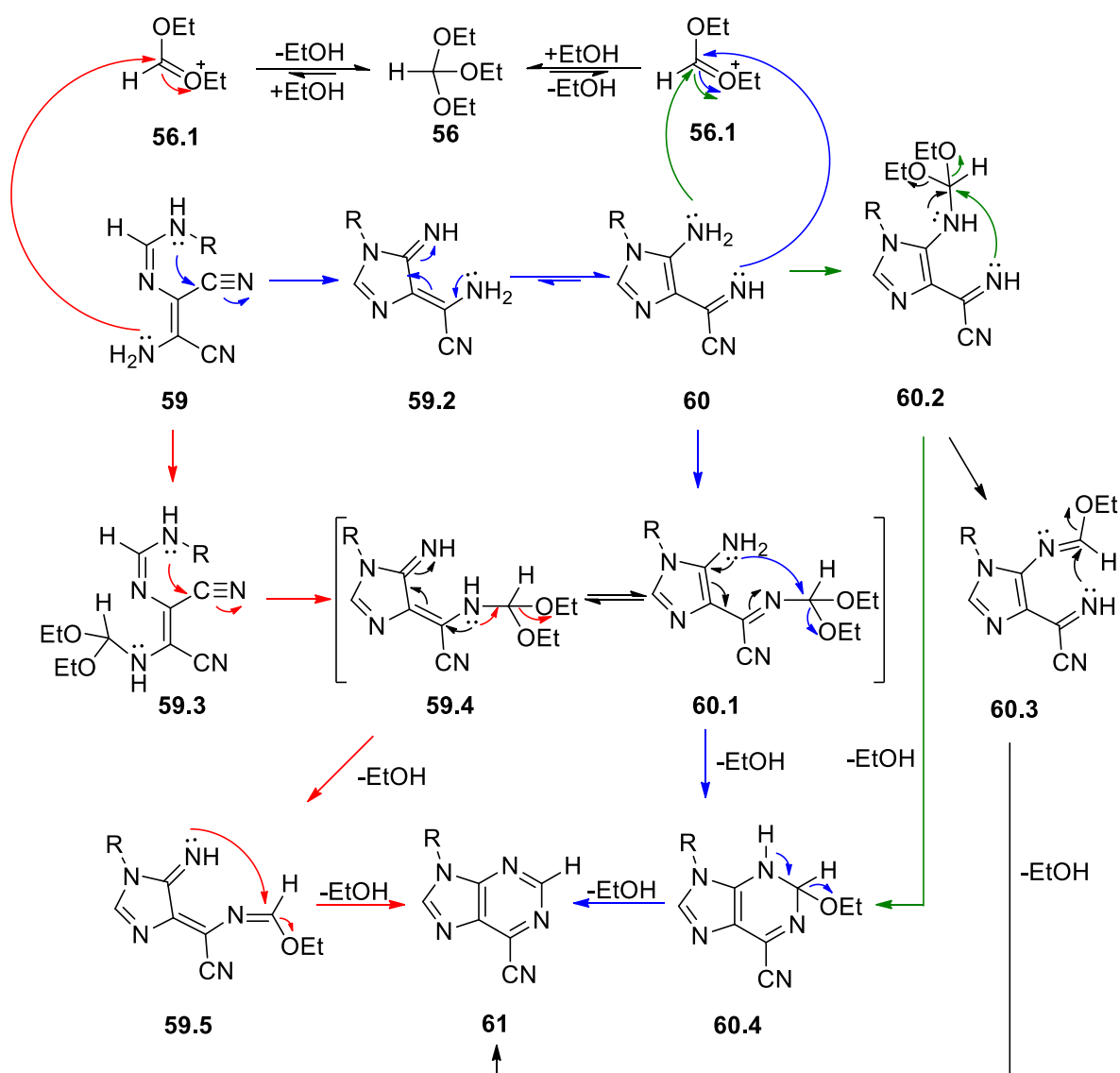
A proposta mecanística para a síntese de **61** Já se encontra reportada [53-62,65]. Nessa proposta sugere-se que, quando se parte de **59** (método A) existem duas vias para chegar ao produto **61** (via da **ciclização a azul** ou via da **condensação a vermelho**) (Esq. 8). Como a reação é levada a cabo a altas temperaturas (115°C) não se sabe ao certo qual a primeira reação a ocorrer.

Quando **59** começa por ciclizar intramolecularmente (**via a azul**), gera-se **59.2** que tautomeriza para **60** à semelhança das reações anteriores. O imidazole **60** em presença de TEOF **56** pode reagir nucleofilicamente, com a espécie **56.1**, pela função imina ou pela amina. Estes ataques geram-se as estruturas **60.1** e **60.2**, respetivamente. **60.1** pode ciclizar intramolecularmente, gerando **60.4** por saída de uma molécula de etanol. Por fim, o intermediário de purina **60.4** aromatiza por saída de mais uma molécula de etanol, gerando o produto **61**.

Este também pode ser gerado a partir de **60.2** por perda de uma molécula de etanol, dando origem a **60.3**. Este último cicliza intramolecularmente na função imidato gerando **61**.

Quando **59** começa por condensar com **56.1** (**via a vermelho**) forma-se a estrutura **59.3** que pode ciclizar gerando a estrutura **59.4**. Esta encontra-se em equilíbrio tautomérico com a espécie **60.1** podendo gerar **61** pela via descrita anteriormente (**azul**). Por outro lado, **59.4** pode evoluir para **59.5**, por perda de etanol, e posteriormente para **61** por ciclização na função imidato e nova perda de etanol.

Método A

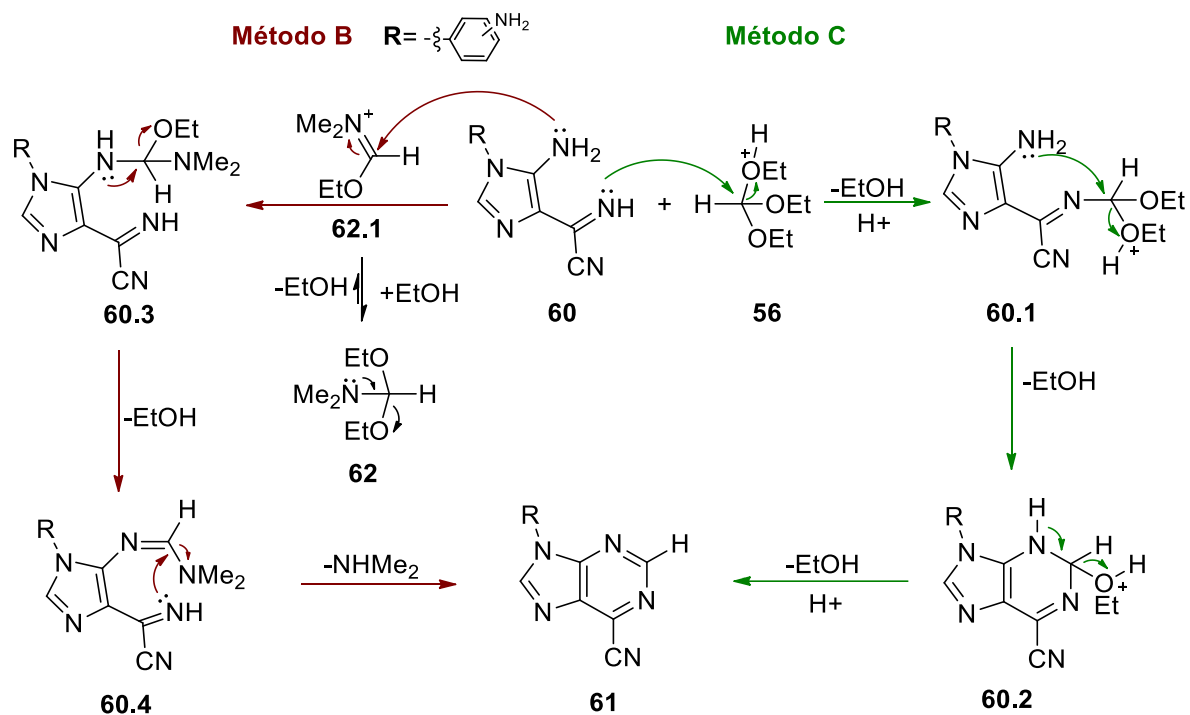


Esquema 8 – Mecanismo reacional de síntese 6-cianopurinas **61** pelo método A

No método C (reportado) [53-62,65] obtém-se **61** partindo de **60** por reação com TEOF **56** em catálise ácida (Esq. 9). Catálise essa que protona um oxigênio de **56** tornando este suscetível a um ataque nucleofílico do imidazole **60** a partir da função imina. O ataque provoca saída de etanol gerando **60.1**, que, por sua vez, cicliza intramolecularmente para **60.2** por saída de mais uma molécula de etanol. Por sua vez, o intermediário de purina **60.2** à semelhança do mecanismo anterior aromatiza para o produto **61** por saída de etanol.

A proposta mecanística do método B foi recentemente reportada pelo grupo de investigação [61], na qual é referido que o DMFDEA é atacado pela função amina da estrutura **60**, gerando o intermediário

60.4. Este intermediário cicliza intramolecularmente na função amidina, gerando o **61** por saída de dimetilamina (Esq. 9).



Esquema 9 – Mecanismo reacional de síntese de 6-cianopurinas **61** pelos métodos B e C

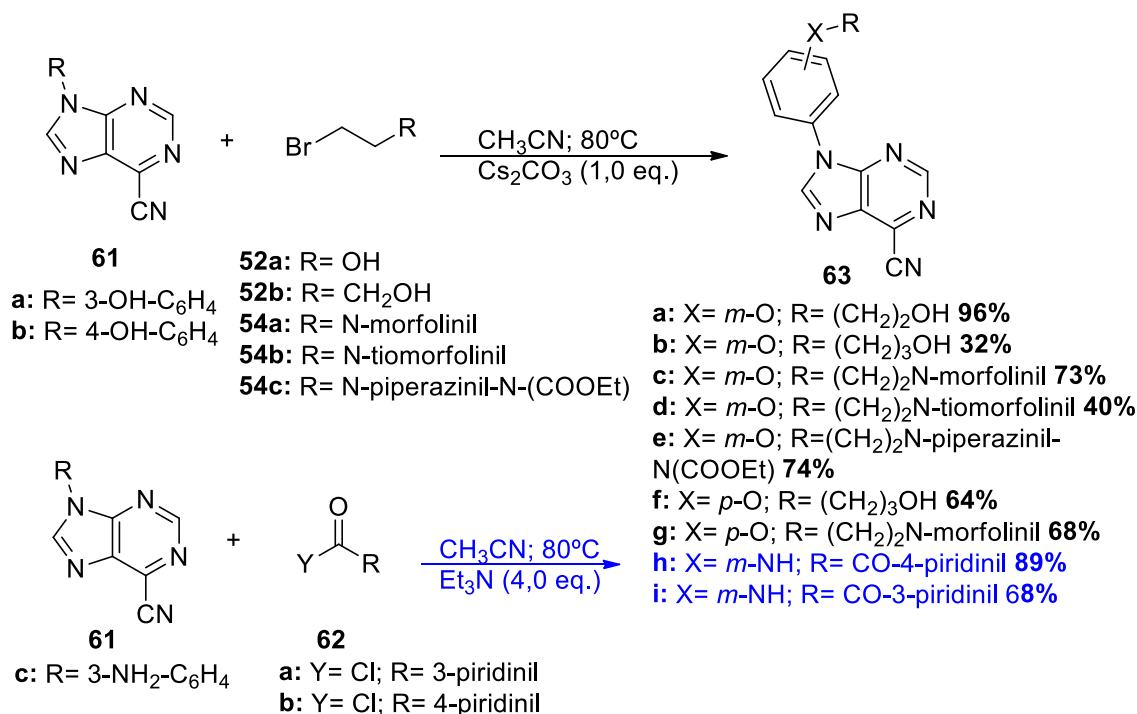
3.1.1.4.2. Síntese de 6-cianopurinas **63**

As 6-cianopurinas **63** foram obtidas por alquilação e acilação de **61** (Esq. 10). Os produtos **63a-g** foram obtidos por alquilação das 6-cianopurinas **61a,b** tratando-as com haletos de alquila **52** e **54** em presença de base (Cs_2CO_3) a 80°C . Destes agentes alquilantes, o 3-bromo-1-propanol **52b** e o 2-bromoetanol **52a** foram adquiridos comercialmente e os restantes foram previamente sintetizados (**54a-c**). As alquilações geraram produtos puros, ao fim de 2-7h com rendimentos variados (32-96%). O isolamento destes produtos requiere uma purificação do crude pós alquilação, por filtração em sílica. O líquido-mãe resultante foi recolhido e concentrado tornando assim possível a precipitação dos produtos. Certos compostos **63** apresentaram alguma dificuldade em precipitar e por isso foram isolados com baixo rendimento da mistura reacional (**63b,d**). Esta particularidade deveu-se sobretudo à sua solubilidade em vários solventes orgânicos. Destes o mais problemático foi o produto **63b** isolado com apenas 32% de rendimento. Contudo, nos capítulos seguintes, irá ser discutida uma alternativa ao isolamento deste produto (síntese “one-pot”) que permitirá resolver o problema apresentado.

Realça-se ainda que, para a síntese de **63a** foram necessárias cerca de 72h para que a reação se completasse. O aumento do tempo de reação foi atribuído à volatilidade do reagente **52a** que, nas

condições usadas (80°C), encontra-se maioritariamente na fase gasosa reduzindo assim a velocidade da reação. Todavia, esta reação foi a que obteve melhor rendimento (96%), uma vez que o produto **63a** precipitou bastante bem da mistura reacional.

Os produtos **63h,i** foram obtidos por acilação da 6-cianopurina **61c** com cloretos de acilo **62** em catálise básica (Et₃N) a 80°C ao final de 1,5-2h. Estes, aquando do término da reação (assegurada por TLC), foram isolados, com bons a excelentes rendimentos por simples tratamento da mistura reacional com H₂O fria e posterior filtração.

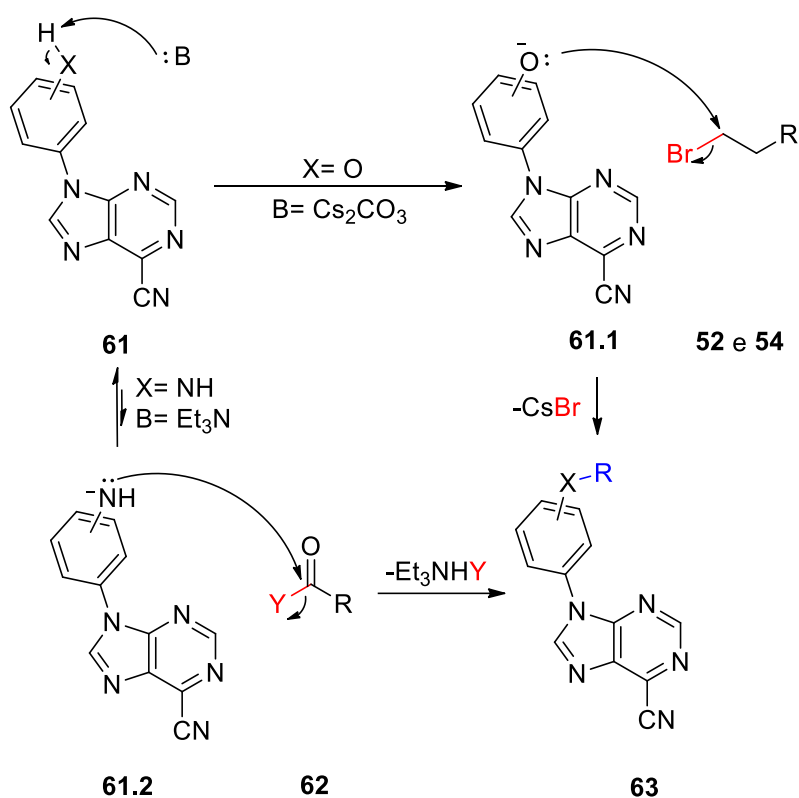


Esquema 10 – Síntese 6-cianopurinas **63**

3.1.1.4.2.1. Mecanismo reacional

O mecanismo associado à alquilação de **61** é semelhante ao apresentado na síntese dos derivados **53**. Neste caso, em presença de uma base forte, os derivados **61** fenólicos (**61a** e **61b**) geram o ião fenóxido **61.1** que ataca um haleto de alquilo **52** ou **54** eliminando Br⁻. Isto gera os produtos da alquilação **63** (Esq 11).

O mecanismo de acilação difere em muito pouco do mecanismo de alquilação, na medida em que, em presença de base, o derivado **61c** gera o correspondente ião **61.2** por desprotonação da amina arílica, contudo trata-se de um equilíbrio deslocado para **61**. O uso de calor na reação faz com que o equilíbrio se desloque no sentido de **61.2** e este, por sua vez, ataca o cloreto de acilo **62** gerando o produto **63** por eliminação de Cl⁻ (Esq 11).

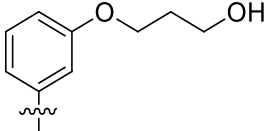
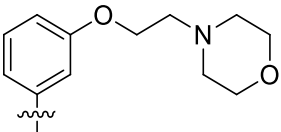
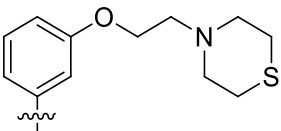
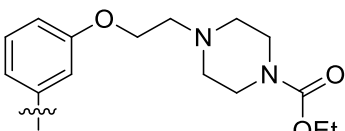
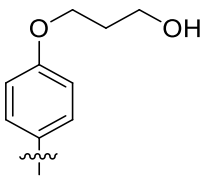
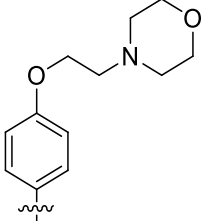
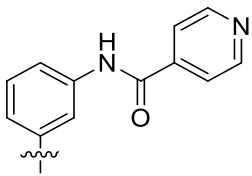
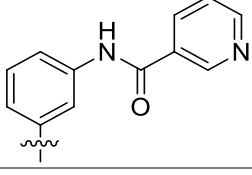


Esquema 11 – Mecanismo reacional de síntese 6-cianopurinas **63**

3.1.1.4.3. Caracterização física analítica e espectroscópica das 6-cianopurinas **61** e **63**

As 6-cianopurinas **61** e **63** apresentaram valores de p.f. entre 100 a 200°C, com exceção dos derivados **63h,i** que não fundiram mesmo a 300°C (Tab. 8). À semelhança do capítulo anterior, os dados de análise elementar experimentais não se conseguiram obter e apresentam-se apenas os dados obtidos a partir do software ChemDraw.

Tabela 8 - Dados físicos e analíticos dos compostos 61 e 63						
R	Nº	η (%)	P.f. (°C)	Fórmula Molecular	Massa molar	C; H; N; S % Esperado* (obtido)
	61i	82	194 - 195	C ₁₁ H ₇ N ₆	222,21	59,46; 2,72; 37,82;
	63a	96	132 - 133	C ₁₄ H ₁₁ N ₅ O ₂	281,27	59,78; 3,94; 24,90;

	63b	32	130 - 133	C ₁₅ H ₁₃ N ₅ O ₂	295,30	61,01; 4,44; 23,72;
	63c	73	153 - 155	C ₁₈ H ₁₈ N ₆ O ₂	350,37	61,70; 5,18; 23,99;
	63d	40	115 - 119	C ₁₈ H ₁₈ N ₆ OS	366,44	59,00; 4,95; 22,93; 8,75;
	63e	71	107 - 109	C ₂₁ H ₂₃ N ₇ O ₃	421,45	59,85; 5,50; 23,26;
	63f	64	153 - 155	C ₁₅ H ₁₃ N ₅ O ₂	295,30	61,01; 4,44; 23,72;
	63g	68	153 - 155	C ₁₈ H ₁₈ N ₆ O ₂	350,37	61,70; 5,18; 23,99;
	63h	89	>300	C ₁₈ H ₁₁ N ₇ O	341,10	63,34; 3,25; 28,73;
	63i	68	>300	C ₁₈ H ₁₁ N ₇ O	341,10	63,34; 3,25; 28,73;

*Valores retirados do ChemDraw Ultra (12.0.2.1076)

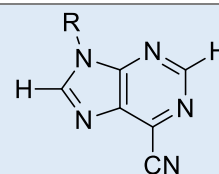
IV

A análise dos espectros de IV (Tab. 9) dos derivados **61** e **63** permitiu identificar várias bandas de intensidade média e fraca na zona entre 3600-3000 cm⁻¹. Verificou-se que, nos derivados com grupos OH, **63a,b,f** identificou-se bandas na zona entre 3600-3200 cm⁻¹ como esperado.

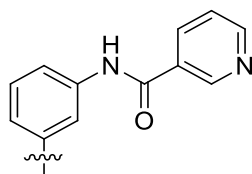
Além disso, na zona entre 2300-1500 cm⁻¹, detetou-se em todos os derivados a banda característica do grupo CN a 2260-2200 cm⁻¹. Na mesma zona, especificamente entre 1700-1630 cm⁻¹, também foi possível detetar bandas intensas correspondentes a carbonilos de amida. Nos derivados **63e,h,i** foi

possível identificar essas bandas a 1672, 1698 e 1698 cm^{-1} , respetivamente. Em conjunto estes resultados permitem identificar qualitativamente alguns dos grupos funcionais das estruturas **61** e **63**.

Tabela 9 - Dados espectroscópicos de FTIR dos compostos **61** e **63** (cm^{-1})



R	Nº	3600-3000 cm^{-1}	2300-1500 cm^{-1}
	61i	3120 (f); 3089 (f); 3052 (f);	2239 (CN, f); 1758 (f); 1597 (m); 1583 (i); 1501 (i);
	63a	3541 (m); 3433 (m); 3097 (m); 3096 (f);	2250 (CN, f); 1612 (i); 1683 (i); 1508 (i);
	63b	3391 (m); 3093 (m);	2236 (CN, f); 1587 (i); 1525 (i);
	63c	3099(m);	2245 (CN, f); 1807 (m); 1778 (m); 1583 (i); 1520
	63d	3127 (m); 3097 (m); 3008 (f);	2239 (CN, f); 1612 (m); 1595 (i); 1504 (i);
	63e	3101 (m); 3062 (f);	2243 (CN, f); 1672 (i); 1616 (m); 1590 (i); 1508 (i);
	63f	3115 (m); 3086 (f); 3050 (f);	2238 (CN, f); 1758 (f); 1600 (m); 1575 (i); 1500 (i);
	63g	3440 (m); 3347 (m); 3220 (m);	2239 (CN, f); 1885 (f); 1743 (f); 1642 (m); 1612 (f); 1590 (i); 1523 (i);
	63h	3377 (m); 3078 (f); 3034 (m);	2251 (CN, f); 1698 (i); 1609 (i); 1590 (i); 1549 (i); 1504 (i);



63i

3403 (f); 3381 (m);
3116 (f); 3071 (f);
3037 (m);

2050 (CN, f); 1889 (f); 1698 (i);
1616 (i); 1590 (i); 1549 (i); 1504 (i);

¹H RMN

A análise dos espectros de ¹H RMN (Tab. 10) permitiu identificar os sinais dos prótons H2 e H8 do núcleo de purina a $\delta \approx 9,14$ e $9,30$ ppm, respetivamente. Também foi possível detetar sinais compatíveis com a presença dos diversos grupos aromáticos **R** por comparação dos sinais registados para os compostos **61** e **63** com os dos respetivos reagentes de partida. Os grupos alquilo dos derivados alquilados **63a-g** foram identificados a partir dos sinais a δ entre 4-1 ppm conforme o esperado. O sinal do grupo OH dos derivados **63a,b,f** foi observado a δ entre 4,9-4,6 ppm e o do grupo NH dos derivados **63h,i** a $\delta = 10,8$ ppm.

Tabela 10 – Dados espectroscópicos de ¹H RMN (400 MHz, DMSO_{d6}) dos compostos **61** e **63**



R	Nº	H8,H2	R
	61i	9,31 (s, 1H, H8) 9,19 (s, 1H, H2)	9,11 (d, 1H, J= 2,4 Hz, Ho') 8,74 (dd, 1H, J= 1,2; 4,8 Hz, Hp) 8,34 (ddd, 1H, J= 1,2; 2,4; 8,4 Hz, Ho) 7,20 (dd, 1H, J= 4,8; 8,4 Hz, Hm)
	63a	9,37 (s, 1H, H8) 9,17 (s, 1H, H2)	7,54 (t, 1H, J= 8,0 Hz, Hm) 7,51 (t, 1H, J= 2,0 Hz, Ho') 7,46 (dd, 1H, J= 2,0; 8,0 Hz, Ho) 7,11 (dd, 1H, J= 2,0; 8,0 Hz, Hp) 4,92 (sl, 1H, OH) 4,07 (t, 2H, J= 4,8 Hz, H10) 3,74 (t, 2H, J= 4,8 Hz, H11)
	63b	9,28 (s, 1H, H8) 9,16 (s, 1H, H2)	7,53 (t, 1H, J= 8,0 Hz, Hm) 7,48 (t, 1H, J= 2,0 Hz, Ho') 7,45 (dd, 1H, J= 2,0; 8,0 Hz, Ho) 7,09 (dd, 1H, J= 2,0; 8,0 Hz, Hp) 4,67 (t, 1H, J= 5,2 Hz, OH) 4,11 (t, 2H, J= 6,4 Hz, H10) 3,63 (t, 2H, J= 6,4 Hz, H12) 1,88 (quint, 2H, J= 6,4 Hz, H11)

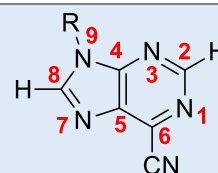
	63c 9,34 (s, 1H, H8) 9,18 (s, 1H, H2)	7,54 (t, 1H, J= 8,0 Hz, Hm) 7,52 (t, 1H, J= 2,0 Hz, Ho') 7,50 (dd, 1H, J= 2,0; 8,0 Hz, Ho) 7,12 (dd, 1H, J= 2,0; 8,0 Hz, Hp) 4,18 (t, 2H, J= 6,0 Hz, H10) 3,57 (t, 4H, J= 4,8 Hz, H13) 2,73 (t, 2H, J= 6,0 Hz, H11) 2,49 (t, 4H, J= 4,8 Hz, H12)
	63d 9,33 (s, 1H, H8) 9,17 (s, 1H, H2)	7,6-7,4 (m, 3H, Hm, Ho', Ho) 7,01 (dd, 1H, J= 2,0; 8,0 Hz, Hp) 4,15 (t, 2H, J= 5,8 Hz, H10) 2,77 (m, 6H, H11, H12) 2,59 (t, 4H, J= 4,8 Hz, H13)
	63e 9,34 (s, 1H, H8) 9,18 (s, 1H, H2)	7,65-7,45 (m, 3H, Hm, Ho', Ho) 7,11 (dd, 1H, J= 2,0; 8,0 Hz, Hp) 4,18 (t, 2H, J= 5,6 Hz, H10) 4,02 (q, 2H, J= 7,2 Hz, OEt) 3,35 (t, 4H, J= 4,8 Hz, H13) 2,76 (t, 2H, J= 6,0 Hz, H11) 2,46 (t, 4H, J= 4,8 Hz, H12) 1,14 (t, 3H, J= 7,2 Hz, OEt)
	63f 9,23 (s, 1H, H8) 9,15 (s, 1H, H2)	7,75 (d, 2H, J= 9,2 Hz, Ho) 7,18 (d, 2H, J= 9,2 Hz, Hm) 4,59 (t, 1H, J= 5,2 Hz, OH) 4,12 (t, 2H, J= 6,4 Hz, H10) 3,57 (t, 2H, J= 6,4 Hz, H12) 1,89 (quint, 2H, J= 6,4 Hz, H11)
	63g 9,22 (s, 1H, H8) 9,14 (s, 1H, H2)	7,75 (d, 1H, J= 8,8 Hz, Ho) 7,50 (d, 1H, J= 8,8 Hz, Hm) 4,17 (t, 2H, J= 6,0 Hz, H10) 3,58 (t, 4H, J= 4,8 Hz, H13) 2,72 (t, 2H, J= 6,0 Hz, H11) 2,49 (t, 4H, J= 4,8 Hz, H12)
	63h 9,30 (s, 1H, H8) 9,18 (s, 1H, H2)	10,8 (sl, 1H, NH) 8,80 (d, 2H, J= 4,8 Hz, Hm'') 8,41 (t, 1H, J= 2,0 Hz, Ho') 7,89 (m, 3H, Ho, Ho'') 7,65 (t, 1H, J= 8,0 Hz, Hm) 7,61 (dd, 1H, J= 2,0; 8,0 Hz, Hp)
	63i 9,31 (s, 1H, H8) 9,19 (s, 1H, H2)	10,8 (s, 1H, N¹⁰H) 9,12 (d, 1H, J= 1,2 Hz, Ho''') 8,31 (dd, 1H, J= 2,0; 4,8 Hz, Ho'') 8,41 (t, 1H, J= 2,0 Hz, Ho') 8,31 (dd, 1H, J= 2,0; 4,8 Hz, Hp') 7,89 (dd, 1H, J= 2,0; 8,0 Hz, Ho) 7,64 (t, 1H, J= 8,0 Hz, Hm) 7,67-7,54 (m, 2H, Hm''; Hp)

¹³C RMN

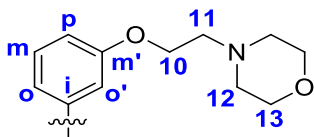
A análise dos espectros de ¹³C RMN (tab 11) permitiu identificar os sinais correspondentes aos carbonos característicos do núcleo de purina (C2, C4, C8, C5, C6 e CN) a $\delta \approx 153,0$; 152,8; 149,3 135,5; 129,4 e 114 ppm, respetivamente. Também foi possível detetar os sinais correspondentes aos diversos grupos aromáticos **R** a δ entre 160-110 ppm. Os carbonos dos grupos alquilo (C10-C13) dos derivados alquilados **63a-g** foram detetados a δ entre 70-32 ppm. O carbonilo (C10) dos derivados **63h,i** apresentou-se a valores de $\delta \approx 164$ ppm e o C14 do derivado **63e** foi detetado com valor de δ 154,5 ppm.

Destaca-se ainda que a correlação por HMBC do H10 com o Cm' e Cp do anel aromático **R** confirma a alquilação das 6-cianopurinas **61a** e **61b**, respetivamente e a correlação do NH da amida (**63h,i**) com os carbonos aromáticos Cp/Co' prova que a acilação ocorreu no NH₂ da 6-cianopurina **61c**.

Tabela 11 – Dados espectroscópicos de ¹³C RMN (100 MHz, DMSO_{d6}) dos compostos **61** e **63**



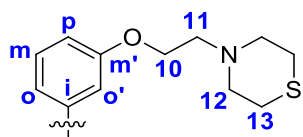
R	Nº	C2/C4/C8/C5/C6/CN	R
	61i	153,0 (CH, C2)	149,6 (CH, Cp)
		152,8 (C4)	144,7 (CH, Co')
		149,3 (CH, C8)	131,7 (CH, Co)
		135,4 (C5)	130,5 (Ci)
		129,3 (C6)	124,4 (CH, Cm)
		114,3 (CN)	
			63a
152,9 (CH, C2)	134,6 (Ci)		
152,6 (C4)	130,7 (CH, Cm)		
149,5 (CH, C8)	115,6 (CH, Co)		
135,6 (C5)	114,7 (CH, Cp)		
129,3 (C6)	110,2 (CH, Co')		
114,3 (CN)	70,00 (CH ₂ , C10)		
	63b		59,50 (CH ₂ , C11)
			159,6 (Cm')
		153,0 (CH, C2)	134,7 (Ci)
		152,8 (C4)	130,8 (CH, Cm)
		149,6 (CH, C8)	115,8 (CH, Co)
		135,7 (C5)	114,8 (CH, Cp)
		129,4 (C6)	110,3 (CH, Co')
114,5 (CN)	65,30 (CH ₂ , C10)		
	57,44 (CH ₂ , C12)		
	32,09 (CH ₂ , C11)		



63c

152,8 (CH, **C2**)
 152,6 (**C4**)
 149,5 (CH, **C8**)
 135,6 (**C5**)
 129,3 (**C6**)
 114,3 (**CN**)

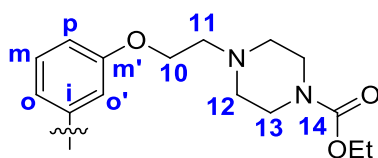
159,2 (**Cm'**)
 134,6 (**Ci**)
 130,6 (CH, **Cm**)
 115,7 (CH, **Co**)
 114,6 (CH, **Cp**)
 110,2 (CH, **Co'**)
 66,10 (CH₂, **C13**)
 65,70 (CH₂, **C10**)
 56,80 (CH₂, **C11**)
 53,60 (CH₂, **C12**)



63d

152,8 (CH, **C2**)
 152,5 (**C4**)
 149,4 (CH, **C8**)
 135,5 (**C5**)
 129,3 (**C6**)
 114,2 (**CN**)

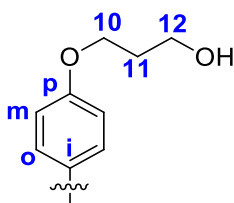
159,2 (**Cm'**)
 134,6 (**Ci**)
 130,6 (CH, **Cm**)
 115,6 (CH, **Co**)
 114,7 (CH, **Cp**)
 110,1 (CH, **Co'**)
 66,79 (CH₂, **C10**)
 57,06 (CH₂, **C11**)
 54,77 (CH₂, **C12**)
 27,12 (CH₂, **C13**)



63e

152,8 (CH, **C2**)
 152,5 (**C4**)
 149,4 (CH, **C8**)
 135,5 (**C5**)
 129,2 (**C6**)
 114,2 (**CN**)

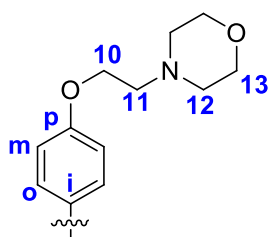
159,2 (**Cm'**)
 154,5 (**C14**)
 134,6 (**Ci**)
 130,6 (CH, **Cm**)
 115,6 (CH, **Co**)
 114,6 (CH, **Cp**)
 110,1 (CH, **Co'**)
 65,81 (CH₂, **C10**)
 60,65 (CH₂, **OEt**)
 56,36 (CH₂, **C11**)
 52,66 (CH₂, **C12**)
 43,29 (CH₂, **C13**)
 14,53 (CH₃, **OEt**)



63f

152,8 (s, **C2; C4**);
 149,8 (s, **C8**);
 135,3 (s, **C5**)
 129,1 (s, **C6**)
 114,4 (s, **CN**)

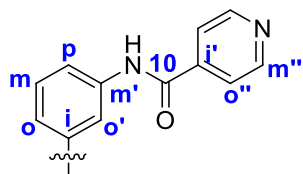
158,8 (**Cp**)
 126,2 (**Ci**)
 125,6 (CH, **Co**)
 115,3 (CH, **Cm**)
 65,30 (CH₂, **C10**)
 57,44 (CH₂, **C12**)
 32,09 (CH₂, **C11**)



63g

152,8 (CH, **C2**)
 152,7 (CH, **C4**)
 149,7 (CH, **C8**);
 135,3 (**C5**)
 129,1 (**C6**)
 114,3 (**CN**)

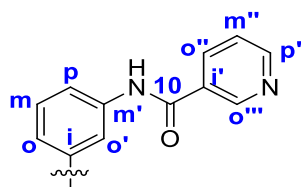
158,5 (**Cp**)
 126,3 (**Ci**)
 125,5 (CH, **Co**)
 115,4 (CH, **Cm**)
 66,20 (CH₂, **C13**)
 65,80 (CH₂, **C10**)
 56,90 (CH₂, **C11**)
 53,60 (CH₂, **C12**)



63h

152,9 (CH, **C2**)
 152,7 (**C4**)
 149,4 (CH, **C8**)
 135,6 (**C5**)
 129,4 (**C6**)
 114,3 (**CN**)

164,4 (**C10**)
 150,4 (**Cm''**)
 141,6 (**C7**)
 139,8 (**Cm'**)
 133,8 (**C1**)
 130,1 (CH, **Cm**)
 121,7 (CH, **Co''**)
 120,6 (CH, **Co**)
 119,6 (CH, **Cp**)
 115,8 (CH, **Co'**)



63i

152,9 (CH, **C2**)
 152,6 (**C4**)
 149,5 (CH, **C8**)
 135,5 (**C5**)
 129,4 (**C6**)
 114,3 (**CN**)

164,5 (**C10**)
 152,4 (CH, **Cp'**)
 148,8 (CH, **Co'''**)
 140,0 (**Cm'**)
 135,6 (CH, **Co''**)
 133,8 (**C1**)
 130,3 (**C7**)
 130,1 (CH, **Cm**)
 123,6 (**Cm''**)
 120,4 (CH, **Co**)
 119,4 (CH, **Cp**)
 115,7 (CH, **Co'**)

3.1.1.5. Síntese de Dihidropirimidopirimidinas **65**

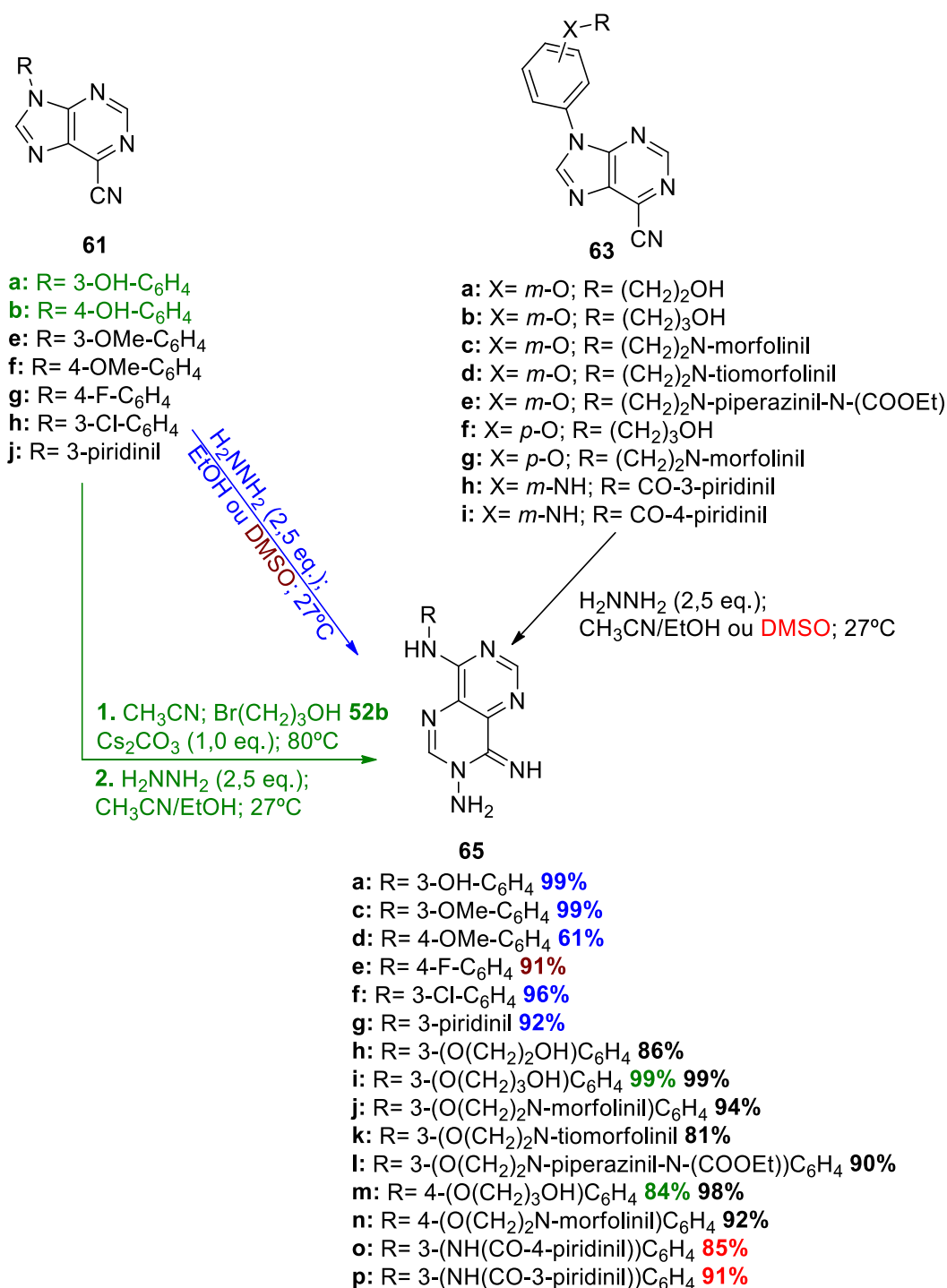
As dihidropirimidopirimidinas **65** foram obtidas por reação de 6-cianopurinas **61** e **63** com hidrazina **64**, a 27°C, com excelentes rendimentos seguindo procedimentos anteriormente reportados [61,62,65] (Esq. 12). Os derivados **65a-d** e **65f,g** foram obtidos por reação dos respectivos precursores **61a-f** e **61h,j** com hidrazina em EtOH nas condições já referidas ao final de 0,25-3h com excelentes rendimentos (92-99%). O produto **65d** foi isolado com um rendimento de 61% provavelmente por ser moderadamente solúvel em EtOH.

Uma vez que a solubilidade de certos produtos **65** em EtOH poderia vir a ser um problema para o seu isolamento, em alguns casos usou-se uma mistura de CH₃CN/EtOH como solvente da reação. O uso do CH₃CN, em conjunto com EtOH, permitiu uma precipitação mais eficaz dos produtos **65** das misturas reacionais. As sínteses de **65h-n** foram levadas a cabo aplicando-se uma mistura de CH₃CN/EtOH (2:1 ou 3:1) como solvente e os produtos foram obtidos ao final de 0,75-3h com excelentes rendimentos (81-99%).

Durante a síntese dos compostos **63b** e **63f** verificou-se que estes compostos eram muito solúveis e difíceis de isolar sendo obtidos com baixos rendimentos. Por esse motivo, pensou-se em criar um procedimento “one-pot” no qual os produtos **65** fossem obtidos diretamente a partir de **61** sem o isolamento de **63** evitando os problemas associados ao isolamento de **63**.

Assim, efetuaram-se alquilações de **61a** e **61b** com **52b**, como anteriormente. Ao fim de 1-2h (reação terminada), eliminou-se totalmente da mistura reacional quaisquer vestígios de **52b** por evaporação a pressão reduzida. Os resíduos resultantes das misturas reacionais foram então tratados com CH₃CN/EtOH (2:1) e hidrazina, a 27°C. Após 40-60 minutos de reação, foram isolados os produtos **65i,m** puros com excelentes rendimentos (99 e 84%, respetivamente). Da reação de **63b,f** com hidrazina, nas mesmas condições, verificou-se que, os mesmos produtos **65i,m** foram obtidos com rendimentos de 99 e 98%, respetivamente. Estes resultados mostraram-se interessantes na medida em que foi possível evitar o isolamento de **63b,f** tendo-se obtido os produtos **65i,m** com rendimentos semelhantes. Deve-se salientar que este procedimento só funciona se o agente alquilante **52** puder ser eliminado na totalidade da mistura reacional.

A baixa solubilidade dos reagentes **61g**, **63h** e **63i** em EtOH, fez com que nas sínteses de **65e,o,p** se efetuassem em DMSO para que a reação ocorresse. Os produtos foram obtidos com rendimentos superiores a 85% ao final de 20-90 minutos.

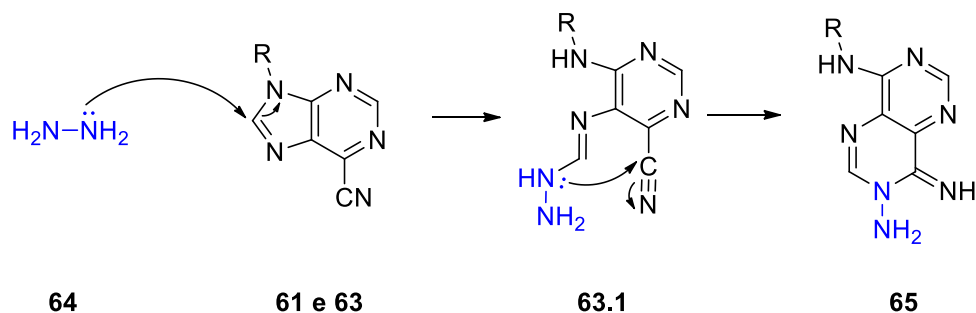


Esquema 12 – Síntese de dihidropirimidopirimidinas **65**

3.1.1.5.1. Mecanismo reacional

O mecanismo reacional para a síntese dos compostos **65** Já se encontra publicado pelo grupo de investigação [61,62,65]. Neste propõe-se que a hidrazina **64** ataca nucleofílicamente o C8 da purina **61/63** abrindo o anel de imidazole e gerando o intermediário **63.1**. Este reage intramolecularmente

por ataque do nitrogénio da hidrazina ao grupo nitrilo vizinho levando a uma ciclização 6-exo-dig e gerando o produto **65** (Esq. 13).



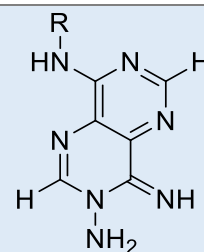
Esquema 13 – Mecanismo reacional de síntese de Dihidropirimidopirimidinas **65**

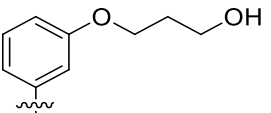
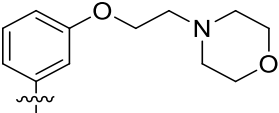
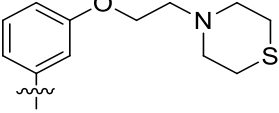
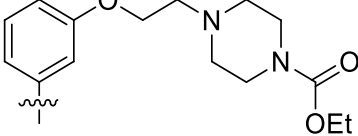
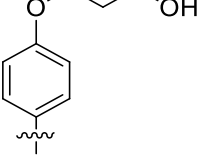
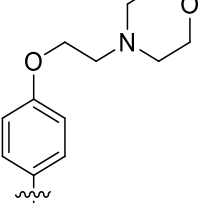
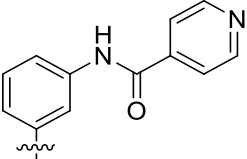
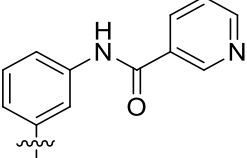
3.1.1.5.2. Caracterização física e espectroscópica dos compostos **65**

Os compostos **65a-f** já foram previamente caracterizados pelo grupo de investigação [61,62,65], e neste trabalho foram identificados por simples comparação dos seus espectros de ^1H RMN com o espectro de ^1H RMN de um padrão puro. Para a confirmação da estrutura e pureza dos derivados **65g-p** foi efetuada a caracterização por métodos físicos e espectroscópicos. Os dados físicos obtidos (tab 12) permitem verificar que o p.f. dos derivados **65** varia consideravelmente com o grupo **R**. Este apresentou valores entre 180-290°C com exceção do derivado **65i** que mostrou p.f. abaixo dos restantes compostos (155-158°C). Novamente, os dados analíticos experimentais não se conseguiram obter dentro do prazo de entrega deste trabalho.

Tabela 12 - Dados físicos e analíticos dos compostos **65**

R	Nº	η (%)	P.f. (°C)	Fórmula Molecular	Massa molar (g/mol)	C; H; N; S % Esperado* (obtido)
	65g	88	221-223	$\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{N}_8$	254,25	51,96; 3,96; 44,07
	65h	82	193-195	$\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{N}_7\text{O}_2$	313,31	53,67; 4,83; 31,29



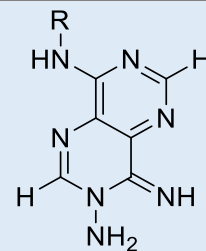
	65i	99	185-187	C ₁₅ H ₁₇ N ₇ O ₂	327,34	55,04; 5,23; 29,95
	65j	90	201-203	C ₁₈ H ₂₂ N ₈ O ₂	382,42	56,53; 5,80; 29,30
	65k	81	193-195	C ₁₈ H ₂₂ N ₈ OS	398,49	54,25; 5,56; 28,12; 8,05
	65l	90	155-158	C ₂₁ H ₂₇ N ₉ O ₃	453,50	55,62; 6,00; 27,80;
	65m	84	180-183	C ₁₅ H ₁₇ N ₇ O ₂	327,34	55,04; 5,23; 29,95
	65n	92	202-204	C ₁₈ H ₂₂ N ₈ O ₂	382,42	56,53; 5,80; 29,30
	65o	85	284-287	C ₁₈ H ₁₅ N ₉ O	373,37	57,90; 4,05; 33,76
	65p	91	288-289	C ₁₈ H ₁₅ N ₉ O	373,37	57,90; 4,05; 33,76

*Valores retirados do ChemDraw Ultra (12.0.2.1076)

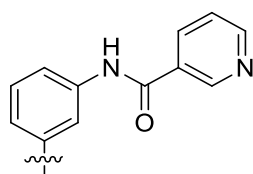
IV

A análise dos espectros de IV, registados na tabela 13, dos compostos **65** permitiu confirmar a ausência da banda correspondente ao CN (2260-2209 cm⁻¹) dos precursores **61** e **63**. Observa-se ainda o aparecimento de bandas correspondentes a grupos amina, NH e NH₂, na zona entre 3500-3070 cm⁻¹. Na zona compreendida entre 2300-1500 cm⁻¹, os espectros apresentam padrões semelhantes aos respetivos precursores **61** e **63**.

Tabela 13 - Dados espectroscópicos de FTIR dos compostos **65** (cm^{-1})



R	Nº	3600-3000	2300-1500
	65g	3347 (m); 3284 (m); 3052 (f);	1642 (i); 1601 (i); 1549 (i); 1530 (i);
	65h	3361 (f); 3325 (f); 3254 (m); 3175 (f);	1638 (m); 1601 (i); 1579 (i); 1553 (i); 1527 (i);
	65i	3358 (m); 3325 (m); 3295 (m); 3250 (m); 3168 (m);	1739 (f); 1649 (m); 1601 (i); 1583 (i); 1553 (i); 1534 (i); 1504 (i);
	65j	3323 (m); 2349 (m); 3074 (f); 3039 (f);	1649 (m); 1605 (i); 1570 (m); 1560 (i); 1532 (i);
	65k	3317 (m); 2350 (m); 3067 (f); 3045 (f);	1646 (m); 1609 (i); 1571 (m); 1557 (i); 1538 (i);
	65l	3340 (m); 3291 (f); 3235 (i); 3179 (f); 3086 (f); 3037 (f);	1698 (i); 1650 (m); 1605 (i); 1583 (i); 1557 (i); 1538 (i);
	65m	3360 (m); 3323 (m); 3292 (m); 3250 (m); 3170 (m);	1740 (f); 1642 (m); 1605 (i); 1580 (i); 1553 (i); 1534 (i); 1504 (i);
	65n	3310 (m); 2331 (m); 3069 (f); 3047 (f);	1648 (m); 1607 (i); 1570 (m); 1558 (i); 1540 (i);
	65o	3377 (m); 3351 (m); 3265 (f); 3071 (f); 3041 (m);	1698 (i); 1642 (m); 1609 (i); 1509 (i); 1549 (i); 1534 (i); 1504 (i);



65p

3309 (m); 3257 (m);
3023 (f);

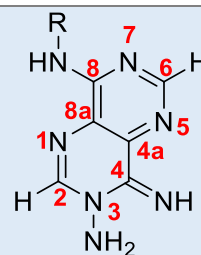
1697 (i); 1646 (f); 1612 (i);
1595 (i); 1565 (i); 1534 (i);

¹H RMN

A análise dos dados de ¹H RMN (Tab 14) mostraram os sinais correspondentes aos prótons H2 e H6 característicos da estrutura **65**. Estes foram detetados como singletos a $\delta \approx 8,17$ e $8,56$ ppm, respetivamente. Além destes, também se detetou, em todos os derivados **65**, os sinais correspondentes ao NH ligado a C8, C4 e NH₂ ligado a N3 a $\delta \approx 9,55$; $8,38$ e $5,79$ ppm, respetivamente. Os sinais da amina primária ligada a N3 e a amina secundária ligada a C8, servem como sinais de referência para a identificação da estrutura **65**. Destaca-se que quando **R** não é um dador forte (**65g,o,p**) o próton N⁸H desloca-se para δ por volta de 10 ppm.

Os restantes prótons dos grupos **R** foram atribuídos por comparação com os sinais dos precursores **61** e **63**. Na grande maioria, verificou-se uma mudança do desvio químico, nos sinais correspondentes aos prótons aromáticos de **R**, associada à modificação do núcleo de purina para dihidropirimidopirimidina.

Tabela 14 – Dados espectroscópicos de ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) dos compostos **65**



R	N^o	N⁸H/H6/ N⁴H/H2/NH₂	R
	65g	9,94 (s, 1H, N⁸H)	9,05 (d, 1H, J= 2,4 Hz, Ho')
		8,55 (s, 1H, H6)	8,34 (ddd, 1H, J= 1,6; 2,4; 8,0 Hz, Ho)
		8,42 (sl, 1H, N⁴H)	8,28 (dd, 1H, J= 1,6; 4,8 Hz, Hp)
		8,20 (s, 1H, H2)	7,37 (dd, 1H, J= 4,8; 8,0 Hz, Hm)
		5,80 (s, 2H, NH₂)	
	65h	9,55 (sl, 1H, N⁸H)	7,66 (t, 1H, J= 2,0 Hz, Ho')
		8,56 (s, 1H, H6)	7,50 (dd, 1H, J= 2,0; 8,0 Hz, Ho)
		8,38 (sl, 1H, N⁴H)	7,23 (t, 1H, J= 8,0 Hz, Hm)
		8,17 (s, 1H, H2)	6,66 (dd, 1H, J= 2,0; 8,0 Hz, Hp)
		5,79 (s, 2H, NH₂)	4,88 (sl, 1H, OH)
			3,97 (t, 2H, J= 5,2 Hz, H10)
	3,72 (q, 2H, J= 5,2; 4,8 Hz, H11)		

	65i	9,56 (sl, 1H, N⁸H) 8,56 (s, 1H, H6) 8,38 (sl, 1H, N⁴H) 8,18 (s, 1H, H2) 5,79 (s, 2H, NH₂)	7,64 (t, 1H, J= 2,0 Hz, Ho') 7,50 (dd, 1H, J= 2,0; 8,0 Hz, Ho) 7,23 (t, 1H, J= 8,0 Hz, Hm) 6,66 (dd, 1H, J= 2,0; 8,0 Hz, Hp) 4,55 (t, 1H, J= 5,2 Hz, OH) 4,02 (t, 2H, J= 6,4 Hz, H10) 3,55 (t, 2H, J= 6,4 Hz, H12) 1,86 (quint, 2H, J= 6,4 Hz, H11)
	65j	9,54 (sl, 1H, N⁸H) 8,55 (s, 1H, H6) 8,39 (sl, 1H, N⁴H) 8,17 (s, 1H, H2) 5,78 (s, 2H, NH₂)	7,63 (t, 1H, J= 2,0 Hz, Ho') 7,52 (dd, 1H, J= 2,0; 8,0 Hz, Ho) 7,23 (t, 1H, J= 8,0 Hz, Hm) 6,66 (dd, 1H, J= 2,0; 8,0 Hz, Hp) 4,18 (t, 2H, J= 6,0 Hz, H10) 3,57 (t, 4H, J= 4,8 Hz, H13) 2,73 (t, 2H, J= 6,0 Hz, H11) 2,49 (t, 4H, J= 4,8 Hz, H12)
	65k	9,52 (sl, 1H, N⁸H) 8,55 (s, 1H, H6) 8,38 (sl, 1H, N⁴H) 8,17 (s, 1H, H2) 5,78 (s, 2H, NH₂)	7,62 (t, 1H, J= 2,0 Hz, Ho') 7,52 (dd, 1H, J= 2,0; 8,0 Hz, Ho) 7,22 (t, 1H, J= 8,0 Hz, Hm) 6,65 (dd, 1H, J= 2,0; 8,0 Hz, Hp) 4,05 (t, 2H, J= 5,6 Hz, H10) 2,74 (m, 6H, H11; H12) 2,59 (t, 4H, J= 4,8 Hz, H13)
	65l	9,54 (sl, 1H, N⁸H) 8,55 (s, 1H, H6) 8,38 (sl, 1H, N⁴H) 8,17 (s, 1H, H2) 5,78 (s, 2H, NH₂)	7,62 (t, 1H, J= 2,0 Hz, Ho') 7,51 (dd, 1H, J= 2,0; 8,0 Hz, Ho) 7,23 (t, 1H, J= 8,0 Hz, Hm) 6,66 (dd, 1H, J= 2,0; 8,0 Hz, Hp) 4,01 (t, 2H, J= 5,6 Hz, H10) 4,02 (q, 2H, J= 7,2 Hz, OEt) 3,35 (t, 4H, J= 4,8 Hz, H13) 2,72 (t, 2H, J= 5,6 Hz, H11) 2,44 (t, 4H, J= 4,8 Hz, H12) 1,16 (t, 3H, J= 7,2 Hz, OEt)
	65m	9,55 (sl, 1H, N⁸H) 8,46 (s, 1H, H6) 8,39 (sl, 1H, N⁴H) 8,16 (s, 1H, H2) 5,77 (s, 2H, NH₂)	7,75 (d, 1H, J= 9,2 Hz, Ho) 6,90 (d, 1H, J= 9,2 Hz, Hm) 4,54 (t, 1H, J= 5,2 Hz, OH) 4,01 (t, 2H, J= 6,4 Hz, H10) 3,55 (t, 2H, J= 6,4 Hz, H12) 1,84 (quint, 2H, J= 6,4 Hz, H11)
	65n	9,53 (sl, 1H, N⁸H) 8,44 (s, 1H, H6) 8,39 (sl, 1H, N⁴H) 8,14 (s, 1H, H2) 5,74 (s, 2H, NH₂)	7,52 (d, 1H, J= 8,8 Hz, Ho) 7,12 (d, 1H, J= 8,8 Hz, Hm) 4,05 (t, 2H, J= 6,0 Hz, H10) 3,57 (t, 4H, J= 4,8 Hz, H13) 2,66 (t, 2H, J= 6,0 Hz, H11) 2,45 (t, 4H, J= 4,8 Hz, H12)
	65o	10,2 (sl, 1H, N⁸H) 8,54 (s, 1H, H6) 8,38 (sl, 1H, N⁴H) 8,16 (s, 1H, H2)	9,18 (s, 1H, N¹⁰H) 8,78 (dd, 2H, J= 1,6; 4,8 Hz, Hm'') 8,27 (s, 1H, Ho') 7,87 (dd, 2H, J= 1,6; 4,8 Hz, Ho'')

	5,69 (s, 2H, NH₂)	7,60 (dd, 1H, J= 2,0; 8,0 Hz, Ho)
		7,53 (dd, 1H, J= 2,0; 8,0 Hz, Hp)
65p		7,34 (t, 1H, J= 8,0 Hz, Hm)
		9,18 (s, 1H, N¹⁰H)
	10,2 (sl, 1H, N⁸H)	9,11 (d, 1H, J= 1,2 Hz, Ho''')
	8,54 (s, 1H, H6)	8,73 (dd, 1H, J= 2,0; 4,8 Hz, Ho'')
	8,38 (sl, 1H, N⁴H)	8,3-8,27 (m, 2H, Ho' ; Hp')
	8,16 (s, 1H, H2)	7,60 (dd, 1H, J= 2,0; 8,0 Hz, Ho)
	5,69 (s, 2H, NH₂)	7,54-7,49 (m, 2H, Hm'' ; Hp)
		7,34 (t, 1H, J= 8,0 Hz, Hm)

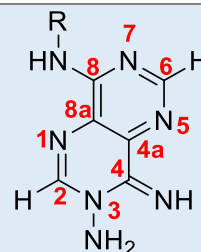
¹³C RMN

A análise dos espectros de ¹³C RMN dos compostos **65** (Tab 15) permitiu confirmar o número de carbonos esperados e identificar os sinais correspondentes aos carbonos característicos da estrutura. São estes o C8, C4, C6, C2, C4a e C8a que apresentam valores de δ aproximadamente a 156,6; 156,0; 154,8; 148,3; 138,3 e 125,6, respetivamente. Os resultados mostraram que estes não são influenciados pelo grupo **R**, uma vez que todos os derivados **65** mostraram os sinais descritos com desvios químicos praticamente iguais. Destaca-se ainda a ausência do sinal a $\delta = 114$ ppm correspondente ao CN dos precursores **61** e **63**.

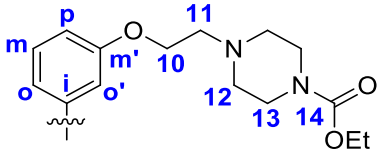
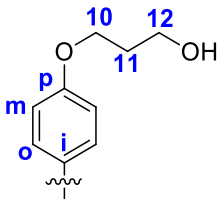
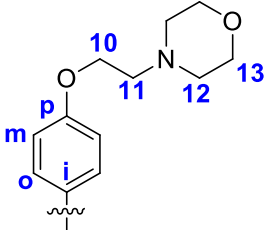
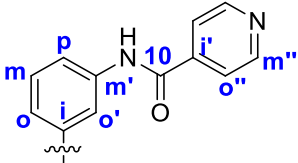
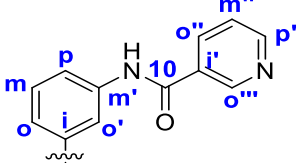
Os carbonos do núcleo de pirimidopirimidina foram identificados por análise conjunta dos espectros de HMQC e HMBC. Por HMBC foi possível identificar o C2 e C4 pela sua correlação com o grupo NH₂. Uma vez identificado o C2, a correlação do seu protão (H2) permitiu identificar C8a a 3 ligações e C4a 4 ligações. O C8a foi ainda detetado pela sua correlação com o N⁸H, que também mostrou correlação com C6. Em conjunto, a atribuição dos sinais do núcleo reflete as estruturas atribuídas e justifica posição dos grupos NH₂ e NH.

A atribuição dos sinais correspondentes ao grupo **R** foi levada a cabo por comparação com os precursores **61** e **63** e por correlações bidimensionais de protão-carbono (HMQC e HMBC).

Tabela 15 – Dados espectroscópicos de ^{13}C RMN (100 MHz, DMSO-d_6) dos compostos **65**



R	Nº	C8/C4/C6/C2/C4a/C8a	R
	65g	156,8 (C8)	144,2 (CH, Cp)
		155,9 (C4)	143,2 (CH, Co')
		154,6 (CH, C6)	135,4 (Ci)
		148,3 (CH, C2)	128,4 (CH, Co)
		138,6 (C4a)	123,2 (CH, Cm)
		125,6 (C8a)	
	65h	156,6 (C8)	158,9 (Cm')
		156,0 (C4)	139,8 (Ci)
		154,8 (CH, C6)	129,3 (CH, Cm)
		148,3 (CH, C2)	113,5 (CH, Co)
		138,3 (C4a)	109,4 (CH, Cp)
		125,6 (C8a)	107,7 (CH, Co')
	65i	156,6 (C8)	69,51 (CH ₂ , C10)
		156,0 (C4)	59,63 (CH ₂ , C11)
		154,8 (CH, C6)	158,9 (Cm')
		148,3 (CH, C2)	139,7 (Ci)
		138,3 (C4a)	129,3 (CH, Cm)
		125,6 (C8a)	113,5 (CH, Co)
	65j	156,5 (C8)	109,4 (CH, Cp)
		156,0 (C4)	107,6 (CH, Co')
		154,8 (CH, C6)	66,20 (CH ₂ , C13)
		148,3 (CH, C2)	65,20 (CH ₂ , C10)
		138,2 (C4a)	57,10 (CH ₂ , C11)
		125,5 (C8a)	53,60 (CH ₂ , C12)
	65k	156,5 (C8)	158,6 (Cm')
		155,9 (C4)	139,8 (Ci)
		154,8 (CH, C6)	129,3 (CH, Cm)
		148,3 (CH, C2)	113,5 (CH, Co)
		138,2 (C4a)	109,5 (CH, Cp)
		125,5 (C8a)	107,6 (CH, Co')

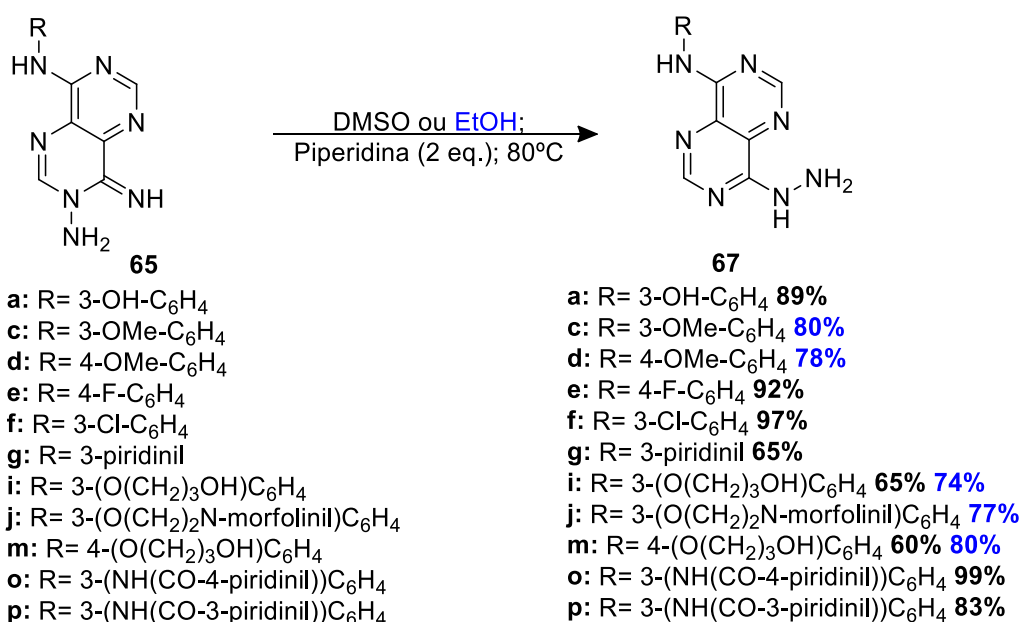
	65l	156,6 (C8) 156,1 (C4) 154,8 (CH, C6) 148,3 (CH, C2) 138,2 (C4a) 125,5 (C8a)	54,83 (CH ₂ , C12) 27,16 (CH ₂ , C13) 158,6 (Cm') 154,7 (C14) 139,8 (Cl) 129,3 (CH, Cm) 113,5 (CH, Co) 109,5 (CH, Cp) 107,7 (CH, Co') 65,33 (CH ₂ , C10) 60,75 (CH ₂ , OEt) 56,54 (CH ₂ , C11) 52,76 (CH ₂ , C12)
	65m	156,6 (C8) 156,1 (C4) 154,9 (CH, C6) 148,1 (CH, C2) 138,0 (C4a) 125,3 (C8a)	155,1 (CH, Cp) 131,5 (CH, Cl) 123,2 (CH, Co) 114,2 (CH, Cm) 65,75 (CH ₂ , C10) 57,37 (CH ₂ , C12) 32,20 (CH ₂ , C11)
	65n	156,9 (C8) 156,4 (C4) 155,3 (CH, C6) 148,5 (CH, C2) 138,1 (C4a) 125,7 (C8a)	155,2 (CH, Cp) 131,2 (CH, Cl) 123,6 (CH, Co) 114,7 (CH, Cm) 66,40 (CH ₂ , C13) 65,72 (CH ₂ , C10) 57,27 (CH ₂ , C11) 53,85 (CH ₂ , C12)
	65o	156,3 (C8) 155,4 (C4) 154,3 (CH, C6) 147,5 (CH, C2) 137,8 (C4a) 125,1 (C8a)	163,7 (C10) 150,2 (CH, Cm'') 141,9 (Cl) 138,7 (Cl) 138,3 (Cm') 128,2 (CH, Cm) 121,6 (CH, Co'') 116,8 (CH, Co) 116,1 (CH, Cp) 113,6 (CH, Co')
	65p	156,3 (s, C8) 155,4 (s, C4) 154,3 (s, CH, C6) 147,5 (s, CH, C2) 137,8 (s, C4a) 125,1 (s, C8a)	163,7 (C10) 151,5 (CH, Co'') 148,2 (CH, Co''') 138,7 (Cl) 138,3 (Cm') 134,8 (CH, Cp') 130,3 (Cl) 128,2 (CH, Cm) 122,8 (CH, Cm'') 116,8 (CH, Co) 116,1 (CH, Cp) 113,6 (CH, Co')

3.1.1.6. Síntese de 4-Hidrazinopirimidopirimidinas **67**

Compostos de estrutura **67**, 4-hidrazinopirimidopirimidinas, foram obtidas anteriormente por reação de **65** com excesso de piperidina **66** em DMSO ou EtOH a 80°C [61,62,65]. Estas foram obtidas com rendimentos bons a excelentes dependendo da solubilidade do produto final. No trabalho agora realizado (Esq. 14) usou-se a abordagem sintética desenvolvida anteriormente tendo-se verificado que os tempos de reação variaram entre 0,75 a 25h, dependendo do solvente usado. Para reagentes **65** mais insolúveis (**65a,e,f,g** e **65o,p**) usou-se DMSO como solvente e os produtos foram isolados após 2-18h, com a exceção de **67a** que foi isolado ao fim de 45min. Neste caso, após 45 minutos de reação, precipitou de solução um sólido laranja que foi imediatamente isolado com 89% de rendimento. Este foi o único caso em que se verificou esta particularidade.

Os reagentes **65i,m** foram usados para estabelecer/otimizar as condições de aromatização para os derivados mais solúveis (**65c,d,i,j,m**). Numa primeira tentativa, usou-se EtOH como solvente de reação e foi possível isolar os produtos **67i,m** ao fim de 16-25h com rendimentos superiores a 74%. Num segundo ensaio, quando se usou DMSO como solvente, nas mesmas condições obteve-se, ao final de 1-6h, os produtos **67i,m** com rendimentos entre 60 e 65%.

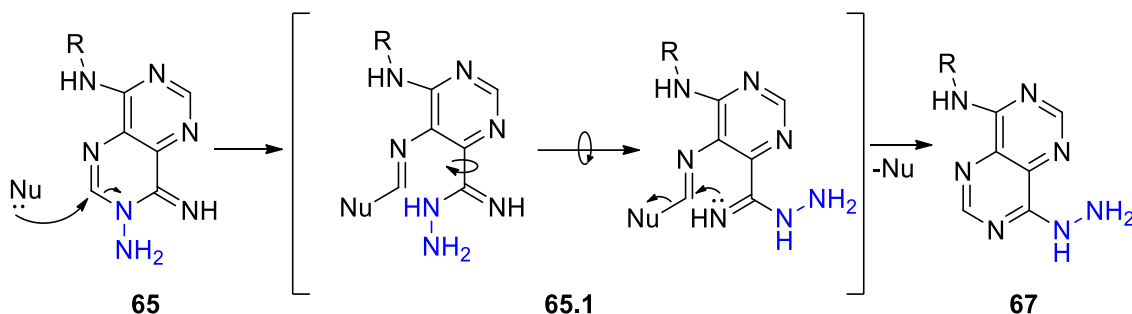
Estes resultados mostram que, apesar de a reação ser mais rápida em DMSO, perde-se rendimento devido à elevada solubilidade dos produtos **67i,m** nas condições de isolamento. A utilização de EtOH permite isolar o produto mais facilmente, ainda que a reação seja mais lenta. O EtOH como solvente, foi usado como solvente com os reagentes **65c,d,j** tendo-se obtido os respetivos produtos **67c,d,j** com rendimentos entre 77-80% ao final de 17-18h.



Esquema 14 – Síntese de 4-Hidrazinopirimidopirimidinas **67**

3.1.1.6.1. Mecanismo reacional

Novamente, a proposta mecanística para síntese dos produtos **67** Já se encontra reportada [61,62,65]. Quando os compostos **65** são colocados na presença de um nucleófilo de nitrogénio **66**, este ataca o C2 de **65** abrindo o anel da dihidropirimidopirimidina e gerando o intermediário **65.1**. Após rotação do grupo amidina de **65.1** ocorre o fecho do novo anel de pirimidina com eliminação do nucleófilo e formação do produto aromático **67** (Esq. 15).



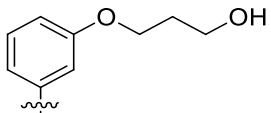
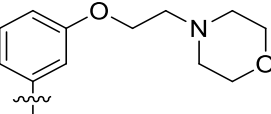
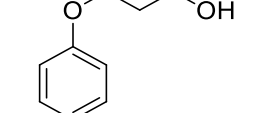
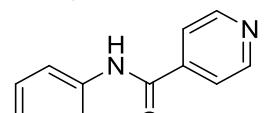
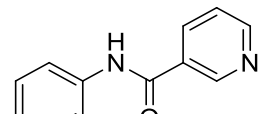
Esquema 15 – Mecanismo reacional de síntese de 4-Hidrazinopirimidopirimidinas **67**

3.1.1.6.2. Caracterização física analítica e espectroscópica

Os compostos **67a-f** tendo já sido previamente caracterizados pelo grupo [61,62,65], foram identificados por simples comparação com o espectro de ^1H RMN de um padrão puro. Para a confirmação da estrutura e pureza dos derivados **67g-n** foi efetuada a caracterização por métodos físicos e espectroscópicos. A análise dos dados de p.f. dos compostos **67** (tab 16) mostra que os p.f. destes compostos parecem ser geralmente superiores aos respetivos precursores **65**. Os valores registados de p.f. variaram entre 214-280°C com exceção do derivado **67j** que mostrou p.f. mais baixo que o seu precursor **65j**, 150-152°C e 201-203°C, respetivamente. Novamente, os dados analíticos experimentais não se conseguiram obter dentro do prazo de entrega deste trabalho.

Tabela 16 - Dados físicos e analíticos dos compostos **67**

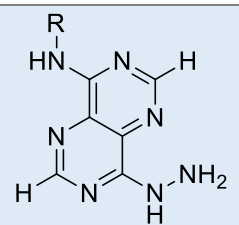
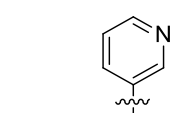
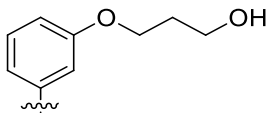
R	Nº	η (%)	P.f. (°C)	Fórmula Molecular	Massa molar (g/mol)	C; H; N; S % Esperado* (obtido)
	67g	65	278-280	C ₁₁ H ₁₀ N ₈	254,25	51,96; 3,96; 44,07

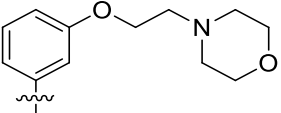
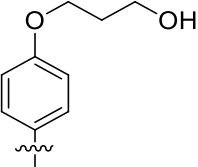
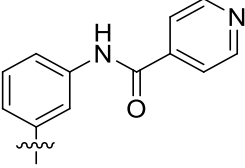
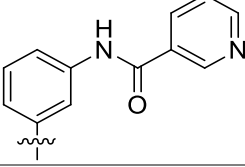
	67i	74	222-225	C ₁₅ H ₁₇ N ₇ O ₂	327,34	55,04; 5,23; 29,95
	67j	77	150-152	C ₁₈ H ₂₂ N ₈ O ₂	382,42	56,53; 5,80; 29,30
	67m	80	214-220	C ₁₅ H ₁₇ N ₇ O ₂	327,34	55,04; 5,23; 29,95
	67o	83	272-275	C ₁₈ H ₁₅ N ₉ O	373,37	57,90; 4,05; 33,76
	67p	99	276-279	C ₁₈ H ₁₅ N ₉ O	373,37	57,90; 4,05; 33,76

*Valores retirados do ChemDraw Ultra (12.0.2.1076)

IV

A análise por IV dos derivados **67** (tab 17) permitiu identificar padrões semelhantes aos percussores **65**, nas zonas 3600-3000 cm⁻¹ e 2300-1500 cm⁻¹, resultado da sua similaridade estrutural. Foram detetadas bandas na zona 3500-3070 cm⁻¹ correspondentes a grupos NH e NH₂.

Tabela 17 - Dados espectroscópicos de infravermelho dos compostos 67 (cm ⁻¹)			
R	Nº	3600-3000 cm⁻¹	2300-1500 cm⁻¹
	67g	3201 (f); 3168 (f); 3041 (m);	1594 (i); 1557 (i); 1530 (i);
	67i	3358 (m); 3250 (m); 3168 (m);	1601 (i); 1583 (i); 1553 (i); 1534 (i);

	67j	3355 (m); 3287 (m); 3261 (m);	1608 (i); 1590 (i); 1568 (i); 1534 (i);
	67m	3360 (m); 3250 (m); 3170 (m);	1605 (i); 1580 (i); 1553 (i); 1534 (i);
	67o	3411 (f); 3317 (m); 3265 (m); 3041 (f);	1676 (i); 1653 (m); 1612 (m); 1586 (m); 1530 (i);
	67p	3310 (m); 3258 (m); 3023 (f);	1687 (i); 1642 (f); 1612 (i); 1590 (i); 1564 (i); 1534 (i);

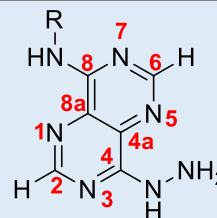
¹H RMN

A análise dos espectros de ¹H RMN dos compostos **67** (tabela 18) permitiu detetar os sinais correspondentes aos prótons característicos do núcleo de pirimidopirimidina **67**, H2 e H6, como singletos a $\delta \approx 8,55$ e $8,50$ ppm, respetivamente. Verificou-se ainda que o desvio químico da amina ligada a C8 varia em função de **R**. Quando este é um grupo dador fraco o sinal surgiu a um valor de $\delta \approx 9,9$ ppm (**67g,o,p**) e quando **R** é um grupo dador mais forte o mesmo sinal surgiu a valores de δ entre $9,8-9,6$ ppm (**67i-m**). Os prótons dos diversos grupos **R** foram atribuídos por comparação com os respetivos percursos **65** e em regra geral não sofreram mudanças de desvio químico significativas.

As principais evidências que justificam a estrutura **67** são a mudança de desvio químico do próton H2 e dos grupos N⁴H e NH₂ face aos respetivos percursos **65**. O sinal correspondente ao próton H2 dos derivados **67** apresentou um valor de δ superior aos derivados **65** ($8,55$ e $8,15$ ppm, respetivamente). O mesmo efeito foi detetado no grupo N⁴H que em **67** surge a $\delta \approx 9,7$ ppm e nos compostos **65** surge a $\delta \approx 8,4$ ppm. Por fim, o grupo NH₂ dos derivados **67** surge como um singletto/banda larga a $\delta \approx 5,0$ ppm. Nos compostos **65** o mesmo grupo apresenta-se como um singletto aguçado a $\delta \approx 5,8$ ppm.

Em conjunto, os dados obtidos permitiram identificar sinais caraterísticos dos derivados **67** apoiando as estruturas propostas. A comparação com os resultados do capítulo anterior foi necessária para esta atribuição uma vez que as estruturas **67** e **65** são isoméricas.

Tabela 18 – Dados espectroscópicos de ^1H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) dos compostos **67**



R	N ^o	N ^o H/N ⁴ H/H6/H2/NH ₂	R
	67g	9,87 (s, 1H, N⁸H) 9,70 (sl, 1H, N⁴H) 8,55 (s, 1H, H6) 8,51 (s, 1H, H2) 5,02 (sl, 2H, NH₂)	9,05 (d, 1H, J= 2,4 Hz, Hσ') 8,34 (ddd, 1H, J= 1,6; 2,4; 8,0 Hz, Ho) 8,28 (dd, 1H, J= 1,6; 4,8 Hz, Hρ) 7,37 (dd, 1H, J= 4,8; 8,0 Hz, Hm)
	67i	9,78 (s, 1H, N⁸H) 9,74 (s, 1H, N⁴H) 8,58 (s, 1H, H6) 8,50 (s, 1H, H2) 5,01 (sl, 2H, NH₂)	7,72 (t, 1H, J= 2,0 Hz, Hσ') 7,57 (dd, 1H, J= 2,0; 8,0 Hz, Ho) 7,24 (t, 1H, J= 8,0 Hz, Hm) 6,67 (dd, 1H, J= 2,0; 8,0 Hz, Hρ) 4,58 (t, 1H, J= 5,2 Hz, OH) 4,04 (t, 2H, J= 6,4 Hz, H$_{10}$) 3,56 (t, 2H, J= 6,4 Hz, H$_{12}$) 1,88 (quint, 2H, J= 6,4 Hz, H$_{11}$)
	67j	9,68 (s, 1H, N⁸H) 9,67 (sl, 1H, N⁴H) 8,54 (s, 1H, H6) 8,46 (s, 1H, H2) 5,03 (sl, 2H, NH₂)	7,63 (s, 1H, Hσ'); 7,50 (d, 1H, J= 8,0 Hz, Ho) 7,24 (t, 1H, J= 8,0 Hz, Hm) 6,66 (dd, 1H, J= 2,0; 8,0 Hz, Hρ) 4,06 (t, 2H, J= 6,0 Hz, H$_{10}$) 3,55 (t, 4H, J= 4,8 Hz, H$_{13}$) 2,67 (t, 2H, J= 6,0 Hz, H$_{11}$) 2,49 (t, 4H, J= 4,8 Hz, H$_{12}$)
	67m	9,77 (s, 1H, N⁸H) 9,65 (sl, 1H, N⁴H) 8,48 (s, 2H, H6, H2) 4,86 (sl, 2H, NH₂)	7,83 (d, 2H, J= 9,2 Hz, Hm) 6,93 (d, 2H, J= 9,2 Hz, Ho) 4,55 (t, 1H, J= 5,2 Hz, OH) 4,02 (t, 2H, J= 6,4 Hz, H$_{10}$) 3,56 (t, 2H, J= 6,4 Hz, H$_{12}$) 1,85 (quint, 2H, J= 6,4 Hz, H$_{11}$)
	67o	9,86 (sl, 1H, N⁸H) 9,30 (sl, 1H, N⁴H) 8,56 (s, 1H, H6) 8,51 (s, 1H, H2) 5,00 (sl, 2H, NH₂)	10,6 (s, 1H, N¹⁰H) 8,78 (s, 2H, J= 1,6; 4,8 Hz, Hm'') 8,46 (t, 1H, J= 2,0 Hz, Hσ') 7,87 (s, 2H, J= 1,6; 4,8 Hz, Hσ'') 7,66 (dd, 1H, J= 2,0; 8,0 Hz, Ho) 7,52 (dd, 1H, J= 2,0; 8,0 Hz, Hρ) 7,36 (t, 1H, J= 8,0 Hz, Hm)
	67p	9,83 (s, 1H, N⁸H) 9,72 (sl, 1H, N⁴H) 8,56 (s, 1H, H6) 8,51 (s, 1H, H2) 4,88 (sl, 2H, NH₂)	10,5 (s, 1H, N¹⁰H) 9,10 (d, 1H, J= 2,0 Hz, Hσ''') 8,75 (dd, 1H, J= 2,0; 4,8 Hz, Hρ') 8,43 (t, 1H, J= 2,0 Hz, Hσ') 8,29 (dt, 1H, J= 2,0; 8,0 Hz, Hσ'') 7,64 (ddd, 1H, J= 1,2; 2,0; 8,0 Hz, Ho) 7,56 (dd, 1H, J= 4,8; 8,0 Hz, Hm'') 7,52 (ddd, 1H, J= 1,2; 2,0; 8,0 Hz, Hρ) 7,35 (t, 1H, J= 8,0 Hz, Hm)

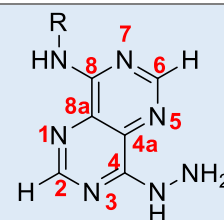
¹³C RMN

A análise dos espectros de ¹³C RMN (tabela 19) permitiu detectar os sinais correspondentes aos carbonos característicos dos compostos **67**. À semelhança dos derivados **65** os carbonos do núcleo de pirimidopirimidina apresentam a mesma numeração, contudo o desvio químico de alguns dos sinais e as suas correlações prótão-carbono são fatores determinantes para a distinção entre **67** e **65**. São estes o C8, C4, C2, C6, C4a e C8a que geralmente se detetam a valores de δ aproximadamente a 157,0; 156,0; 155,0; 153,5; 131,6 e 131,0, respetivamente.

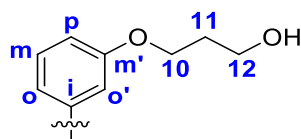
Os carbonos do núcleo de pirimidopirimidina foram identificados por análise conjunta dos espectros bidimensionais (HMQC e HMBC). Foi possível identificar o C6 e C8a pela sua correlação com o grupo N⁸H. Uma vez identificado o C6, a correlação do seu prótão (H6) permitiu identificar C4a a 3 ligações e confirmar C8a 4 ligações. A identificação de C8a permitiu identificar C2 dado que apresentava correlação com o prótão H2. Uma vez identificado o C2, foi possível confirmar o desvio químico de C4 por correlação com o H2. Em conjunto, a atribuição dos sinais do núcleo reflete as estruturas atribuídas e confirma o rearranjo de Dimroth.

Verificou-se ainda que o C2 dos derivados **67** apresentou um δ semelhante ao C6, uma vez que estes se encontram em ambiente químico semelhante, resultado da aromatização do sistema. Em **65** o mesmo carbono (C2) foi detetado a $\delta \approx 148$ ppm (não aromático). Além desta particularidade, as variações de C4a e C8a são as evidências claras que diferenciam as estruturas **67** e **65**. O C4a apresenta $\delta \approx 132$ ppm em **67** e 138 ppm em **65** e o C8a apresenta $\delta \approx 131$ e 125,6 ppm, respetivamente. Em conjunto, estas variações de desvio químico entre os carbonos comuns das estruturas **67** e **65** (C2, C4a e C8a) permitem comprovar com clareza as estruturas **67** atribuídas e justificam o rearranjo de Dimroth e conseqüente aromatização do anel heterocíclico.

Tabela 19 – Dados espectroscópicos de ¹³C RMN (100 MHz, DMSO_{d6}) dos compostos **67**



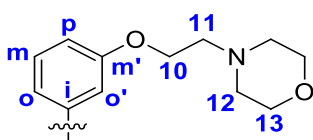
R	N ^o	C8/C4/C2/C6/C4a/C8a	R
	67g	157,0 (C8)	144,2 (CH, Cp')
		156,3 (C4)	143,2 (CH, Co')
		155,0 (CH, C2)	135,4 (Cj)
		153,4 (CH, C6)	128,4 (CH, Co)
		131,6 (C4a)	123,2 (CH, Cm)
		131,0 (C8a)	



67i

156,9 (**C8**)
 157,2 (**C4**)
 154,9 (CH, **C2**)
 153,5 (CH, **C6**)
 131,7 (**C4a**)
 130,9 (**C8a**)

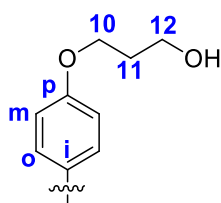
156,2 (**Cm'**)
 131,5 (**Ci**)
 129,3 (CH, **Cm**)
 113,4 (CH, **Co**)
 109,5 (CH, **Cp**)
 107,6 (CH, **Co'**)
 64,60 (CH₂, **C10**)
 57,40 (CH₂, **C12**)
 32,10 (CH₂, **C11**)



67j

157,3 (**C8**)
 156,3 (**C4**)
 155,5 (CH, **C2**)
 153,7 (CH, **C6**)
 131,6 (**C4a**)
 131,0 (**C8a**)

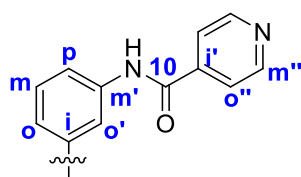
158,8 (**Cm'**)
 139,8 (**Ci**)
 129,6 (CH, **Cm**)
 113,7 (CH, **Co**)
 109,8 (CH, **Cp**)
 107,8 (CH, **Co'**)
 66,30 (CH₂, **C13**)
 65,40 (CH₂, **C10**)
 57,20 (CH₂, **C11**)
 53,80 (CH₂, **C12**)



67m

157,2 (**C8**)
 156,2 (**C4**)
 154,6 (CH, **C2**)
 153,7 (CH, **C6**)
 131,5 (**C4a**)
 130,8 (**C8a**)

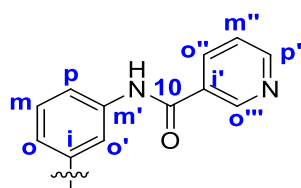
155,1 (CH, **Cp**)
 131,3 (CH, **Ci**)
 123,1 (CH, **Co**)
 114,2 (CH, **Cm**)
 66,74 (CH₂, **C10**)
 57,35 (CH₂, **C12**)
 32,17 (CH₂, **C11**)



67o

157,1 (**C8**)
 156,3 (**C4**)
 154,9 (CH, **C2**)
 153,5 (CH, **C6**)
 131,6 (**C4a**)
 130,9 (**C8a**)

164,0 (**C10**)
 150,2 (CH, **Cm''**)
 141,9 (**Ci'**)
 138,8 (**Ci**)
 138,7 (**Cm'**)
 128,7 (CH, **Cm**)
 121,6 (CH, **Co''**)
 116,7 (CH, **Co**)
 116,3 (CH, **Cp**)
 113,9 (CH, **Co'**)



67p

157,3 (**C8**)
 156,4 (**C4**)
 154,9 (CH, **C2**)
 153,6 (CH, **C6**)
 131,6 (**C4a**)
 130,9 (**C8a**)

164,2 (**C10**)
 152,2 (CH, **Co''**)
 148,7 (CH, **Co'''**)
 138,9 (**Cm'**)
 138,8 (**Ci**)
 135,6 (CH, **Cp'**)
 130,7 (**Ci'**)
 128,8 (CH, **Cm**)
 123,6 (CH, **Cm''**)
 117,6 (CH, **Co**)
 116,3 (CH, **Cp**)
 113,9 (CH, **Co'**)

3.1.2. Síntese e caracterização de 4-hidrazonopirimidopirimidinas **69-82**

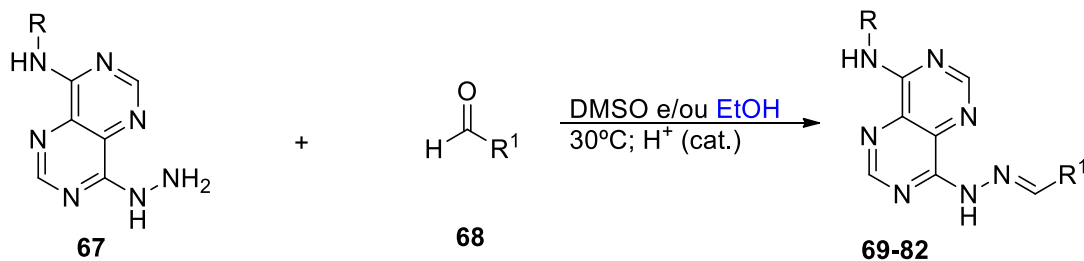
Durante este trabalho sintetizou-se vários derivados de 4-hidrazonopirimidopirimidinas **69-82** para serem avaliados como potenciais fármacos antileishmaniais e antitripanosomiais, usando métodos de síntese anteriormente desenvolvidos no grupo de investigação. O método 1 envolveu a reação dos compostos **67** com aldeídos **68**, em DMSO ou EtOH, a 30°C, usando catálise ácida [61,62,65], o método 2 envolveu a reação dos derivados **65** com aldeídos **68** na presença de uma base nucleofílica, em DMSO, a 80°C [55a,b]. Neste último ocorre a condensação do aldeído e o rearranjo de Dimroth, numa reação “One-pot”, tendo-se verificado que alguns aldeídos são incompatíveis com este método, degradando na mistura reacional.

3.1.2.1. Síntese de 4-hidrazonopirimidopirimidinas a partir de **67**

Inicialmente, para a síntese de **69-82** adotou-se o método 1, já bastante estudado e otimizado pelo grupo de investigação [61,62,65]. Neste, os aldeídos **68** reagem com 4-hidrazinopirimidopirimidinas **67** em DMSO, com catálise ácida (Esq. 15). Quando aplicado com os reagentes **67a-g** e **67o,p** os respectivos produtos das séries **69-74**, **81** e **82** foram isolados com rendimentos excelentes ao fim de 0,5-3h, com exceção de **71d**, que se mostrou mais solúvel na mistura reacional e foi isolado com rendimento de 52%.

Ao longo da síntese da série **80** verificou-se que, quando se fez reagir **67m** com **68j-l** obtiveram-se os respectivos produtos **80j-l** com bons rendimentos (76-86%) ao fim de 30-40 minutos. Contudo, aquando do uso dos aldeídos **68n,o**, nas mesmas condições os produtos **80n,o** foram isolados ao fim de 40-50 minutos, com rendimentos inferiores a 50%. Estes resultados foram associados à elevada solubilidade destes compostos na mistura reacional, em particular devido à presença de DMSO. Por esse motivo, e a fim de se terminar a síntese da série **80** decidiu-se usar EtOH em vez de DMSO para efetuar as reações que faltavam. Desta forma, tratou-se **67m** com **68m** e **68p** em EtOH e manteve-se as restantes condições reacionais. Ao final de 40-120 minutos os respectivos produtos **80m** e **80p** foram isolados com bons rendimentos (93 e 66%, respetivamente).

Dado os bons resultados obtidos pelo uso de EtOH, aplicaram-se as mesmas condições com o reagente **67i** tendo-se obtido todos os derivados a série **79**, ao fim de 30-80 minutos com bons a excelentes rendimentos (72-99%).



a: R= 3-OH-C₆H₄
c: R= 3-OMe-C₆H₄
d: R= 4-OMe-C₆H₄
e: R= 4-F-C₆H₄
f: R= 3-Cl-C₆H₄
g: R= 3-piridinil
i: R= 3-(O(CH₂)₃OH)C₆H₄
m: R= 4-(O(CH₂)₃OH)C₆H₄
o: R= 3-(NH(CO-4-piridinil))C₆H₄
p: R= 3-(NH(CO-3-piridinil))C₆H₄

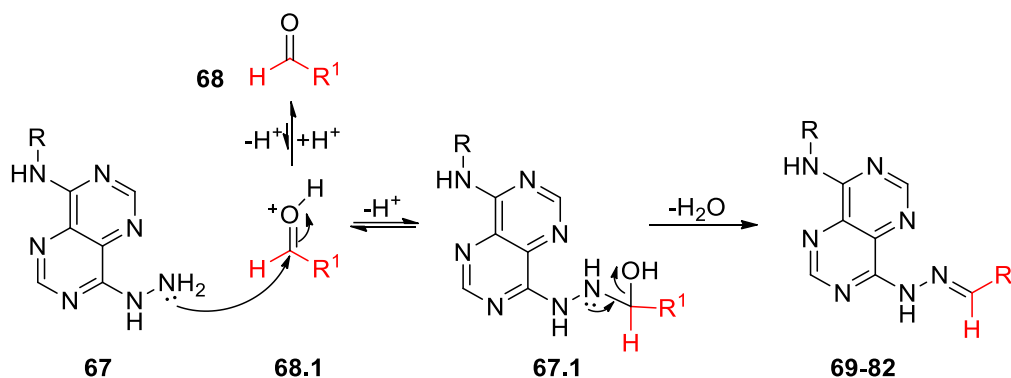
68
a: R¹= Ph
d: R¹= 3-F-C₆H₄
e: R¹= 4-F-C₆H₄
f: R¹= 3-Cl-C₆H₄
h: R¹= 3-Br-C₆H₄
j: R¹= 4-OH-C₆H₄
k: R¹= 3,4-OH-C₆H₃
l: R¹= 3,4,5-OH-C₆H₂
m: R¹= 3-OMe-4-OH-C₆H₃
n: R¹= 3-OH-4-OMe-C₆H₃
o: R¹= 3,4-OMe-C₆H₃
p: R¹= 3,4,5-OMe-C₆H₂
q: R¹= 3,5-OMe-4-OH-C₆H₃

69l: R= 3-piridinil; R¹= 3,4,5-OH-C₆H₂ **91%**
70f: R= 4-F-C₆H₄; R¹= 3-Cl-C₆H₄ **96%**
70k: R= 4-F-C₆H₄; R¹= 3,4-OH-C₆H₃ **98%**
70l: R= 4-F-C₆H₄; R¹= 3,4,5-OH-C₆H₂ **99%**
70o: R= 4-F-C₆H₄; R¹= 3,4-OMe-C₆H₃ **96%**
71d: R= 3-Cl-C₆H₄; R¹= 3-F-C₆H₄ **52%**
71e: R= 3-Cl-C₆H₄; R¹= 4-F-C₆H₄ **95%**
71h: R= 3-Cl-C₆H₄; R¹= 3-Br-C₆H₄ **99%**
71l: R= 3-Cl-C₆H₄; R¹= 3,4,5-OH-C₆H₂ **88%**
72k: R= 4-OMe-C₆H₄; R¹= 3,4-OH-C₆H₃ **99%**
72l: R= 4-OMe-C₆H₄; R¹= 3,4,5-OH-C₆H₂ **99%**
72o: R= 4-OMe-C₆H₄; R¹= 3,4-OMe-C₆H₃ **99%**
73k: R= 3-OMe-C₆H₄; R¹= 3,4-OH-C₆H₃ **98%**
73l: R= 3-OMe-C₆H₄; R¹= 3,4,5-OH-C₆H₂ **99%**
74k: R= 3-OH-C₆H₄; R¹= 3,4-OH-C₆H₃ **89%**
79j: R= 3-O((CH₂)₃)C₆H₄; R¹= 4-OH-C₆H₄ **72%**
79k: R= 3-O((CH₂)₃)C₆H₄; R¹= 3,4-OH-C₆H₃ **96%**
79l: R= 3-O((CH₂)₃)C₆H₄; R¹= 3,4,5-OH-C₆H₂ **99%**
79m: R= 3-O((CH₂)₃)C₆H₄; R¹= 3-OMe-4-OH-C₆H₃ **95%**
79o: R= 3-O((CH₂)₃)C₆H₄; R¹= 3,4-OMe-C₆H₃ **99%**
79p: R= 3-O((CH₂)₃)C₆H₄; R¹= 3,4,5-OMe-C₆H₂ **99%**
79q: R= 3-O((CH₂)₃)C₆H₄; R¹= 3,5-OMe-4-OH-C₆H₂ **88%**
80j: R= 4-O((CH₂)₃)C₆H₄; R¹= 4-OH-C₆H₄ **76%**
80k: R= 4-O((CH₂)₃)C₆H₄; R¹= 3,4-OH-C₆H₃ **86%**
80l: R= 4-O((CH₂)₃)C₆H₄; R¹= 3,4,5-OH-C₆H₂ **85%**
80m: R= 4-O((CH₂)₃)C₆H₄; R¹= 3-OMe-4-OH-C₆H₃ **93%**
80n: R= 4-O((CH₂)₃)C₆H₄; R¹= 3-OH-4-OMe-C₆H₃ **28%**
80o: R= 4-O((CH₂)₃)C₆H₄; R¹= 3,4-OMe-C₆H₃ **30%**
80p: R= 4-O((CH₂)₃)C₆H₄; R¹= 3,4,5-OMe-C₆H₂ **66%**
81k: R= 3-(NH(CO-4-piridinil))C₆H₄; R¹= 3,4-OH-C₆H₂ **96%**
81l: R= 3-(NH(CO-4-piridinil))C₆H₄; R¹= 3,4,5-OH-C₆H₂ **97%**
82l: R= 3-(NH(CO-3-piridinil))C₆H₄; R¹= 3,4,5-OH-C₆H₂ **99%**

Esquema 15 – Síntese de derivados de pirimidopirimidina **69-82** por condensação de **67** com aldeídos **68** (Método 1)

3.1.2.1.1. Mecanismo reacional

A proposta mecanística para a síntese dos derivados **69-82** pelo método 1 apresenta-se no esquema seguinte (Esq. 16). Trata-se de uma reação clássica entre uma amina primária e um aldeído em meio ácido. Em meio ácido, o grupo amina de **67** ataca o carbonilo ativado do aldeído **68** gerando **67.1**. A protonação do álcool secundário gera um excelente grupo de saída, H₂O, que se liberta gerando o produto final **69-82**.



Esquema 16 – Proposta mecanística para a síntese de derivados de 4-hidrazonopirimidopirimidinas **69-82** a partir de **67** (Método 1)

3.1.2.2. Síntese de 4-hidrazonopirimidopirimidinas a partir de **65**

Recentemente, no grupo de investigação, surgiu um protocolo que permitia sintetizar novos compostos de estrutura **69-82** partindo-se de compostos de estrutura **65** [61,62]. Esta via de síntese (método 2), apesar de muito eficiente, apresenta algumas limitações relacionadas com a natureza do aldeído e do produto gerado. Uma das maiores dificuldades é a de controlar o tempo de reação pois se o produto não for isolado rapidamente do meio reacional degrada [54,55a,b]. Ainda assim, ao longo do trabalho, a pressão constante de ter de se sintetizar rapidamente vários derivados de 4-hidrazonopirimidopirimidina fez com que se optasse sempre pelo uso deste método após o primeiro rastreio.

O protocolo em questão (método 2) consiste em tratar as espécies **65** com os aldeídos **68** em DMSO, na presença de uma base nucleofílica, a 80°C [61,62] (Esq. 17). Realça-se que o aldeído **68** não é compatível com esta síntese dado à sua suscetibilidade em meio básico. Observou-se que, quando **68** era usado, nas condições referidas, a mistura reacional enegrecia e dela não se conseguiu isolar um produto puro.

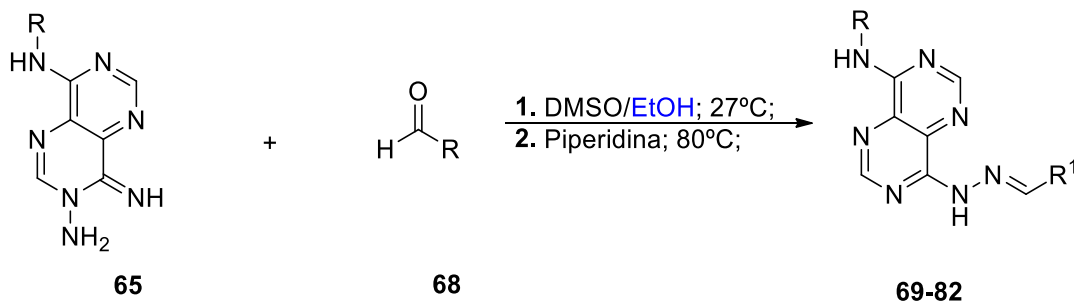
O método 2 foi aplicado aos reagentes **65a-p** e os produtos das respectivas series **69-82** foram isolados com os mais variados rendimentos (44-99%) ao final de 20-90 minutos (Esq 17.). Os rendimentos mais baixos foram obtidos para os compostos **75b**, **76a**, **76g** e **79b,c** devido à sua elevada solubilidade na mistura reacional.

Para contornar este problema, algumas reações foram efetuadas em EtOH. Estas reações mostraram-se muito mais lentas (demoraram entre 3-5h) e os produtos foram isolados com rendimentos inferiores a 50% (**79n** e **80l**). A análise da mistura reacional por TLC mostrava uma mistura complexa sugerindo que o uso de EtOH, neste método, deve ser evitado.

Quando se tratou os derivados **65h** e **65i** com o 4-fluorobenzaldeído **68e** e piperidina **66**, nas mesmas condições reacionais, foram obtidos sólidos cuja análise do espectro de ^1H RMN mostrava dois compostos, o respetivo produto esperado **75e/78e** e ainda um novo composto desconhecido.

Uma análise cuidada do espectro dos compostos desconhecidos permitiu identificar a presença de sinais compatíveis com o núcleo de pirimidopirimidina a $\delta = 8,6$ e $8,5$ ppm, correspondentes a H2 e H6, contudo os sinais típicos do grupo 4-F-C₆H₄ haviam desaparecido. Em sua vez surgiram dois dupletos a $\delta = 6,95$ e $6,69$ ppm ($J = 9,2$ Hz). Havia ainda no espectro mais dois sinais, um multipletto a $\delta = 3,25$ ppm e outro a $\delta = 1,57$ ppm, compatíveis com a presença de uma unidade de piperidina.

Os vários sinais nos espectros e as suas integrações relativas eram compatíveis com a estrutura **75e'/78e'**. Assim, os produtos **75e** e **78e** foram isolados com os seus respetivos produtos da substituição nucleofílica aromática **75e'** e **78e'** nas proporções 3:1 e 9:1, respetivamente.



a: R= 3-OH-C₆H₄

e: R= 4-F-C₆H₄

f: R= 3-Cl-C₆H₄

g: R= 3-piridinil

h: R= 3-(O(CH₂)₂OH)C₆H₄

i: R= 3-(O(CH₂)₃OH)C₆H₄

j: R= 3-(O(CH₂)₂N-morfolinil)C₆H₄

k: R= 3-(O(CH₂)₂N-tiomorfolinil)C₆H₄

l: R= 3-(O(CH₂)₂N-piperazinil-N-(COOEt))C₆H₄

n: R= 4-(O(CH₂)₃OH)C₆H₄

o: R= 3-(NH(CO-4-piridinil))C₆H₄

p: R= 3-(NH(CO-3-piridinil))C₆H₄

68

a: R= Ph

b: R= 3-piridinil

c: R= 4-piridinil

d: R= 3-F-C₆H₄

e: R= 4-F-C₆H₄

f: R= 3-Cl-C₆H₄

g: R= 4-Cl-C₆H₄

h: R= 3-Br-C₆H₄

i: R= 4-Br-C₆H₄

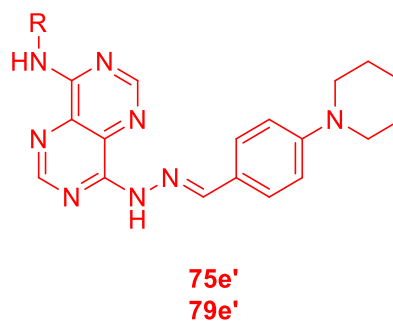
k: R= 3,4-OH-C₆H₃

n: R= 3-OH-4-OMe-C₆H₃

o: R= 3,4-OMe-C₆H₃

q: R= 3,5-OMe-4-OH-C₆H₃

69-82



69d: R= 3-piridinil; R¹= 3-F-C₆H₄ **89%**

69f: R= 3-piridinil; R¹= 3-Cl-C₆H₄ **88%**

69h: R= 3-piridinil; R¹= 3-Br-C₆H₄ **87%**

69k: R= 3-piridinil; R¹= 3,4-OH-C₆H₃ **65%**

69o: R= 3-piridinil; R¹= 3,4-OMe-C₆H₃ **69%**

71a: R= 3-Cl-C₆H₄; R¹= Ph **83%**

71b: R= 3-Cl-C₆H₄; R¹= 3-piridinil **82%**

71c: R= 3-Cl-C₆H₄; R¹= 4-piridinil **96%**

71f: R= 3-Cl-C₆H₄; R¹= 3-Cl-C₆H₄ **78%**

71g: R= 3-Cl-C₆H₄; R¹= 4-Cl-C₆H₄ **77%**

71k: R= 3-Cl-C₆H₄; R¹= 3,4-OH-C₆H₃ **77%**

71o: R= 3-Cl-C₆H₄; R¹= 3,4-OMe-C₆H₃ **92%**

73o: R= 3-OMe-C₆H₄; R¹= 3,4-OMe-C₆H₃ **61%**

74o: R= 3-OH-C₆H₄; R¹= 3,4-OMe-C₆H₃ **70%**

75a: R= 3-O((CH₂)₂OH)C₆H₄; R¹= Ph **99%**

75b: R= 3-O((CH₂)₂OH)C₆H₄; R¹= 3-piridinil **59%**

75c: R= 3-O((CH₂)₂OH)C₆H₄; R¹= 4-piridinil **90%**

75d: R= 3-O((CH₂)₂OH)C₆H₄; R¹= 3-F-C₆H₄ **70%**

75e: R= 3-O((CH₂)₂OH)C₆H₄; R¹= 4-F-C₆H₄ + **75e'** (3:1)

75f: R= 3-O((CH₂)₂OH)C₆H₄; R¹= 3-Cl-C₆H₄ **83%**

75g: R= 3-O((CH₂)₂OH)C₆H₄; R¹= 4-Cl-C₆H₄ **73%**

75h: R= 3-O((CH₂)₂OH)C₆H₄; R¹= 3-Br-C₆H₄ **71%**

75i: R= 3-O((CH₂)₂OH)C₆H₄; R¹= 4-Br-C₆H₄ **77%**

76a: R= 3-O((CH₂)₂-N-morfolinil)C₆H₄; R¹= Ph **54%**

76b: R= 3-O((CH₂)₂-N-morfolinil)C₆H₄; R¹= 3-Pirimidil **69%**

76c: R= 3-O((CH₂)₂-N-morfolinil)C₆H₄; R¹= 4-Pirimidil **65%**

76f: R= 3-O((CH₂)₂-N-morfolinil)C₆H₄; R¹= 3-Cl-C₆H₄ **81%**

76g: R= 3-O((CH₂)₂-N-morfolinil)C₆H₄; R¹= 4-Cl-C₆H₄ **54%**

77f: R= 3-O((CH₂)₂-N-tiomorfolinil)C₆H₄; R¹= 3-Cl-C₆H₄ **87%**

78f: R= 3-O((CH₂)₂-N-piperazinil-N-(COOEt))C₆H₄;

R¹= 3-Cl-C₆H₄ **60%**

78e: R= 3-O((CH₂)₂-N-piperazinil-N-(COOEt))C₆H₄;

R¹= 4-F-C₆H₄ + **78e'** (9:1)

79b: R= 3-O((CH₂)₃OH)C₆H₄; R¹= 3-Pirimidil **44%**

79c: R= 3-O((CH₂)₃OH)C₆H₄; R¹= 4-Pirimidil **44%**

79n: R= 3-O((CH₂)₃OH)C₆H₄; R¹= 4-OMe-3-OH-C₆H₃ **24%**

80q: R= 4-O((CH₂)₃OH)C₆H₄; R¹= 3,5-OMe-4-OH-C₆H₂ **50%**

82k: R= 3-(NH(CO-3-piridinil))C₆H₄; R¹= 3,4-OH-C₆H₃ **76%**

Esquema 17 – Síntese de derivados de pirimidopirimidina por condensação de **65** com aldeídos **68** (Método 2)

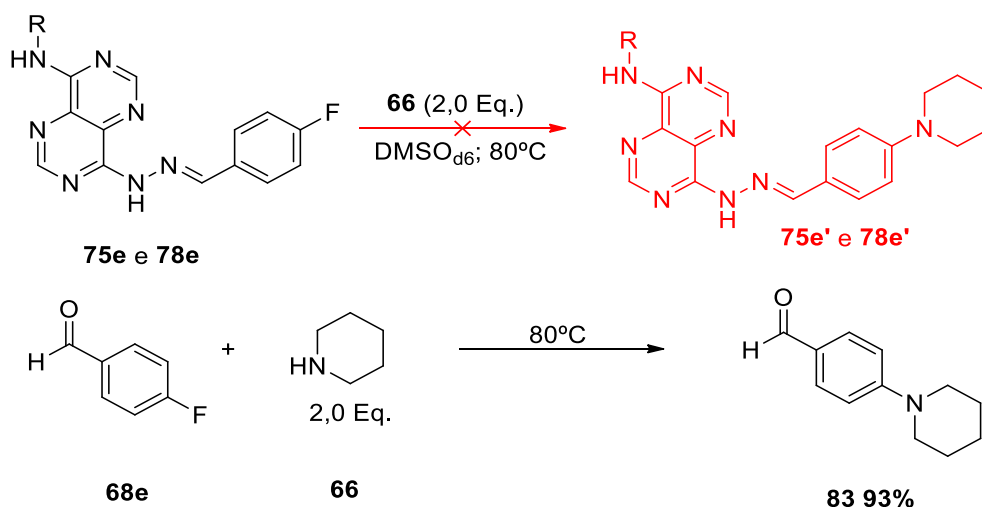
Após a identificação do contaminante tentou-se perceber a sua origem. Foram colocadas duas hipóteses. Os novos compostos **75e'**/**78e'** poderiam ter-se formado a partir dos produtos **75e**/**78e**

por reação com a piperidina presente no meio ou, o 4-fluorobenzaldeído **68e**, em presença de piperidina, começava por gerar **83** que em seguida reagiria com **65** para gerar os produtos finais. Para testar estas hipóteses foram realizados dois ensaios, como se segue (Esq 18).

Em primeiro lugar, sujeitou-se, em tubo de RMN, os sólidos impuros a piperidina **66**, em DMSO_{d6}, a 80°C. Ao fim de 18h, as proporções **75e:75e'** e **78e:78e'** não se haviam alterado.

Num outro tubo tratou-se o 4-fluorobenzaldeído, **68e**, com 2 equivalentes de piperidina **66**, a 80°C. Após 17 horas, quando a mistura foi arrefecida à t.a, precipitaram abundantemente uns cristais de cor laranja que foram filtrados, analisados por ¹H RMN e identificados como **83**. O composto **83** está disponível comercialmente [66] pelo que não foi caracterizado neste trabalho

Estes resultados mostraram que os compostos **75e'** e **78e'** não se formaram a partir dos respetivos compostos **75e/78e**. Mostraram ainda que o aldeído reage de forma limpa com a piperidina para formar o produto da substituição nucleofílica aromática **83**, nas condições de reação usadas.



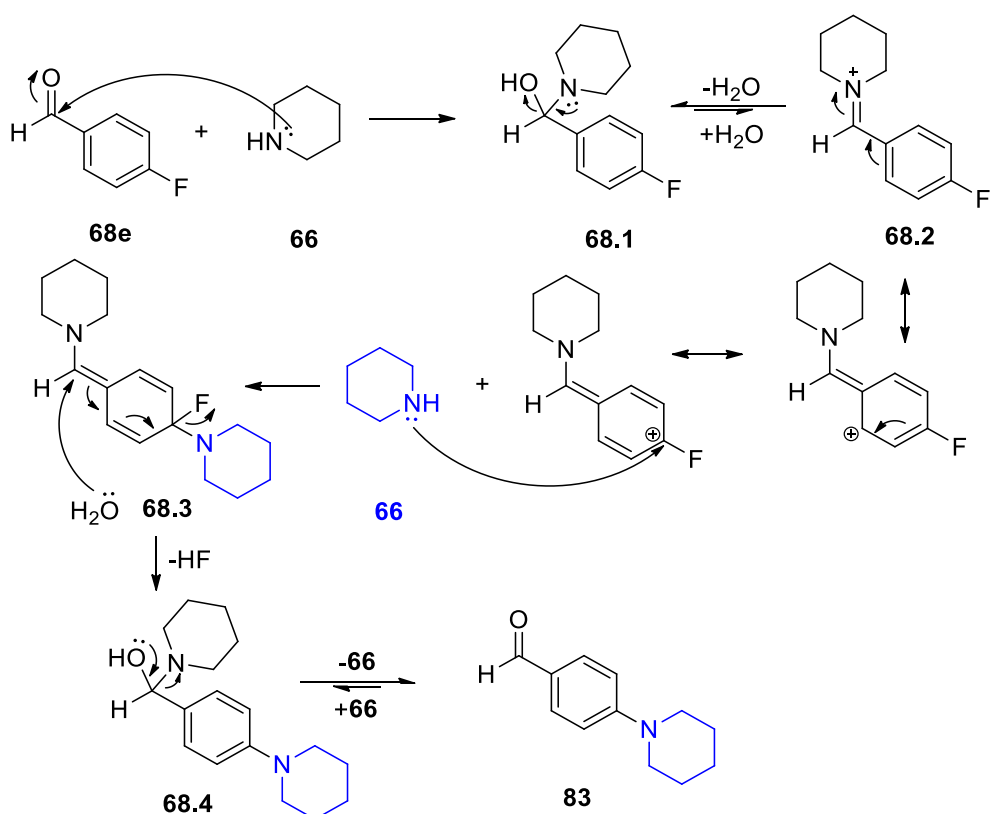
Esquema 18 – Estudos de reatividade de **75e**, **78e** e **68e** em presença de piperidina **66**

3.1.2.2.1. Mecanismo reacional

O mecanismo para a formação de **83** está representado no esquema 19 e o mecanismo de reação para formar os compostos **69-82** por reação “one-pot” encontra-se descrito no esquema 20.

Quando **68e** se encontra em presença de uma amina secundária (**66**) gera-se, por ataque desta ao carbonilo, o intermediário **68.1** que se encontra em equilíbrio com **68.2**. Apesar de o equilíbrio se encontrar deslocado para o derivado tetraédrico, no ião imínio (**68.2**) a posição *para* (eletrodeficiente) do anel aromático fica muito ativada por ressonância, que, perante o excesso de **66**, é suscetível a ataque nucleofílico gerando o intermediário **68.3**. O ataque de água, presente na mistura reacional, e a

eliminação do átomo de flúor de **68.3**, leva à formação de **68.4** que posteriormente gera o aldeído **83**.

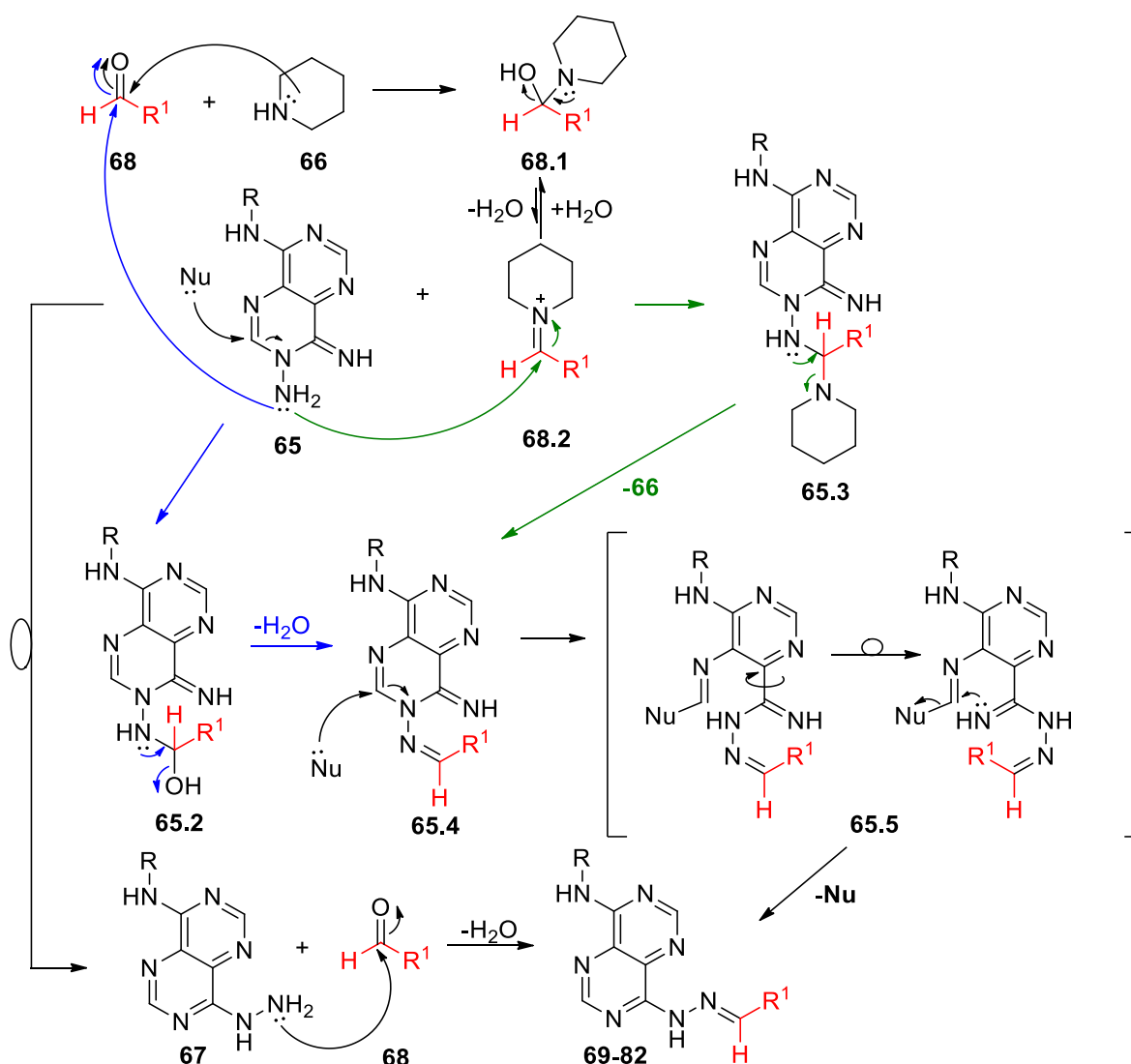


Esquema 19 – Proposta mecanística para a síntese de 4-piperidinobenzaldeído (**83**)

Atendendo aos resultados experimentais, apresentam-se 3 possíveis vias para a formação de **69-82** a partir de **65** (Esq. 20). A primeira via pode ser resumida dizendo que **65** gera **67** pelo mecanismo apresentado no capítulo anterior e que posteriormente condensa com **68** gerando a estrutura final por saída de H_2O . Esta hipótese é a menos plausível uma vez que a reação “one-pot” é mais rápida do que a reação de aromatização (conversão de **65** em **67** na ausência de aldeído).

Por outro lado (via a azul), **65** pode começar por condensar com **68** gerando **65.2** e posteriormente **65.4** por saída de H_2O . Este intermediário é muito mais suscetível a ataque em C2 do que **67** devido ao efeito retirador da hidrazona podendo explicar a maior velocidade da reação. Assim sendo, o ataque abre o anel e gera **65.5** que, ao rodar sobre a função amidina pode reciclar dando a estrutura final.

Por último, propõe-se uma nova via até ao intermediário **65.4** (via a verde). Nesta proposta assume-se que **68** reage com **66** gerando o intermediário **68.2**. Este, sendo muito suscetível a ataque por um nucleófilo, é atacado pela amina de **65** gerando **65.3** que posteriormente gera **65.4** por saída de **66**. A evolução seguinte deverá ser igual à da proposta anterior dando a estrutura final por rearranjo de Dimroth.

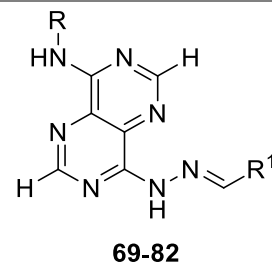


Esquema 20 – Proposta mecânica para a síntese de 4-hidrazonopirimidopyrimidinas **69-82** a partir de **65** (Método 2 – síntese “one-pot”)

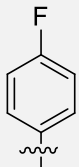
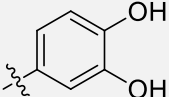
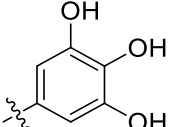
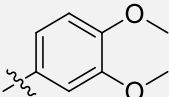
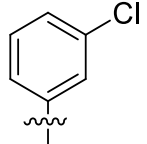
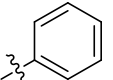
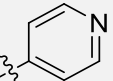
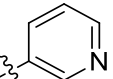
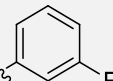
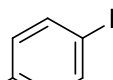
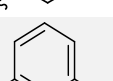
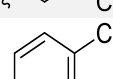
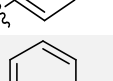
3.1.2.3. Caracterização física analítica e espectroscópica

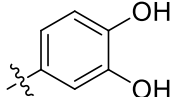
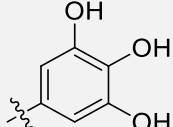
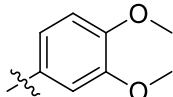
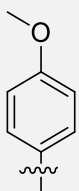
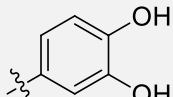
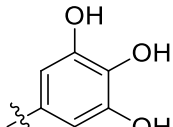
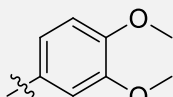
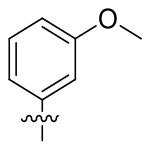
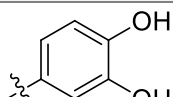
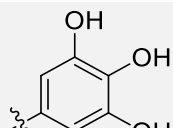
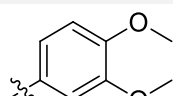
Os derivados de 4-hidrazonopirimidopyrimidinas **69-82** foram todos caracterizados por métodos físicos e espectroscópicos para confirmação da sua estrutura e pureza. Os dados físicos dos derivados **69-82** (Tab. 20) mostraram que o p.f. deste tipo de estrutura não varia consideravelmente dentro das series sintetizadas, contudo, entre series a variação é significativa. Este apresentou valores entre 140 a 300°C. Acrescenta-se ainda que vários compostos com $R^1 = 3,4-(HO)_2C_6H_3$ e $3,4,5-(HO)_3C_6H_2$ não chegaram a fundir e degradaram entre 250-280°C. À semelhança dos capítulos anteriores os dados analíticos experimentais não se obtiveram durante o período regular pelo que se apresentam apenas os dados teóricos obtidos por ChemDraw.

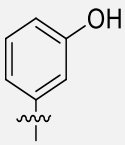
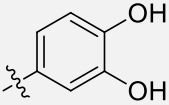
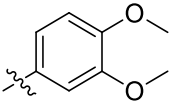
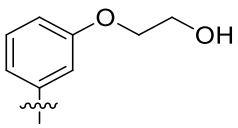
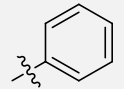
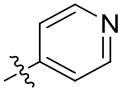
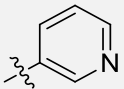
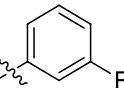
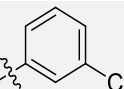
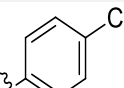
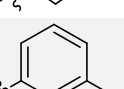
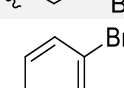
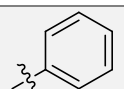
Tabela 20 - Dados físicos e analíticos dos compostos **69-82**

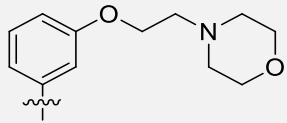
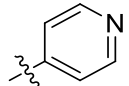
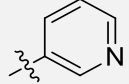
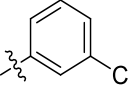
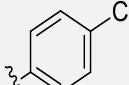
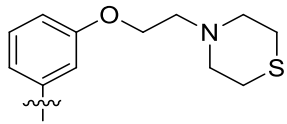
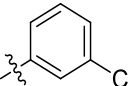
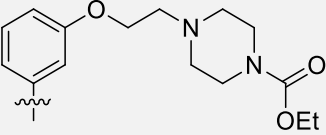
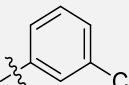
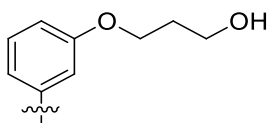
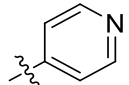
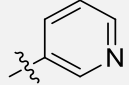
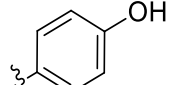
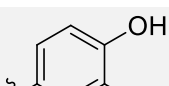


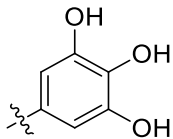
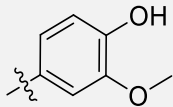
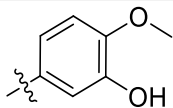
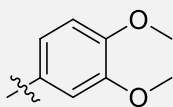
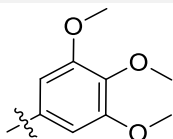
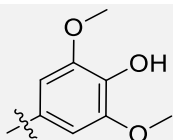
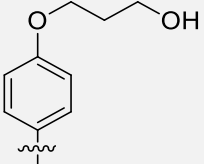
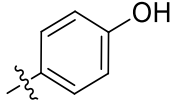
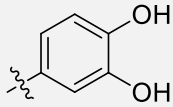
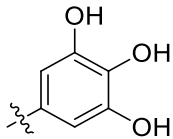
R	R¹	N^o	η (%)	P.f. (°C)	Fórmula Molecular	Massa Molar (g/mol)	C; H; N; S % Esperado* (obtido)
		69d	89	273 - 275	C ₁₈ H ₁₃ FN ₈	360,35	60,00; 3,64; 31,10
		69f	88	233 - 235	C ₁₈ H ₁₃ ClN ₈	376,80	57,38; 3,48; 29,74
		69h	87	227 - 230	C ₁₈ H ₁₃ BrN ₈	421,25	51,32; 3,11; 26,60
		69k	65	>300	C ₁₈ H ₁₄ N ₈ O ₂	374,36	57,75; 3,77; 29,93
		69l	91	270 (Dec.)	C ₁₈ H ₁₄ N ₈ O ₃	390,36	55,38; 3,61; 28,71
		69o	69	235 - 237	C ₂₀ H ₁₈ N ₈ O ₂	402,42	59,69; 4,51; 27,85
		70f	96	243 - 245	C ₁₉ H ₁₃ ClFN ₇	393,80	57,95; 3,33; 24,90

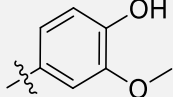
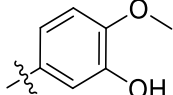
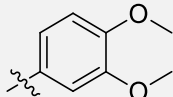
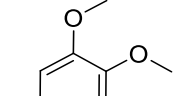
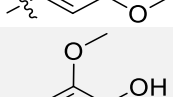
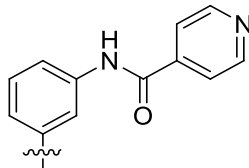
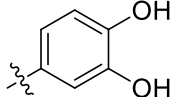
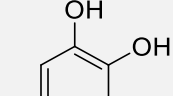
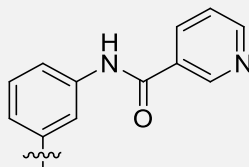
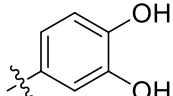
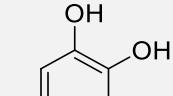
		70k	98	274 (Dec.)	C ₁₉ H ₁₄ FN ₇ O ₂	391,12	58,31; 3,61; 25,05
		70l	99	283 (Dec.)	C ₁₉ H ₁₄ FN ₇ O ₃	407,37	56,02; 3,46; 24,07
		70o	96	255 - 258	C ₂₁ H ₁₈ FN ₇ O ₂	419,15	60,14; 4,33; 23,38
		71a	83	262 - 265	C ₁₉ H ₁₄ ClN ₇	375,81	60,72; 3,75; 26,09
		71b	96	249 - 253	C ₁₈ H ₁₃ ClN ₈	376,80	57,38; 3,48; 29,74
		71c	82	282 - 285	C ₁₈ H ₁₃ ClN ₈	376,80	57,38; 3,48; 29,74
		71d	78	256 - 260	C ₁₉ H ₁₃ ClFN ₇	393,80	57,95; 3,33; 24,90
		71e	77	250 - 255	C ₁₉ H ₁₃ ClFN ₇	393,80	57,95; 3,33; 24,90
		71f	78	250 - 254	C ₁₉ H ₁₃ Cl ₂ N ₇	410,26	55,62; 3,19; 23,90
		71g	77	288 - 293	C ₁₉ H ₁₃ Cl ₂ N ₇	410,26	55,62; 3,19; 23,90
		71h	99	255 - 260	C ₁₉ H ₁₃ BrClN ₇	454,71	50,19; 2,88; 21,56

		71k	77	295 - 300	C ₁₉ H ₁₄ N ₇ O ₂	407,81	55,96; 3,46; 24,04
		71l	88	280 (Dec.)	C ₁₉ H ₁₄ N ₇ O ₃	423,81	53,85; 3,33; 23,13
		71o	92	240 - 243	C ₂₁ H ₁₈ N ₇ O ₂	435,87	57,87; 4,16; 22,49
		72k	99	273 - 276	C ₂₀ H ₁₇ N ₇ O ₃	403,40	59,55; 4,25; 24,31
		72l	99	284 - 287	C ₂₀ H ₁₇ N ₇ O ₄	419,13	57,28; 4,09; 23,38
		72o	99	248 - 250	C ₂₂ H ₂₁ N ₇ O ₃	431,17	61,24; 4,91; 22,73
		73k	98	280 (Dec.)	C ₂₀ H ₁₇ N ₇ O ₃	403,40	59,55; 4,25; 24,31
		73l	99	270 - 272	C ₂₀ H ₁₇ N ₇ O ₄	419,13	57,28; 4,09; 23,38
		73o	61	221 - 223	C ₂₂ H ₂₁ N ₇ O ₃	431,17	61,24; 4,91; 22,73

		74k	59	283 - 284	C ₁₉ H ₁₅ N ₇ O ₃	389,38	58,61; 3,88; 25,18
		74o	93	284 (Dec.)	C ₂₁ H ₁₉ N ₇ O ₃	417,43	60,42; 4,59; 23,49
		75a	99	231 - 234	C ₂₁ H ₁₉ N ₇ O ₂	401,43	62,83; 4,77; 24,42
		75b	90	255 - 258	C ₂₀ H ₁₈ N ₈ O ₂	402,42	59,69; 4,51; 27,85
		75c	59	243 - 246	C ₂₀ H ₁₈ N ₈ O ₂	402,42	59,69; 4,51; 27,85
		75d	70	252 - 255	C ₂₁ H ₁₈ FN ₇ O ₂	419,41	60,14; 4,33; 23,38
		75f	83	250 - 253	C ₂₁ H ₁₈ ClN ₇ O ₂	435,87	57,87; 4,16; 22,49
		75g	73	239 - 242	C ₂₁ H ₁₈ ClN ₇ O ₂	435,87	57,87; 4,16; 22,49
		75h	71	280 - 283	C ₂₁ H ₁₈ BrN ₇ O ₂	480,32	52,51; 3,78; 20,41
		75i	77	247 - 251	C ₂₁ H ₁₈ BrN ₇ O ₂	480,32	52,51; 3,78; 20,41
		76a	54	140 - 143	C ₂₅ H ₂₆ N ₈ O ₂	470,54	63,82; 5,57; 23,81

		76b	65	205 - 208	C ₂₄ H ₂₅ N ₉ O ₂	471,53	61,13; 5,34; 26,74
		76c	69	270 - 274	C ₂₄ H ₂₅ N ₉ O ₂	471,53	61,13; 5,34; 26,74
		76f	80	150 - 154	C ₂₅ H ₂₅ ClN ₈ O ₂	504,98	59,46; 4,99; 22,19
		76g	50	180 - 184	C ₂₅ H ₂₅ ClN ₈ O ₂	504,98	59,46; 4,99; 22,19
		77f	87	143 - 145	C ₂₅ H ₂₅ ClN ₈ OS	521,04	57,63; 4,84; 21,51; 6,15
		78f	60	224 - 226	C ₂₈ H ₃₀ ClN ₉ O ₃	576,05	58,38; 5,25; 21,88
		79b	44	235 - 238	C ₂₁ H ₂₀ N ₈ O ₂	416,45	60,57; 4,84; 26,91
		79c	44	215 - 217	C ₂₁ H ₂₀ N ₈ O ₂	416,45	60,57; 4,84; 26,91
		79j	72	220 - 221	C ₂₂ H ₂₁ N ₇ O ₃	431,17	61,24; 4,91; 22,73
		79k	71	255 - 260	C ₂₂ H ₂₁ N ₇ O ₄	447,47	59,05; 4,73; 21,91

		79l	99	247 - 249	C ₂₂ H ₂₁ N ₇ O ₅	463,16	57,02; 4,57; 21,16
		79m	99	218 - 222	C ₂₃ H ₂₃ N ₇ O ₄	461,18	59,86; 5,02; 21,25
		79n	24	220 - 222	C ₂₃ H ₂₃ N ₇ O ₄	461,18	59,86; 5,02; 21,25
		79o	99	190 -195	C ₂₄ H ₂₅ N ₇ O ₄	475,20	60,62; 5,30; 20,62
		79p	99	205 (Dec.)	C ₂₅ H ₂₇ N ₇ O ₅	505,21	59,40; 5,38; 19,40
		79q	88	240 (Dec.)	C ₂₄ H ₂₅ N ₇ O ₅	491,19	58,65; 5,13; 19,95
		80j	76	210- 215	C ₂₂ H ₂₁ N ₇ O ₃	431,17	61,24; 4,91; 22,73
		80k	86	256 (Dec.)	C ₂₂ H ₂₁ N ₇ O ₄	447,47	59,05; 4,73; 21,91
		80l	85	250 (Dec.)	C ₂₂ H ₂₁ N ₇ O ₅	463,16	57,02; 4,57; 21,16

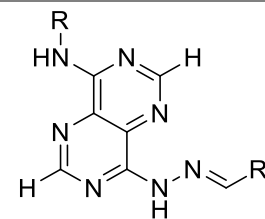
		80m	68	262 - 265	C ₂₃ H ₂₃ N ₇ O ₄	461,18	59,86; 5,02; 21,25
		80n	58	282 - 285	C ₂₃ H ₂₃ N ₇ O ₄	461,18	59,86; 5,02; 21,25
		80o	47	185 -186	C ₂₄ H ₂₅ N ₇ O ₄	475,20	60,62; 5,30; 20,62
		80p	50	203 - 208	C ₂₅ H ₂₇ N ₇ O ₅	505,21	59,40; 5,38; 19,40
		80q	50	266 - 269	C ₂₄ H ₂₅ N ₇ O ₅	491,19	58,65; 5,13; 19,95
		81k	96	>300	C ₂₅ H ₁₉ N ₉ O ₃	493,48	60,85; 3,88; 25,55
		81l	97	262 - 266	C ₂₅ H ₁₉ N ₉ O ₄	509,48	58,94; 3,76; 24,74
		82k	76	242 - 245	C ₂₅ H ₁₉ N ₉ O ₃	493,48	60,85; 3,88; 25,55
		82l	99	250 (Dec.)	C ₂₅ H ₁₉ N ₉ O ₄	509,48	58,94; 3,76; 24,74

IV

A análise dos espectros de IV, registados na tabela 21, dos compostos **69-82** mostrou bandas correspondentes a grupos amina e hidroxilo na zona entre 3500-3070 cm^{-1} . Na zona compreendida entre 2300-1500 cm^{-1} , os espectros apresentam padrões semelhantes aos respetivos precursores **67** e **65**.

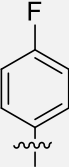
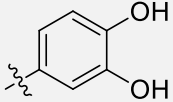
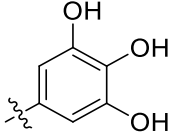
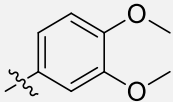
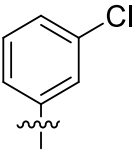
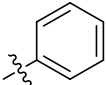
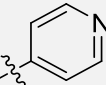
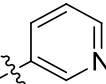
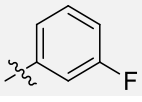
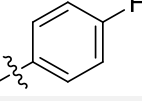
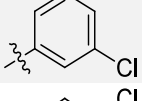
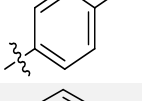
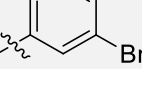
Dentro de cada serie os padrões das bandas apresentaram-se praticamente iguais entre 2300-1500 cm^{-1} . A zona entre 3500-2800 cm^{-1} , mais especificamente nos derivados cujo $\mathbf{R}^1 = 3,4\text{-(HO)}_2\text{C}_6\text{H}_3$ e $3,4,5\text{-(HO)}_3\text{C}_6\text{H}_2$, caracteriza-se pelo aparecimento de uma banda muito larga com máximo de intensidade a cerca de 3050 cm^{-1} que evidencia a existência de pontes de hidrogénio entre as moléculas.

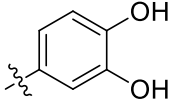
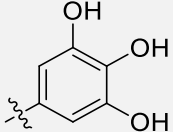
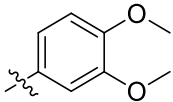
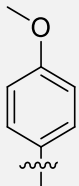
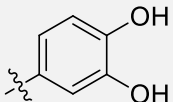
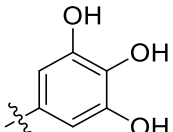
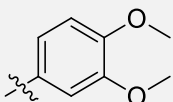
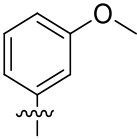
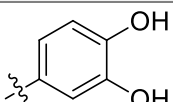
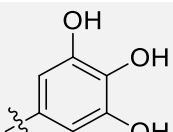
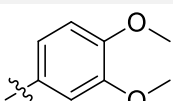
Tabela 21 - Dados espectroscópicos de infravermelho dos compostos **69-82** (cm⁻¹)

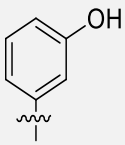
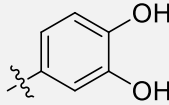
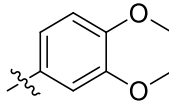
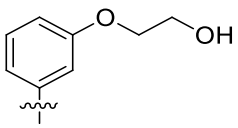
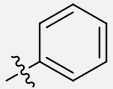
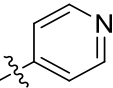
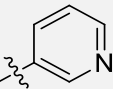
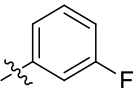
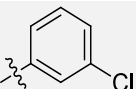
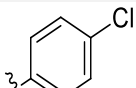
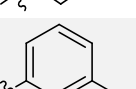
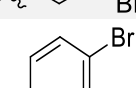
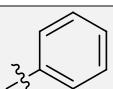


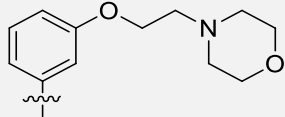
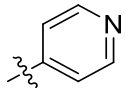
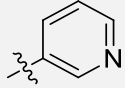
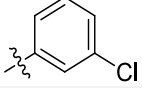
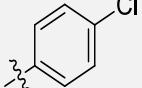
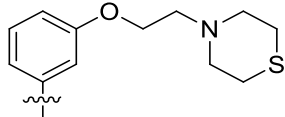
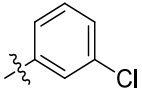
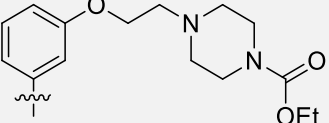
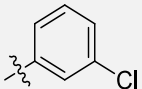
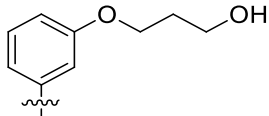
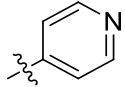
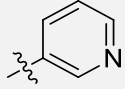
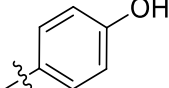
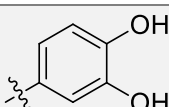
69-82

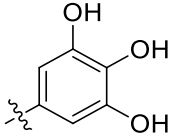
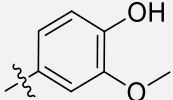
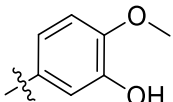
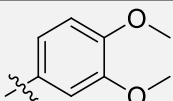
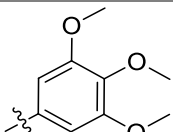
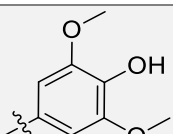
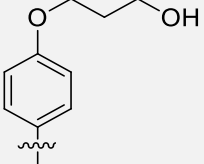
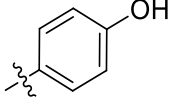
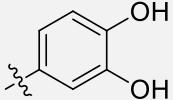
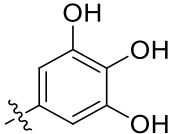
R	R¹	N^o	3600-3000 cm⁻¹	2300-1500 cm⁻¹
		69d	3358 (m); 3286 (m); 3196 (m); 3062 (m);	1655 (m); 1589 (i); 1572 (i); 1539 (i);
		69f	3520 (m); 3475 (m); 3336 (m); 3207 (f); 3057 (f);	1600 (m); 1583 (m); 1561 (m); 1539 (i);
		69h	3302 (m); 3258 (f); 3028 (m);	1600 (m); 1583 (m); 1550 (i); 1527 (i);
		69k	3366 (i); 3280 (m); 3217 (m);	1601 (i); 1560 (i); 1534 (i);
		69l	3174 (m); 3124 (m);	1594 (i); 1539 (i);
		69o	3560 (m); 3440 (f); 3187 (m); 3041 (m);	1495 (i); 1560 (i); 1530 (i); 1508 (i);
		70f	3559 (m); 3347 (m); 3252 (m); 3074 (f);	1611 (m); 1583 (i); 1544 (i); 1511 (i);

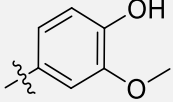
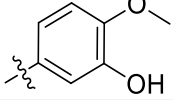
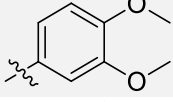
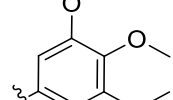
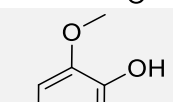
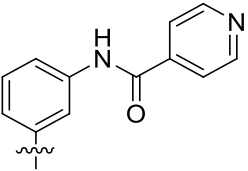
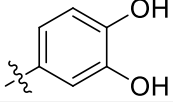
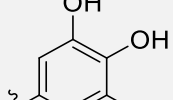
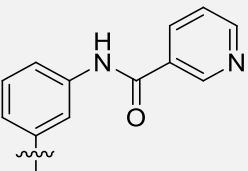
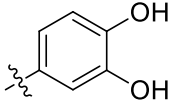
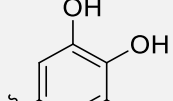
		70k	3358 (m); 3314 (m); 3068 (f);	1620 (i); 1605 (i); 1583 (i); 1568 (i); 1549 (i); 1534 (i); 1504 (i);
		70l	3358 (f); 3273 (m); 3052 (m);	1653 (f); 1609 (m); 1571 (i); 1534 (i); 1504 (i);
		70o	3366 (m); 3306 (m); 3026 (f);	1597 (m); 1564 (i); 1534 (i); 1508 (i);
		71a	3364 (m); 3241 (f); 3040 (f);	1606 (m); 1589 (i); 1567 (i); 1539 (i);
		71b	3420 (f); 3302 (m); 3057 (m);	1600 (m); 1567 (i); 1544 (i);
		71c	3308 (f); 3258 (f); 3079 (f); 3040 (f);	1589 (m); 1555 (i); 1533 (i);
		71d	3308 (m); 3252 (m); 3068 (f);	1600 (m); 1550 (i); 1527 (i);
		71e	3381 (f); 3347 (m); 3046 (f);	1639 (m); 1594 (i); 1566 (m); 1539 (i);
		71f	3302 (f); 3263 (f); 3046 (f);	1600 (i); 1555 (i); 1533 (i); 1505 (i);
		71g	3531 (f); 3353 (m); 3247 (f); 3113 (f);	1600 (i); 1561 (i); 1533 (i);
		71h	3347 (m); 3291 (m); 3062 (f);	1594 (i); 1555 (m); 1533 (i);

		71k	3353 (f); 3263 (f); 3062 (f);	1594 (i); 1561 (i); 1533 (i);
		71l	3353 (f); 3263 (f); 3062 (f);	1594 (i); 1561 (m); 1533 (i);
		71o	3297 (f); 3258 (m); 3051 (f);	1594 (i); 1550 (i); 1539 (i); 1511 (i);
		72k	3306 (m); 3172 (f);	1605 (i); 1564 (i); 1527 (i); 1504 (i);
		72l	3358 (f); 3273 (m); 3052 (m);	1653 (f); 1609 (m); 1571 (i); 1534 (i); 1504 (i);
		72o	3381 (f); 3351 (m); 3291 (m); 3067 (f);	1598 (i); 1564 (i); 1537 (i); 1504 (i);
		73k	3314 (m); 3045 (m);	1605 (i); 1568 (i); 1534 (i);
		73l	3336 (f); 3052 (m);	1653 (m); 1598 (i); 1568 (i); 1530 (i);
		73o	3351 (m); 3306 (m); 3097 (f); 3015 (f);	1601 (m); 1568 (i); 1538 (i); 1512 (i);

		74k	3146 (m); 3060 (m);	1654 (m); 1609 (i); 1571 (i); 1534 (i); 1508 (i);
		74o	3526 (f); 3291 (m); 3046 (i);	1600 (i); 1567 (i); 1533 (i); 1505 (i);
		75a	3297 (m); 3051 (f);	1605 (i); 1583 (m); 1567 (i); 1544 (i);
		75b	3335 (m); 3040 (i);	1606 (m); 1567 (i); 1533 (i);
		75c	3308 (m); 3168 (m); 3046 (m);	1600 (m); 1567 (i); 1539 (i);
		75d	3375 (f); 3336 (m); 3280 (m); 3230 (m); 3062 (f);	1600 (i); 1583 (i); 1567 (i); 1539 (i);
		75f	3386 (f); 3341 (m); 3068 (f);	1606 (m); 1567 (i); 1539 (i);
		75g	3358 (m); 3302 (f); 3219 (f); 3057 (f);	1600 (i); 1572 (i); 1539 (i);
		75h	3370 (f); 3336 (m); 3207 (f); 3073 (f);	1606 (m); 1567 (i); 1539 (i);
		75i	3358 (m); 3302 (m); 3224 (m); 3057 (f);	1594 (i); 1572 (i); 1539 (i);
		76a	3353 (f); 3313 (m); 3068 (f);	1628 (m); 1606 (m); 1583 (m); 1572 (i); 1539 (i);

		76b	3347 (m); 3202 (f); 3085 (f);	1606 (m); 1561 (i); 1533 (i);
		76c	3313 (m); 3224 (f); 3101 (f); 3046 (f);	1594 (m); 1561 (i); 1533 (i);
		76f	3341 (f); 3302 (f); 3185 (f); 1057 (f);	1606 (m); 1583 (m); 1572 (i); 1539 (i);
		76g	3392 (f); 3358 (f); 3336 (f); 3062 (f);	1600 (m); 1572 (i); 1544 (i);
		77f	3336 (m); 3258 (m); 3057 (f);	1600 (m); 1567 (i); 1544 (i);
		78f	3509 (f); 3353 (m); 3330 (m); 3057 (f);	1678 (i); 1600 (i); 1567 (i); 1538 (i);
		79b	3343 (m); 3217 (m); 3052 (f);	1605 (m); 1568 (i); 1542 (i); 1501 (m);
		79c	3329 (m); 3217 (m); 3045 (m);	1598 (m); 1564 (i); 1530 (i);
		79j	3302 (m); 3052 (m);	1650 (m); 1594 (i); 1564 (i); 1530 (i);
		79k	3347 (f); 3284 (m); 3064 (m);	1653 (m); 1601 (i); 1568 (i); 1534 (i);

	79l	3052 (m);	1653 (m); 1605 (m); 1564 (i); 1538 (i);	
	79m	3340 (f); 3272 (m); 3112 (f);	1597 (i); 1571 (i); 1538 (i); 1515 (i);	
	79n	3373 (f); 3313 (f); 3285 (m);	1609 (m); 1594 (m); 1560 (i); 1538 (i); 1501 (i);	
	79o	3314 (m); 3276 (f); 3067 (m);	1650 (m); 1598 (i); 1568 (i); 1538 (i); 1512 (i);	
	79p	3549 (f); 3295 (f);	1657 (m); 1624 (m); 1605 (m); 1575 (i); 1534 (m); 1504 (m);	
	79q	3369 (m); 3332 (f); 3075 (f);	1657 (m); 1616 (i); 1597 (i); 1568 (i); 1538 (m); 1508 (i);	
		80j	3302 (m); 3164 (m);	1657 (m); 1597 (i); 1571 (i); 1534 (i); 1504 (i);
		80k	3298 (m); 3176 (m); 3064 (m);	1653 (m); 1601 (i); 1568 (i); 1530 (i); 1509 (i);
		80l	3052 (m);	1650 (m); 1597 (i); 1568 (i); 1534 (i); 1508 (i);

		80m	3295 (m); 3183 (m); 3071 (m);	1653 (m), 1597 (i); 1568 (i); 1530 (m); 1508 (i);
		80n	3362 (f); 3332 (f); 3258 (m); 3067 (m);	1653 (m); 1605 (i); 1560 (i); 1534 (i); 1508 (i);
		80o	3324 (m); 3232 (m);	1597 (i); 1564 (i); 1549 (i); 1538 (i); 1508 (i);
		80p	3362 (m); 3310 (m); 3261 (m);	1594 (m); 1564 (i); 1542 (i); 1508 (i);
		80q	3358 (f); 3276 (m);	1597 (i); 1568 (i); 1545 (i); 1512 (i);
		81k	3347 (f); 3263 (f); 3046 (f);	1661 (i); 1600 (m); 1533 (i);
		81l	3269 (f); 3062 (m);	1661 (i); 1606 (i); 1578 (i); 1533 (i);
		82k	3034 (m);	1656 (i); 1611 (i); 1572 (i); 1533 (i);
		82l	3046 (m);	1656 (i); 1611 (m); 1572 (i); 1533 (i);

*Valores retirados do ChemDraw Ultra (12.0.2.1076)

¹H RMN

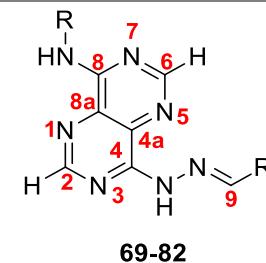
A análise dos dados de ¹H RMN (Tab. 22) permitiu identificar os sinais característicos do núcleo de 4-hidrazonopirimidopirimidina assim como sinais correspondentes a grupos aromáticos **R** e **R¹**. Os sinais a $\delta \approx 8,6-8,7$ ppm (H2 e H6) confirmam a presença do núcleo de pirimidopirimidina detetada nos capítulos anteriores. Além disso, o aparecimento do sinal correspondente ao próton H9 a δ entre 8,7-8,4 ppm é uma das principais evidências para comprovar a presença do grupo hidrazona. O desvio químico associado a este sinal é muito dependente do grupo **R¹**. Quando mais remotor for **R¹** maior o desvio químico a que o H9 aparece.

A presença de um segundo conjunto de sinais para prótons aromáticos correspondentes aos grupos **R¹** a $\delta \approx 8 - 6$ ppm provam a introdução de um segundo anel aromático. Este último resultado, combinado com o desaparecimento dos sinais correspondentes à amina primária dos precursores **67** ($\delta \approx 5,0$ ppm) e **65** ($\delta \approx 5,6$ ppm) confirma a reação de condensação do aldeído.

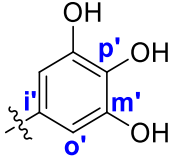
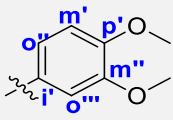
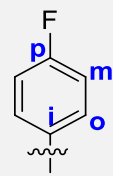
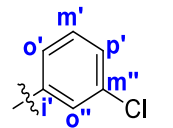
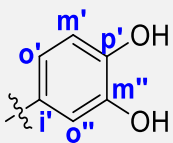
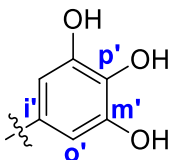
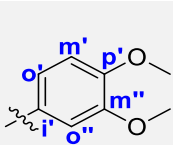
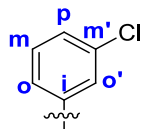
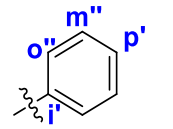
Acrescenta-se ainda que, os sinais correspondentes a **R** foram atribuídos por comparação com os respectivos precursores **67** e **65** e, em regra geral, não sofreram mudanças de desvio químico significativas. Salienta-se que dentro da mesma serie os sinais de **R** foram praticamente iguais somente variando nos sinais correspondentes a **R¹**.

Também foram detetados sinais na forma de bandas largas correspondentes aos grupos amina. Destes, destaca-se a amina ligada a C4, que se deslocou para desvios químicos mais elevados ($\delta \approx 13,0-10,0$ ppm). A amina ligada a C8 manteve-se a desvio químico semelhante ao registado para o correspondente precursor **67** variando entre $\delta \approx 11,0$ a $9,0$ ppm.

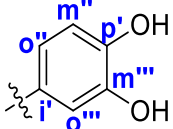
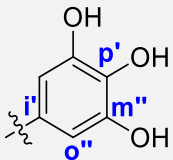
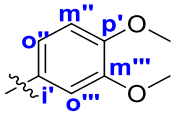
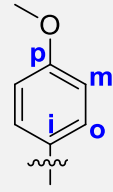
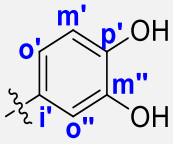
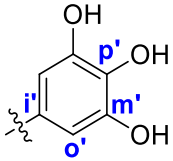
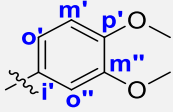
Tabela 22 – Dados espectroscópicos de ^1H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) dos compostos **69-82**

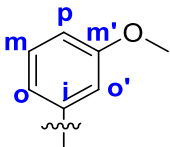
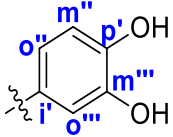
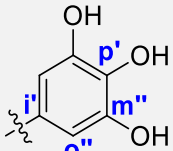
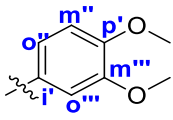
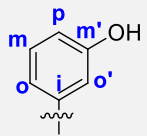
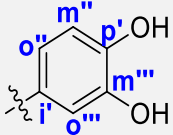
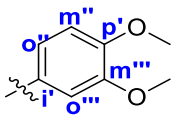
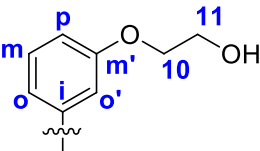
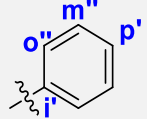


R	R¹	N²	N⁴H/N⁸H/H₂/H₆/H₉	R	R¹
		69d	12,3-11,0 (sl, 1H, N⁴H) 9,95 (sl, 1H, N⁸H) 8,72 (sl, 1H, H₂) 8,67 (sl, 2H, H₆; H₉)	9,13 (d, 1H, J=2,4 Hz, H_{o'}) 8,38 (dt, 1H, J=2,4; 8,0 Hz, H_o) 8,33 (dd, 1H, J=1,6; 4,8 Hz, H_p) 7,39 (dd, 1H, J=4,8; 8,0 Hz, H_m)	7,7-7,5 (m, 3H, H_{o''} ; H_{o'''} ; H_{m''}) 7,23 (dt, 1H, J=5,6; 8,8 Hz, H_{p'})
		69f	12,1 (sl, 1H, N⁴H) 10,4 (s, 1H, N⁸H) 8,76 (s, 1H, H₂) 8,69 (s, 1H, H₆) 8,64 (s, 1H, H₉)	9,15 (s, 1H, H_{o'}) 8,40 (d, 1H, J=8,4 Hz, H_o) 8,32 (d, 1H, J=4,8 Hz, H_p) 7,41 (dd, 1H, J=4,8; 8,4 Hz, H_m)	7,78 (s, 1H, H_{o'''}) 7,67 (sl, 1H, H_{o''}) 7,50 (m, 2H, H_{m'} ; H_{p'})
		69h	12,3-11,0 (sl, 1H, N⁴H) 10,4-9,5 (sl, 1H, N⁸H) 8,66 (sl, 2H, H₂; H₆) 8,62 (s, 1H, H₉)	9,13 (d, 1H, J=2,4 Hz, H_{o'}) 8,37 (dd, 1H, J=2,4; 8,4 Hz, H_o) 8,32 (dd, 1H, J=1,6; 4,8 Hz, H_p) 7,45-7,32 (m, 2H, H_m)	7,97 (s, 1H, H_{o'''}) 7,73 (d, 1H, J=8,0 Hz, H_{o''}) 7,58 (dd, 1H, J=2,0; 8,0 Hz, H_{p'}) 7,45-7,32 (m, 2H, H_{m''})
		69k	11,7 (sl, 1H, N⁴H) 10,3 (sl, 1H, N⁸H) 8,68 (s, 1H, H₂); 8,67 (s, 1H, H₆) 8,48 (s, 1H, H₉)	9,14 (d, 1H, J=2,4 Hz, H_{o'}) 8,40 (dd, 1H, J=2,4; 8,4 Hz, H_o) 8,32 (dd, 1H, J=1,6; 4,8 Hz, H_p) 7,42 (dd, 1H, J=4,8; 8,4 Hz, H_m)	10,0–9,00 (sl, 2H, m,p-OH) 7,29 (d, 1H, J=2,0 Hz, H_{o'''}) 6,95 (dd, 1H, J=2,0; 8,4 Hz, H_{o''}) 6,79 (d, 1H, J=8,4 Hz, H_{m'})

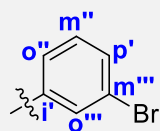
		69i 10,7 (sl, 1H, N⁸H) 8,76 (s, 1H, H6) 8,64 (s, 1H, H2) 8,44 (s, 1H, H9)	9,40 (d, 1H, J=2,4 Hz, Ho') 8,77 (d, 1H, J=8,4 Hz, Ho) 8,50 (dd, 1H, J=1,6; 4,8 Hz, Hp) 7,77 (dd, 1H, J=4,8; 8,4 Hz, Hm)	6,78 (s, 2H, Ho')
		69o 12,4 - 11,2 (sl, 1H, N⁴H) 10,8 - 10,0 (sl, 1H, N⁸H) 8,66 (s, 2H, H2, H6) 8,55 (s, 1H, H9)	9,11 (d, 1H, J=2,4 Hz, Ho') 8,38 (d, 1H, J=8,4 Hz, Ho) 8,31 (dd, 1H, J=1,6; 4,8 Hz, Hp) 7,41 (dd, 1H, J=4,8; 8,4 Hz, Hm)	7,46 (s, 1H, Ho'') 7,20 (d, 1H, J=8,4 Hz, Ho'') 7,00 (d, 1H, J=8,4 Hz, Hm') 3,83 (s, 3H, m-OCH₃) 3,79 (s, 3H, p-OCH₃)
		70f 13,0-11,0 (sl, 1H, N⁴H) 10,2 (sl, 1H, N⁸H) 8,67 (s, 1H, H2) 8,64 (s, 2H, H6; H9)	8,00 (dd, 2H, J=5,2; 9,2 Hz, Ho) 7,22 (t, 2H, J=9,2 Hz, Hm)	7,82 (s, 1H, Ho'') 7,68 (d, 1H, J=2,0; 8,0 Hz, Ho'') 7,48 (m, 2H, Hp'; Hm')
		70k 10,2 (s, 1H, N⁸H) 8,63 (s, 1H, H6) 8,58 (s, 1H, H2) 8,49 (s, 1H, H9)	7,97 (dd, 2H, J=5,2; 9,2 Hz, Ho) 7,22 (t, 2H, J=9,2 Hz, Hm)	10,0 - 9,00 (sl, 2H, m,p-OH) 7,32 (d, 1H, J=2,0 Hz, Ho'') 7,01 (dd, 1H, J=2,0; 8,4 Hz, Ho') 6,79 (d, 1H, J=8,4 Hz, Hm')
		70l 10,2 (s, 1H, N⁸H) 8,64 (s, 1H, H6) 8,57 (s, 1H, H2) 8,42 (s, 1H, H9)	7,95 (dd, 2H, J=5,2; 9,2 Hz, Ho) 7,22 (t, 2H, J=9,2 Hz, Hm)	6,79 (s, 2H, Ho')
		70o 10,5 - 9,00 (sl, 1H, N⁸H) 8,59 (s, 1H, H6) 8,56 (s, 1H, H2) 8,52 (s, 1H, H9)	7,92 (dd, 2H, J=5,2; 9,2 Hz, Ho) 7,18 (t, 2H, J=9,2 Hz, Hm)	7,51 (d, 1H, J=2,0 Hz, Ho'') 7,26 (dd, 1H, J=2,0; 8,4 Hz, Ho') 7,01 (d, 1H, J=8,4 Hz, Hm') 3,84 (s, 3H, p-OCH₃) 3,79 (s, 3H, m-OCH₃)
			71a 11,9 (sl, 1H, N⁴H) 10,2 (sl, 1H, N⁸H) 8,72 (s, 1H, H2, H6) 8,65 (s, 1H, H9)	8,27 (s, 1H, Ho') 7,93 (dd, 1H, J=2,0; 8,0 Hz, Ho) 7,39 (t, 1H, J=8,0 Hz, Hm) 7,15 (dd, 1H, J=2,0; 8,0 Hz, Hp)

	71b	12,0-10,0 (sl, 1H, N⁴H) 10,0 (sl, 1H, N⁸H) 8,73 (s, 1H, H6) 8,71 (sl, 1H, H2) 8,65 (m, 3H, H9)	8,24 (t, 1H, J= 2,0 Hz, Ho') 7,92 (dd, 1H, J= 2,0; 8,0 Hz, Ho) 7,39 (t, 1H, J= 8,0 Hz, Hm) 7,16 (dd, 1H, J= 2,0; 8,0 Hz, Hp)	8,65 (d, 2H, J= 4,8 Hz, Hm'') 7,69 (d, 2H, J= 4,8 Hz, Ho'')
	71c	12,1 (sl, 1H, N⁴H) 10,3 (sl, 1H, N⁸H) 8,75 (s, 2H, H2, H6) 8,71 (s, 1H, H9)	8,28 (s, 1H, Ho') 7,95 (d, 1H, J= 8,0 Hz, Ho) 7,39 (t, 1H, J= 8,0 Hz, Hm) 7,16 (dd, 1H, J= 2,0; 8,0 Hz, Hp)	8,87 (s, 1H, Ho''') 8,61 (dd, 1H, J= 1,6; 4,8 Hz Hp') 8,17 (d, 1H, J= 4,8 Hz Ho'') 7,49 (dd, 1H, J= 4,8; 8,0 Hz, Hm'')
	71d	12,1 (sl, 1H, N⁴H) 10,3 (sl, 1H, N⁸H) 8,74 (s, 1H, H6) 8,69 (s, 1H, H2) 8,64 (s, 1H, H9)	8,27 (s, 1H, Ho') 7,94 (d, 1H, J= 8,0 Hz, Ho) 7,39 (t, 1H, J= 8,0 Hz, Hm) 7,15 (dd, 1H, J= 2,0; 8,0 Hz, Hp)	7,6-7,4 (m, 3H, Ho''' ; Hp' ; Ho'') 7,26 (m, 1H, Hm'')
	71e	13,0-11,0 (sl, 1H, N⁴H) 10,2 (s, 1H, N⁸H) 8,73 (s, 1H, H6) 8,66 (sl, 2H, H2; H9)	8,29 (t, 1H, J= 2,0 Hz, Ho') 7,95 (dd, 1H, J= 2,0; 8,0 Hz, Ho) 7,39 (t, 1H, J= 8,0 Hz, Hm) 7,16 (dd, 1H, J= 2,0; 8,0 Hz, Hp)	7,81 (dd, 2H, J= 5,6; 8,4 Hz Ho'') 7,30 (d, 2H, J= 5,6; 8,4 Hz, Hm'')
	71f	10,2 (sl, 1H, N⁸H) 8,74 (s, 1H, H6) 8,69 (s, 1H, H2) 8,64 (s, 1H, H9)	8,30 (t, 1H, J= 2,0 Hz, Ho') 7,96 (dd, 1H, J= 2,0; 8,0 Hz, Ho) 7,41 (t, 1H, J= 8,0 Hz, Hm) 7,17 (dd, 1H, J= 2,0; 8,0 Hz, Hp)	7,83 (s, 1H, Ho''') 7,69 (d, 1H, J= 2,0; 8,0 Hz, Ho'') 7,50 (m, 2H, Hp' ; Hm'')
	71g	12,0 (sl, 1H, N⁴H) 10,3 (s, 1H, N⁸H) 8,74 (s, 1H, H6) 8,73 (s, 1H, H2) 8,65 (s, 1H, H9)	8,29 (t, 1H, J= 2,0 Hz, Ho') 7,95 (dd, 1H, J= 2,0; 8,0 Hz, Ho) 7,40 (t, 1H, J= 8,0 Hz, Hm) 7,16 (dd, 1H, J= 2,0; 8,0 Hz, Hp)	7,76 (d, 2H, J= 8,8 Hz Ho'') 7,51 (d, 2H, J= 8,8 Hz, Hm'')
	71h	13,0-10,5 (sl, 1H, N⁴H) 9,86 (s, 1H, N⁸H) 8,67 (sl, 2H, H6; H2) 8,57 (s, H, H9)	8,19 (t, 1H, J= 2,0 Hz, Ho') 7,87 (dd, 1H, J= 2,0; 8,0 Hz, Ho) 7,37 (t, 1H, J= 8,0 Hz, Hm) 7,13 (dd, 1H, J= 2,0; 8,0 Hz, Hp)	7,96 (s, 1H, Ho''') 7,72 (d, 1H, J= 8,0 Hz, Ho'') 7,57 (d, 1H, J= 8,0 Hz, Hp') 7,39 (t, 1H, J= 8,0 Hz Hm'')

		<p>71k</p> <p>11,7 (sl, 1H, N⁴H) 10,2 (sl, 1H, N⁸H) 8,72 (s, 1H, H6) 8,67 (s, 1H, H2) 8,49 (s, 1H, H9)</p>	<p>8,29 (s, 1H, Ho') 7,95 (d, 1H, J=8,4 Hz, Ho) 7,39 (t, 1H, J=8,4 Hz, Hm) 7,16 (d, 1H, J=8,4 Hz, Hp)</p>	<p>10,0 – 8,90 (sl, 2H, m,p-OH) 7,29 (d, 1H, J=2,0, Ho''') 6,95 (d, 1H, J=8,0 Hz, Ho'') 6,79 (d, 1H, J=8,0 Hz, Hm'')</p>
		<p>71l</p> <p>10,2 (sl, 1H, N⁸H) 8,70 (s, 1H, H6) 8,59 (s, 1H, H2) 8,40 (s, 1H, H9)</p>	<p>8,24 (t, 1H, J=2,0 Hz, Ho') 7,91 (dd, 1H, J=2,0; 8,4 Hz, Ho) 7,38 (t, 1H, J=8,4 Hz, Hm) 7,15 (d, 1H, J=2,0; 8,4 Hz, Hp)</p>	<p>6,77 (s, 2H, Ho'')</p>
		<p>71o</p> <p>12,6 - 11,0 (sl, 1H, N⁴H) 10,2 (sl, 1H, N⁸H) 8,71 (s, 1H, H6) 8,66 (s, 1H, H2) 8,57 (s, 1H, H9)</p>	<p>8,28 (t, 1H, J=2,0 Hz, Ho') 7,94 (d, 1H, J=8,4 Hz, Ho) 7,39 (t, 1H, J=8,4 Hz, Hm) 7,16 (dd, 1H, J=2,0; 8,4 Hz, Hp)</p>	<p>7,41 (s, 1H, Ho''') 7,21 (dd, 1H, 8,4 Hz, Ho'') 7,02 (d, 1H, J=8,4 Hz, Hm'') 3,83 (s, 3H, p-OCH₃) 3,80 (s, 3H, m-OCH₃)</p>
		<p>72k</p> <p>10,0 (s, 1H, N⁸H) 8,57 (s, 1H, H6); 8,54 (s, 1H, H2) 8,47 (s, 1H, H9)</p>	<p>7,79 (d, 2H, J=8,8 Hz, Ho) 6,94 (d, 2H, J=8,8 Hz, Hm) 3,74 (s, 3H, p-OCH₃)</p>	<p>10,0 – 9,00 (sl, 2H, m,p-OH) 7,32 (d, 1H, J=2,0 Hz, Ho'') 7,02 (dd, 1H, J=2,0; 8,4 Hz, Ho') 6,79 (d, 1H, J=8,4 Hz, Hm')</p>
		<p>72l</p> <p>10,0 (s, 1H, N⁸H) 8,58 (s, 1H, H6) 8,55 (s, 1H, H2) 8,39 (s, 1H, H9)</p>	<p>7,79 (d, 2H, J=8,8 Hz, Ho) 6,94 (d, 2H, J=8,8 Hz, Hm) 3,76 (s, 3H, p-OCH₃)</p>	<p>6,78 (s, 2H, Ho')</p>
		<p>72o</p> <p>10,1 (sl, 1H, N⁸H) 8,60 (s, 1H, H6) 8,60 (s, 1H, H2) 8,59 (s, 1H, H9)</p>	<p>7,82 (d, 2H, J=8,8 Hz, Ho) 7,03 (d, 2H, J=8,8 Hz, Hm) 3,76 (s, 3H, p-OCH₃)</p>	<p>7,51 (d, 1H, J=2,0 Hz, Ho'') 7,26 (dd, 1H, J=2,0; 8,4 Hz, Ho') 7,01 (d, 1H, J=8,4 Hz, Hm') 3,84 (s, 3H, p-OCH₃) 3,79 (s, 3H, m-OCH₃)</p>

	 73k	10,1 (s, 1H, N⁸H) 8,71 (s, 1H, H2) 8,58 (s, 1H, H6) 8,54 (s, 1H, H9)	7,68 (t, 1H, J= 2,4 Hz, Ho') 7,60 (dd, 1H, J= 2,4; 8,0 Hz, Ho) 7,29 (t, 1H, J= 8,0 Hz, Hm) 6,73 (dd, 1H, J= 2,4; 8,0 Hz, Hp) 3,77 (s, 3H, m-OCH₃)	10,0 – 9,00 (sl, 2H, m,p-OH) 7,35 (d, 1H, J= 2,0, Ho''') 7,04 (dd, 1H, J= 2,0; 8,4 Hz, Ho'') 6,81 (d, 1H, J= 8,4 Hz, Hm'')
	 73l	10,1 (s, 1H, N⁸H) 8,71 (s, 1H, H2) 8,57 (s, 1H, H6) 8,46 (s, 1H, H9)	7,67 (t, 1H, J= 2,4 Hz, Ho') 7,59 (dd, 1H, J= 2,4; 8,0 Hz, Ho) 7,29 (t, 1H, J= 8,0 Hz, Hm) 6,73 (dd, 1H, J= 2,4; 8,0 Hz, Hp) 3,77 (s, 3H, m-OCH₃)	6,82 (s, 2H, Ho'')
	 73o	11,8 (sl, 1H, N⁴H) 9,99 (s, 1H, N⁸H) 8,70 (s, 1H, H2) 8,58 (s, 1H, H6) 8,54 (s, 1H, H9)	7,73 (s, 1H, Ho') 7,64 (d, 1H, J= 8,0 Hz, Ho) 7,28 (t, 1H, J= 8,0 Hz, Hm) 6,69 (dd, 1H, J= 2,4; 8,0 Hz, Hp) 3,77 (s, 3H, m-OCH₃)	7,39 (s, 1H, Ho''') 7,20 (dd, 1H, 8,4 Hz, Ho'') 7,03 (d, 1H, J= 8,4 Hz, Hm'') 3,84 (s, 3H, p-OCH₃) 3,80 (s, 3H, m-OCH₃)
	 74k	11,7 (sl, 1H, N⁴H) 9,79 (s, 1H, N⁸H) 8,63 (s, 2H, H6; H2) 8,43 (s, 1H, H9)	9,8–9,0 (sl, 3H, OH) 7,51 (s, 1H, Ho') 7,33 (d, 1H, J= 8,0 Hz, Ho) 7,15 (t, 1H, J= 8,0 Hz, Hm) 6,54 (dd, 1H, J= 2,0; 8,0 Hz, Hp)	9,8–9,0 (sl, 3H, m,p-OH) 7,57 (d, 1H, J= 2,0, Ho''') 7,35 (dd, 1H, J= 2,0; 8,4 Hz, Ho'') 7,07 (d, 1H, J= 8,4 Hz, Hm'')
	 74o	10,2 (s, 1H, N⁸H) 8,71 (s, 1H, H6) 8,65 (s, 1H, H9) 8,59 (s, 1H, H2)	10,0–9,00 (sl, 1H, OH) 7,45 (t, 1H, J= 2,0 Hz, Ho') 7,32 (dd, 1H, J= 2,0; 8,0 Hz, Ho) 7,17 (t, 1H, J= 8,0 Hz, Hm) 6,59 (dd, 1H, J= 2,0; 8,0 Hz, Hp)	7,57 (d, 1H, J= 2,0, Ho''') 7,35 (dd, 1H, J= 2,0; 8,4 Hz, Ho'') 7,07 (d, 1H, J= 8,4 Hz, Hm'') 3,84 (s, 3H, p-OCH₃) 3,79 (s, 3H, m-OCH₃)
	 75a	11,9 (s, 1H, N⁴H) 9,98 (s, 1H, N⁸H) 8,70 (s, 1H, H2) 8,68 (s, 1H, H6) 8,65 (s, 1H, H9)	7,74 (s, 1H, Ho') 7,58 (dd, 1H, J= 2,0; 8,0 Hz, Ho) 7,26 (t, 1H, J= 8,0 Hz, Hm) 6,69 (dd, 1H, J= 2,0; 8,0 Hz, Hp) 4,95 (t, 1H, J= 5,2 Hz; OH) 3,99 (t, 2H, J= 4,8 Hz, H10) 3,73 (q, 2H, J= 4,8; 5,2 Hz, H11)	7,76 (m, 2H, Ho'') 7,58 (m, 3H, Hm'', Hp)

	75b	12,2 (sl, 1H, N⁴H) 10,07 (s, 1H, N⁸H) 8,76 (s, 1H, H2) 8,71 (s, 1H, H6) 8,63 (s, 1H, H9)	7,73 (s, 1H, Ho') 7,58 (d, 1H, J=8,0 Hz, Ho) 7,27 (t, 1H, J=8,0 Hz, Hm) 6,71 (dd, 1H, J=2,0; 8,0 Hz, Hp) 4,96 (t, 1H, J=5,2 Hz; OH) 3,99 (t, 2H, J=4,8 Hz, H10) 3,72 (q, 2H, J=4,8; 5,2 Hz H11) 7,74 (s, 1H, Ho')	8,64 (d, 2H, J=4,8 Hz, Hm'') 7,69 (d, 2H, J=4,8 Hz, Ho'')
	75c	12,1 (sl, 1H, N⁴H) 10,01 (s, 1H, N⁸H) 8,69 (s, 3H, H2; H6; H9)	7,58 (d, 1H, J=8,0 Hz, Ho) 7,26 (t, 1H, J=8,0 Hz, Hm) 6,69 (dd, 1H, J=2,0; 8,0 Hz, Hp) 4,92 (t, 1H, J=5,2 Hz; OH) 3,99 (t, 2H, J=4,8 Hz, H10) 3,73 (q, 2H, J=4,8; 5,2 Hz H11)	8,87 (s, 1H, Ho''') 8,60 (dd, 1H, J=1,6; 4,8 Hz Hp') 8,17 (d, 1H, J=4,8 Hz Ho'') 7,48 (dd, 1H, J=4,8; 8,0 Hz, Hm'')
	75d	12,0 (sl, 1H, N⁴H) 9,99 (sl, 1H, N⁸H) 8,69 (sl, 2H, H6; H2) 8,66 (s, 1H, H9)	7,76 (t, 1H, J=2,0 Hz, Ho') 7,61-7,47 (m, 4H, Ho) 7,26 (m, 2H, Hm) 6,69 (dd, 1H, J=2,0; 8,0 Hz, Hp) 4,88 (s, 1H, OH) 3,99 (t, 2H, J=4,8 Hz, H10) 3,74 (q, 2H, J=4,8 Hz H11)	7,6-7,4 (m, 4H, Ho''' ; Hp' ; Ho'') 7,26 (m, 2H, Hm'')
	75f	12,7-11,3 (sl, 1H, N⁴H) 9,98 (s, 1H, N⁸H) 8,69 (s, 2H, H6; H2) 8,62 (s, 1H, H9)	7,74 (t, 1H, J=2,4 Hz, Ho') 7,58 (dd, 1H, J=2,4; 8,4 Hz, Ho) 7,26 (t, 1H, J=8,4 Hz, Hm) 6,70 (dd, 1H, J=2,4; 8,0 Hz, Hp) 4,92 (sl, 1H, OH) 3,99 (t, 2H, J=4,8 Hz, H10) 3,73 (s, 2H, H11)	7,83 (s, 1H, Ho''') 7,60 (dd, 1H, J=2,8; 4,4 Hz, Ho'') 7,48 (m, 2H, Hm'' , Hp')
	75g	12,0 (sl, 1H, N⁴H) 9,99 (sl, 1H, N⁸H) 8,68 (sl, 2H, H2, H6) 8,62 (s, 1H, H9)	7,73 (s, 1H, Ho') 7,57 (d, 1H, J=8,4 Hz, Ho) 7,26 (t, 1H, J=8,4 Hz, Hm) 6,69 (dd, 1H, J=2,0; 8,4 Hz, Hp) 4,93 (sl, 1H, OH)	7,77 (d, 2H, J=8,8 Hz, Ho'') 7,51 (d, 2H, J=8,8 Hz, Hm'')

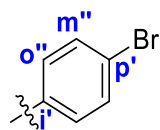


75h

12,0 (sl, 1H, **N⁴H**)
 9,99 (sl, 1H, **N⁸H**)
 8,69 (sl, 2H, **H₆**; **H₂**)
 8,62 (s, 1H, **H₉**)

3,99 (t, 2H, J= 4,8 Hz, **H₁₀**)
 3,73 (q, 2H, J=4,8; 5,2 Hz **H₁₁**)
 7,76 (t, 1H, J= 2,4 Hz, **H_{o'}**)
 7,60 (m, 2H, **H_o**)
 7,26 (t, 1H, J= 8,0 Hz, **H_m**)
 6,71 (dd, 1H, J= 2,4; 8,0 Hz, **H_p**)
 4,88 (sl, 1H, **OH**)
 3,99 (t, 2H, J= 4,8 Hz, **H₁₀**)
 3,73 (q, 2H, J=4,8 Hz **H₁₁**)

7,96 (s, 1H, **H_{o'''}**)
 7,74 (d, 1H, J=8,0 Hz, **H_{o''}**)
 7,60 (m, 2H, **H_{p'}**)
 7,41 (t, 1H, J= 8,0 Hz **H_{m''}**)

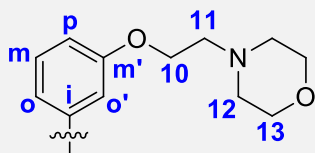


75i

11,9 (sl, 1H, **N⁴H**)
 9,97 (sl, 1H, **N⁸H**)
 8,70 (s, 1H, **H₂**)
 8,67 (s, 1H, **H₆**)
 8,59 (s, 1H, **H₉**)

7,74 (s, 1H, **H_{o'}**)
 7,70-7,50 (m, 3H, **H_o**)
 7,25 (t, 1H, J= 8,0 Hz, **H_m**)
 6,69 (dd, 1H, J= 2,0; 8,0 Hz, **H_p**)
 4,93 (s, 1H, **OH**)
 3,99 (t, 2H, J= 4,8 Hz, **H₁₀**)
 3,73 (sl, 2H, **H₁₁**)

7,77 (d, 2H, J=8,8 Hz, **H_{o''}**)
 7,51 (d, 2H, J=8,8 Hz, **H_{m''}**)



76a

11,9 (sl, 1H, **N⁴H**)
 10,00 (sl, 1H, **N⁸H**)
 8,70 (s, 2H, **H₆**, **H₂**)
 8,68 (s, 1H, **H₉**)

7,75 (m, 2H, **H_{o'}**)
 7,61 (d, 1H, J=8,4 Hz, **H_o**)
 7,27 (t, 1H, J= 8,4 Hz, **H_m**)
 6,71 (dd, 1H, J= 2,0; 8,4 Hz, **H_p**)
 4,09 (t, 2H, J= 5,6 Hz, **H₁₀**)
 3,56 (t, 4H, J= 4,4 Hz, **H₁₃**)
 2,69 (t, 2H, J= 5,6 Hz, **H₁₁**)
 2,46 (t, 4H, J= 4,4 Hz, **H₁₂**)

7,75 (m, 2H, **H_{o''}**)
 7,47 (m, 2H, **H_{m''}**, **H_p**)

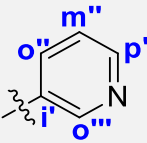
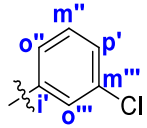
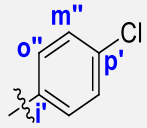
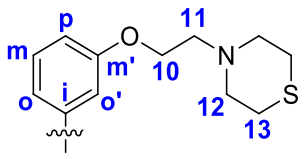
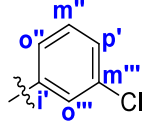


76b

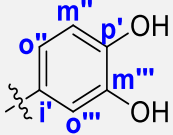
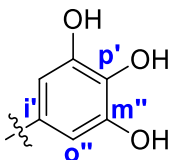
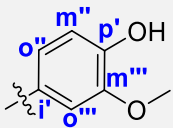
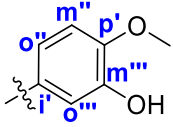
12,7-11,5 (sl, 1H, **N⁴H**)
 10,0 (sl, 1H, **N⁸H**)
 8,73 (s, 1H, **H₂**)
 8,70 (s, 1H, **H₆**)
 8,63 (s, 1H, **H₉**)

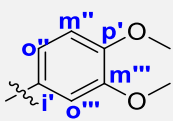
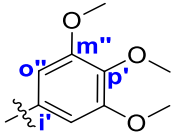
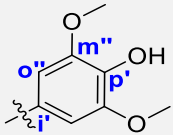
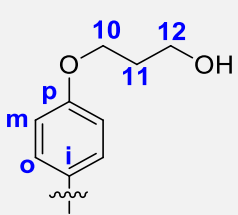
7,71 (s, 1H, **H_{o'}**)
 7,59 (dd, 1H, J= 2,0; 8,0 Hz, **H_o**)
 7,27 (t, 1H, J= 8,0 Hz, **H_m**)
 6,71 (dd, 1H, J= 2,4; 8,0 Hz, **H_p**)
 4,09 (t, 2H, J= 5,6 Hz, **H₁₀**)
 3,57 (t, 4H, J= 4,4 Hz, **H₁₃**)
 2,69 (t, 2H, J= 5,6 Hz, **H₁₁**)
 2,47 (t, 4H, J= 4,4 Hz, **H₁₂**)

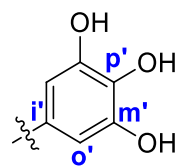
8,65 (d, 2H, J=4,8 Hz, **H_{m''}**)
 7,69 (d, 2H, J= 4,8 Hz, **H_{o''}**)

	 <p>76c</p> <p>13,0-10,0 (sl, 1H, N⁴H) 9,59 (sl, 1H, N⁸H) 8,69 (sl, 2H, H2; H9) 8,67 (s, 1H, H6)</p>	7,67 (t, 1H, J= 2,0 Hz, Ho') 7,54 (dd, 1H, J= 2,0; 8,0 Hz, Ho) 7,27 (t, 1H, J= 8,0 Hz, Hm) 6,72 (dd, 1H, J= 2,0; 8,0 Hz, Hp) 4,14 (t, 2H, J= 5,6 Hz, H10) 3,59 (t, 4H, J= 4,8 Hz, H13) 2,74 (t, 2H, J= 5,6 Hz, H11) 2,52 (t, 4H, J= 4,8 Hz, H12)	8,91 (s, 1H, Ho''') 8,60 (dd, 1H, J= 1,6; 4,8 Hz, Hp') 8,17 (d, 1H, J= 8,0 Hz, Ho'') 7,47 (dd, 1H, J= 4,8; 8,0 Hz, Hm'')
	 <p>76f</p> <p>12,1 (sl, 1H, N⁴H) 10,0 (sl, 1H, N⁸H) 8,75 (s, 1H, H2) 8,72 (s, 1H, H6) 8,66 (s, 1H, H9)</p>	7,75 (t, 1H, J= 2,0 Hz, Ho') 7,64 (d, 1H, J= 8,0 Hz, Ho) 7,27 (t, 1H, J= 8,0 Hz, Hm) 6,71 (dd, 1H, J= 2,0; 8,0 Hz, Hp) 4,09 (t, 2H, J= 5,6 Hz, H10) 3,58 (t, 4H, J= 4,4 Hz, H13) 2,70 (t, 2H, J= 5,6 Hz, H11) 2,47 (t, 4H, J= 4,4 Hz, H12)	7,80 (s, 1H, Ho''') 7,68 (s, 1H, Ho'') 7,50 (m, 2H, Hp', Hm'')
	 <p>76g</p> <p>12,0 (sl, 1H, N⁴H) 9,99 (sl, 1H, N⁸H) 8,69 (sl, 2H, H2, H6) 8,65 (s, 1H, H9)</p>	7,74 (s, 1H, Ho') 7,61 (d, 1H, J= 8,0 Hz, Ho) 7,27 (t, 1H, J= 8,0 Hz, Hm) 6,71 (dd, 1H, J= 2,4; 8,0 Hz, Hp) 4,09 (t, 2H, J= 5,6 Hz, H10) 3,57 (t, 4H, J= 4,4 Hz, H13) 2,70 (t, 2H, J= 5,6 Hz, H11) 2,47 (t, 4H, J= 4,4 Hz, H12)	7,78 (d, 2H, J= 8,8 Hz, Ho'') 7,52 (d, 2H, J= 8,8 Hz, Hm'')
	 <p>77f</p> <p>11,9 (sl, 1H, N⁴H) 9,99 (sl, 1H, N⁸H) 8,69 (sl, 2H, H2; H6) 8,65 (s, 1H, H9)</p>	7,74 (t, 1H, J= 2,0 Hz, Ho') 7,62 (d, 1H, J= 8,0 Hz, Ho) 7,27 (t, 1H, J= 8,0 Hz, Hm) 6,71 (dd, 1H, J= 2,0; 8,0 Hz, Hp) 4,08 (t, 2H, J= 5,6 Hz, H10) 2,76 (m, 6H, H11; H12) 2,60 (t, 4H, J= 4,8 Hz, H13)	7,83 (sl, 1H, Ho''') 7,69 (sl, 1H, Ho'') 7,49 (m, 2H, Hp', Hm'')

	<p>78f</p> <p>12,1 (sl, 1H, N⁴H) 10,0 (sl, 1H, N⁸H) 8,73 (s, 1H, H2) 8,69 (s, 1H, H6) 8,63 (s, 1H, H9)</p>	<p>7,73 (s, 1H, Ho') 7,61 (d, 1H, J=8,0 Hz, Ho) 7,26 (t, 1H, J=8,0 Hz, Hm) 6,69 (dd, 1H, J=2,0; 8,0 Hz, Hp) 4,09 (t, 2H, J=5,6 Hz, H10) 4,01 (q, 2H, J=7,2 Hz, OEt) 3,37 (t, 4H, J=4,8 Hz, H13) 2,73 (t, 2H, J=5,6 Hz, H11) 2,47 (t, 4H, J=4,8 Hz, H12) 1,16 (t, 3H, J=7,2 Hz, OEt)</p> <p>7,80 (sl, 1H, Ho''') 7,68 (sl, 1H, Ho'') 7,48 (m, 2H, Hp', Hm'')</p>
	<p>79b</p> <p>12,2 (sl, 1H, N⁴H) 10,0 (sl, 1H, N⁸H) 8,75 (s, 1H, H2) 8,69 (s, 1H, H6) 8,62 (s, 1H, H9)</p>	<p>7,72 (s, 1H, Ho') 7,67 (d, 1H, J=8,0 Hz, Ho) 7,26 (t, 1H, J=8,0 Hz, Hm) 6,69 (dd, 1H, J=2,4; 8,0 Hz, Hp) 4,63 (t, 1H, J=5,2 Hz, OH) 4,04 (t, 2H, J=6,4 Hz, H10) 3,57 (t, 2H, J=6,4 Hz, H12) 1,87 (quint, 2H, J=6,4 Hz, H11)</p> <p>8,64 (d, 2H, J=4,8 Hz, Hm'') 7,69 (d, 2H, J=4,8 Hz, Ho'')</p>
	<p>79c</p> <p>12,0 (sl, 1H, N⁴H) 10,0 (sl, 1H, N⁸H) 8,72 (sl, 3H, H6, H2, H9)</p>	<p>7,75 (s, 1H, Ho') 7,60 (d, 1H, J=8,0 Hz, Ho) 7,28 (t, 1H, J=8,0 Hz, Hm) 6,71 (dd, 1H, J=2,4; 8,0 Hz, Hp) 4,61 (t, 1H, J=5,2 Hz, OH) 4,06 (t, 2H, J=6,4 Hz, H10) 3,59 (t, 2H, J=6,4 Hz, H12) 1,89 (quint, 2H, J=6,4 Hz, H11)</p> <p>8,89 (s, 1H, Ho''') 8,63 (dd, 1H, J=1,6; 4,8 Hz, Hp') 8,19 (d, 1H, J=8,4 Hz, Ho'') 7,51 (dd, 1H, J=4,8; 8,4 Hz, Hm'')</p>
	<p>79j</p> <p>9,92 (sl, 1H, N⁸H) 8,67 (s, 1H, H6) 8,61 (sl, 1H, H2) 8,56 (s, 1H, H9)</p>	<p>7,73 (t, 1H, J=2,4 Hz, Ho') 7,57 (d, 1H, J=8,0 Hz, Ho) 7,26 (t, 1H, J=8,0 Hz, Hm) 6,68 (dd, 1H, J=2,4; 8,0 Hz, Hp) 5,00 - 4,50 (sl, 1H, OH) 4,04 (t, 2H, J=6,4 Hz, H10)</p> <p>7,60 (d, 2H, J=8,8 Hz, Ho'') 6,84 (d, 2H, J=8,8 Hz, Hm'')</p>

			3,57 (t, 2H, J= 6,4 Hz, H12) 1,87 (quint, 2H, J= 6,4 Hz, H11)	
	79k	10,2 (sl, 1H, N⁸H) 8,73 (s, 1H, H6) 8,55 (s, 1H, H9) 8,54 (s, 1H, H2)	7,65 (t, 1H, J= 2,4 Hz, Ho') 7,52 (d, 1H, J= 8,0 Hz, Ho) 7,28 (t, 1H, J= 8,0 Hz, Hm) 6,72 (dd, 1H, J= 2,4; 8,0 Hz, Hp) 4,04 (t, 2H, J= 6,4 Hz, H10) 3,41 (t, 2H, J= 6,4 Hz, H12) 1,87 (quint, 2H, J= 6,4 Hz, H11)	7,38 (d, 1H, J= 2,0, Ho''') 7,11 (dd, 1H, J= 2,0; 8,4 Hz, Ho'') 6,82 (d, 1H, J= 8,4 Hz, Hm'')
	79l	10,1 (sl, 1H, N⁸H) 8,73 (s, 1H, H6) 8,55 (s, 1H, H2) 8,47 (s, 1H, H9)	7,67 (t, 1H, J= 2,4 Hz, Ho') 7,54 (dd, 1H, J= 2,4; 8,0 Hz, Ho) 7,27 (t, 1H, J= 8,0 Hz, Hm) 6,72 (dd, 1H, J= 2,4; 8,0 Hz, Hp) 4,04 (t, 2H, J= 6,4 Hz, H10) 3,57 (t, 2H, J= 6,4 Hz, H12) 1,87 (quint, 2H, J= 6,4 Hz, H11)	6,84 (s, 2H, Ho'')
	79m	10,3 (sl, 1H, N⁸H) 8,76 (s, 1H, H6) 8,64 (s, 1H, H9) 8,59 (s, 1H, H2)	7,63 (t, 1H, J= 2,4 Hz, Ho') 7,51 (d, 1H, J= 8,0 Hz, Ho) 7,23 (m, 2H, Hm) 6,74 (dd, 1H, J= 2,4; 8,0 Hz, Hp) 4,04 (t, 2H, J= 6,4 Hz, H10) 3,56 (t, 2H, J= 6,4 Hz, H12) 1,87 (quint, 2H, J= 6,4 Hz, H11)	7,60 (d, 1H, J= 2,0, Ho''') 7,23 (m, 2H, Ho'') 6,87 (d, 1H, J= 8,0 Hz, Hm'') 3,88 (s, 3H, m-OCH₃)
	79n	12,5-10,7 (sl, 1H, N⁴H) 9,94 (sl, 1H, N⁸H) 8,67 (s, 1H, H6) 8,66 (sl, 1H, H2) 8,51 (s, 1H, H9)	7,74 (t, 1H, J= 2,4 Hz, Ho') 7,58 (d, 1H, J= 8,0 Hz, Ho) 7,25 (m, 2H, Hm) 6,68 (dd, 1H, J= 2,4; 8,0 Hz, Hp) 4,59 (sl, 1H, OH) 4,04 (t, 2H, J= 6,4 Hz, H10) 3,57 (t, 2H, J= 6,4 Hz, H12) 1,88 (quint, 2H, J= 6,4 Hz, H11)	7,33 (d, 1H, J= 2,0, Ho''') 7,07 (m, 2H, Ho'') 6,97 (d, 1H, J= 8,0 Hz, Hm'') 3,80 (s, 3H, p-OCH₃)

	 <p>79o</p> <p>10,2 (sl, 1H, N⁸H) 8,73 (s, 1H, H6) 8,63 (s, 1H, H9) 8,61 (s, 1H, H2)</p>	<p>7,67 (t, 1H, J= 2,0 Hz, Ho') 7,56 (d, 1H, J= 8,0 Hz, Ho) 7,28 (t, 1H, J= 8,0 Hz, Hm) 6,73 (dd, 1H, J= 2,0; 8,0 Hz, Hp) 4,05 (t, 2H, J= 6,4 Hz, H10) 3,57 (t, 2H, J= 6,4 Hz, H12) 1,88 (quint, 2H, J= 6,4 Hz, H11)</p>	<p>7,53 (d, 1H, J= 2,0, Ho''') 7,32 (dd, 1H, J= 2,0; 8,4 Hz, Ho'') 7,05 (d, 1H, J= 8,4 Hz, Hm'') 3,83 (s, 3H, m-OCH₃) 3,79 (s, 3H, p-OCH₃)</p>
	 <p>79p</p> <p>10,3 (sl, 1H, N⁸H) 8,76 (s, 1H, H6) 8,64 (sl, 2H, H2, H9)</p>	<p>7,64 (t, 1H, J= 2,4 Hz, Ho') 7,52 (dd, 1H, J= 2,4; 8,0 Hz, Ho) 7,28 (t, 1H, J= 8,0 Hz, Hm) 6,74 (dd, 1H, J= 2,4; 8,0 Hz, Hp) 4,04 (t, 2H, J= 6,4 Hz, H10) 3,56 (t, 2H, J= 6,4 Hz, H12) 1,88 (quint, 2H, J= 6,4 Hz, H11)</p>	<p>7,23 (s, 2H, Ho'') 3,87 (s, 6H, m-OCH₃) 3,72 (s, 3H, p-OCH₃)</p>
	 <p>79q</p> <p>10,3 (sl, 1H, N⁸H) 8,75 (s, 1H, H6) 8,60 (s, 2H, H2, H9)</p>	<p>7,64 (t, 1H, J= 2,4 Hz, Ho') 7,55 (dd, 1H, J= 2,4; 8,0 Hz, Ho) 7,28 (t, 1H, J= 8,0 Hz, Hm) 6,74 (dd, 1H, J= 2,4; 8,0 Hz, Hp) 4,03 (t, 2H, J= 6,4 Hz, H10) 3,57 (t, 2H, J= 6,4 Hz, H12) 1,88 (quint, 2H, J= 6,4 Hz, H11)</p>	<p>7,21 (s, 2H, Ho'') 3,85 (s, 6H, m-OCH₃)</p>
	<p>80j</p> <p>10,13 (s, 1H, N⁸H) 8,61 (s, 1H, H6) 8,59 (s, 1H, H2) 8,54 (s, 1H, H9)</p>	<p>7,80 (d, 2H, J= 8,8 Hz, Ho) 6,94 (d, 2H, J= 8,8 Hz, Hm) 4,03 (t, 2H, J= 6,4 Hz, H10) 3,56 (t, 2H, J= 6,4 Hz, H12) 1,85 (quint, 2H, J= 6,4 Hz, H11)</p>	<p>7,68 (d, 2H, J= 8,8 Hz, Ho') 6,85 (d, 2H, J= 8,8 Hz, Hm')</p>
	<p>80k</p> <p>10,10 (s, 1H, N⁸H) 8,60 (s, 1H, H6) 8,53 (s, 1H, H2) 8,51 (s, 1H, H9)</p>	<p>7,79 (d, 2H, J= 8,8 Hz, Ho) 6,93 (d, 2H, J= 8,8 Hz, Hm) 4,02 (t, 2H, J= 6,4 Hz, H10) 3,55 (t, 2H, J= 6,4 Hz, H12) 1,85 (quint, 2H, J= 6,4 Hz, H11)</p>	<p>9,70 - 9,00 (sl, 2H, m,p-OH) 7,36 (d, 1H, J= 2,0, Ho'') 7,05 (dd, 1H, J= 2,0; 8,4 Hz, Ho') 6,81 (d, 1H, J= 8,4 Hz, Hm')</p>



80l

10,10 (s, 1H, **N⁸H**)
 8,60 (s, 1H, **H6**)
 8,52 (s, 1H, **H2**)
 8,43 (s, 1H, **H9**)

7,70 (d, 2H, J= 8,8 Hz, **Ho**)
 6,93 (d, 2H, J= 8,8 Hz, **Hm**)
 4,02 (t, 2H, J= 6,4 Hz, **H10**)
 3,55 (t, 2H, J= 6,4 Hz, **H12**)
 1,85 (quint, 2H, J= 6,4 Hz, **H11**)

6,83 (s, 2H, **Ho'**)

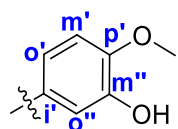


80m

10,42 (s, 1H, **N⁸H**)
 8,69 (s, 1H, **H6**)
 8,65 (s, 1H, **H9**)
 8,57 (s, 1H, **H2**)

7,77 (d, 2H, J= 8,8 Hz, **Ho**)
 6,99 (d, 2H, J= 8,8 Hz, **Hm**)
 4,06 (t, 2H, J= 6,4 Hz, **H10**)
 3,58 (t, 2H, J= 6,4 Hz, **H12**)
 1,87 (quint, 2H, J= 6,4 Hz, **H11**)

7,63 (d, 1H, J=2,0, **Ho''**)
 7,31 (m, 2H, **Ho'**)
 6,90 (d, 1H, J=8,0 Hz, **Hm'**)
 3,90 (s, 3H, **m-OCH₃**)

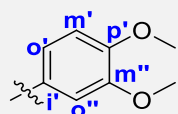


80n

10,13 (s, 1H, **N⁸H**)
 8,60 (s, 1H, **H6**)
 8,54 (s, 1H, **H2**)
 8,53 (s, 1H, **H9**)

7,79 (d, 2H, J= 8,8 Hz, **Ho**)
 6,95 (d, 2H, J= 8,8 Hz, **Hm**)
 4,03 (t, 2H, J= 6,4 Hz, **H10**)
 3,53 (t, 2H, J= 6,4 Hz, **H12**)
 1,85 (quint, 2H, J= 6,4 Hz, **H11**)

7,39 (d, 1H, J=2,0, **Ho''**)
 7,16 (m, 2H, **Ho'**)
 6,99 (d, 1H, J=8,0 Hz, **Hm'**)
 3,82 (s, 3H, **p-OCH₃**)

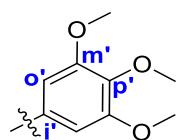


80o

11,76 (sl, 1H, **N⁴H**)
 9,95 (s, 1H, **N⁸H**)
 8,64 (s, 1H, **H6**)
 8,57 (s, 1H, **H2**)
 8,54 (s, 1H, **H9**)

7,81 (d, 2H, J= 8,8 Hz, **Ho**)
 6,93 (d, 2H, J= 8,8 Hz, **Hm**)
 4,65 (t, 1H, J= 5,2 Hz, **OH**)
 4,02 (t, 2H, J= 6,4 Hz, **H10**)
 3,63 (t, 2H, J= 6,4 Hz, **H12**)
 1,84 (quint, 2H, J= 6,4 Hz, **H11**)

7,47 (d, 1H, J=2,0 Hz, **Ho''**)
 7,21 (dd, 1H, J=2,0; 8,4 Hz, **Ho'**)
 7,02 (d, 1H, J=8,4 Hz, **Hm'**)
 3,83 (s, 3H, **p-OCH₃**)
 3,79 (s, 3H, **m-OCH₃**)

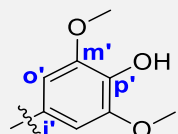


80p

10,16 (s, 1H, **N⁸H**)
 8,62 (s, 1H, **H6**)
 8,60 (s, 1H, **H2**)
 8,58 (s, 1H, **H9**)

7,80 (d, 2H, J= 8,8 Hz, **Ho**)
 6,94 (d, 2H, J= 8,8 Hz, **Hm**)
 4,03 (t, 2H, J= 6,4 Hz, **H10**)
 3,57 (t, 2H, J= 6,4 Hz, **H12**)
 1,85 (quint, 2H, J= 6,4 Hz, **H11**)

7,13 (s, 2H, **Ho'**)
 3,86 (s, 6H, **m-OCH₃**)
 3,70 (s, 3H, **p-OCH₃**)

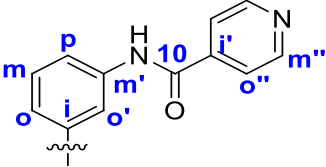
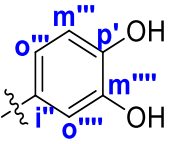
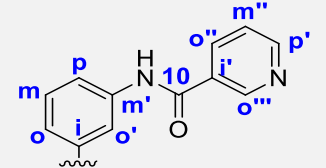
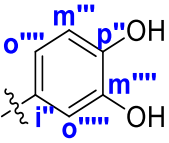
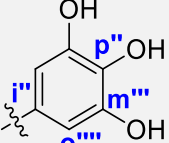


80q

11,74 (sl, 1H, **N⁴H**)
 9,98 (s, 1H, **N⁸H**)
 8,567 (s, 1H, **H6**)
 8,59 (s, 1H, **H2**)
 8,53 (s, 1H, **H9**)

7,84 (d, 2H, J= 8,8 Hz, **Ho**)
 6,94 (d, 2H, J= 8,8 Hz, **Hm**)
 4,03 (t, 2H, J= 6,4 Hz, **H10**)
 3,56 (t, 2H, J= 6,4 Hz, **H12**)
 1,86 (quint, 2H, J= 6,4 Hz, **H11**)

8,95 (sl, 1H, **OH**)
 7,00 (s, 2H, **Ho'**)
 3,83 (s, 6H, **m-OCH₃**)

	 <p>81k</p>	<p>11,71 (sl, 1H, N⁴H) 10,07 (s, 1H, N⁸H) 8,67 (s, 1H, H₂) 8,66 (s, 1H, H₆) 8,49 (s, 1H, H₉)</p>	<p>10,58 (s, 1H, N¹⁰H) 8,78 (d, 2H, J=4,8 Hz, H_{m''}) 8,50 (s, 1H, H_{o'}) 7,87 (d, 2H, J=4,8 Hz, H_{o''}) 7,67 (dd, 1H, J=2,0; 8,0 Hz, H_o) 7,53 (dd, 1H, J=2,4; 8,0 Hz, H_p) 7,38 (t, 1H, J=8,0 Hz, H_m) 10,6 (s, 1H, N¹⁰H) 8,84 (d, 2H, J=4,8 Hz, H_{m''}) 8,47 (s, 2H, H_{o'}) 7,97 (d, 2H, J=4,8 Hz, H_{o''}) 7,65 (d, 1H, J=8,0 Hz, H_o) 7,55 (d, 1H, J=8,0 Hz, H_p) 7,39 (t, 1H, J=8,0 Hz, H_m)</p>	<p>9,43 (sl, 1H, OH) 9,29 (sl, 1H, OH) 7,29 (dd, 1H, J=2,0; 8,4 Hz, H_{o'''}) 6,94 (d, 1H, J=2,0 Hz, H_{o''''}) 6,79 (d, 1H, J=8,4 Hz, H_{m''''})</p>
	 <p>82k</p>	<p>10,2 (sl, 1H, N⁸H) 8,67 (s, 1H, H₆) 8,56 (s, 1H, H₂) 8,51 (s, 1H, H₉)</p>	<p>10,6 (s, 1H, N¹⁰H) 9,13 (d, 1H, J=2,0 Hz, H_{o'''}) 8,78 (dd, 1H, J=1,6; 4,8 Hz, H_{p'}) 8,42 (t, 1H, J=2,0, H_{o'}) 8,38 (dt, 1H, J=2,0; 8,0 Hz, H_{o''}) 7,63 (m, 2H, H_o; H_{m''}) 7,53 (d, 1H, J=8,0 Hz, H_p) 7,37 (m, 2H, H_m) 10,6 (s, 1H, N¹⁰H) 9,15 (d, 1H, J=2,4 Hz, H_{o''''}) 8,81 (dd, 1H, 1,6; 4,8 Hz, H_{p'}) 8,45 (t, 1H, J=2,0, H_{o'}) 8,43 (dt, 1H, J=2,0; 8,0 Hz, H_{o''}) 7,67 (dd, 1H, J=4,8; 8,0 Hz, H_{m''}) 7,62 (d, 1H, J=8,0 Hz, H_o) 7,55 (d, 1H, J=8,0 Hz, H_p) 7,39 (t, 1H, J=8,0 Hz, H_m)</p>	<p>7,37 (m, 2H, H_{o''''}) 7,08 (dd, 1H, J=2,0; 8,0 Hz, H_{o''''}) 6,82 (d, 1H, J=8,0 Hz, H_{m''''})</p>
	 <p>82l</p>	<p>10,2 (sl, 1H, N⁸H) 8,69 (s, 1H, H₆) 8,57 (s, 1H, H₂) 8,47 (s, 1H, H₉)</p>	<p>10,6 (s, 1H, N¹⁰H) 9,15 (d, 1H, J=2,4 Hz, H_{o''''}) 8,81 (dd, 1H, 1,6; 4,8 Hz, H_{p'}) 8,45 (t, 1H, J=2,0, H_{o'}) 8,43 (dt, 1H, J=2,0; 8,0 Hz, H_{o''}) 7,67 (dd, 1H, J=4,8; 8,0 Hz, H_{m''}) 7,62 (d, 1H, J=8,0 Hz, H_o) 7,55 (d, 1H, J=8,0 Hz, H_p) 7,39 (t, 1H, J=8,0 Hz, H_m)</p>	<p>6,85 (s, 2H, H_{o''''})</p>

¹³C RMN

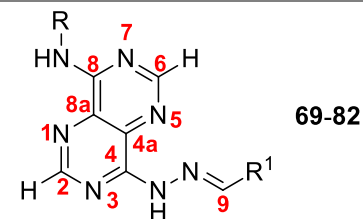
A análise dos dados de ¹³C RMN (Tab. 23) permitiu identificar os sinais característicos do núcleo de 4-hidrazonopirimidopirimidina assim como sinais correspondentes a grupos aromáticos **R** e **R**¹. Os sinais do núcleo C2 e C6 a $\delta \approx 155-154$ ppm confirmam a presença do núcleo de pirimidopirimidina descrito nos capítulos anteriores. Além disso, o aparecimento de sinais correspondentes ao C9 a δ entre 152-146 ppm é uma das principais evidências para comprovar a presença do grupo hidrazona. O desvio químico associado a este sinal é muito dependente do grupo **R**¹. Quando mais remotor for **R**¹ maior o desvio químico a que o sinal de C9 aparece.

A presença de um segundo conjunto de sinais aromáticos correspondentes aos grupos **R**¹ a $\delta \approx 160-100$ ppm provam a introdução de um segundo anel aromático. Este último resultado, combinado com as correlações por HMBC entre o H9 e os carbonos de **R**¹ (Ci', Co e Co') confirmam a reação de condensação do aldeído.

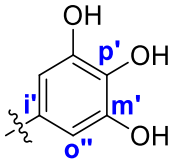

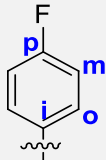
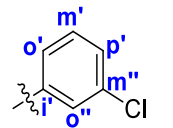
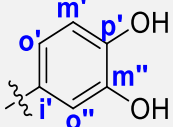
Acrescenta-se ainda que, os sinais correspondentes a **R** foram atribuídos por comparação com os respectivos precursores **67** e **65** e em regra geral não sofreram mudanças de desvio químico significativas. A atribuição dos sinais correspondentes a **R**¹ foi levada a cabo por correlações HMQC e HMBC e, quando possível, por comparação com grupos **R** com padrões de substituição iguais. Salienta-se que dentro da mesma serie os sinais de **R** foram praticamente iguais somente variando nos sinais correspondentes a **R**¹. No entanto, derivados de series diferentes com **R**¹ igual mostraram sinais praticamente idênticos.

Também foram detetados sinais na forma de bandas largas correspondentes a C4a e C8a. Nestes, destaca-se que o seu desvio químico se manteve semelhante quando comparado com **67** variando entre $\delta \approx 132-130$ ppm. Em vários compostos os sinais correspondentes a C4a e C8a surgiram como um único singleto largo.

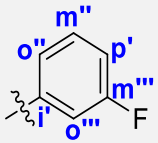
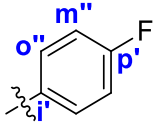
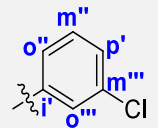
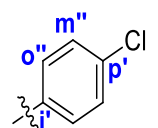
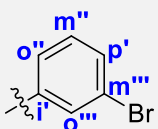
Tabela 23 – Dados espectroscópicos de ^{13}C RMN (100 MHz, DMSO-d_6) dos compostos **69-82**



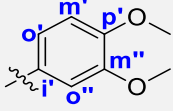
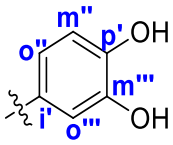
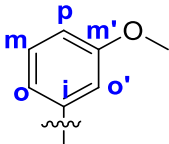
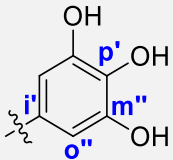
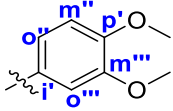
R	R ¹	N ^o	C8/C4/C6/C2/ C9/C4a/C8a	R	R ¹
		69d	156,3 (C8)	144,2 (CH, Cp)	163,3; 160,9 (d, J= 242 Hz, Cm'')
			153,5 (CH, C2; C6; C4)	142,9 (CH, Co')	136,7; 136,6 (d, J= 8 Hz, Ci')
			147,9 (CH, C9)	134,8 (ci)	130,3; 130,2 (d, CH, J= 8 Hz, Cm')
			131,7 (C8a; C4a)	128,1 (CH, Co)	123,2 (d, CH, J= 1 Hz, Co'')
		69f	156,8 (C8)	144,6 (CH, Cp)	136,6 (ci')
			155,4 (C4)	143,5 (CH, Co')	133,7 (Cm'')
			154,9 (CH, C2)	143,5 (CH, Co')	130,8 (CH, Cm')
			153,9 (CH, C6)	135,3 (ci)	129,7 (CH, Cp')
		69h	146,8 (CH, C9)	128,8 (CH, Co)	126,0 (CH, Co''')
			132,7 (C8a)	123,3 (CH, Cm)	125,9 (CH, Co'')
			131,2 (C4a)		
			156,3 (C8)	144,1 (CH, Cp)	136,5 (ci')
		69k	154,9 (C4)	142,9 (CH, Co')	132,0 (Cm'')
			154,4 (CH, C2)	134,7 (ci)	130,3 (CH, Cm')
			153,5 (CH, C6)	128,0 (CH, Co)	130,0 (CH, Cp)
			146,7 (CH, C9)	122,6 (CH, Cm)	128,7 (CH, Co''')
		69k	132,0 (C8a; C4a)		125,9 (CH, Co'')
			156,7 (C8)	144,6 (CH, Cp)	148,1 (Cp')
			155,1 (CH, C2)	143,4 (CH, Co')	145,8 (Cm'')
			155,0 (C4)	135,3 (ci)	125,8 (ci')
		69k	153,8 (CH, C6)	128,8 (CH, Co)	120,8 (CH, Co'')
			149,4 (CH, C9)	123,3 (CH, Cm)	115,7 (CH, Cm')

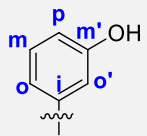
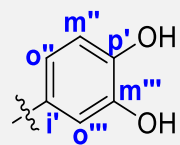

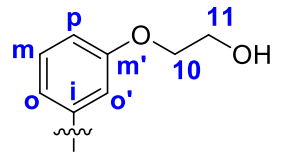
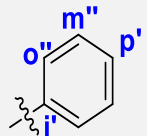
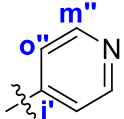
		132,4 (C8a)		112,9 (CH, Co''')
		131,3 (C4a)		
		69i	156,5 (C8)	
		153,8 (CH, C2)	140,5 (CH, Cp)	146,2 (Cp')
		153,7 (C4)	138,8 (CH, Co')	136,3 (Cm')
		153,5 (CH, C6)	136,9 (ci)	124,4 (ci')
		151,3 (CH, C9)	132,7 (CH, Co)	106,8 (CH, Co'')
		132,4 (C8a)	125,2 (CH, Cm)	
		131,8 (C4a)		
		69o	156,8 (C8)	151,1 (Cp')
		155,1 (CH, C4)	144,6 (CH, Cp)	149,4 (Cm'')
		154,0 (C6 , C2)	143,4 (CH, Co')	127,2 (ci')
		149,2 (CH, C9)	135,4 (ci)	122,4 (CH, Co'')
		132,5 (C8a)	128,9 (CH, Co)	111,5 (CH, Cm')
		131,6 (C4a)	123,5 (CH, Cm)	108,6 (CH, Co'')
				55,73 (CH ₃ , p-OCH₃)
				55,71 (CH ₃ , m-OCH₃)
		70f	156,4 (C8)	136,7 (ci')
		154,7 (CH, C2 ; C4)	159,7; 157,3 (d, J= 240 Hz, Cp)	133,7 (Cm'')
		154,1 (CH, C6)	134,8; 134,7 (d, J= 3,0 Hz, ci)	130,8 (CH, Cm')
		146,9 (CH, C9)	123,8; 123,7 (d, CH, J= 8,0 Hz, Co)	129,7 (CH, Cp')
		132,4 (C4a)	115,2; 114,9 (d, CH, J= 22 Hz, Cm)	126,2 (CH, Co' ; Co'')
		131,4 (C8a)		
		70k	156,5 (C8)	148,5 (Cp')
		154,2 (CH, C6)	159,9; 157,5 (d, J= 240 Hz, Cp)	145,8 (Cm'')
		153,5 (C4)	134,7; 134,7 (d, J= 2,0 Hz, ci)	125,5 (ci')
		152,9 (CH, C2)	124,0; 123,9 (d, CH, J= 8,0 Hz, Co)	121,1 (CH, Co')
		150,9 (CH, C9)	115,3; 115,1 (d, CH, J= 23 Hz, Cm)	115,7 (CH, Cm')
		131,9 (C4a)		113,3 (CH, Co'')
		131,8 (C8a)		

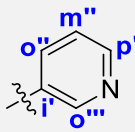
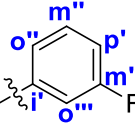
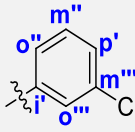
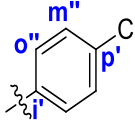
		70i	156,5 (C8) 154,4 (CH, C6) 152,9 (C4) 152,2 (CH, C2) 151,8 (CH, C9) 131,9 (C4a) 131,6 (C8a)	160,0; 157,6 (d, J= 240 Hz, Cp) 134,7; 134,6 (d, J= 3,0 Hz, Ci) 124,2; 124,1 (d, CH, J= 8,0 Hz, Co) 115,4; 115,2 (d, CH, J= 23 Hz, Cm)	146,3 (Cp') 136,6 (Cm'') 124,4 (Cl') 107,1 (CH, Co')
		70o	156,6 (C8) 154,1 (CH, C6) 153,9 (C4) 153,5 (CH, C2) 150,3 (CH, C9) 131,9 (C4a) 131,7 (C8a)	159,9; 157,5 (d, J= 240 Hz, Cp) 134,6; 134,6 (d, J= 3,0 Hz, Ci) 123,8; 123,7 (d, CH, J= 8,0 Hz, Co) 115,3; 115,0 (d, CH, J= 22 Hz, Cm)	151,3 (Cp') 149,3 (Cm'') 127,2 (Cl') 122,4 (CH, Co') 119,7 (CH, Co'') 112,0 (CH, Cm') 55,90 (CH ₃ , p-OCH₃) 55,80 (CH ₃ , m-OCH₃)
		71a	156,4 (C8) 155,1 (C4) 155,0 (CH, C2) 153,9 (CH, C6) 148,9 (CH, C9) 132,4 (C8a) 131,3 (C4a)	140,1 (Cm') 132,9 (Cl) 130,2 (CH, Cm) 123,5 (CH, Cp) 120,9 (CH, Co') 120,0 (CH, Co)	134,5 (Cl') 130,3 (CH, Cp') 128,9 (CH, Cm'') 127,3 (CH, Co'')
		71b	156,2 (C8) 154,8 (CH, C2; C4) 153,8 (CH, C6) 146,6 (CH, C9) 132,3 (C8a) 131,5 (C4a)	139,7 (Cm') 132,7 (Cl) 129,8 (CH, Cm) 123,3 (CH, Cp) 120,8 (CH, Co') 119,7 (CH, Co)	149,9 (s, CH, Cm'') 141,4 (s, Cl') 120,8 (s, CH, Co'')
	71c	156,5 (C8) 155,4 (CH, C2) 154,9 (C4) 154,0 (CH, C6) 145,8 (CH, C9)	140,1 (Cm') 132,8 (Cl) 130,2 (CH, Cm) 123,5 (CH, Cp) 120,9 (CH, Co')	150,7 (CH, Cp') 148,7 (CH, Co''') 133,6 (CH, Co'') 130,4 (Cl') 124,1 (CH, Cm'')	

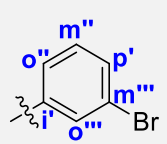
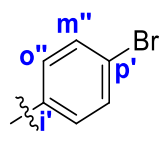
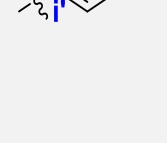
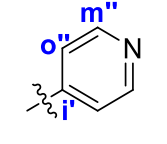
		132,7 (C8a)	120,1 (CH, Co)	
		131,0 (C4a)		
	71d	156,4 (C8)	140,1 (Cm')	163,7; 161,3 (d, J= 420 Hz, Cm''')
		155,3 (CH, C4)	132,9 (Ci)	137,1; 137,0 (d, J= 8 Hz, Ci')
		154,9 (CH, C2)	130,2 (CH, Cm)	131,0; 130,9 (d, CH, J= 8 Hz, Cm'')
		154,1 (CH, C6)	123,5 (CH, Cp)	117,0; 116,8 (d, CH, J= 22 Hz, Cp')
		147,3 (CH, C9)	120,9 (CH, Co')	113,0; 112,8 (d, CH, J= 22 Hz, Co''')
		131,1 (C8a; C4a)	120,0 (CH, Co)	123,8 (CH, Co'')
	71e	156,4 (C8)	140,1 (Cm')	
		154,8 (C4)	132,8 (Ci)	164,4; 161,9 (d, J= 246 Hz, Cp')
		155,4 (CH, C2)	130,1 (CH, Cm)	131,0 (d, J= 2,7 Hz, Ci')
		153,9 (CH, C6)	123,4 (CH, Cp)	129,4; 129,3 (d, CH, J= 8 Hz, Co'')
		148,1 (CH, C9)	120,8 (CH, Co')	116,1; 115,8 (d, CH, J= 22 Hz, Cm'')
		132,2 (C8a; C4a)	119,9 (CH, Co)	
	71f	156,4 (C8)	140,1 (Cm')	136,7 (Ci')
		154,8 (CH, C2; C4)	132,9 (Ci)	133,7 (Cm''')
		154,0 (CH, C6)	130,1 (CH, Cm)	130,8 (CH, Cm'')
		147,1 (CH, C9)	123,4 (CH, Cp)	129,7 (CH, Cp')
		132,4 (C8a; C4a)	120,9 (CH, Co')	126,2 (CH, Co''; Co''')
			119,9 (CH, Co)	
	71g	156,5 (C8)	140,1 (Cm')	
		153,4 (C4)	132,9 (Ci)	134,6 (Cp')
		155,0 (CH, C2)	130,2 (CH, Cm)	133,4 (Ci')
		153,9 (CH, C6)	123,5 (CH, Cp)	129,0 (CH, Cm'')
		147,3 (CH, C9)	120,9 (CH, Co')	128,8 (CH, Co'')
		132,7 (C8a)	120,1 (CH, Co)	
	71h	156,2 (C8)	139,7 (Cm')	136,7 (Ci')
		154,8 (C4)	132,8 (Ci)	132,4 (CH Cp')
		153,8 (CH, C2; C6)	129,8 (CH, Cm)	130,7 (CH, Cm'')
		147,1 (CH, C9)	123,3 (CH, Cp)	129,0 (CH Co''')
		132,4 (C8a)	120,7 (CH, Co')	126,3 (CH Co'')
		130,7 (C4a)	119,7 (CH, Co)	121,9 (Cm''')

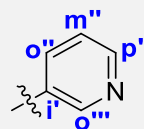
	71k	156,4 (C8) 155,1 (CH, C2) 155,0 (C4) 153,7 (CH, C6) 149,5 (CH, C9) 132,4 (C8a) 131,2 (C4a)	140,1 (Cm') 132,9 (Cl) 130,2 (CH, Cm) 123,4 (CH, Cp) 120,9 (CH, Co') 119,9 (CH, Co)	148,1 (Cp') 145,8 (Cm''') 125,8 (Cl') 120,8 (CH, Co'') 115,7 (CH, Cm'') 112,9 (CH, Co'')	
	71l	156,4 (C8) 155,1 (CH, C6) 153,9 (C4) 153,6 (CH, C2) 151,0 (CH, C9) 132,0 (C8a, C4a)	140,1 (Cm') 133,0 (Cl) 130,3 (CH, Cm) 123,7 (CH, Cp) 121,0 (CH, Co') 120,1 (CH, Co)	146,3 (Cm'') 136,4 (Cp') 124,6 (Cl') 106,9 (CH, Co'')	
	71o	156,4 (C8) 155,0 (CH, C2) 155,0 (C4) 153,9 (CH, C6) 149,5 (CH, C9) 132,3 (C8a) 131,4 (C4a)	140,1 (Cm') 132,9 (Cl) 130,2 (CH, Cm) 123,4 (CH, Cp) 120,8 (CH, Co') 119,9 (CH, Co)	150,9 (Cp') 149,1 (Cm''') 127,1 (Cl') 122,0 (CH, Co'') 111,5 (CH, Cm'') 108,5 (CH, Co'') 55,62 (CH ₃ , m-OCH₃) 55,57 (CH ₃ , p-OCH₃)	
		72k	156,4 (C8) 154,4 (CH, C6) 153,1 (C4) 152,5 (CH, C2) 151,2 (CH, C9) 131,7 (C4a, C8a)	156,2 (CH, Cp) 131,2 (Cl) 123,7 (CH Co) 113,8 (CH Cm) 55,40 (CH ₃ , p-OCH₃)	148,6 (Cp') 145,9 (Cm'') 125,7 (Cl') 121,3 (CH, Co') 115,7 (CH, Cm') 113,5 (CH, Co'')
	72l	156,5 (C8) 154,4 (CH, C6) 153,1 (C4) 152,5 (CH, C2) 151,5 (CH, C9) 131,7 (C4a)	156,2 (CH, Cp) 131,2 (Cl) 123,8 (CH, Co) 113,9 (CH, Cm) 55,40 (CH ₃ , p-OCH₃)	146,3 (Cp') 136,5 (Cm') 124,5 (Cl') 107,1 (CH, Co')	

		131,6 (C8a)		
		72o	156,3 (C8) 154,2 (CH, C6) 153,2 (C4) 152,6 (CH, C2) 150,4 (CH, C9) 131,6 (C4a) 131,1 (C8a)	156,0 (CH, Cp) 131,7 (Ci) 123,6 (CH, Co) 113,7 (CH, Cm) 55,30 (CH ₃ , p-OCH₃)
				151,1 (Cp') 149,1 (Cm''') 126,9 (Ci') 122,4 (CH, Co') 111,5 (CH, Cm'') 108,7 (CH, Co'') 55,64 (CH ₃ , m-OCH₃) 55,61 (CH ₃ , p-OCH₃)
		73k	156,3 (C8) 154,3 (CH, C2) 152,5 (C4) 151,8 (CH, C9) 151,4 (CH, C6) 132,0 (C8a) 131,4 (C4a)	159,4 (CH, Cm') 139,3 (Ci) 129,3 (CH, Cm) 114,0 (CH Co) 109,5 (CH Cp) 107,7 (CH Co') 55,14 (CH ₃ , m-OCH₃)
		73i	156,4 (C8) 154,5 (CH, C2) 152,4 (CH, C6, C9) 151,2 (C4) 132,0 (C8a) 131,5 (C4a)	159,5 (CH, Cm') 139,8 (Ci) 129,4 (CH, Cm) 114,0 (CH Co) 109,6 (CH Cp) 107,8 (CH Co') 55,20 (CH ₃ , m-OCH₃)
				145,8 (Cp') 148,7 (Cm''') 125,3 (Ci') 121,3 (CH, Co'') 115,6 (CH, Cm'') 113,5 (CH, Co''')
		73o	156,4 (C8) 155,1 (C4) 154,9 (CH, C2) 153,9 (CH, C6) 148,9 (CH, C9) 132,0 (C8a) 131,5 (C4a)	159,5 (CH, Cm') 139,6 (Ci) 129,3 (CH, Cm) 113,7 (CH Co) 109,2 (CH Cp) 107,5 (CH Co') 55,14 (CH ₃ , m-OCH₃)
				150,0 (Cp') 149,1 (Cm''') 127,1 (Ci') 122,0 (CH, Co'') 111,5 (CH, Cm'') 107,5 (CH, Co''') 55,61 (CH ₃ , m-OCH₃) 55,55 (CH ₃ , p-OCH₃)

	 74k	156,2 (C8) 154,8 (CH, C2; C4) 153,9 (CH, C6) 148,3 (CH, C9) 132,2 (C4a) 130,8 (C8a)	157,3 (CH, Cm') 139,2 (CI) 129,3 (CH, Cm) 112,3 (CH Co) 111,1 (CH Cp) 108,5 (CH Co')	148,0 (Cp') 145,6 (Cm''') 125,7 (CI') 120,8 (CH, Co'') 115,6 (CH, Cm'') 112,9 (CH, Co''')
	 74o	156,3 (C8) 154,5 (CH, C2) 153,1 (CH C6) 150,6 (C4) 148,9 (CH, C9) 132,3 (C4a) 130,9 (C8a)	157,4 (CH, Cm') 138,7 (CI) 129,2 (CH, Cm) 113,0 (CH Co) 111,7 (CH Cp) 109,3 (CH Co')	151,7 (Cp') 149,1 (Cm''') 126,1 (CI') 123,3 (CH, Co'') 111,4 (CH, Cm'') 109,2 (CH, Co''') 55,67 (CH ₃ , p-OCH₃) 55,64 (CH ₃ , m-OCH₃)
	 75a	156,4 (C8) 155,4 (C4) 154,9 (CH, C2) 154,1 (CH, C6) 148,7 (CH, C9) 132,6 (C8a) 131,0 (C4a)	158,9 (Cm') 139,6 (CI) 129,4 (CH, Cm) 113,8 (CH, Co) 109,8 (CH, Cp) 108,0 (CH, Co') 69,59 (CH ₂ , C10) 59,71 (CH ₂ , C11)	130,2 (CH, Cp') 129,0 (CH, Cm'') 128,3 (CI') 127,3 (CH, Co'')
	 75b	156,6 (C8) 155,6 (C4) 154,8 (CH, C2) 154,4 (CH, C6) 146,0 (CH, C9) 133,0 (C8a) 131,1 (C4a)	158,9 (Cm') 139,6 (CI) 129,5 (CH, Cm) 113,9 (CH, Co) 109,9 (CH, Cp) 108,2 (CH, Co') 69,63 (CH ₂ , C10) 59,75 (CH ₂ , C11)	150,4 (CH, Cm'') 141,7 (CI') 121,2 (CH, Co'')

	75c	156,3 (C8) 155,3 (C4) 154,8 (CH, C2) 154,2 (CH, C6) 145,7 (CH, C9) 132,7 (C8a) 130,9 (C4a)	158,8 (Cm') 139,5 (Cl) 129,3 (CH, Cm) 113,7 (CH, Co) 109,7 (CH, Cp) 107,9 (CH, Co') 64,51 (CH ₂ , C10) 59,61 (CH ₂ , C11)	150,7 (CH, Cp') 148,7 (CH, Co''') 133,6 (CH, Co'') 130,4 (Cl') 124,1 (CH, Cm'')
	75d	156,3 (C8) 154,9 (CH, C2; C4) 154,8 (CH, C2) 154,1 (CH, C6) 147,4 (CH, C9) 132,0 (C4a; C8a)	158,8 (CH, Cm') 139,5 (Cl) 129,2 (CH, Cm) 113,7 (CH Co) 109,7 (CH Cp) 107,9 (CH Co') 69,46 (CH ₂ , C10) 59,57 (CH ₂ , C11)	163,6; 161,2 (d, J= 420 Hz, Cm''') 137,1; 137,0 (d, J= 8 Hz, Cl') 131,0; 130,9 (d, CH, J= 8 Hz, Cm'') 116,9; 116,7 (d, CH, J= 22 Hz, Cp') 112,9; 112,7 (d, CH, J= 22 Hz, Co''') 123,7 (CH, Co'')
	75f	156,4 (C8) 155,1 (C4) 154,8 (CH, C2) 154,2 (CH, C6) 147,2 (CH, C9) 132,4 (C4a; C8a)	158,9 (CH, Cm') 139,6 (Cl) 129,4 (CH, Cm) 113,7 (CH Co) 109,7 (CH Cp) 108,0 (CH Co') 69,50 (CH ₂ , C10) 59,60 (CH ₂ , C11)	136,7 (Cl') 133,7 (Cm''') 130,8 (CH, Cm'') 129,8 (CH, Cp') 126,2 (CH, Co''') 126,1 (CH, Co'')
	75g	156,4 (C8) 155,3 (C4) 154,9 (CH, C2) 154,2 (CH, C6) 147,3 (CH, C9) 132,7 (C8a) 131,0 (C4a)	158,9 (Cm') 139,6 (Cl) 129,4 (CH, Cm) 113,8 (CH, Co) 109,8 (CH, Cp) 108,0 (CH, Co') 64,58 (CH ₂ , C10) 59,69 (CH ₂ , C11)	134,6 (Cp') 133,4 (Cl') 129,0 (CH, Cm'') 128,9 (CH, Co'')

	<p>75h</p>	<p>156,3 (C8) 154,8 (CH, C2; C4) 154,1 (CH, C6) 146,8 (CH, C9) 132,5 (CH, C8a) 131,0 (CH, C4a)</p>	<p>158,8 (CH, Cm') 139,5 (Ci) 129,2 (CH, Cm) 113,6 (CH, Co) 109,7 (CH, Cp) 107,9 (CH, Co') 69,46 (CH2, C10) 59,56 (CH2, C11)</p>	<p>136,9 (Cp') 132,5 (CH, Cp'') 131,0 (CH, Cm''') 128,9 (CH, Co''') 126,4 (CH, Co'') 122,2 (Cm''')</p>
	<p>75i</p>	<p>156,4 (C8) 155,3 (C4) 154,9 (CH, C2) 154,1 (CH, C6) 147,3 (CH, C9) 132,7 (C8a) 130,9 (C4a)</p>	<p>158,9 (CH, Cm') 139,6 (Ci) 129,4 (CH, Cm) 113,7 (CH, Co) 109,7 (CH, Cp) 107,9 (CH, Co') 69,54 (CH2, C10) 59,67 (CH2, C11)</p>	<p>133,8 (Cp') 131,9 (CH, Co'') 129,0 (CH, Cm'') 123,4 (Cp')</p>
	<p>76a</p>	<p>156,4 (C8) 155,3 (C4) 154,9 (CH, C6) 154,0 (CH, C2) 148,6 (CH, C9) 134,4 (C4a) 132,6 (C8a)</p>	<p>158,6 (Cm') 139,6 (Ci) 129,3 (CH, Cm) 113,8 (CH, Co) 109,8 (CH, Cp) 107,9 (CH, Co') 66,20 (CH2, C13) 65,26 (CH2, C10) 57,03 (CH2, C11) 53,66 (CH2, C12)</p>	<p>130,1 (CH, Cp') 128,9 (CH, Cm'') 127,3 (Cp') 127,2 (CH, Co'')</p>
	<p>76b</p>	<p>156,5 (C8) 155,5 (C4) 154,8 (CH, C2) 154,4 (CH, C6) 146,1 (CH, C9) 132,9 (C8a) 131,3 (C4a)</p>	<p>158,7 (Cm') 139,6 (Ci) 129,5 (CH, Cm) 114,0 (CH, Co) 110,0 (CH, Cp) 108,1 (CH, Co') 66,30 (CH2, C13)</p>	<p>150,4 (CH, Cm'') 141,7 (Cp') 121,2 (CH, Co'')</p>

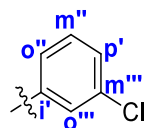


76c

156,2 (**C8**)
 156,1 (**C4**)
 153,7 (CH, **C2**; **C6**)
 145,9 (CH, **C9**)
 137,5 (**C8a**)
 136,0 (**C4a**)

65,37 (CH₂, **C10**)
 57,13 (CH₂, **C11**)
 53,75 (CH₂, **C12**)
 158,6 (**Cm'**)
 139,1 (**Cl**)
 128,9 (CH, **Cm**)
 113,5 (CH, **Co**)
 110,2 (CH, **Cp**)
 107,9 (CH, **Co'**)
 65,88 (CH₂, **C13**)
 65,62 (CH₂, **C10**)
 56,66 (CH₂, **C11**)
 53,23 (CH₂, **C12**)

150,2 (CH, **Cp'**)
 148,3 (CH, **Co'''**)
 133,3 (CH, **Co''**)
 130,0 (**Cl'**)
 123,4 (**Cm''**)

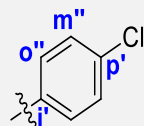


76f

156,4 (**C8**)
 154,4 (**C4**)
 154,8 (CH, **C2**)
 154,1 (CH, **C6**)
 146,8 (CH, **C9**)
 132,7 (**C8a**)
 130,9 (**C4a**)

158,6 (**Cm'**)
 139,6 (**Cl**)
 129,3 (CH, **Cm**)
 113,8 (CH, **Co**)
 109,8 (CH, **Cp**)
 107,9 (CH, **Co'**)
 66,20 (CH₂, **C13**)
 65,25 (CH₂, **C10**)
 57,00 (CH₂, **C11**)
 53,66 (CH₂, **C12**)

136,7 (**Cl'**)
 133,7 (**Cm'''**)
 130,8 (CH, **Cp'**)
 129,7 (CH, **Cm''**)
 126,1 (CH, **Co'''**)
 126,0 (CH, **Co''**)

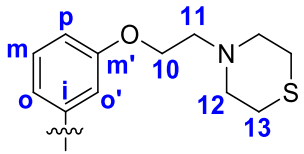
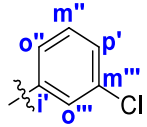
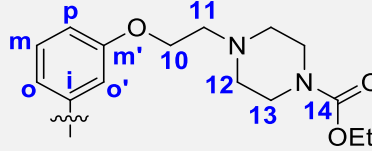
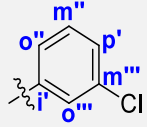
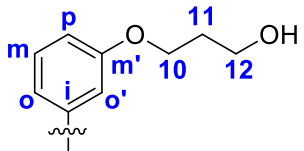
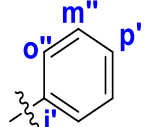


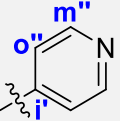
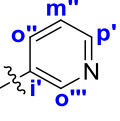
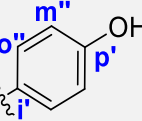
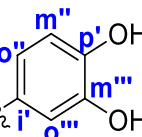
76g

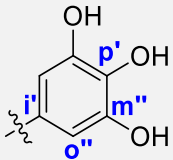
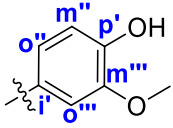
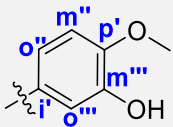
156,3 (**C8**)
 155,3 (**C4**)
 154,7 (CH, **C2**)
 154,1 (CH, **C6**)
 147,2 (CH, **C9**)
 132,6 (**C8a**)
 131,2 (**C4a**)

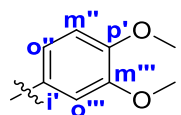
158,6 (**Cm'**)
 139,6 (**Cl**)
 129,3 (CH, **Cm**)
 113,8 (CH, **Co**)
 109,8 (CH, **Cp**)
 107,9 (CH, **Co'**)
 66,20 (CH₂, **C13**)
 65,25 (CH₂, **C10**)
 57,03 (CH₂, **C11**)
 53,65 (CH₂, **C12**)

134,5 (**Cp'**)
 133,4 (**Cl'**)
 129,0 (CH, **Cm''**)
 128,8 (CH, **Co''**)

	 <p>77f</p>	<p>156,3 (C8) 154,8 (CH, C2; C4) 154,1 (CH, C6) 147,0 (CH, C9) 132,4 (C8a) 131,2 (C4a)</p>	<p>158,6 (Cm') 139,6 (Cl) 129,3 (CH, Cm) 113,8 (CH, Co) 109,8 (CH, Cp) 107,9 (CH, Co') 65,31 (CH₂, C10) 57,20 (CH₂, C11) 54,83 (CH₂, C12) 27,16 (CH₂, C13)</p>	<p>136,7 (Cl') 133,7 (Cm''') 130,8 (CH, Cp') 129,7 (CH, Cm'') 126,1 (CH, Co''') 126,0 (CH, Co'')</p>
	 <p>78f</p>	<p>156,4 (C8) 155,4 (C4) 154,9 (CH, C2) 154,1 (CH, C6) 146,8 (CH, C9) 132,7 (C8a) 130,9 (C4a)</p>	<p>158,6 (Cm') 139,6 (Cl) 129,3 (CH, Cm) 113,8 (CH, Co) 109,8 (CH, Cp) 107,9 (CH, Co') 65,34 (CH₂, C10) 60,72 (CH₂, OEt) 56,53 (CH₂, C11) 52,75 (CH₂, C12) 43,36 (CH₂, C13) 14,59 (CH₃, OEt)</p>	<p>136,7 (Cl') 133,7 (Cm''') 130,8 (CH, Cp') 129,7 (CH, Cm'') 126,1 (CH, Co''') 126,0 (CH, Co'')</p>
	 <p>79b</p>	<p>156,3 (C8) 154,9 (C4) 154,0 (CH, C6) 148,7 (CH, C2; C9) 134,5 (C4a; C8a)</p>	<p>158,8 (Cm') 139,6 (Cl) 129,3 (CH, Cm) 113,6 (CH, Co) 109,7 (CH, Cp) 107,8 (CH, Co') 64,60 (CH₂, C10) 57,30 (CH₂, C12) 32,10 (CH₂, C11)</p>	<p>130,1 (CH, Cp') 128,9 (CH, Cm'') 128,3 (Cl') 127,2 (CH, Co'')</p>

	79c	156,5 (C8) 155,5 (C4) 154,8 (CH, C2) 154,4 (CH, C6) 145,9 (CH, C9) 133,0 (C8a) 131,0 (C4a)	158,9 (Cm') 139,6 (Ci) 129,4 (CH, Cm) 113,7 (CH, Co) 109,9 (CH, Cp) 108,0 (CH, Co') 64,70 (CH ₂ , C10) 57,50 (CH ₂ , C12) 32,20 (CH ₂ , C11)	150,4 (CH, Cm'') 141,7 (Cp') 121,1 (CH, Co'')
	79j	156,4 (C8) 154,8 (CH, C2; C4) 154,2 (CH, C6) 145,7 (CH, C9) 131,0 (C4a; C8a)	158,8 (Cm') 139,5 (Ci) 129,3 (CH, Cm) 113,7 (CH, Co) 109,8 (CH, Cp) 107,9 (CH, Co') 64,60 (CH ₂ , C10) 57,40 (CH ₂ , C12) 32,10 (CH ₂ , C11)	150,7 (CH, Cp') 148,7 (CH, Co''') 133,6 (CH, Co'') 130,4 (Cp') 124,1 (CH, Cm'')
	79k	156,3 (C8) 155,5 (C4) 154,0 (CH, C2; C6) 149,6 (CH, C9) 132,1 (C4a; C8a)	158,9 (Cm') 139,6 (Ci) 129,3 (CH, Cm) 113,6 (CH, Co) 109,7 (CH, Cp) 107,8 (CH, Co') 64,60 (CH ₂ , C10) 57,40 (CH ₂ , C12) 32,10 (CH ₂ , C11)	159,6 (Cp') 129,1 (CH, Co'') 125,4 (Cp') 115,8 (CH, Cm'')
	79l	156,4 (C8) 154,8 (CH, C6) 153,3 (CH, C2) 151,2 (C4) 149,6 (CH, C9) 133,4 (C4a)	158,9 (Cm') 139,2 (Ci) 129,5 (CH, Cm) 114,2 (CH, Co) 110,4 (CH, Cp)	149,2 (Cp') 145,9 (Cm''') 125,1 (Cp') 121,9 (CH, Co'') 115,7 (CH, Cm'')

	131,1 (C8a)	108,4 (CH, Co') 64,70 (CH ₂ , C10) 57,40 (CH ₂ , C12) 32,10 (CH ₂ , C11)	114,0 (CH, Co''')
 <p>79m</p>	156,3 (C8) 154,6 (CH, C6) 153,1 (CH, C2) 151,6 (C4) 150,1 (CH, C9) 132,2 (C4a) 131,2 (C8a)	158,9 (CH, Cm') 139,2 (Ci) 129,4 (CH, Cm) 114,0 (CH Co) 110,2 (CH Cp) 108,3 (CH Co') 64,60 (CH ₂ , C10) 57,40 (CH ₂ , C12) 32,10 (CH ₂ , C11)	146,2 (Cp') 137,0 (Cm''') 123,9 (Ci') 107,4 (CH, Co'')
 <p>79n</p>	156,4 (C8) 155,9 (CH, C6) 154,6 (CH, C2) 149,6 (C4) 147,3 (CH, C9) 132,8 (C4a) 130,5 (C8a)	158,9 (Cm') 138,9 (Ci) 129,4 (CH, Cm) 114,2 (CH, Co) 110,6 (CH, Cp) 108,6 (CH, Co') 64,70 (CH ₂ , C10) 57,40 (CH ₂ , C12) 32,10 (CH ₂ , C11)	150,6 (Cp') 148,3 (Cm''') 124,6 (Ci') 124,1 (CH, Co'') 115,6 (CH, Cm'') 110,4 (CH, Co''') 55,92 (CH ₃ , m-OCH₃)
 <p>79o</p>	156,3 (C8) 154,9 (CH, C6) 153,9 (CH, C2) 149,9 (C4) 148,9 (CH, C9) 132,3 (C4a) 131,0 (C8a)	158,8 (Cm') 138,6 (Ci) 129,3 (CH, Cm) 113,6 (CH, Co) 109,7 (CH, Cp) 107,8 (CH, Co') 64,60 (CH ₂ , C10) 57,40 (CH ₂ , C12) 32,10 (CH ₂ , C11)	149,9 (Cp') 146,9 (Cm''') 127,3 (Ci') 120,5 (CH, Co'') 112,5 (CH, Co''') 111,9 (CH, Cm'') 57,40 (CH ₃ , p-OCH₃)

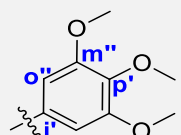


79p

156,4 (**C8**)
 154,6 (CH, **C6**)
 153,4 (CH, **C9**)
 151,5 (**C4**)
 150,0 (CH, **C2**)
 132,3 (**C4a**)
 131,2 (**C8a**)

158,8 (**Cm'**)
 139,2 (**Ci**)
 129,4 (CH, **Cm**)
 114,1 (CH, **Co**)
 110,3 (CH, **Cp**)
 108,3 (CH, **Co'**)
 64,70 (CH₂, **C10**)
 57,70 (CH₂, **C12**)
 32,30 (CH₂, **C11**)

151,6 (**Cp'**)
 149,2 (**Cm'''**)
 126,4 (**Ci'**)
 123,2 (CH, **Co''**)
 111,5 (CH, **Cm''**)
 109,1 (CH, **Co'''**)
 57,70 (CH₃, **m-OCH₃**)
 57,60 (CH₃, **p-OCH₃**)

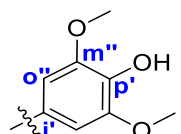
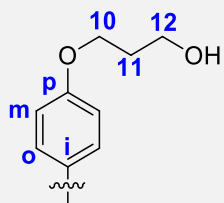


79q

156,4 (**C8**)
 154,6 (CH, **C6**)
 153,4 (CH, **C2**)
 153,3 (**C4**)
 148,6 (CH, **C9**)
 132,4 (**C4a**)
 130,8 (**C8a**)

158,9 (CH, **Cm'**)
 138,9 (**Ci**)
 129,4 (CH, **Cm**)
 114,3 (CH **Co**)
 110,5 (CH **Cp**)
 108,6 (CH **Co'**)
 64,70 (CH₂, **C10**)
 57,30 (CH₂, **C12**)
 32,10 (CH₂, **C11**)

150,5 (**Cm''**)
 140,3 (**Cp'**)
 128,9 (**Ci'**)
 105,6 (CH, **Co''**)
 60,20 (CH₃, **p-OCH₃**)
 56,20 (CH₃, **m-OCH₃**)

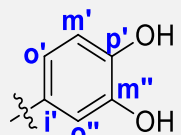


80j

156,4 (**C8**)
 154,9 (CH, **C6**)
 154,3 (CH, **C2**)
 150,0 (**C4**)
 147,9 (CH, **C9**)
 132,7 (**C4a**)
 130,7 (**C8a**)

158,9 (CH, **Cm'**)
 130,0 (**Ci**)
 129,5 (CH, **Cm**)
 114,3 (CH **Co**)
 110,5 (CH **Cp**)
 108,6 (CH **Co'**)
 64,70 (CH₂, **C10**)
 57,40 (CH₂, **C12**)
 32,10 (CH₂, **C11**)

148,3 (**Cm'**)
 148,1 (**Cp''**)
 123,6 (**Ci'**)
 106,2 (CH, **Co''**)
 56,30 (CH₃, **m-OCH₃**)



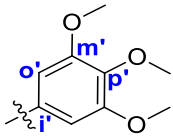
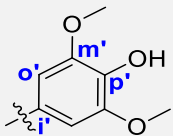
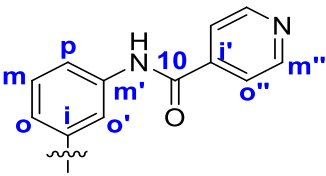
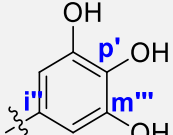
80k

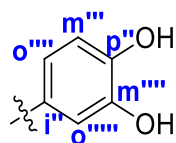
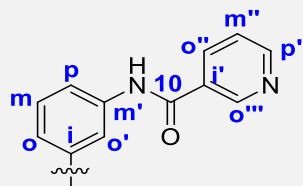
156,3 (**C8**)
 154,5 (CH, **C6**)
 152,1 (CH, **C2**)
 151,9 (**C4**)
 150,9 (CH, **C9**)
 131,8 (**C4a**)

155,7 (**Cp**)
 130,9 (**Ci**)
 123,7 (CH, **Co**)
 114,3 (CH, **Cm**)
 64,80 (CH₂, **C10**)
 57,40 (CH₂, **C12**)

148,8 (**Cp'**)
 145,8 (**Cm''**)
 125,4 (**Ci'**)
 121,5 (CH, **Co'**)
 115,7 (CH, **Cm'**)
 113,7 (CH, **Co''**)

		131,3 (C8a)	32,10 (CH ₂ , C11)	
 80l		156,3 (C8)	155,7 (Cp)	
		154,5 (CH, C6)	130,9 (Ci)	146,3 (Cp')
		152,7 (CH, C9)	123,8 (CH, Co)	136,8 (Cm')
		151,7 (C4)	114,4 (CH, Cm)	124,2 (Ci')
		150,6 (CH, C2)	64,80 (CH ₂ , C10)	107,3 (CH, Co')
		131,8 (C4a)	57,40 (CH ₂ , C12)	
		131,2 (C8a)	32,10 (CH ₂ , C11)	
 80m		156,4 (C8)	156,0 (Cp)	150,6 (Cp')
		154,9 (CH, C9)	130,4 (Ci)	148,2 (Cm'')
		154,7 (CH, C6)	124,3 (CH, Co)	124,7 (Ci')
		148,8 (C4)	114,3 (CH, Cm)	124,1 (CH, Co')
		146,9 (CH, C2)	64,83 (CH ₂ , C10)	115,5 (CH, Cm')
		132,3 (C4a)	57,33 (CH ₂ , C12)	110,5 (CH, Co'')
		130,2 (C8a)	32,14 (CH ₂ , C11)	55,92 (CH ₃ , m-OCH₃)
 80n		156,4 (C8)	155,7 (Cp)	150,5 (Cp')
		154,5 (CH, C6)	130,9 (Ci)	146,9 (Cm'')
		152,3 (C4)	123,6 (CH, Co)	126,9 (Ci')
		151,6 (CH, C9)	114,5 (CH, Cm)	121,3 (CH, Co')
		151,4 (CH, C2)	64,90 (CH ₂ , C10)	113,1 (CH, Co'')
		131,8 (C4a)	57,60 (CH ₂ , C12)	111,9 (CH, Cm')
		131,5 (C8a)	32,30 (CH ₂ , C11)	55,80 (CH ₃ , p-OCH₃)
 80o		156,5 (C8)	155,5 (Cp)	151,0 (Cp')
		155,2 (C4)	131,4 (Ci)	149,3 (Cm'')
		154,8 (CH, C6)	123,6 (CH, Co)	127,3 (Ci')
		154,4 (CH, C2)	113,7 (CH, Cm)	122,4 (CH, Co')
		149,0 (CH, C9)	64,70 (CH ₂ , C10)	111,6 (CH, Cm')
		131,4 (C4a; C8a)	57,40 (CH ₂ , C12)	108,6 (CH, Co'')
			32,10 (CH ₂ , C11)	55,76; 55,74 (CH ₃ , m,p-OCH₃)

	 <p>80p</p>	<p>156,7 (C8) 154,3 (CH, C6) 153,2 (C4) 151,7 (CH, C2) 150,9 (CH, C9) 131,6 (C4a) 131,1 (C8a)</p>	<p>155,6 (Cp) 130,9 (Ci) 123,7 (CH, Co) 114,3 (CH, Cm) 64,80 (CH₂, C10) 57,40 (CH₂, C12) 32,10 (CH₂, C11)</p>	<p>152,5 (Cm') 139,7 (Cp') 129,5 (Ci') 104,9 (CH, Co') 60,20 (CH₃, p-OCH₃) 56,10 (CH₃, m-OCH₃)</p>
	 <p>80q</p>	<p>156,3 (C8) 154,9 (C4) 154,8 (CH, C6) 154,1 (CH, C2) 149,2 (CH, C9) 132,4 (C4a) 130,8 (C8a)</p>	<p>155,3 (Cp) 131,3 (Ci) 123,4 (CH, Co) 114,3 (CH, Cm) 64,78 (CH₂, C10) 57,38 (CH₂, C12) 32,19 (CH₂, C11)</p>	<p>148,2 (Cm') 138,0 (Cp') 124,7 (Ci') 104,8 (CH, Co') 56,11 (CH₃, m-OCH₃)</p>
 <p>81k</p>	<p>156,5 (C8) 155,0 (CH, C6) 155,0 (C4) 153,8 (CH, C9) 149,3 (CH, C2) 132,3 (C4a) 131,1 (C8a)</p>	<p>164,1 (C10) 150,3 (CH, Cm'') 141,9 (Ci') 138,7 (Ci) 138,6 (Cm') 128,7 (CH, Cm) 121,7 (CH, Co'') 118,0 (CH, Co) 116,5 (CH, Cp) 114,3 (CH, Co')</p>	<p>148,1 (Cp') 145,8 (Cm'''') 125,8 (Ci'') 120,7 (CH, Co'''') 115,7 (CH, Cm'''') 112,8 (CH, Co'''')</p>	
	 <p>81l</p>	<p>156,5 (C8) 154,5 (CH, C6) 152,4 (CH, C9; C4) 151,3 (CH, C2) 132,2 (C4a) 131,4 (C8a)</p>	<p>163,8 (C10) 149,3 (CH, Cm''; Ci') 138,7 (Ci) 138,5 (Cm') 128,9 (CH, Cm) 122,3 (CH, Co'') 118,8 (CH, Co) 116,9 (CH, Cp) 114,6 (CH, Co')</p>	<p>146,3 (Cp') 136,8 (Cm'''') 124,2 (Ci'') 107,2 (CH, Co'''')</p>

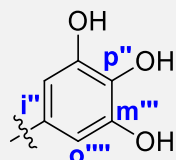


82k

156,4 (**C8**)
 154,5 (CH, **C6**)
 152,5 (CH, **C9**)
 151,9 (**C4**)
 150,8 (CH, **C2**)
 132,2 (**C4a**)
 131,2 (**C8a**)

163,8 (**C10**)
 151,1 (CH, **Cp'**)
 147,9 (CH, **Co'''**)
 138,9 (**Cl**)
 138,5 (**Cm'**)
 136,6 (CH, **Co''**)
 130,9 (**Cl'**)
 128,8 (CH, **Cm**)
 118,1 (CH, **Co**)
 116,8 (CH, **Cp**)
 114,4 (CH, **Co'**)

148,8 (**Cp''**)
 145,8 (**Cm''''**)
 125,3 (**Cl''**)
 121,5 (CH, **Co''''**)
 115,6 (CH, **Cm''''**)
 113,8 (CH, **Co''''**)



82l

156,5 (**C8**)
 154,6 (CH, **C6**)
 153,0 (CH, **C2**)
 151,9 (**C4**)
 150,4 (CH, **C9**)
 132,3 (**C4a**)
 131,2 (**C8a**)

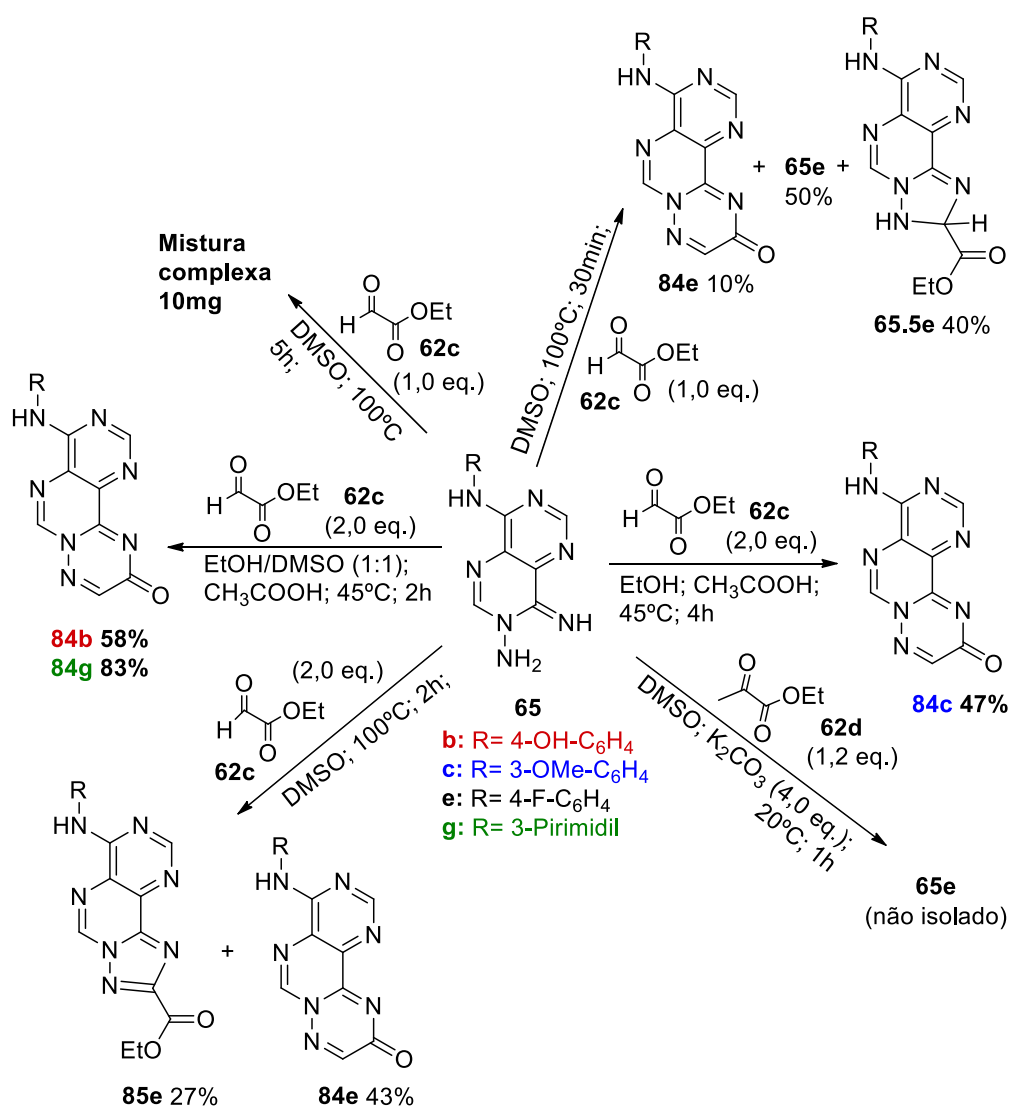
163,7 (**C10**)
 150,9 (CH, **Cp'**)
 147,7 (CH, **Co'''**)
 138,9 (**Cl**)
 138,3 (**Cm'**)
 137,1 (CH, **Co''**)
 131,1 (**Cl'**)
 128,9 (CH, **Cm**)
 118,4 (CH, **Co**)
 116,9 (CH, **Cp**)
 114,6 (CH, **Co'**)

146,3 (**Cp''**)
 136,9 (**Cm''''**)
 124,0 (**Cl''**)
 107,4 (CH, **Co''''**)

3.1.3. Estudos preliminares para a síntese de Triazinopirimidopirimidinas **84**

Recentemente, na procura de fármacos antiparasitários têm-se detetado várias moléculas muito ativas com um núcleo tri e/ou tetracíclico [35,38,39,42]. Dentro do grupo de investigação, já se havia sintetizado alguns derivados tricíclicos cuja estrutura era constituída por um anel de triazole fundido com o núcleo de pirimidopirimidina [61,65].

Neste trabalho iniciou-se o estudo para a síntese de uma nova estrutura tricíclica que combinasse um anel de triazina fundido com o núcleo de pirimidopirimidina. O novo sistema seria o resultado das reações entre os compostos **65** e espécies 1,2-dicarbonílicas (**62c,d**) (Esq. 22).



Esquema 22 – Estudos de reatividade de **65** com espécies 1,2-dicarbonílicas (**62c,d**)

Inicialmente, levou-se a cabo a reação de **65e** com **62d** em DMSO a 20°C, com catálise básica. Esta decisão resulta dos resultados do capítulo anterior, nos quais se conseguiu condensar compostos

carbonílicos com **65** aplicadas condições básicas. Usou-se, contudo, uma base não nucleofílica (K_2CO_3) e ao fim de 1h de reação verificou-se espectroscopicamente a presença de somente reagente de partida **65e** na mistura reacional.

Dado os resultados, decidiu-se despoletar a reação por incremento da temperatura. Para isso, removeu-se o catalisador, aumentou-se a temperatura ($100^\circ C$) e efetuou-se a reação com um reagente mais reativo (**62c**). Tendo-se estabelecido estas novas condições reacionais efetuou-se 3 tentativas:

Na primeira, isolou-se ao fim de 5h, uma quantidade vestigial de amostra que, por 1H RMN, revelou uma mistura extremamente complexa, na qual não se conseguiu identificar nenhum composto maioritário.

Na segunda tentativa, diminuiu-se o tempo de reação, e ao fim de 30 min, isolou-se uma primeira fração de sólido (35mg) que mostrou ter **65e** e um composto desconhecido numa proporção de 2:1. O composto desconhecido foi identificado como o produto **84e** pelo aparecimento de um sinal correspondente ao H11 a $\delta = 8,31$ ppm e pela diminuição da integração associada ao NH_2 de **65e**. Acrescenta-se que, durante o isolamento da primeira fração, verificou-se a precipitação abundante de sólido no líquido-mãe. Esta segunda fração foi isolada (120mg) e avaliada espectroscopicamente (1H RMN). A sua análise revelou uma mistura, na qual se detetou a presença de 2 compostos maioritários na proporção 1:1. A presença de **65e** foi confirmada pelo sinal correspondente ao NH_2 a $\delta = 5,67$ ppm e o composto secundário foi identificado com base em 2 dupletos a $\delta = 5,77$ e $7,33$ ppm, que pareceram apontar para presença de uma estrutura tricíclica não aromática. Os dupletos, apresentam a mesma constante de acoplamento ($J = 10$ Hz) pelo que poderão eventualmente corresponder ao carbono tetraédrico e ao NH adjacente da estrutura **65.5e**. Estes resultados parecem sugerir que o composto secundário apresenta a estrutura **65.5e**, contudo não foram efetuados mais estudos para comprovar. Em suma, desta segunda tentativa isolou-se **65e**, **84e** e **65.5e** nas proporções (5:1:4) e a reação não se concluiu uma vez detetada a presença do reagente **65e**.

Na terceira tentativa, a fim de terminar a reação, duplicou-se a quantidade de **62c**, e ao fim de 2h, isolou-se um sólido que quando se analisou espectroscopicamente mostrou uma mistura do que aparentava ser **84e** (43%) e **85e** (27%). A análise espectroscópica do sólido obtido permitiu identificar o produto **84e** pelo aparecimento de um sinal correspondente ao H11 a $\delta = 8,31$ ppm à semelhança da tentativa anterior. Para a identificação de **85e** recorreu-se a evidências experimentais obtidas pelo grupo

de investigação. Estas indicam que quando se forma um anel de triazole o protão H2 das estruturas tricíclicas desloca-se para perto de 10 ppm [61,65]. Esta informação mostrou-se coincidente com os nossos resultados, uma vez que foi detetado um sinal a $\delta = 9,9$ ppm. Além disso, o aparecimento de outros sinais, independentes de **84e**, mostraram a presença de um grupo OEt associada á estrutura **85e** (Fig. 18). Contudo, apesar de os dados parecem mostrar que o composto secundário é **85e**, este não foi isolado puro e por esse motivo não foi efetuada uma análise por ^{13}C RMN para comprovar a estrutura.

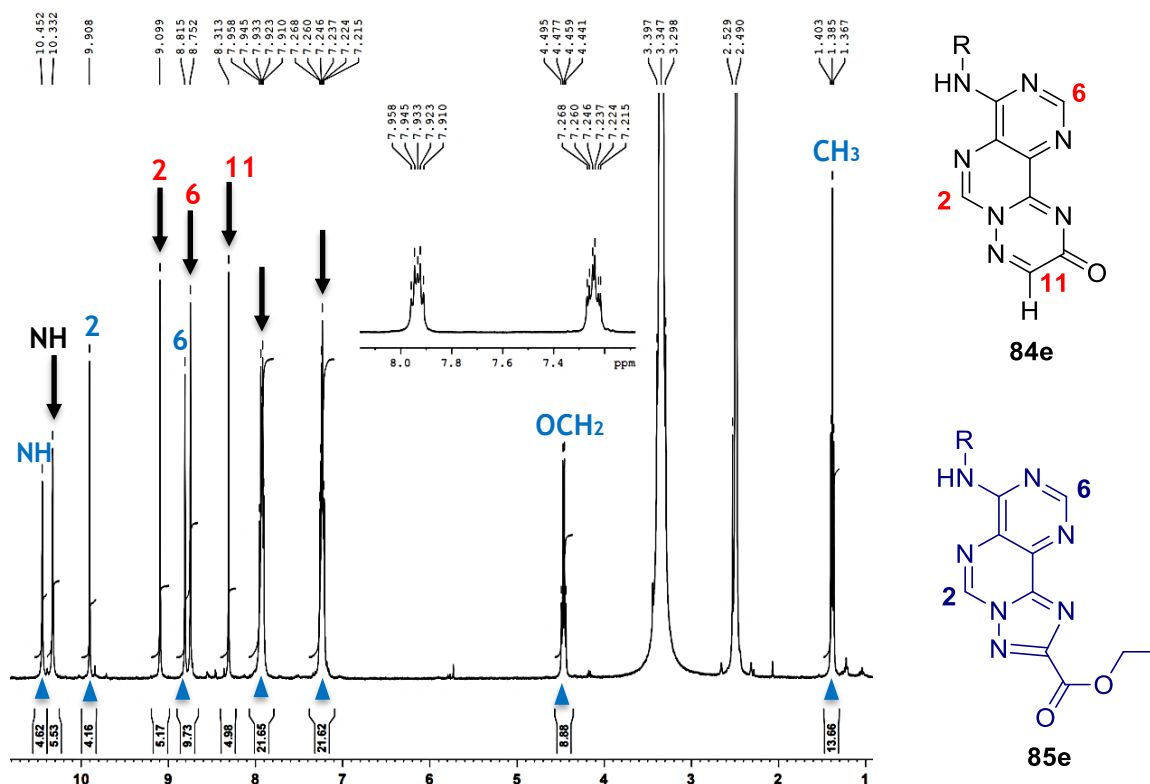


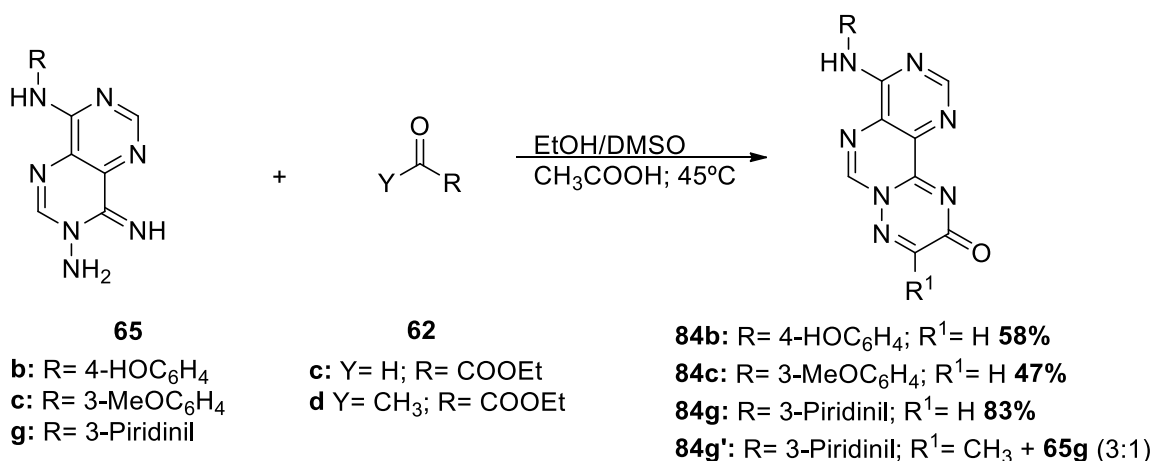
Figura 18 – Espectro de ^1H RMN do isolado (11:7) de **84e** e **85e** em DMSO-d_6 ; As setas a preto indicam sinais correspondentes a **84a** e os triângulos a azul, sinais correspondentes a **85a**; **R**= 4- FC_6H_4

Em conjunto, os resultados parecem sugerir que quando se parte de **65e**, nas condições estabelecidas (100°C), podem-se formar 2 produtos tricíclicos aromáticos competitivamente. As suas estruturas foram atribuídas com base em dados espectroscópicos dos isolados que pareceram ser compatíveis com **84e** e **85e**. Uma vez que, nas condições estabelecidas (100°C) não se conseguiu obter o composto desejado **84** seletivamente, elaborou-se um novo procedimento, menos agressivo ($T < 100^\circ\text{C}$), no qual se propôs o uso de catálise ácida, para reagir **65** com **62c**. Sabe-se por evidências experimentais [61,62,65] que os reagentes **65** são instáveis em presença de ácido, contudo, conseguem aguentar o uso de ácido acético desde que a exposição seja rápida. Assim sendo, elaborou-se um

protocolo no qual se planeou reagir **65** com **62c** com catálise ácida (CH₃COOH) em EtOH a 45°C. Todavia, o derivado **65e** não solubilizava nas condições pretendidas, pelo que se recorreu ao uso de outro análogo (**65c**) para este efeito. Aplicado este procedimento, tratou-se **65c** com **62c** tendo-se isolado o respetivo produto **84c** ao fim de 4h com rendimento moderado (47%). Este rendimento pode ser atribuído ao elevado tempo de reação, uma vez que o reagente **65** pode ter degradado na mistura reacional. Para contornar o problema, replicou-se as condições com os derivados **65b** e **65g** tendo-se usado desta vez uma mistura de DMSO/EtOH (1:1) como solvente. Ao fim de 2h, obtiveram-se os correspondentes produtos **84b** e **84g**, com bons rendimentos (58 e 83%, respetivamente). Perante os resultados, o uso de DMSO parece estar a aumentar a velocidade da reação e consequentemente a diminuir a degradação do reagente **65**. Esta particularidade revela-se nos rendimentos obtidos.

Em suma, os novos derivados tricíclicos de pirimidopirimidinas (**84**) foram obtidos com rendimentos moderados a bons por reação dos derivados **65** com **62c** em catálise ácida (Esq 23). Acrescenta-se ainda que, quando se fez reagir **65g** com **62d**, nas condições previamente estabelecidas, obteve-se, ao final de 2h, uma mistura de **84g'** e **65g** na proporção 3:1 (Esq.23). Este último resultado mostra que a reação também ocorre na presença de **62** com grupos Y alquílicos, porém é necessário prolongar o tempo de reação para que esta termine.

Estes estudos preliminares serviram para detetar as condições para gerar os derivados de triazinopirimidopirimidinas **84** a partir de **65** e, futuramente, espera-se que estes resultados permitam sintetizar novos análogos com diferentes grupos **R** e **R¹**.



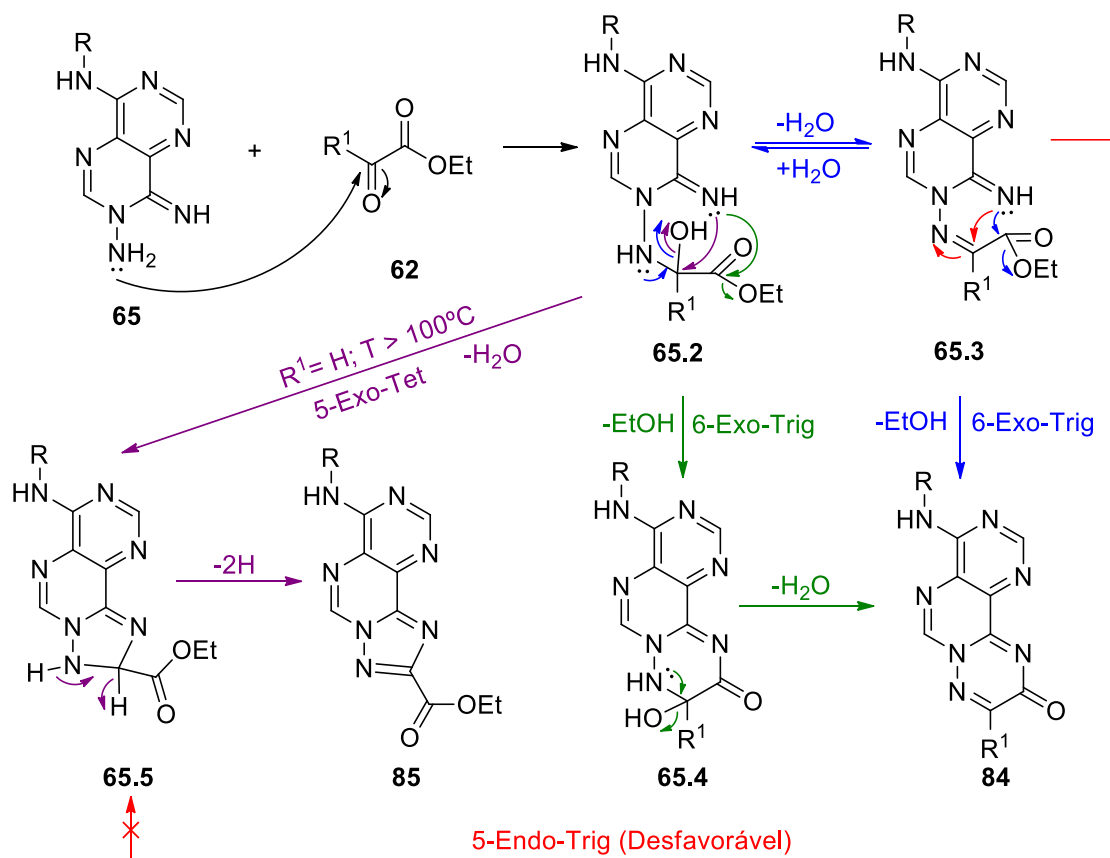
Esquema 23 – Síntese de Triazinopirimidopirimidinas **84**

3.1.3.1. Mecanismo reacional

A proposta mecanística para a formação dos compostos **84** apresenta-se no esquema seguinte (Esq. 24). Considerando os resultados experimentais, o passo inicial deverá envolver o ataque da amina livre de **65** ao carbonilo mais ativado de **62** gerando **65.2**. Dependendo das condições experimentais usadas o intermediário **65.2** pode evoluir de várias formas.

A altas temperaturas o ataque 5-Exo-Tet e 6-Exo-Trig podem ocorrer competitivamente. O ataque 5-Exo-Tet conduz à formação do anel de cinco membros **65.5** que em seguida aromatiza e gera **85**. Se ocorrer o ataque 6-Exo-Trig forma-se o anel de 6 membros **65.4** que por perda de uma molécula de água gera **84**.

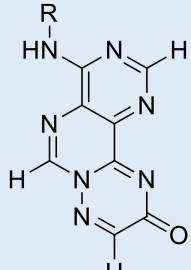
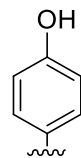
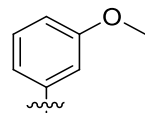
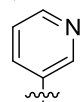
A temperatura mais moderada, e em meio ácido, o intermediário **65.2** pode eliminar uma molécula de água gerando **65.3** ou fechar o anel de seis membros gerando **65.4** que evolui para **84** por perda de água. A formação de **65.5** a partir de **65.3** envolve uma ciclização desfavorável e por isso não deve ocorrer. Por outro lado, a ciclização 6-Exo-Trig é favorável e por isso o nitrogênio imínico deve atacar o carbonilo da função éster, eliminando etanol e gerando o produto final **84**.



Esquema 24 – Proposta de mecanismo reacional na síntese de novos derivados tricíclicos de pirimidopirimidina **84** e **85** por condensação com aldeídos

3.1.3.2. Caracterização física analítica e espectroscópica dos compostos **84**

Para a confirmação da estrutura e pureza dos derivados **84** foi efetuada a caracterização por métodos físicos e espectroscópicos. Os dados físicos obtidos (Tab. 24) permitem verificar que o p.f. dos derivados **84** não varia significativamente com o grupo **R**. Este apresentou valores entre 263-287°C. Novamente, os dados analíticos experimentais não se conseguiram obter dentro do prazo de entrega deste trabalho.

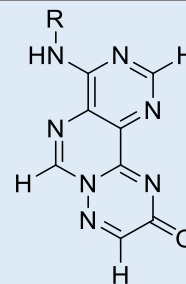
Tabela 24 - Dados físicos e analíticos dos compostos 84						
R	Nº	η (%)	P.f. (°C)	Fórmula Molecular	Massa molar (g/mol)	C; H; N; S % Esperado* (obtido)
	84b	58	265 (Deg.)	C ₁₄ H ₉ N ₇ O ₂	307,27	54,72; 2,95; 31,91
	84c	47	263-265	C ₁₅ H ₁₁ N ₇ O ₂	321,29	56,07; 3,45; 30,52
	84g	83	285-287	C ₁₃ H ₈ N ₈ O	292,26	53,43; 2,76; 38,34;

*Valores retirados do ChemDraw Ultra (12.0.2.1076)

IV

A análise por IV dos derivados **84g,b** (Tab. 25) permitiu identificar padrões muito semelhantes na zona 2300-1500 cm⁻¹, salientando-se a banda correspondente ao carbonilo C=O a 1668 e 1665 cm⁻¹, respetivamente. Também se detetaram bandas correspondentes a grupos amina na zona 3500-3070 cm⁻¹ como seria espetável. A análise do derivado **84c** não foi efetuada devido a escassez da amostra obtida durante a síntese. Uma vez que se tratava de um teste de reatividade a amostra foi toda consumida noutros métodos de caracterização (¹H e ¹³C RMN).

Tabela 25 - Dados espectroscópicos de infravermelho dos compostos **84** (cm⁻¹)

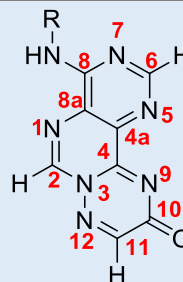


R	N ^o	3600-3000 cm ⁻¹	2300-1500 cm ⁻¹
	84b	3202 (m); 3065 (f); 3011 (m);	1665 (i); 1620 (m); 1571 (i); 1557 (i); 1527 (i);
	84c	—	—
	84g	3250 (m); 3168 (f); 3123 (f); 3079 (f); 3015 (m);	1668 (i); 1609 (i); 1560 (i); 1531 (i);

¹H RMN

A análise dos espectros de ¹H RMN dos compostos **84** (Tab. 26) permitiu detetar os sinais correspondentes aos prótons característicos do novo núcleo de triazinopirimidopirimidina. São estes o H2, H6 e H11 que foram detetados a δ por volta de 9,1; 8,7 e 8,3 ppm, respetivamente. Realça-se a mudança de desvio químico do H2 quando comparado com os precursores **65** ($\delta = 8,2$ ppm). Além desta particularidade, não se pode ignorar o aparecimento do sinal H11 e o desaparecimento de sinais correspondentes ao grupo hidrazina de **65** como provas para confirmação da estrutura **84**. Os sinais correspondentes aos prótons do grupo **R** dos derivados **84** não sofreram variações de desvio químico significativas quando comparados com os respetivos precursores **65**.

Tabela 26 – Dados espectroscópicos de ^1H RMN (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) dos compostos **84**



R	Nº	N ⁸ H/H2/H6/H11	R
	84b	10,02 (s, 1H, N⁸H) 9,05 (s, 1H, H2) 8,66 (s, 1H, H6) 8,29 (s, 1H, H11)	9,42 (sl, 1H, OH) 7,61 (d, 2H, J= 9,2 Hz, Hm); 6,93 (d, 2H, J= 9,2 Hz, Ho);
	84c	10,17 (s, 1H, N⁸H) 9,10 (s, 1H, H2) 8,80 (s, 1H, H6) 8,56 (s, 1H, H11)	7,63 (t, 1H, J= 2,0 Hz, Ho') 7,59 (dd, 1H, J= 2,0; 8,0 Hz, Ho) 7,30 (t, 1H, J= 8,0 Hz, Hm) 6,74 (dd, 1H, J= 2,0; 8,0 Hz, Hp) 3,77 (s, 3H, m-OCH₃)
	84g	10,51 (s, 1H, N⁸H) 9,14 (s, 1H, H2) 8,81 (s, 1H, H6) 8,33 (s, 1H, H11)	9,08 (d, 1H, J= 2,4 Hz, Ho'); 8,36-8,33 (m, 2H, Ho ; Hp); 7,45 (dd, 1H, J= 4,8; 8,0 Hz, Hm);

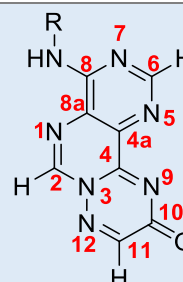
^{13}C RMN

O composto **84g** mostrou-se muito insolúvel em DMSO e não foi possível fazer o espectro de ^{13}C , mesmo a temperatura elevada (80°C). Quando se tentou usar uma base (Et_3N) para ajudar na solubilização verificou-se degradação da amostra. A análise dos espectros de ^{13}C RMN (Tab. 27) dos outros compostos **84**, em comparação com os espectros dos precursores **65**, permitiu detetar novos sinais correspondentes aos carbonos C10 e C11 característicos dos compostos **84c,b** (tabela 18). Como era espectável o C10 apresentou-se a $\delta = 160,6$ ppm e o C11 a $\delta = 147,7$ ppm. Realça-se os sinais de C6 e C4 que foram os únicos a variar consideravelmente face aos precursores **65**. O C6 apresenta-se a $\delta \approx 157$ ppm nos derivados **84** e a $\delta \approx 155$ ppm em **65**. O C4 tem o efeito inverso na medida em que se apresenta desvio químico maior em **65** do que em **84** ($\delta \approx 156$ e 151 ppm, respetivamente).

Os carbonos correspondentes aos grupos **R** de **84** não sofreram mudanças de desvio químico significativas face aos precursores **65**. A sua atribuição foi efetuada por comparação com os respetivos reagentes **65** e por análise dos espectros de correlação HMQC, HMBC.

Salienta-se que a correlação por HMBC do próton H11 com C10 comprova a proximidade dos grupos funcionais imina e amida. Não se detetou outras correlações significativas que ajudassem a provar as estruturas atribuídas **84c,b**.

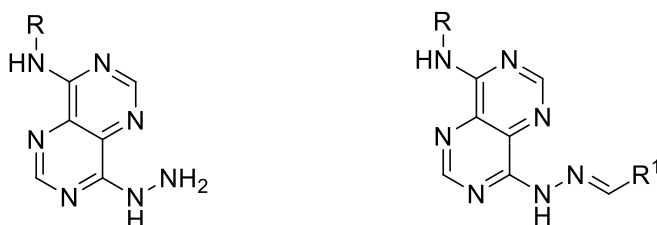
Tabela 27 – Dados espectroscópicos de ^{13}C RMN (100 MHz, DMSO-d_6) dos compostos **84**



R	Nº	C10/C6/C8/C4/C11/ C12/C4a/C8a	R
	84b	160,6 (C10)	
		157,3 (CH, C6)	
		156,5 (C8)	154,5 (Cp)
		151,0 (C4)	129,5 (Ci)
		147,7 (CH, C11)	124,2 (CH, Co)
		144,4 (CH, C2)	115,0 (CH, Cm)
		139,5 (C4a)	
		127,1 (C8a)	
	84c	160,6 (C10)	159,5 (CH, Cm')
		157,1 (CH, C6)	139,4 (Ci)
		156,5 (C8)	129,4 (CH, Cm)
		151,1 (C4)	114,2 (CH, Co)
		147,7 (CH, C11)	109,7 (Cp)
		144,7 (CH, C2)	108,0 (CH, Co')
		139,9 (C4a)	56,10 (CH ₃ , m-OCH₃)
		127,2 (C8a)	
	84g	—	—

3.2. Avaliação Biológica

Para além dos derivados de pirimidina sintetizados neste trabalho foram selecionados 28 compostos pertencentes à biblioteca de compostos do grupo de investigação, já previamente sintetizados [54,55]. Destes, 2 pertencem à classe de precursores **67** e os outros 26 partilham a mesma estrutura base das 4-hidrazonopirimidopirimidinas sintetizadas variando os grupos **R** e mantendo os padrões de substituição usados nas series **79** e **80**. Com esta seleção (**86-92**) pretende-se alargar a variedade de grupos **R** para a análise SAR (Esq. 21).



67u: R= 4-OCF₃-C₆H₄

67v: R= 3-O(CH₂-4-Piridinil)C₆H₄

86-92

86k: R= 4-F-3-Cl-C₆H₃; R¹= 3,4-OH-C₆H₄

86l: R= 4-F-3-Cl-C₆H₃; R¹= 3,4,5-OH-C₆H₄

86m: R= 4-F-3-Cl-C₆H₃; R¹= 3-OMe-4-OH-C₆H₄

86n: R= 4-F-3-Cl-C₆H₃; R¹= 3-OH-4-OMe-C₆H₄

86p: R= 4-F-3-Cl-C₆H₃; R¹= 3,4,5-OMe-C₆H₄

86q: R= 4-F-3-Cl-C₆H₃; R¹= 3,5-OMe-4-OH-C₆H₄

87k: R= 4-Cl-3-CF₃-C₆H₃; R¹= 3,4-OH-C₆H₄

87l: R= 4-Cl-3-CF₃-C₆H₃; R¹= 3,4,5-OH-C₆H₄

87n: R= 4-Cl-3-CF₃-C₆H₃; R¹= 3-OH-4-OMe-C₆H₄

87p: R= 4-Cl-3-CF₃-C₆H₃; R¹= 3,4,5-OMe-C₆H₄

87q: R= 4-Cl-3-CF₃-C₆H₃; R¹= 3,5-OMe-4-OH-C₆H₄

88k: R= 4-OCF₃-C₆H₄; R¹= 3,4-OH-C₆H₄

88l: R= 4-OCF₃-C₆H₄; R¹= 3,4,5-OH-C₆H₄

88m: R= 4-OCF₃-C₆H₄; R¹= 3-OMe-4-OH-C₆H₄

88n: R= 4-OCF₃-C₆H₄; R¹= 3-OH-4-OMe-C₆H₄

88p: R= 4-OCF₃-C₆H₄; R¹= 3,4,5-OMe-C₆H₄

89k: R= 4-(NH-COCH₃)C₆H₄; R¹= 3,4-OH-C₆H₄

89l: R= 4-(NH-COCH₃)C₆H₄; R¹= 3,4,5-OH-C₆H₄

90k: R= 3-(NH-COCH₃)C₆H₄; R¹= 3,4-OH-C₆H₄

91k: R= 3-(NH-COPh)C₆H₄; R¹= 3,4-OH-C₆H₄

91l: R= 3-(NH-COPh)C₆H₄; R¹= 3,4,5-OH-C₆H₄

92k: R= 3-O(CH₂-4-Piridinil)C₆H₄; R¹= 3,4-OH-C₆H₄

92l: R= 3-O(CH₂-4-Piridinil)C₆H₄; R¹= 3,4,5-OH-C₆H₄

92n: R= 3-O(CH₂-4-Piridinil)C₆H₄; R¹= 3-OMe-4-OH-C₆H₄

92p: R= 3-O(CH₂-4-Piridinil)C₆H₄; R¹= 3,4,5-OMe-C₆H₄

92q: R= 3-O(CH₂-4-Piridinil)C₆H₄; R¹= 3,5-OMe-4-OH-C₆H₄

Esquema 21 – Compostos sintetizados pelo grupo de investigação selecionados para avaliação da atividade antiparasitária

3.2.1. Avaliação biológica em formas promastigotas de *L. infantum*, *T. brucei* e macrófagos da linha celular THP1

A avaliação *in vitro* da atividade antiparasitária foi levada a cabo por um método já reportado e recentemente otimizado pelo grupo de investigação [63,64]. Trata-se de um ensaio no qual se usa uma solução de resazurina após o término do período de incubação para detetar a viabilidade mitocondrial dos parasitas. Este derivado (azul e pouco fluorescente) quando metabolizado pela mitocôndria de parasitas metabolicamente ativos é convertido em resorufina, um derivado com coloração rosa altamente fluorescente. A quantificação da fluorescência deste último permite calcular a percentagem de inibição por comparação com controlos não tratados. Quanto mais rosa, maior a viabilidade celular, quanto mais azul, maior a inibição do crescimento celular (Fig 19).

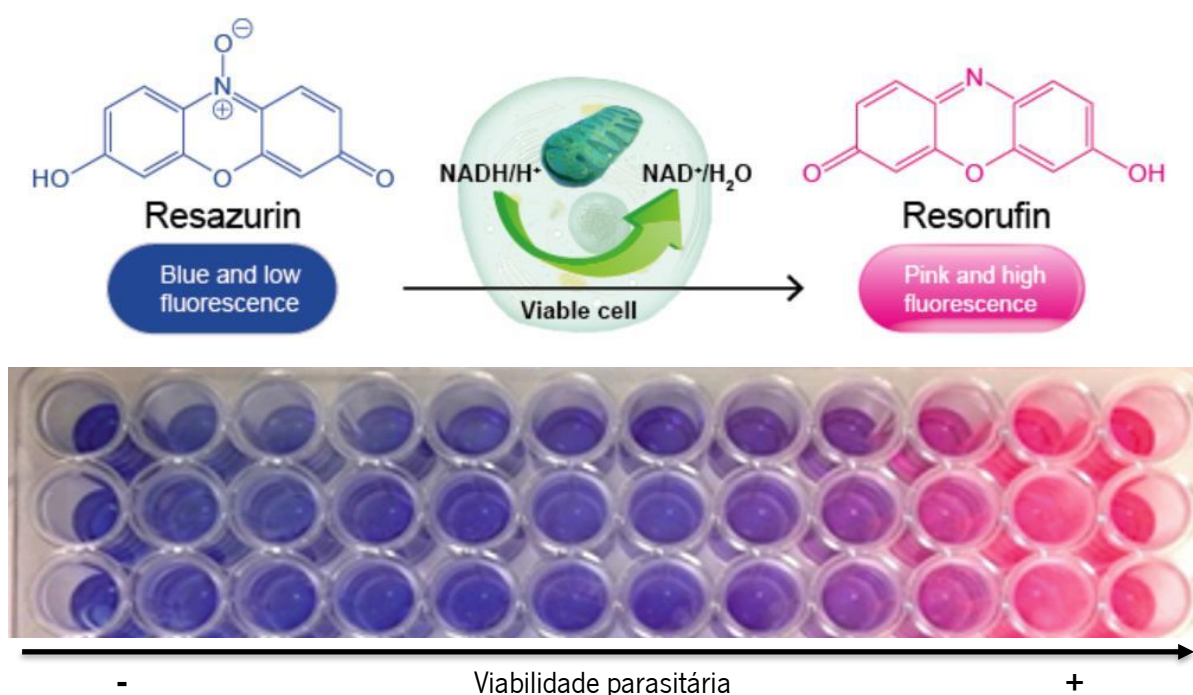


Figura 19 – Esquema de metabolização celular da resazurina a resorufina e respetivo ensaio biológico “Resazurin assay”

Em relação à citotoxicidade, esta foi avaliada usando outro método [45,63,64]. Este também avalia a viabilidade mitocondrial, contudo o substrato usado e conseqüente método de revelação diferem do ensaio com resazurina. Neste método é usado MTT (amarelo) que, quando é reduzido pela mitocôndria, dá origem ao derivado “formazan” que cristaliza dentro do poço. Este quando é solubilizado em isopropanol dá origem a uma solução arroxeadada. A absorção da radiação UV-Vis desta segunda espécie pode ser quantificada sendo possível calcular a percentagem de inibição. Quando mais arroxeadado maior

a viabilidade celular, quanto menos arroxado maior a inibição/morte celular (Fig 20).

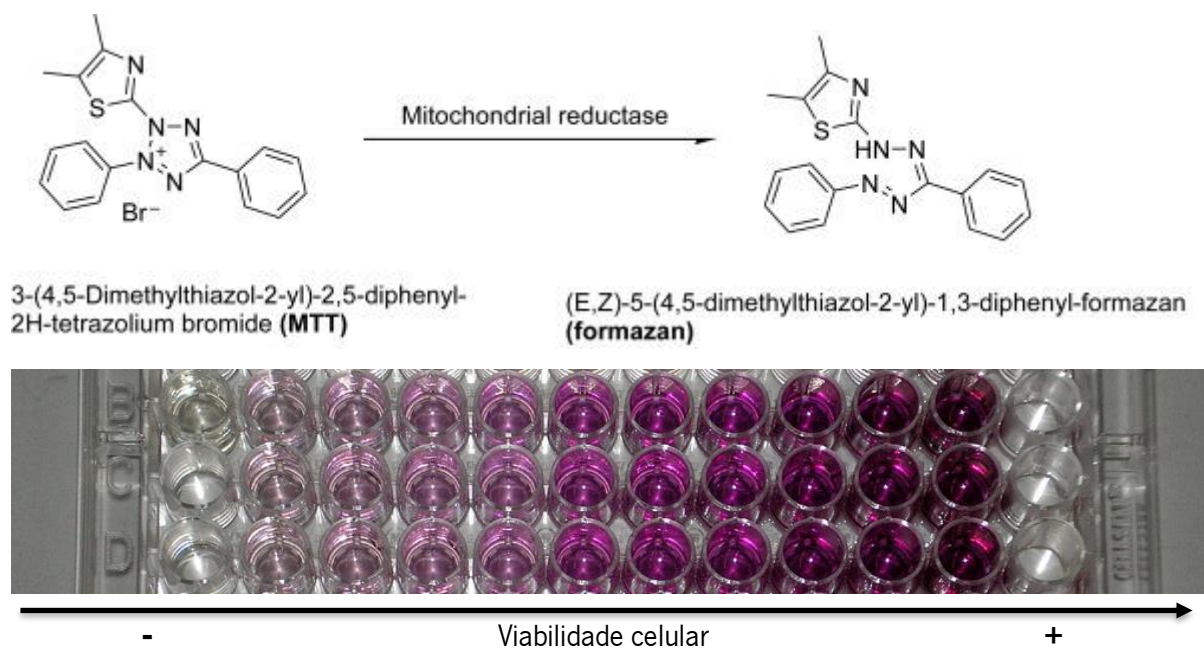


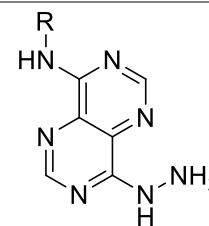
Figura 20 – Esquema de metabolização celular do MTT a formazan e respetivo ensaio biológico

3.2.1.1. 1ª Seleção

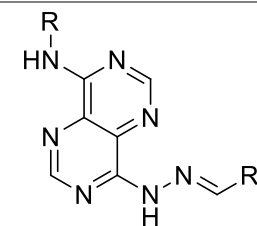
No 1º rastreio foram usados 44 compostos para avaliação da atividade antiparasitária em promastigotas de *L. infantum*, e formas sanguíneas de *T. brucei* e citotoxicidade em macrófagos da linha celular THP1. Destes 44 derivados de pirimidopirimidina, 28 já se encontravam sintetizados pelo grupo de investigação (**67u,v** e **86-92**) e foram selecionados por apresentarem semelhança estrutural com o “hit”. Os restantes 16 compostos (**79-80**) foram sintetizados com a expectativa de serem mais hidrossolúveis do que os compostos anteriores. Nesta série encontramos compostos com diferentes grupos substituintes, onde tentaremos analisar o efeito do volume, planaridade, hidrofobicidade e grupo funcional presente na atividade. Abaixo apresentam-se os resultados compilados sob forma de tabela (Tab 28).

A determinação da toxicidade dos derivados de pirimidopirimidina foi levada a cabo, testando, inicialmente, todos os compostos em macrófagos de linhas celulares THP1 a 10 µM. Os compostos que não se mostraram tóxicos (% inibição < 20) foram então testados a 100 µM (máxima concentração permitida pela solução stock). Se a 100 µM, fosse observada toxicidade, os compostos eram testados a concentrações sucessivamente menores (50 µM, 25 µM) de forma a obter-se uma gama para **CC**₅₀. As gamas de **CC**₅₀ encontram-se indicadas na tabela 28 e foram usadas para o cálculo do índice do **SI**.

Tabela 28 – Dados de atividade biológica da 1ª série de derivados de pirimidopirimidina em *L. infantum* (promastigotas), *T. brucei* e macrófagos da linha celular **THP1** (1ª seleção). Dados representados são originários de um mínimo de 3 ensaios independentes. Os valores de IC₅₀ apresentados representam a extrapolação feita a partir da curva média obtida com todos os dados experimentais.

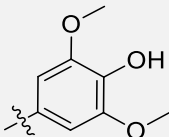
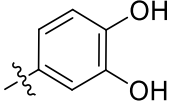
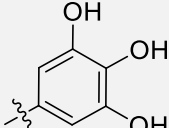
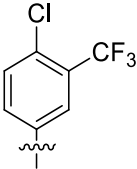
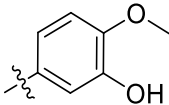
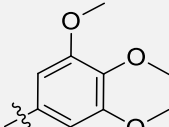
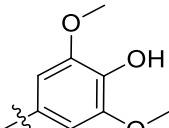
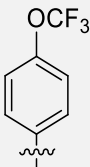
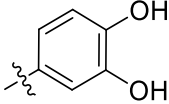
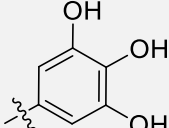


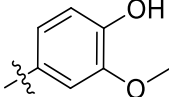
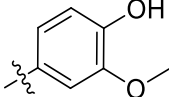
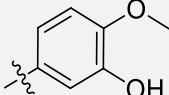
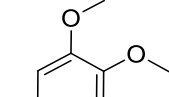
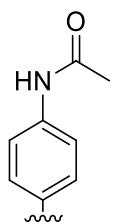
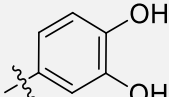
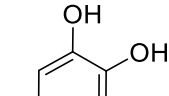
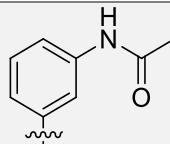
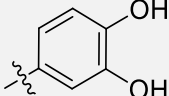
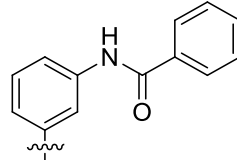
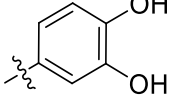
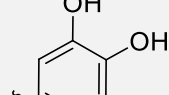

67

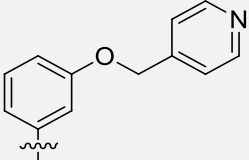
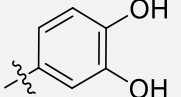
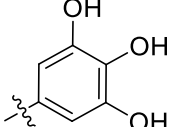
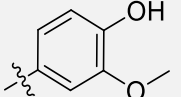
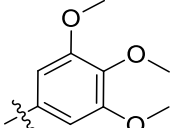
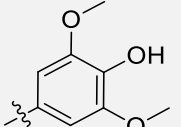
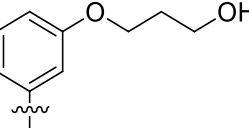
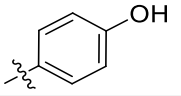
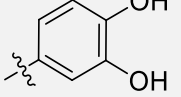
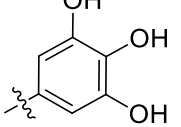
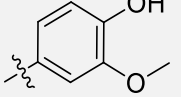


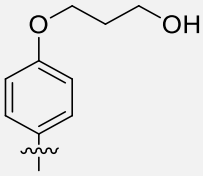
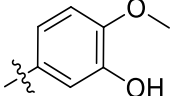
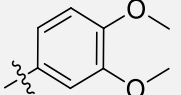
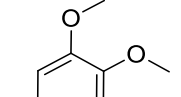
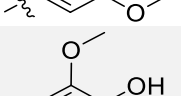
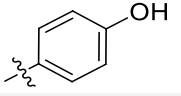
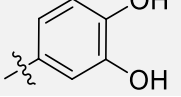
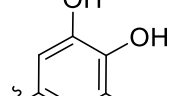
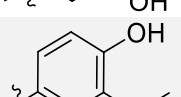
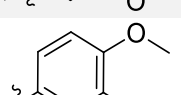
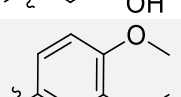
79-80 e 86-92

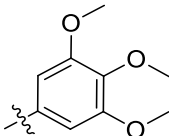
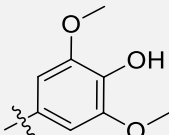
R	R ¹	N ^o	<i>Leishmania infantum</i> pro.			<i>Trypanosoma brucei</i>			THP1
			%Inibição ^a	IC ₅₀ (95%) ^b	SI ^c	IC ₉₀	IC ₅₀ (95%) ^b	SI ^c	CC ₅₀
		86k	N.a.	—	—	0,97	0,59 (0,57-0,63)	169>SI>85	100>CC50>50
		86l	N.a.	—	—	0,56	0,38 (0,37-0,40)	65>SI>26	25>CC50>10
		86m	N.a.	—	—	22,18	10,34 ^d	10>SI>5	100>CC50>50
						0,37	0,26 (0,25-0,26)	392>SI>196	
			86n	N.a.	—	—	14,96	5,81 (5,23-6,46)	4>SI>2
		86p	N.a.	—	—	16,89	8,72 (7,94-9,51)	—	N.d.

		86q	N.a.	—	—	13,34	5,83 (5,21-6,44)	>17	>100
		87k	N.a.	—	—	0,61	0,43 (0,39-0,48)	57>SI>23	25>CC50>10
		87l	N.a.	—	—	3,03	2,76 (2,71-2,81)	9>SI>4	25>CC50>10
		87n	N.a.	—	—	1,70	1,44 (1,39-1,49)	—	N.d.
		87p	N.a.	—	—	1,81	1,76 (1,75-1,77)	14>SI>6	25>CC50>10
		87q	N.a.	—	—	13,50	5,63 (5,23-6,06)	5>SI>2	25>CC50>10
		67u	N.a.	—	—	0,23	0,18 (0,18-0,19)	139>SI>55	25>CC50>10
		88k	52 ± 13	14,88 (12,53-18,37)	2>SI>1	0,40	0,35 (0,34-0,35)	72>SI>29	25>CC50>10
		88l	N.a.	—	—	0,34	0,16 (0,14-0,18)	159>SI>64	25>CC50>10

		88m	50 ± 8	8,75 (7,36- 10,71)	3>SI>1	0,28	0,18 (0,164-0,206)	136>SI>54	25>CC50>10
		88n	60 ± 14	2,54 (2,32-2,76)	10>SI>4	0,39	0,26 (0,251-0,264)	97>SI>39	25>CC50>10
		88p	N.a.	—	—	0,66	0,39 (0,34-0,43)	64>SI>26	25>CC50>10
		89k	N.a.	—	—	17,16	9,64 (7,16-13,46)	>10	>100
		89l	N.a.	—	—	N.a.	N.a.	—	100>CC50>50
		90k	N.a.	—	—	11,71	5,24 (4,65-5,86)	>19	>100
		91k	N.a.	—	—	1,33	0,99 (0,93-1,06)	>101	>100
		91l	N.a.	—	—	45,87	15,40 (13,44-17,94)	>7	>100
		67v	53 ± 2	3,13 (2,67-3,61)	>32	1,24	0,94 (0,86-1,02)	>107	>100

	 92k	N.a.	—	—	1,75	1,73 ^d	>58	>100
	 92l	N.a.	—	—	8,36	3,88 (2,47-6,04)	>26	>100
	 92n	N.a.	—	—	N.a.	N.a.	—	N.d.
	 92p	N.a.	—	—	N.a.	N.a.	—	N.d.
	 92q	N.a.	—	—	37,24	3,41 (2,43-4,78)	>29	>100
	 79j	N.a.	—	—	21,15	6,18 (5,75-6,68)	16>SI>8	100>CC50>50
	 79k	N.a.	—	—	5,67	2,29 (2,14-2,45)	22>SI>4	50>CC50>25
	 79l	N.a.	—	—	14,5	3,26 (2,70-3,92)	31>SI>15	100>CC50>50
	 79m	N.a.	—	—	44,87	13,40 (11,72-16,44)	4>SI>1	50>CC50>25

	 79n	N.a.	—	—	18,67	6,57 (6,00-7,24)	15>SI>8	100>CC50>50
	 79o	N.a.	—	—	8,17	2,72 (2,45-3,01)	>37	>100
	 79p	N.a.	—	—	17,59	6,12 (5,53-6,88)	16>SI>8	100>CC50>50
	 79q	N.a.	—	—	18,07	6,06 (5,55-6,65)	17>SI>4	100>CC50>50
	 80j	N.a.	—	—	88,32	12,94 (10,87-16,75)	8>SI>3	100>CC50>50
	 80k	N.a.	—	—	2,07	1,90 (1,88-1,92)	26>SI>5	50>CC50>25
	 80l	N.a.	—	—	20,52	6,95 (6,05-7,95)	>14	>100
	 80m	N.a.	—	—	9,22	3,76 (3,54-3,99)	27>SI>14	100>CC50>50
	 80n	N.a.	—	—	8,73	2,60 (2,34-2,89)	38>SI>19	100>CC50>50
	 80o	N.a.	—	—	25,54	8,59 (7,69-9,97)	12>SI>6	100>CC50>50

	 80p	N.a.	—	—	37,68	3,32 (2,98-3,69)	>30	>100
	 80q	N.a.	—	—	255,1	12,39 (9,11-20,96)	9>SI>4	100>CC50>50
	Miltefosina^e	97 ± 3 ^f	11,88 (10,36-13,52)	2,5	—	—	—	30*
	Pentamidina^g	—	—	—	—	—	>5000*	<10*

Todos os dados de IC₅₀ e CC₅₀ encontram-se em µM; **Na** - Não ativo na concentração testada (Inibição < 20%); **N.d.** - Não determinado (insolúvel); **a)** %inibição a 10 µM **b)** Intervalo de confiança 95% (µM) para a curva média de todos os ensaios independentes; **c)** O cálculo de SI foi levado a acabo pela fórmula SI = CC₅₀ (THP1)/ IC₅₀ (parasita); **d)** Dados obtidos partir de um único ensaio; **e)** Fármaco de referência para *L. infantum* *(dados fornecidos pelo grupo de investigação [63]); **f)** %Inibição a 12,5 µM; **g)** Fármaco de referência para *T. brucei* *(dados fornecidos pelo grupo de investigação [63]); Células a laranja indicam compostos que não foram testados no parasita indicado

3.2.1.1.1. Atividade antileishmanial: Estudos de relação estrutura-atividade

De entre todos os compostos testados, em formas promastigotas de *L. infantum*, a uma concentração inicial de 10 μM , somente 4 compostos mostraram uma % de inibição *in vitro* superior a 50. Destes 4 compostos, 3 pertencem à família de derivados com o grupo **R**= 4-(CF₃O)C₆H₄, compostos **88k**, **88m** e **88n**. A análise da atividade da série completa com este grupo **R**, mostra que nenhum composto com um anel aromático **R**¹ tri-substituído apresenta atividade e todos os que apresentam dois substituintes tem atividade.

A presença de um metoxilo em **R**¹ parece aumentar drasticamente a atividade de acordo com os resultados obtidos para os compostos **88k**, **88m** e **88n**. A posição do grupo metoxilo em **R**¹ também afeta a potência dos compostos uma vez que para os compostos **88n** e **88m** o **IC**₅₀ é 2,54 μM e 8,75 μM , respetivamente (Tab. 28).

O composto **67v** que apresenta **R**= 3-(4'-piridinil-CH₂O)C₆H₄ também apresenta atividade. Este composto é o precursor dos restantes compostos da série (compostos **92k-q**) e nenhum deles mostrou atividade. Estes resultados mostram claramente que a atividade depende dos grupos **R** e **R**¹. A ausência de atividade para a maioria dos compostos pode estar relacionada com o tamanho total da molécula, ou seja pode haver um problema de volume.

Esta hipótese foi levantada considerando que o composto **67v** tem atividade, ao contrário dos compostos **92k-q** e ainda, a ausência de atividade de todos os compostos que apresentavam grupos volumosos em **R** (**89k - 91i**, **79j - 80q**). Deve ser salientado que o grupo **R** parece ser crucial para a atividade, uma vez que, apenas os derivados **88k**, **88m** e **88n** com **R**= 4-(CF₃O)C₆H₄ apresentaram atividade relevante.

A análise da tabela 28 e do gráfico 1 permite verificar que as séries em que **R** é um grupo hidrofóbico (**X**= OCF₃, **X**= 4-Cl-3-CF₃ e **X**= 4-F-3Cl) os compostos **67u**, **86i**, **86n** e **87k-88p**, apresentam elevada toxicidade com **CC**₅₀ entre 10 – 25 μM . Nestas séries são exceção os compostos **86k**, **86m** e **86q** que, nos 2 primeiros, apresentam **CC**₅₀ entre 100 – 50 μM e no caso de **86q** superior a 100 μM .

Nas séries em que **X**= 3-O(CH₂)₃OH, **X**= 4-O(CH₂)₃OH, compostos **79j – 80q**, o **CC**₅₀ encontra-se entre 100 – 50 μM para a maioria dos compostos, destacando-se os derivados **80i** e **80q** com **CC**₅₀ superior a 100 μM . Apenas os derivados que possuem **R**¹= 3,4-(HO)₂C₆H₃ (**79k** e **80k**) e o composto

79m, apresentam **CC₅₀** mais baixos.

Finalmente, as séries em que **X**= 3-O(CH₂(4'-piridinil)) e NHCOR², compostos **89k** – **92q**, apresentam todos valores de **CC₅₀** maiores a 100 μM à exceção do derivado **89l**.

Citotoxicidade da 1ª serie de derivados de pirimidopirimidina em THP1

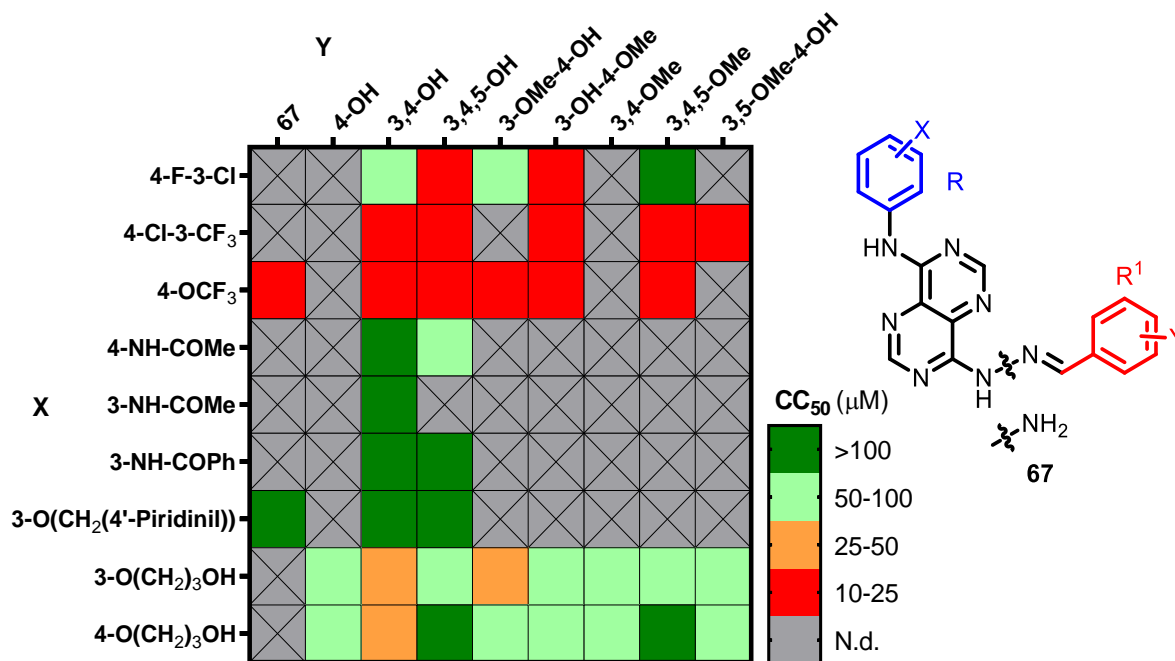


Gráfico 1 – Análise da relação entre as gamas de **CC₅₀** (THP1) da 1ª serie de derivados de pirimidopirimidina e os seus grupos substituintes **R** e **R¹**.

Tendo em consideração a potência dos compostos e a sua toxicidade, considerou-se que os novos derivados a sintetizar deveriam possuir grupos **R** hidrofóbicos e pequenos. Para grupos **R¹** foram selecionados **R¹**= 3,4-(HO)₂C₆H₃; 3,4,5-(HO)₃C₆H₂ e 3,4-(MeO)₂C₆H₃ por serem os que conduziam a compostos menos tóxicos.

Uma vez que os compostos em estudo são quase simétricos, considerou-se ainda a hipótese de os compostos poderem estar a ligar-se ao alvo de forma invertida e por isso foi também planeada a síntese de derivados com grupos **R** hidrofílicos e grupos **R¹** hidrofóbicos.

3.2.1.1.2. Atividade antitripanosomial: Estudos de relação estrutura-atividade

Dos 44 compostos testados (Tab 28) a uma concentração inicial de 10 μM somente 3 compostos não inibiram mais de 50% do crescimento parasitário *in vitro*. Dos 41 compostos ativos, 16 apresentaram

valores de **IC₅₀** compreendidos entre 16 - 5 μM , 25 mostraram um **IC₅₀** < 5 μM e, desses 25, 11 apresentaram **IC₅₀** < 1 μM .

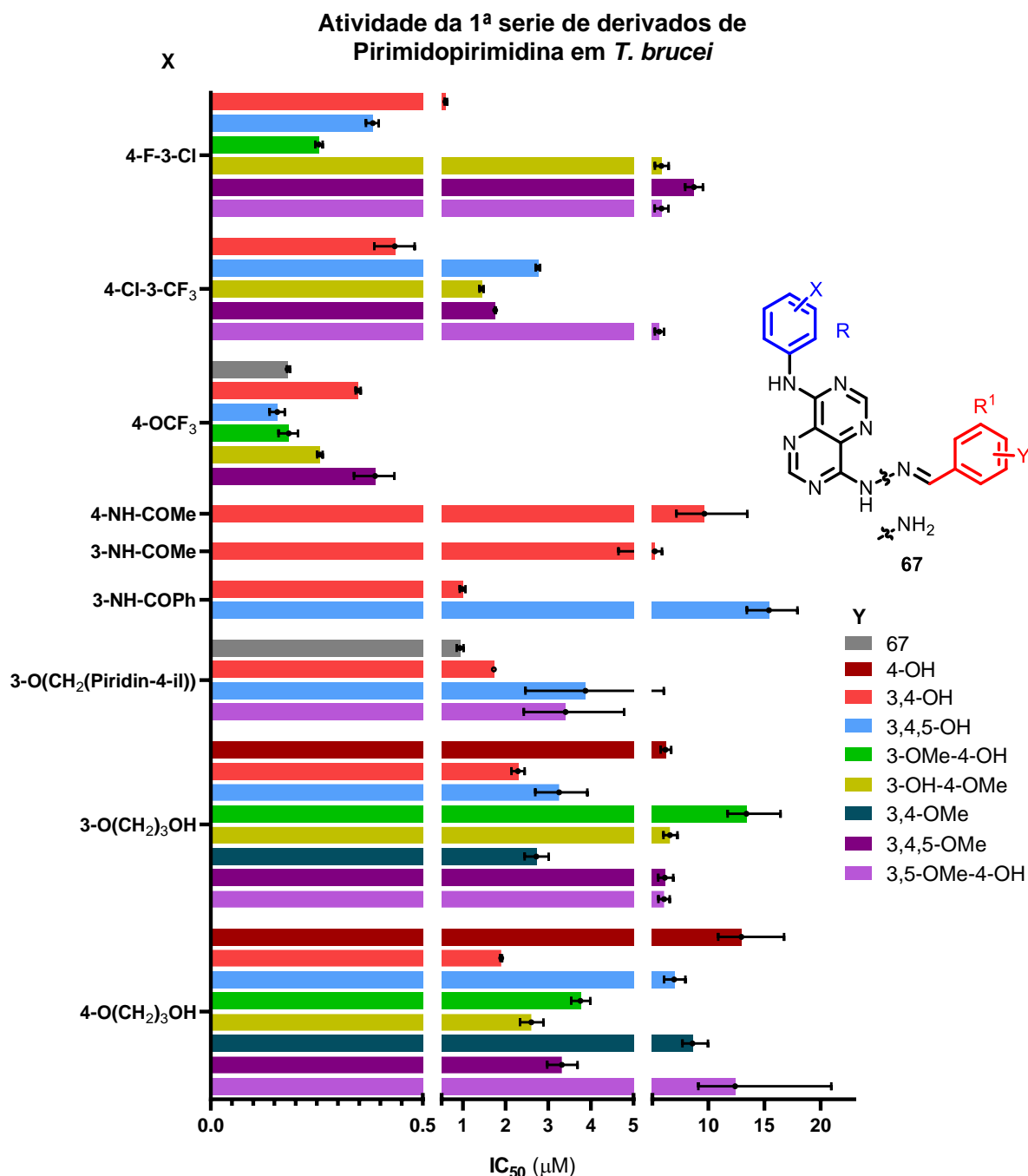


Gráfico 2 – Atividade biológica (**IC₅₀** em *T. brucei*) da 1ª série de derivados de pirimidopirimidina em função dos grupos substituintes **Y** e **X** em **R¹** e **R**, respetivamente.

O gráfico 2 apresenta a relação entre os valores de **IC₅₀** e os grupos substituintes **X** e **Y**. A primeira observação a destacar é a potência dos derivados com **X**= 4OCF₃, compostos **67u**, **88k-p**. Dentro desta família todos os compostos apresentaram **IC₅₀** < 0,5 μM sendo os derivados **67u** e **88i** os mais

ativos com $IC_{50} = 0,18 \mu M$ e $IC_{50} = 0,16 \mu M$, respetivamente (Tab 28).

Compostos em que **R** possui 2 grupos substituintes hidrofóbicos em posição 3 e 4, compostos **86k** – **87q**, também mostraram atividade muito elevada com valores de IC_{50} entre 0,26 – 8,72 μM . Grupos mais volumosos na posição 3, compostos **87k-q**, parecem favorecer a atividade, uma vez que, a maioria dos compostos com o grupo mais volumoso (CF₃) em *meta* foram mais ativos que os correspondentes derivados com o grupo Cl. Dos compostos substituídos em 3 e 4 destaca-se o derivado **86m** (**R**¹ = 3-OMe-4-OH-C₆H₃) com IC_{50} da mesma ordem de grandeza dos derivados OCF₃ ($IC_{50} = 0,26 \mu M$). Há ainda a salientar que este composto se mostrou bifásico apresentando um segundo valor de IC_{50} a 10,34 μM (Tab 28). Este comportamento foi identificado apenas neste composto e serão necessários mais estudos para perceber a que se deve. Em conjunto, estes resultados parecem indicar que grupos hidrofóbicos favorecem a atividade.

A análise dos resultados tabelados para os derivados com **R** = (NHCOR²)C₆H₃ (**X** = NHCOMe e NHCOPh), compostos **89k** – **91i**, permite verificar que o grupo substituinte **X** em *meta* leva a compostos mais ativos, composto **90k** ($IC_{50} = 5,24 \mu M$) mais ativo do que **89k** ($IC_{50} = 9,64 \mu M$).

Além disso, acrescenta-se que grupos **R** planares, como **X** = NHCOPh, parecem ser mais favoráveis para a atividade, do que grupos não planares (**X** = NHCOMe), uma vez que o composto **91k** se mostrou mais ativo ($IC_{50} = 0,99 \mu M$) que **90k**.

A análise dos resultados para os derivados **R** = (OR²)C₆H₃ (**X** = 3-O(CH₂)₃OH, 4-O(CH₂)₃OH e 3-O(CH₂(4'-piridinil))), compostos **67v** – **92q** e **79i** – **80q**, mostra que não é clara qual a posição mais favorável para uma maior atividade. Nestes casos o grupo **R**¹ parece condicionar a potência dos compostos. Quando se compara a atividade dos derivados **X** = 3-O(CH₂)₃OH, compostos **79j** – **79q**, com os derivados **X** = 3-O(CH₂(piridin-4-il))), compostos **67v** - **92q**, estes últimos são tendencialmente mais ativos, sugerindo que grupos mais planos aumentam a atividade.

Nas 3 séries (**X** = 3-O(CH₂(4'-piridinil))), **X** = 3-O(CH₂)₃OH, **X** = 4-O(CH₂)₃OH) compostos **67v** – **92q** e **79j** – **80q**, o composto mais ativo é o derivado não substituído, composto **67v**, sugerindo que pode haver um problema com o volume do grupo **R**¹. Em conjunto, há resultados em que grupos mais volumosos parecem favorecer a atividade (compostos **87k-q** em comparação com **86k-q**) e outros em que grupos grandes parecem fazer diminuir a atividade (compostos **92k-q** em comparação com **67v**). Estas observações parecem sugerir que pode haver outros fatores responsáveis pelos resultados

observados.

A observação do gráfico 2 permite ainda verificar que, o padrão de substituição **Y** mais favorável à atividade antitripanossomial é a hidroxilação nas posições *meta* e *para* do anel aromático. A mancha gráfica correspondente ao padrão de substituição **Y**= 3,4-OH mostra que a maioria dos derivados com esse padrão de substituição são os mais ativos da sua respetiva família.

Em suma, apesar dos derivados em que **R**= 4-(CF₃)C₆H₃, compostos **67u** a **88p**, serem os mais potentes, eles apresentam também uma toxicidade considerável (**CC**₅₀ entre 10 – 25 μM) (Tab 28 e gráfico 2). Como exceção temos os compostos **67u** e **88i** que apresentam índices de seletividade respetivamente 139> **SI** >55 e 118> **SI** >47 (Tab. 28). Outros compostos que apresentaram índices de seletividade elevados foram os compostos **86k,m**, com **R**= 4-F-3-ClC₆H₃ (169> **SI** >85 e 392> **SI** >196), **91k**, com **R**= 3-(NHCOPh)C₆H₄ (**SI** > 101), **67v** e **92k** com **R**= 3-((4'-Piridinil)CH₂O)C₆H₄ (**SI** > 107; **SI** > 58).

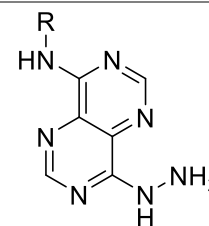
Uma vez que moléculas mais pequenas, planares e a presença do anel de piridina em **R** parecem favorecer a atividade e a seletividade dos compostos, considerou-se sintetizar novos derivados de pequeno tamanho. Os novos derivados manteriam o núcleo heterocíclico e como substituintes em **R** uma piridina ou fenil-3-nicotinamida combinadas com **R**¹= 3,4-(HO)₂(C₆H₃) e **R**¹= 3,4,5-(HO)₃(C₆H₂), grupos **R**¹ que se mostraram mais ativos e menos tóxicos.

3.2.1.2. 2^a seleção

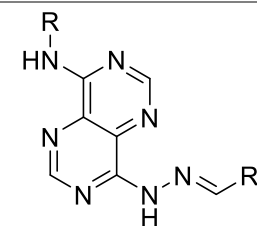
Após análise dos resultados de atividade biológica obtidos na 1^a seleção sintetizaram-se 33 novos derivados de pirimidopirimidinas **69-82**. Para gerar compostos com atividade contra *L. infantum*, a estratégia de síntese foi a incorporação de grupos pequenos hidrofóbicos nos substituintes **R** e/ou **R**¹ combinados com grupos hidrofílicos no outro substituinte **R** e/ou **R**¹.

Os novos derivados a serem testados em *T. brucei* foram desenhados para testar as hipóteses levantadas após a 1^a seleção, e contemplam a síntese de novos compostos com **R**= piridinil ou **R**= 3-R²(C₆H₄) em que R² é um grupo planar (NHCOPiridinil) combinados com os grupos 3,4-(HO)₂C₆H₃ e 3,4,5-(HO)₃C₆H₂ em **R**¹ ou 3-F-C₆H₄, 3-FC₆H₄ e 3-BrC₆H₄. A metodologia de avaliação biológica foi a mesma que usamos na 1^a seleção, mas, uma vez que nenhum dos compostos (1^a seleção) foi tóxico a 10 μM em macrófagos, neste rastreio a SD ("single dose") para o ensaio da citotoxicidade iniciou-se a 100 μM. Abaixo apresentam-se os resultados do 2^a seleção compilados sob forma de tabela (Tab 29).

Tabela 29 - Atividade biológica da 2ª série de derivados de pirimidopirimidina em *L. infantum* (promastigotas), *T. brucei* e macrófagos da linha celular **THP1** (2ª Seleção). Dados representados são originários de um mínimo de 3 ensaios independentes. Os valores de IC₅₀ apresentados representam a extrapolação feita a partir da curva média obtida com todos os dados experimentais.

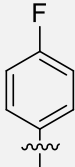
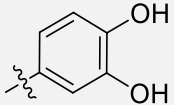
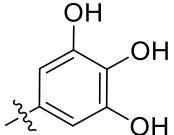
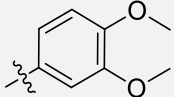
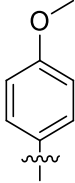
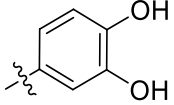
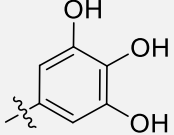
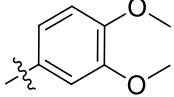
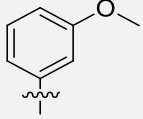
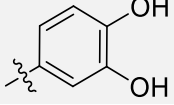
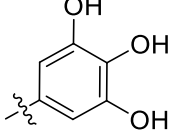
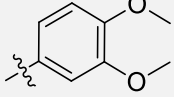


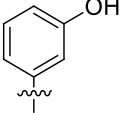
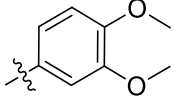
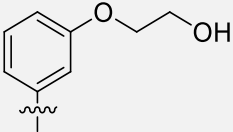
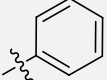
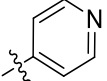
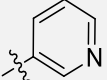
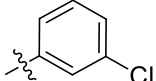
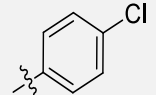
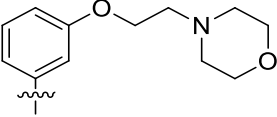
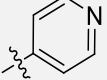
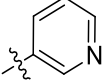
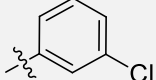
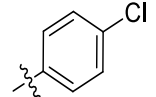
67

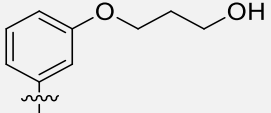
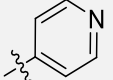
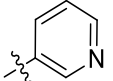
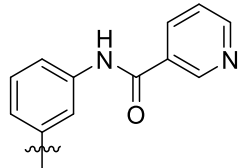
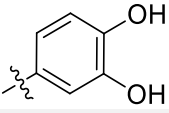
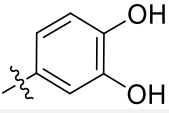
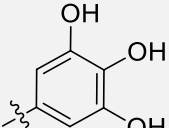
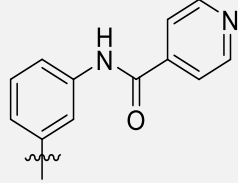
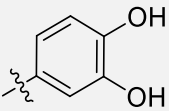
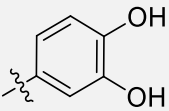
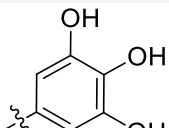


69-82

R	R ¹	N ^o	<i>Leishmania infantum</i> pro.			<i>Trypanosoma brucei</i>			THP1
			%Inibição ^a	IC ₅₀ (95%) ^b	SI ^c	%Inibição ^a	IC ₅₀ (95%) ^b	SI ^c	CC ₅₀
		69d	N.a.	—	—	N.a.	—	—	>100
		69f	N.a.	—	—	N.a.	—	—	>100
		69h	N.a.	—	—	N.a.	—	—	>100
		69k	N.a.	—	—	49 ± 4	15,26 (12,58-19,74)	>7	>100
		69l	N.a.	—	—	N.a.	—	—	>100
		69o	N.a.	—	—	53 ± 7	13,31 (11,30-16,13)	>8	>100

	 70k	98 ± 0,1	0,73 (0,69-0,77)	>131	—	—	—	>100
	 70l	98 ± 0,1	0,39 (0,36-0,43)	>254	—	—	—	>100
	 70o	98 ± 0,2	0,35 (0,31-0,39)	>144	—	—	—	>50
	 72k	98 ± 0,1	0,99 (0,89-1,10)	>101	—	—	—	>100
	 72l	94 ± 0,4	0,20 (0,16-0,22)	>502	—	—	—	>100
	 72o	98 ± 0,1	1,93 (1,74-2,15)	>52	—	—	—	>100
	 73k	94 ± 0,4	1,67 (1,47-1,88)	60>SI>30	—	—	—	100>CC ₅₀ >50
	 73l	95 ± 0,4	0,45 (0,39-0,51)	>221	—	—	—	>100
	 73o	98 ± 0,1	1,44 (1,35-1,54)	70>SI>35	—	—	—	100>CC ₅₀ >50

	 74o	N.a.	—	—	—	—	—	>100
	 75a	26 ± 4	—	—	—	—	—	>100
	 75b	N.a.	—	—	—	—	—	>100
	 75c	N.a.	—	—	—	—	—	>100
	 75f	99 ± 0,1	0,64 (0,63-0,65)	156>SI>78	—	—	—	100>CC ₅₀ >50
	 75g	56 ± 1	3,23 (2,53-4,14)	>31	—	—	—	>100
	 76a	51 ± 3	9,18 (8,29-10,56)	>11	—	—	—	>100
	 76b	25 ± 5	—	—	—	—	—	>100
	 76c	N.a.	—	—	—	—	—	>100
	 76f	99 ± 0,2	1,90 (1,72-2,12)	53>SI>26	—	—	—	100>CC ₅₀ >50
	 76g	96 ± 0,1	2,35 (2,26-2,76)	21>SI>10	—	—	—	50>CC ₅₀ >25

	 79b	N.a.	–	–	–	–	–	>100
	 79c	N.a.	–	–	–	–	–	–
	 67s	–	–	–	58 ± 2	10,76 (9,34-15,48)	>9	>100
	 81k	–	–	–	N.a.	–	–	>100
	 81l	–	–	–	N.a.	–	–	>100
	 67t	–	–	–	63 ± 4	6,02 (5,33-6,91)	>17	>100
	 82k	–	–	–	N.a.	–	–	>100
	 82l	–	–	–	N.a.	–	–	>100
Miltefosina^d		97 ± 3 ^e	11,88 (10,36-13,52)	2,5	–	–	–	30*
Pentamidina^f		–	–	–	–	–	>5000*	<10*

Todos os dados de IC₅₀ e CC₅₀ encontram-se em µM; **Na** - Não ativo na concentração testada (Inibição < 20%); **N.d.** - Não determinado (insolúvel); Células a laranja indicam que o composto não foi testado no parasita indicado; **a**) %inibição a 10 µM **b**) Intervalo de confiança 95% (µM) para a curva média de todos os ensaios independentes; **c**) O cálculo de SI foi levado a cabo pela fórmula SI = CC₅₀ (THP1)/ IC₅₀ (parasita); **d**) Fármaco de referência para *L. infantum* *(dados fornecidos pelo grupo de investigação [63]); **e**) %Inibição a 12,5 µM; **f**) Fármaco de referência para *T. brucei* *(dados fornecidos pelo grupo de investigação [63]);

A análise da tabela 29 e do gráfico 3, permite verificar que, dos 34 compostos testados, a 100 μM em THP1, 27 compostos mostraram ter um **CC₅₀** superior a 100 μM enquanto que os restantes apresentaram **CC₅₀** entre 25 – 100 μM . Realça-se o facto que todos os compostos com **R= 3-Piridinil** ou **R¹= 3-Piridinil; 4-Piridinil; 3,4,5-(HO)₃C₆H₂** apresentaram **CC₅₀** superior a 100 μM . O derivado **70o** apresentou problemas de solubilidade pelo que só foi possível ser testado a 50 μM . A esta concentração o composto não foi tóxico e por isso se inferiu um **CC₅₀** > 50 μM .

Estes resultados mostram que a citotoxicidade dos novos derivados em macrófagos da linha celular THP1 é reduzida. Destacam-se os grupos 3,4,5-(HO)₃C₆H₂ e piridinil como aqueles que geraram os compostos menos citotóxicos.

Citotoxicidade da 2ª serie de derivados de pirimidopirimidina em THP1

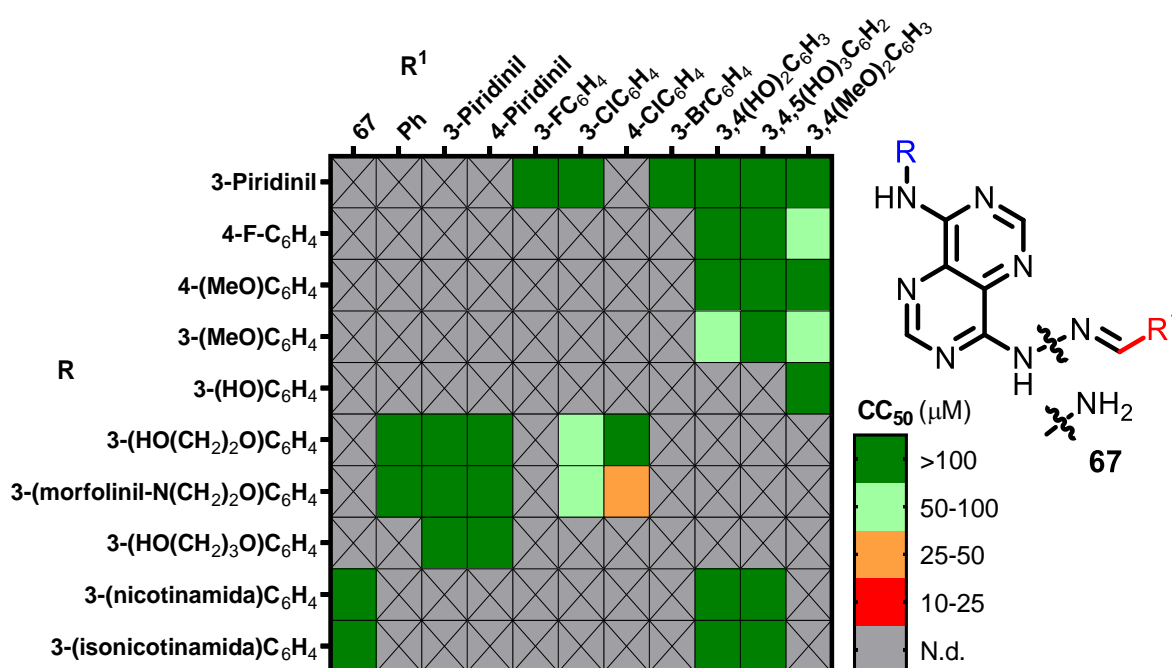


Gráfico 3– Análise da relação entre as gamas de **CC₅₀** (THP1) da 2ª serie de derivados de pirimidopirimidina e dos diferentes grupos substituintes **R** e **R¹**.

3.2.1.2.1. Atividade antileishmanial: Estudos de relação estrutura-atividade

De entre os 28 compostos testados, em promastigotas de *L. infantum*, a uma concentração inicial de 10 μM , 14 mostraram-se significativamente ativos (**IC₅₀** < 10 μM). Destes 14, 6 apresentaram **IC₅₀** a variar entre 5 μM – 1 μM , e 7 mostraram-se muito ativos com **IC₅₀** < 1 μM (Tab 29 gráfico 4).

Atividade da 2ª série de derivados de Pirimidopirimidina em promastigotas *L. infantum*

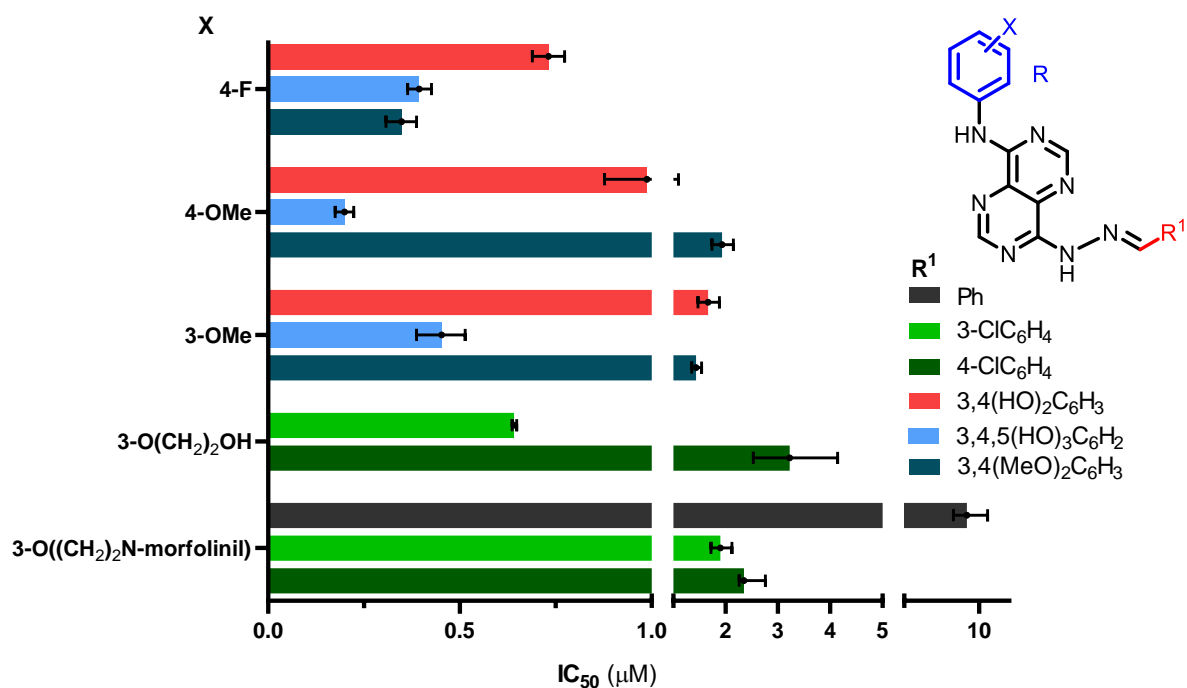


Gráfico 4– Atividade biológica (IC_{50} em *L. infantum*) dos compostos em função dos grupos substituintes R^1 e R

A análise do gráfico 4 e da tabela 29 mostra claramente a potência da série com $X=4-F$, na qual se destacam os derivados **70i** e **70o** com IC_{50} de 0,39 e 0,35 μM , respectivamente. Realça-se ainda **72i** ($X=4-OMe$) como o composto mais potente até ao momento, apresentando IC_{50} de 0,20 μM .

Destaca-se ainda (gráfico 4), que a incorporação do grupo $R^1=3-ClC_6H_4$ nas duas séries $X=3-O(CH_2)_2OH$; $3-O((CH_2)_2N\text{-morfolinil})$ mostrou-se extremamente favorável à atividade leishmanicida dado que os compostos **75f** e **76f** foram os mais ativos da sua série, IC_{50} de 0,64 e 1,90 μM , respectivamente. Por último, realça-se o efeito negativo do anel piridina, uma vez que nenhum composto com esse heterociclo como grupo R ou R^1 mostrou atividade.

Os resultados obtidos neste segundo rastreio permitem também verificar que compostos com dois grupos volumosos R e R^1 podem ter atividade elevada contra as formas promastigotas de *L. infantum*, **75f,g** e **76f,g** ($3,23 > IC_{50} > 0,64 \mu M$). Estes resultados permitem assim anular a hipótese que se levantou após análise da 1ª seleção de que compostos com dois grupos volumosos não teriam atividade.

Os novos resultados mostram ainda que, todos compostos que combinam um dos grupos R ou R^1

hidrofílico com um grupo **R** ou **R**¹ hidrofóbico, geram compostos ativos (**70k-o**, **72k-o**, **73k-o**, **75f-g**, **76a**, **76f-g**). Estes resultados parecem sugerir que a combinação de um grupo hidrofílico com um hidrofóbico, na estrutura base pode levar a compostos ativos. O grupo hidrofílico/hidrofóbico poderá ser quer **R** quer **R**¹. Para testar esta hipótese, propõe-se a síntese e avaliação biológica de novos derivados acolhendo grupos **R** e **R**¹ hidrofóbico/hidrofóbico, hidrofílico/hidrofóbico e vice-versa. Uma vez que os compostos são quase simétricos propõe-se ainda a síntese de alguns derivados em que se trocam as posições dos grupos **R** e **R**¹.

3.2.1.2.2. Atividade antitripanosomal: Estudos de relação estrutura-atividade

Dos 12 compostos testados em *T. brucei* (Tab. 29) a uma concentração inicial de 10 µM, 4 compostos mostraram-se ativos. Foram estes os derivados **69k** e **69o** com **R**= 3-Piridinil e os compostos **67s** e **67t**. Destes compostos, o derivado **67t** mostrou IC₅₀ inferior a 10 µM. Destaca-se o facto de a posição do nitrogénio da piridina ser importante para a atividade, uma vez que o derivado **67t** (IC₅₀= 6,02 µM) é mais ativo que **67s** (IC₅₀= 10,76 µM). Deve ainda ser salientado que também em *T. brucei* a existência de uma unidade piridinil no grupo **R** (**69d-o**, **81k,l** e **82k,l**) leva a compostos com atividade menor do que derivados com um grupo fenilo (**91k**, 1^a seleção, Tab 28).

Em conjunto, apesar dos compostos testados apresentarem baixa citotoxicidade, as modificações nos grupos **R** e **R**¹ foram geralmente desfavoráveis para atividade em *T. brucei*. Os resultados mostram que a presença de um anel de piridina ou um grupo 3(NHCO-piridinil)C₆H₄ como **R** leva a compostos inativos ou pouco ativos. Uma vez que os compostos em que **R**= (3-NHCOPh)C₆H₄ foram ativos e os que possuíam a unidade **R**= 3(NHCO-piridinil)C₆H₄ foram inativos ou pouco ativos pode levantar-se a hipótese de que a presença de um anel de piridina em **R** é a responsável pela perda de atividade. Esta hipótese parece ser reforçada pelos resultados obtidos com os derivados em que **R**= 3-piridinil.

A hipótese levantada anteriormente acerca da atividade estar a ser condicionada por grupos volumosos (**R**) não pode ser confirmada com segurança com os resultados obtidos com os compostos agora testados, uma vez que, todos eles possuem um anel de piridina em **R**, contudo, o facto dos derivados mais ativos serem os compostos **67**, compostos de menor tamanho, parece ser um bom indicador de que grupos grandes como **R**¹ podem causar problemas estéreos.

Uma vez que no 1º rastreio se identificaram 12 compostos com SI>30, e destes, 3 com SI >100, deu-se por concluído o estudo de design e avaliação biológica de novos derivados antitripanosomiais até ao momento. Esta decisão deve-se ao interesse preferencial de desenvolver e otimizar novas moléculas com atividade antiparasitária contra parasitas *Leishmania* relativamente a *T. brucei*.

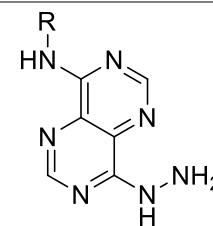
Em suma, após screening de 56 novos compostos, podemos inferir que os compostos **67** parecem ser os mais ativos em *T. brucei*. O grupo hidrazina provou ser favorável à atividade antiparasitária. Quando em vez desta, se introduz uma hidrazona arílica verificou-se geralmente perda de potência dentro das series sintetizadas. Contudo, é de acentuar que a introdução de hidroxilos no fenilo de **R¹** gerou compostos tão ativos como os seus precursores. Tendo em atenção este resultado, futuramente, poder-se-ão desenhar novos derivados para a fim de diminuir a toxicidade, manter a potência e consequentemente aumentar o SI. Deixa-se em aberto esta hipótese para um trabalho futuro.

3.2.1.3. 3ª Seleção

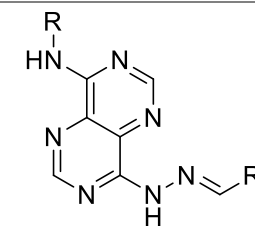
De acordo com as informações obtidas na 2ª seleção sintetizou-se, exclusivamente para *L. infantum*, uma 3ª serie de 18 novas pirimidopirimidinas. Como foi referido, adotou-se uma estratégia de emparelhar em **R** e **R¹** grupos hidrofóbico/hidrofóbico, hidrofílico/hidrofóbico e vice-versa. Além disso deu-se grande ênfase à colocação de halogéneos nos anéis aromáticos, uma vez que anteriormente os compostos com Cl se mostraram muito ativos. Sintetizou-se ainda, 2 compostos com padrões de substituição **R** e **R¹** opostos (**70f** e **71e**) para determinar a importância do distanciamento dos grupos substituintes ao heterociclo.

Usou-se a mesma metodologia de avaliação biológica da 2ª seleção, na qual, para o ensaio da citotoxicidade se iniciou a SD (“single dose”) a 100 µM. Abaixo apresentam-se os resultados compilados na tabela 30.

Tabela 30 – Dados de atividade biológica da 3ª série de derivados de pirimidopirimidina em *L. infantum* (promastigotas) e macrófagos da linha celular **THP1** (3º screening). Dados representados são originários de um mínimo de 3 ensaios independentes. Os valores de IC₅₀ apresentados representam a extrapolação feita a partir da curva média obtida com todos os dados experimentais.

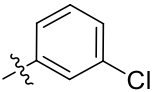
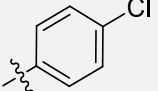
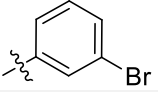
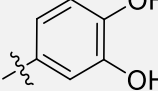
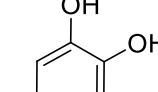
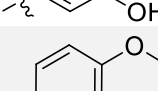
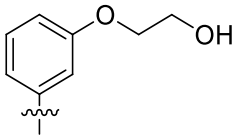
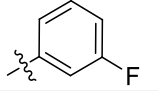
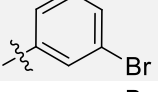
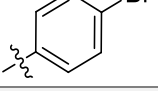
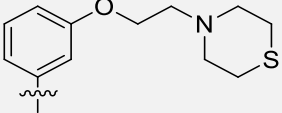
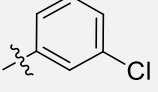


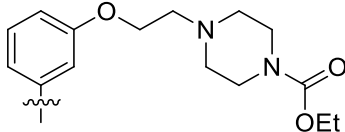
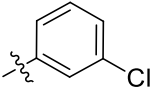
67



70-78

R	R ¹	Nº	<i>Leishmania infantum</i> pro.			THP1
			%Inibição ^a	IC ₅₀ (95%) ^b	SI ^c	CC ₅₀
		70f	99 ± 1	0,70 (0,65-0,76)	36>SI>14	25>CC ₅₀ >10
		67e	N.a.	—	—	25>CC ₅₀ >10
		71a	N.a.	—	—	50>CC ₅₀ >25
		71b	43 ± 7	10,25 (6,84-15,78)	>10	>100
		71c	N.a.	—	—	100>CC ₅₀ >50
		71d	98 ± 2	3,53 (3,02-4,09)	7>SI>3	25>CC ₅₀ >10
		71e	99 ± 1	3,89 (3,47-4,38)	6>SI>3	25>CC ₅₀ >10

	 71f	N.a.	—	—	25>CC ₅₀ >10
	 71g	N.a.	—	—	25>CC ₅₀ >10
	 71h	N.a.	—	—	25>CC ₅₀ >10
	 71j	N.a.	—	—	>100
	 71k	N.a.	—	—	25>CC ₅₀ >10
	 71o	N.a.	—	—	25>CC ₅₀ >10
	 75d	53 ± 4	18,24 (16,27-21,52)	1>SI>0,5	50>CC ₅₀ >25
	 75h	N.a.	—	—	50>CC ₅₀ >25
	 75i	99 ± 1	3,15 (2,85-3,50)	8>SI>3	25>CC ₅₀ >10
	 77f	99 ± 1	3,17 (2,95-3,41)	16>SI>8	50>CC ₅₀ >25

	 78f	99 ± 1	$3,92$ (3,45-4,39)	$26 > SI > 12$	$100 > CC_{50} > 50$
Miltefosina^d		97 ± 3^e	$11,88$ (10,36-13,52)	$2,5$	30^*

Todos os dados de IC₅₀ e CC₅₀ encontram-se em μM; **Na** - Não ativo na concentração testada (Inibição < 20%); **N.d.** - Não determinado (insolúvel); **a)** %inibição a 10 μM **b)** Intervalo de confiança 95% (μM) para a curva média de todos os ensaios independentes; **c)** O cálculo de SI foi levado a acabo pela fórmula SI = CC₅₀ (THP1)/ IC₅₀ (parasita); **d)** Fármaco de referência para *L. infantum* *(dados fornecidos pelo grupo de investigação [63]); **e)** %Inibição a 12,5 μM;

Pela análise da tabela 30 e do gráfico 5, podemos constatar que os 18 compostos testados a 100 μM em macrófagos da linha celular THP1, são notavelmente mais citotóxicos que os do 2º screening. Contudo, destes 18, 4 compostos mostraram ter **CC**₅₀ superior a 50 μM , e destes 4, 2 obtiveram **CC**₅₀ >100 μM (**71c** e **71j**) da serie **71** (**X**= 3-Cl) com **R**¹= 4-Piridinil e 3,4(HO)₂C₆H₃, respetivamente. Realça-se ainda que a presença de halogéneos em **R** ou **R**¹, gerou compostos bastante citotóxicos para as células THP1. Contudo, aparentemente, quando **X** é um éter ou quando **R**¹ é uma piridina a toxicidade parece diminuir consideravelmente à semelhança dos resultados do 2º screening.

Citotoxicidade da 3ª serie de derivados de pirimidopirimidina em THP1

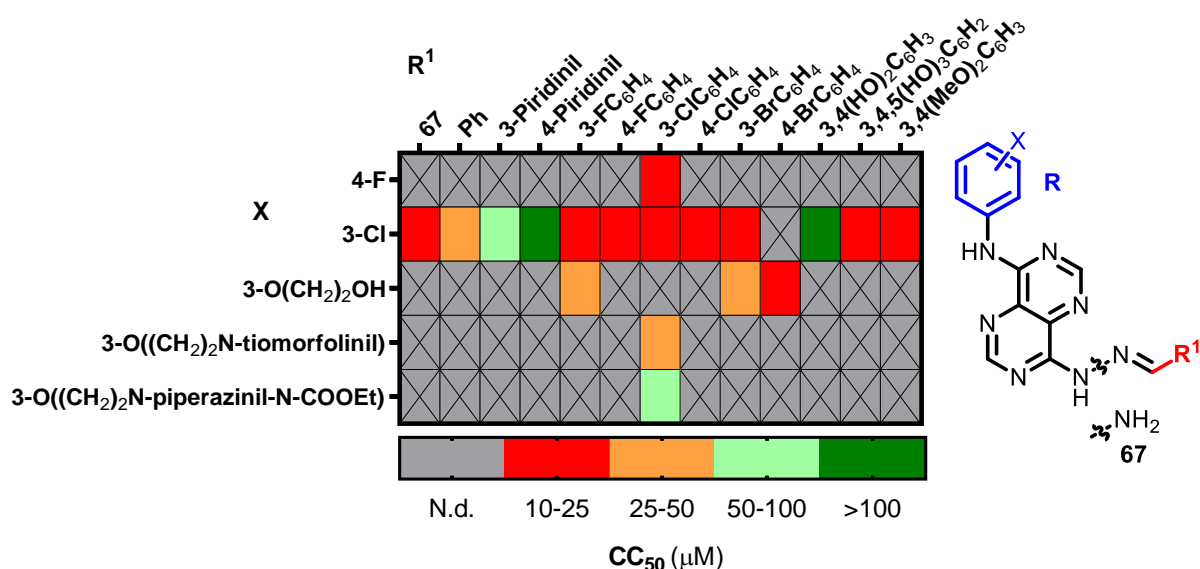


Gráfico 5 – Análise da relação entre as gamas de **CC**₅₀ (THP1) da 3ª serie de derivados de pirimidopirimidina e os seus grupos substituintes **R** e **R**¹.

3.2.1.3.1. Atividade antileishmanial: Estudos de relação estrutura-atividade

De entre os 18 compostos testados, em formas promastigotas de *L. infantum*, a uma concentração inicial de 10 μM , 8 mostraram-se ativos. Destes, 5 mostraram **IC**₅₀ entre 5 - 1 μM , e um mostrou **IC**₅₀ inferior a 1 μM (Tab 30). Nesta série o composto mais ativo foi **70f** com um valor de **IC**₅₀ de 0,70 μM .

Pela análise da tabela 30 e do gráfico 6, destaca-se o facto de todos os compostos com F incorporado quer em **R** ou **R**¹ terem mostrado atividade. Destaca-se ainda que, quando foi incorporado um átomo de Cl no substituinte **R**, somente os derivados com fluor em **R**¹ (**71d** e **71e**) mostraram atividade significante (**IC**₅₀ de 3,53 e 3,59 μM , respetivamente). Contudo, quando o átomo de Cl foi incorporado no grupo **R**¹ (**70f**, **77f** e **78f**), os compostos mostraram **IC**₅₀ de 0,70; 3,17 e 3,92 respetivamente.

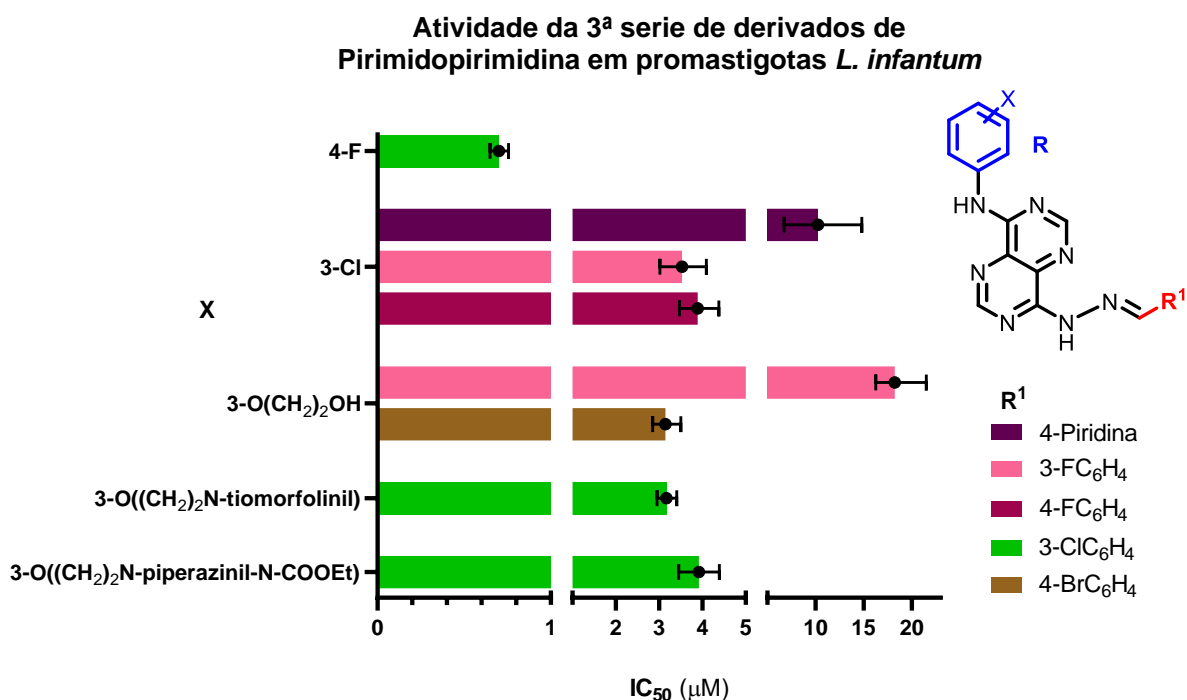


Gráfico 6 – Atividade biológica (IC_{50} em *L. infantum*) dos compostos da 3ª serie de derivados de pirimidopirimidina em função dos grupos substituintes R^1 e R

Quando se compara os valores de IC_{50} dos compostos **70f** e **71e** (padrão de substituição em R e R^1 oposto) é possível verificar que o composto com Cl em R^1 (**70f**) é cerca de 5,6x mais potente que o seu isómero **71e** (IC_{50} de 0,701 e 3,89 μ M, respetivamente). Isto sugere que o grupo R^1 parece ser a posição ideal para acolher o átomo de Cl.

Os resultados, sugerem que a presença de um átomo de fluor em R ou R^1 é favorável à atividade, contudo a presença de um átomo de cloro também leva a compostos ativos, preferencialmente, quando esse átomo se encontra no grupo R^1 . De facto, todos os derivados com $R=3-ClC_6H_4$, sem flúor em R^1 , não mostraram atividade significativa ($IC_{50} < 10 \mu$ M), no entanto, todos os compostos com $R^1=3-ClC_6H_4$, e $R \neq$ piridinil, até ao momento mostraram elevada atividade leishmanicida ($IC_{50} < 5 \mu$ M).

3.2.2. Seleção de candidatos para estudos intracelulares

A avaliação biológica na forma amastigota intracelular é essencial para a identificação de novos fármacos, uma vez que se trata da forma mais relevante num contexto clínico de “kala-azar” (LV). Trata-se de um ensaio dispendioso pelo que só os melhores candidatos são testados neste contexto.

Os candidatos foram selecionados com base em 3 critérios: atividade leishmanicida, citotoxicidade e índice de seletividade. Foram selecionados os compostos que mostraram atividade na forma promastigota de *L. infantum* ($IC_{50} \leq 10 \mu M$), apresentaram nas células THP1 $CC_{50} > 10 \mu M$ e simultaneamente apresentaram índice de seletividade maior ou igual ao da miltefosina ($SI = 2,5$). Tendo isto em consideração, selecionou-se um total de 24 candidatos: 3 da 1ª série (**88m,n** e **67v**), 14 da 2ª série (**70k-o**, **72k-o**, **73k-o**, **75f,g** e **76a-g**), destacando-se **72l** com SI superior a 502, e 7 da 3ª série (**70f**, **71b,d,e**, **75i**, **77f** e **78f**).

3.2.3. Avaliação biológica em amastigotas de *L. infantum* intramacrofágicos

A avaliação biológica da atividade leishmanicida intramacrofágica é levada a cabo usando um método já reportado [64] (Fig 21). Neste os candidatos são testados em macrófagos previamente infetadas com amastigotas Luc+ (Luciferase positivos). A enzima luciferase é capaz de oxidar o substrato luciferina a oxiluciferina emitindo radiação no processo. Este processo de emissão de luminescência é quantificada e permite calcular a percentagem de inibição parasitária. Quanto maior o sinal de luminescência maior a viabilidade parasitária, quanto menor o sinal maior a inibição do crescimento parasitário.

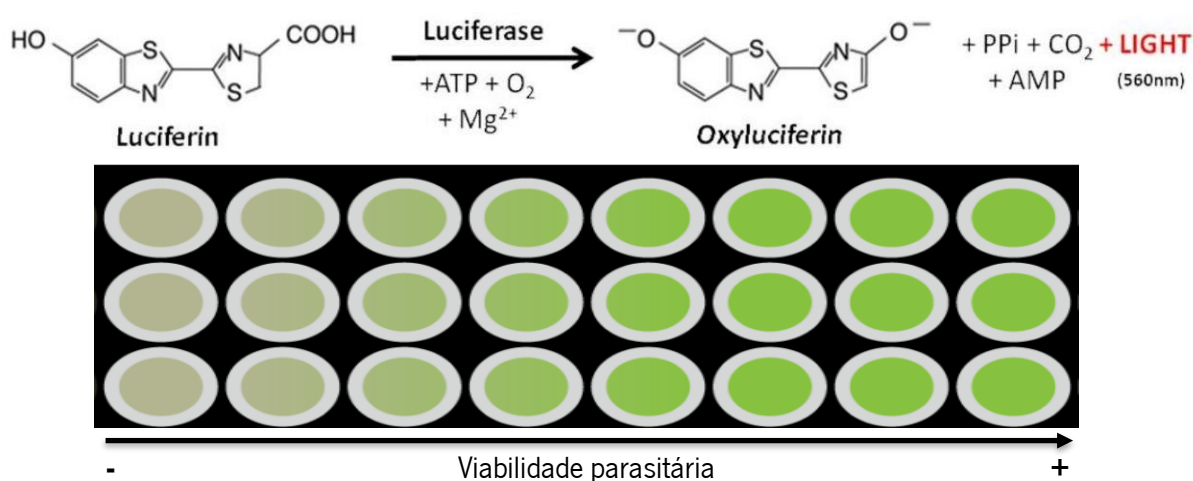
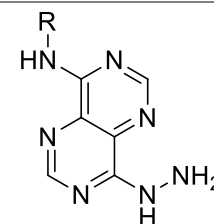


Figura 21 – Esquema de metabolização celular da luciferina a oxiluciferina; ilustração representativa do ensaio de Luciferase

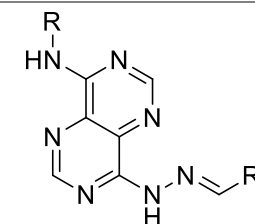
A metodologia abordada foi semelhante aos rastreios anteriores, na medida em que, se iniciou a avaliação biológica por SD a 10 μM e sempre que o composto mostrasse atividade significativa (%inibição ≥ 50) este era sujeito a um segundo teste (DRC) para determinação do **IC₅₀**. Alguns candidatos que, a 10 μM , mostraram inibição ligeiramente abaixo de 50% também foram avaliados por DRC.

De seguida apresentamos a tabela com os dados da atividade biológica em formas amastigotas intracelulares dos 24 compostos escolhidos (Tab 31). Para efeitos comparativos, transpôs-se os dados da citotoxicidade e atividade em formas promastigotas (obtidos nos ensaios biológicos anteriores). Além disso, dado o interesse farmacológico de alguns compostos, também se determinou o valor absoluto de **CC₅₀** e respetivo SI. Este foi determinado efetuando uma DRC em macrófagos da linha celular THP1. Devido à variabilidade deste ensaio somente alguns compostos puderam ser testados desta forma, uma vez que são necessários bastantes recursos para a determinação do valor absoluto de **CC₅₀** de um único composto.

Tabela 31 – Dados de atividade biológica de derivados de pirimidopirimidina em formas promastigotas e amastigotas de *L. infantum* e macrófagos da linha celular **THP1**. Dados representados são originários de um mínimo de 3 ensaios independentes. Os valores de IC₅₀ apresentados representam a extrapolação feita a partir da curva média obtida com todos os dados experimentais.

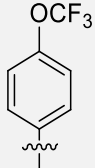
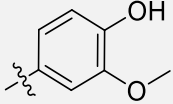
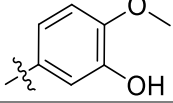
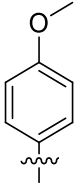
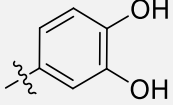
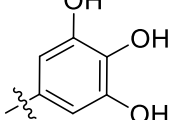
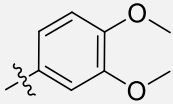
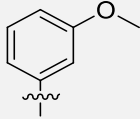
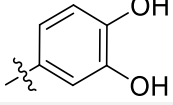
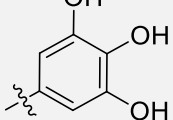
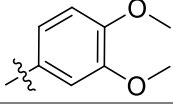
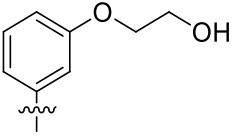
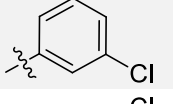
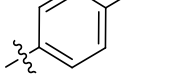


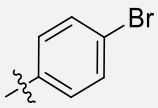
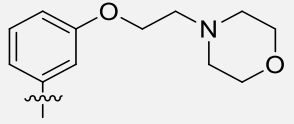
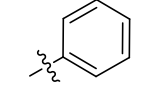
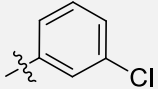
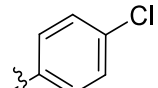
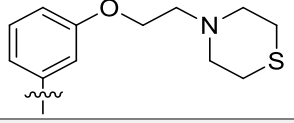
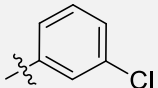
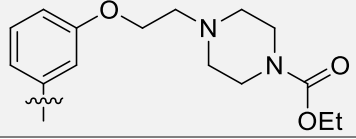
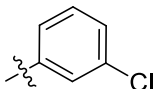
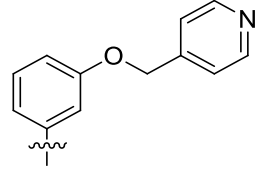
67



70-78

R	R ¹	N ^o	<i>Leishmania infantum</i>				THP1	
			Promastigotas		Amastigotas			
			IC ₅₀ (95%) ^b	SI ^c	%Inibição ^a	IC ₅₀ (95%) ^b		SI ^c
		70f	0,70 (0,65-0,76)	36>SI>14	N.a.	—	—	25>CC ₅₀ >10
		70k	0,77 (0,69-0,77)	>131	77 ± 7	1,72 (1,35-2,20)	>58	>100
		70l	0,39 (0,36-0,43)	>254	82 ± 4	1,53 (1,20-1,95)	>66	>100
		70o	0,35 (0,31-0,39)	>144	67 ± 13	2,03 (1,31-2,91)	>25	>50
		71b	10,25 (6,84-15,78)	>10	38 ± 8	11,66 (7,85-20,16)	>9	>100
		71d	3,53 (3,02-4,09)	7>SI>3	N.a.	—	—	25>CC ₅₀ >10
		71e	3,89 (3,47-4,38)	6>SI>3	N.a.	—	—	25>CC ₅₀ >10

	 88m	8,75 (7,36- 10,71)	3>SI>1	N.a.	--	--	25>CC50>10
	 88n	2,54 (2,32-2,76)	10>SI>4	N.a.	--	--	25>CC50>10
	 72k	0,99 (0,88-1,10)	>101	87 ± 4	3,13 (2,65-3,73)	>32	>100
	 72l	0,20 (0,18-0,22)	>502	41 ± 10	>20	--	>100
	 72o	1,93 (1,74-2,15)	>52	85 ± 7	3,00 (2,39-3,82)	>33	>100
	 73k	1,67 (1,47-1,88)	60>SI>30	62 ± 8	8,51 (7,42-9,51)	12>SI>6	100>CC50>50
	 73l	0,45 (0,33-0,45)	>221	N.a.	--	--	>100
	 73o	1,44 (1,35-1,54)	70>SI>35	34 ± 10	>20	--	100>CC50>50
	 75f	0,64 (0,63-0,65)	156>SI>78	75 ± 6	1,55 (1,00-2,20)	70>SI>35	100>CC50>50
	 75g	3,23 (2,52-4,14)	>31	75 ± 11	2,60 (1,95-3,39)	>39	>100

		75i	3,15 (2,85-3,50)	4	86 ± 6	2,34 (1,75-3,13)	6	13,06 (10,42-15,89)
		76a	9,18 (8,29-10,56)	>11	80 ± 7	1,96 (1,39-2,68)	>51	>100
		76f	1,90 (1,72-2,12)	31	86 ± 4	1,74 (1,23-2,40)	34	58,29 (43,01-80,03)
		76g	2,35 (2,26-2,76)	12	64 ± 16	4,58 (3,04-7,56)	6>SI>3	28,43 (22,74-34,39)
		77f	3,17 (2,95-3,41)	16>SI>8	N.a.	—	—	50>CC ₅₀ >25
		78f	3,92 (3,45-4,39)	26>SI>12	79 ± 9	3,04 (2,01-4,45)	33>SI>16	100>CC ₅₀ >50
		67v	3,13 (2,67-3,61)	>32	N.a.	—	—	>100
Miltefosina^d			11,88 (10,36-13,52)	2,5	99 ± 1 ^e	0,71 (0,64-0,78)	42	30*

Todos os dados de IC₅₀ e CC₅₀ encontram-se em μM; **Na** - Não ativo na concentração testada (Inibição < 20%); **N.d.** - Não determinado (insolúvel); **a**) %inibição a 10 μM **b**) Intervalo de confiança 95% (μM) para a curva média de todos os ensaios independentes; **c**) O cálculo de SI foi levado a acabo pela fórmula SI = CC₅₀ (THP1)/ IC₅₀ (parasita); **d**) Fármaco de referência para *L. infantum* *(dados fornecidos pelo grupo de investigação [63]); **e**) %Inibição a 12,5 μM;

A análise inicial dos dados da tabela 31 permite verificar que dos 24 compostos testados, 13 mostraram atividade significativa em amastigotas de *L. infantum* ($IC_{50} \leq 10 \mu M$). Destes 13, 12 mostraram $IC_{50} < 5 \mu M$. Destacam-se os derivados **70k,l**, **75f** e **76a,f** como os mais ativos apresentando $IC_{50} = 1,72; 1,53; 1,55; 1,96$ e $1,74 \mu M$, respetivamente.

A análise da tabela 31 e do gráfico 7 permite verificar que, quando **R** é um grupo hidrofóbico (**70**, **72** e **73**), verificou-se uma perda de atividade em formas amastigotas relativamente à atividade em promastigotas, os valores de IC_{50} obtidos em formas promastigotas são menores do que os correspondentes em amastigotas. O mesmo não sucedeu quando **R** é hidrofílico. Nestes casos (**75g,i**, **76f** e **78f**) a atividade em amastigotas foi ligeiramente superior à atividade registada para promastigotas. Ainda sim, na maioria, não se verificou uma variação significativa. O único composto que mostrou uma variação significativa entre a atividade promastigota/amastigota foi o derivado **76a** tendo sido muito mais potente na forma amastigota intramacrofágica ($IC_{50} = 1,96 \mu M$) do que na forma promastigota ($IC_{50} = 9,18 \mu M$).

Destaca-se ainda que, quando **R** é um grupo hidrofóbico todos os derivados com $R^1 = 3,4(HO)_2C_6H_3$ mostraram atividade em formas amastigotas e quando **R** é um grupo hidrofílico somente o derivado com enxofre (**77f**) e o precursor **67v** não foram ativos. Perante as series $R = 3-MeO(C_6H_4)$ **73** e $4-MeO(C_6H_4)$ **72** foi possível observar que a posição do metoxilo é extremamente importante para a atividade em amastigotas intramacrofágicos. Quando este se encontra na posição *meta* do anel **R** (**73**) os seus derivados são significativamente menos ativos que os respetivos derivados **72**. Somente o derivado **73k** com $R^1 = 3,4(HO)_2C_6H_3$ é que mostrou atividade em formas amastigotas.

Da serie **72**, curiosamente, o composto **72i**, que se tinha mostrado muito potente em formas promastigotas foi o único que não mostrou atividade significativa em amastigotas. O mesmo não aconteceu na serie **70**, uma vez que nesta, a perda de atividade foi só verificada no composto **70f** ($R^1 = 3-ClC_6H_4$).

Em conjunto, identificam-se os derivados **70k,l**, **75f,g** e **76a** como sendo aqueles que mostraram SI superior ao fármaco de referência (SI = 42).

Destes 5 compostos altamente promissores, selecionaram-se 3 para o estudo final em formas promastigotas de *L. infantum* multirresistentes (M200.5). Os compostos selecionados possuíam o maior SI, **70k** e **70l**, SI superior a 51 e 68, respetivamente, e o derivado **75g** que apresentava SI > 39, e simultaneamente elevada solubilidade em meio aquoso. Este estudo será discutido no capítulo seguinte.

Atividade em *L. infantum* promastigotas vs amastigotas intramacrofágicos

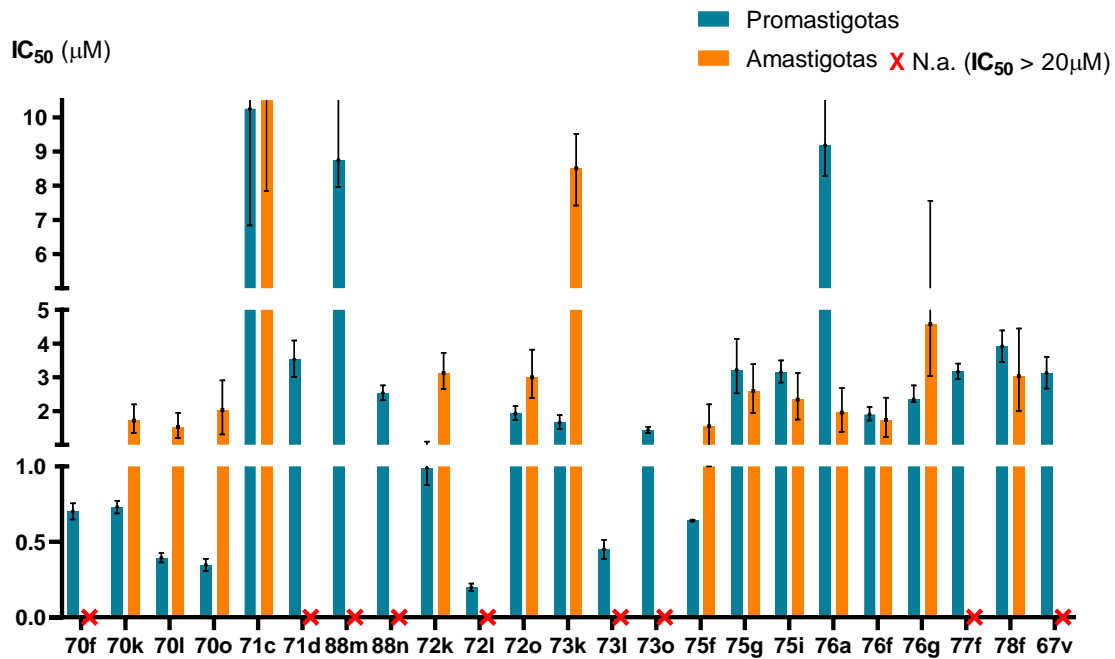


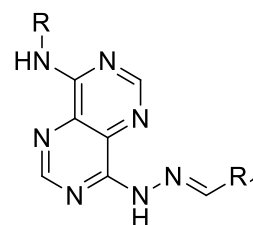
Gráfico 7 – Atividade biológica (IC₅₀ em *L. infantum*) dos compostos selecionados para estudos intracelulares em formas promastigotas e amastigotas

3.3. Avaliação biológica em formas promastigotas de *L. infantum* multirresistentes (M200.5)

A avaliação biológica dos compostos selecionados em formas promastigotas multirresistentes de *L. infantum* foi levada a cabo pelo mesmo método usado para promastigotas normais ou “Wild-type”. Iniciou-se a DRC a 10 µM e aplicou-se a mesma metodologia dos rastreios anteriores. Este ensaio permite identificar compostos ativos numa estirpe multirresistente (M200.5) obtendo-se assim dados qualitativos sobre o mecanismo de ação/resistência dos nossos compostos face aos fármacos de referência. Esta estirpe foi recentemente estudada no grupo de investigação e mostrou-se resistente à miltefosina, anfotericina B e paromomicina [63].

Apresenta-se abaixo a compilação dos dados de atividade, dos compostos testados, obtidos em formas promastigotas M200.5 (Tab 32). Para efeitos comparativos transpôs-se os dados de atividade em formas promastigotas W.t e de citotoxicidade para o cálculo do SI.

Tabela 32- Dados de atividade biológica de derivados de pirimidopirimidina em formas promastigotas **W.t.** e multirresistentes (**M200.5**) de *L. infantum*. Dados representados são originários de um mínimo de 3 ensaios independentes. Os valores de IC₅₀ apresentados representam a extrapolação feita a partir da curva média obtida com todos os dados experimentais.



70-78

R	R ¹	N ^o	<i>Leishmania infantum</i>				THP1
			Wild-type		M200.5		
			IC ₅₀ (95%) ^a	SI ^b	IC ₅₀ (95%) ^a	SI ^b	CC ₅₀
		70k	0,766 (0,69-0,77)	>131	0,88 (0,77-1,00)	>114	>100
		70l	0,39 (0,36-0,43)	>254	0,54 (0,49-0,59)	>186	>100
		75g	3,23 (2,52-4,14)	>31	1,07 (0,930-1,23)	>93	>100
Miltefosina^c			11,88 (10,36-13,52)	2,5	>125	<0,2	30*

Todos os dados de IC₅₀ e CC₅₀ encontram-se em µM; **a)** Intervalo de confiança 95% (µM) para a curva média de todos os ensaios independentes; **b)** O cálculo de SI foi levado a cabo pela fórmula SI = CC₅₀ (THP1)/ IC₅₀ (parasita); **c)** Fármaco de referência em *L. infantum* * (dados fornecidos pelo grupo de investigação [57]);

Uma primeira análise da tabela 32 permite afirmar que todos os compostos ativos em formas promastigotas w.t. foram também ativos na estirpe resistente M200.5. Além disso a ordem de grandeza dos IC₅₀ em M200.5 manteve-se semelhante aos W.t. Dos 3 compostos testados o derivado **75g** foi mais potente em M200.5 do que em W.t. Os outros 2 foram ligeiramente menos potentes.

No caso do derivado **75g**, este, não só é mais potente em M200.5, como, conseqüentemente, apresentou um incremento do SI de 3x.

3.2.5. Identificação de compostos “lead”

Ao longo dos diferentes rastreios foram detetados vários compostos ativos contra parasitas *L. infantum* e *T. brucei*. Estes compostos foram avaliados e selecionados com base no seu índice de seletividade, obtido pela razão entre o **CC₅₀** (THP1) e **IC₅₀** (parasita).

Desta seleção realça-se 10 compostos ativos em *T. brucei* com SI superior a 50. Destes 10, 3 mostraram SI superior a 100 sendo identificados como os melhores candidatos a “lead” em *T. brucei*. São estes os composto **67v**, **86m** e **91k**. Dentro deles, destaca-se **67v** como sendo um derivado mais simples e mais hidrossolúvel do que os restantes. Apesar da elevada potência dos restantes, a sua baixa solubilidade e o efeito bifásico de **86m** terá de ser otimizada e estudada, respetivamente. Desta forma, identificou-se o derivado **67v** como o mais promissor a “lead” em *T. brucei*.

Em *L. infantum* surgiram vários compostos interessantes sendo ativos tanto na forma promastigota como na forma amastigota intramacrofágica. Destes compostos realçam-se 5 que mostraram um SI superior à miltefosina (SI = 42). São estes os derivados **70k,l**, **75f,g** e **76a** que podem ser divididos em 2 grupos:

Os derivados **70k,l** apesar de muito ativos nas várias formas do parasita, inclusive em multirresistentes, não são muito solúveis em solução aquosa. Essa particularidade faz com que estes não sejam candidatos ideais a futuros testes *in vivo*. Por esse motivo, ainda requerem uma otimização adicional para serem compostos “lead”. Por outro lado, os derivados **75f,g** e **76a**, são bastante hidrossolúveis e mostram atividade (em amastigotas) semelhante aos derivados referidos anteriormente. Destes, **75g** mostrou-se ativo também na estirpe multirresistente e especula-se se os restantes também o serão.

Destaca-se ainda o facto de o derivado **76a** ser particularmente mais hidrossolúvel em condições acidicas. Este fator pode ser determinante para o nosso objetivo de desenvolver fármacos para administração oral. Em suma, os compostos **75f,g** e **76a** são candidatos promissores a “lead” em *L. infantum* e identifica-se **75g** como o candidato mais promissor preenchendo os critérios, até ao momento, que o tornam indicado para a próxima fase de testes (*in vivo*).

4. Conclusões e perspectivas futuras

A leishmaniose e a doença do sono são doenças provocadas por parasitas *Leishmania* e *Trypanosoma brucei*, respetivamente, que afetam um elevadíssimo número de pessoas em todo o mundo. Apesar de haver tratamento, o aparecimento de resistência aos tratamentos disponíveis e a variedade genética dos parasitas representam enorme perigo para a humanidade. A descoberta de novas moléculas para combate a essas doenças foi considerada pela Organização Mundial de Saúde uma necessidade urgente.

No grupo de investigação foi anteriormente identificada uma nova estrutura, contendo o núcleo de pirimidopirimidina, com elevada atividade contra *L. infantum* e *T. brucei*, mas com solubilidade reduzida em meio aquoso. De modo a produzir compostos igualmente ativos, mas mais solúveis em meio aquoso levou-se a cabo a síntese de novos derivados do composto hit, descritos neste trabalho.

Os análogos da molécula “hit” foram sintetizados por uma cascata reacional partindo do precursor imidato **57**. As amidinas **59a,b** e os imidazoles **60c-i** foram sintetizados a partir do imidato **57** com bons a excelentes rendimentos, usando métodos de síntese já anteriormente desenvolvidos no grupo de investigação. As 6-cianopurinas **61** foram sintetizadas com bons a excelentes rendimentos por reação de **59** e **60** com TEOF por 3 métodos distintos já descritos anteriormente. As 6-cianopurinas **61a,b** foram sujeitas a processos de alquilação com **52** e **54** e a 6-cianopurina **61c** foi sujeita a acilação com **62a,b** obtendo-se as 6-cianopurinas **63** com rendimentos variados.

As dihidropirimidopirimidinas **65** foram sintetizadas com excelentes rendimentos por reação de 6-cianopurinas **61** e **63** com hidrazina usando o método anteriormente desenvolvido no grupo. Uma vez que as cianopurinas **63b,f** se mostraram difíceis de isolar a partir do meio reacional em que haviam sido geradas, foram convertidas diretamente nas dihidropirimidopirimidinas **65** por tratamento da mistura reacional com hidrazina. Este protocolo “one pot” foi aplicado na síntese de **65i,m** apresentando excelentes rendimentos. As 4-hidrazinopirimidopirimidinas **67** foram sintetizadas com bons a excelentes rendimentos a partir de dihidropirimidopirimidinas **65**, em presença de uma base nucleofílica, por rearranjo de Dimroth.

Por último, as 4-hidrazonopirimidopirimidinas **69-82** foram sintetizadas com rendimentos variados a partir da reação de dihidropirimidopirimidinas **65** e 4-hidrazinopirimidopirimidinas **67** com aldeídos **68**. A síntese a partir de **67** ocorreu usando catálise ácida e mostrou-se consistente gerando os produtos

69-82 com elevado rendimento. Por outro lado, o protocolo “one-pot” que parte diretamente de **65**, com catálise básica, mostrou-se menos consistente dando os produtos **69-82** com rendimentos muito variados. Este método, contudo, permitiu a síntese rápida dos novos compostos para testes biológicos. Futuramente, espera-se otimizar este método de síntese uma vez que a rapidez com que se geram os compostos para testes biológicos é essencial para trabalhos de otimização estrutural.

Deu-se ainda início aos estudos preliminares de reatividade de dihidropirimidopirimidinas com compostos 1,2-dicarbonílicos para gerar derivados tricíclicos de pirimidopirimidinas. Os resultados obtidos apontam para a possibilidade de ocorrerem reações competitivas pelo que este método de síntese terá de ser otimizado no futuro. Dos ensaios realizados foi possível obter 3 triazinopirimidopirimidinas **84** com rendimentos razoáveis.

Do ponto visto de avaliação biológica, foram testadas 96 moléculas contra parasitas *Leishmania* e *Trypanosoma* e avaliou-se a sua citotoxicidade na linha celular THP1.

Testaram-se 56 moléculas *in vitro* contra *T. brucei* tendo-se observado atividade em 44 delas. Destas destacaram-se 3 tendo um índice de seletividade superior ou igual a 100 (**67v**, **86m** e **91k**). Os estudos de relação estrutura atividade mostram que a atividade depende dos grupos **R** e **R¹** presentes em torno do núcleo central de pirimidopirimidina. Realça-se ainda que, sempre que um precursor **67** foi testado, este foi o mais ativo da sua respetiva serie. Esta hipótese deverá ser estudada no futuro para a avaliar se a estrutura base de 4-hidrazinopirimidopirimidina é suficiente para gerar compostos ativos.

Em *L. infantum*, forma promastigota, foram testadas 90 moléculas *in vitro* emergindo 24 muito ativas e com índices de seletividade superiores ao fármaco de referência utilizado a Miltefosina. A análise SAR mostrou que a atividade depende de **R** e **R¹** sendo que estes não podem ser ambos hidrofóbicos/hidrofílicos. Verificou-se ainda que a presença de F aumenta tendencialmente a atividade dos compostos e que a introdução de Cl, nos anéis aromáticos, só se mostrou favorável quando este átomo foi introduzido em **R¹**.

Os 24 compostos mais ativos em formas promastigotas de *L. infantum* foram, de seguida, avaliados na forma amastigota intramacrofágica. Nestes ensaios foram identificadas 5 moléculas muito ativas e pouco tóxicas (**70k,i**, **75f,g** e **76a**) com SI superior à Miltefosina.

Dos cinco compostos ativos em *L.i.*, forma amastigota intramacrofágica, foram selecionados 3 para serem testados em formas promastigotas de uma estirpe multirresistente de *L. infantum*. Todos os

compostos se mostraram muito ativos na estirpe resistente destacando-se o **75g** que se mostrou 3x mais potente na estirpe resistente quando comparado com a estirpe normal ou w.t.

Uma vez que os compostos da serie **70** se mostraram os mais potentes e menos tóxicos de todos os compostos testados, no futuro a otimização da sua solubilidade deverá ser uma prioridade uma vez que os compostos já sintetizados se mostraram pouco solúveis em meio aquoso.

Em conjunto, identificaram-se vários compostos com elevada atividade antiparasitária, contudo destacam-se **75g** e **67v** como os “leads” mais promissores em *L. infantum* e *T. brucei*, respetivamente.

O derivado **75g** foi selecionado com base nos critérios de seletividade (SI > 42) e solubilidade, destacando-se, contudo, **75f** que, apesar de mais tóxico, apresentou elevada potência contra a forma amastigota (IC₅₀ = 1,55 µM) e elevada solubilidade.

O derivado **67v** foi selecionado com base nos critérios de seletividade (SI > 100), solubilidade e tamanho. Este ao contrário dos outros derivados promissores (**86m** e **91k**), é mais simples de sintetizar, bastante mais solúvel e igualmente seletivo.

Em relação aos “leads” e derivados promissores selecionados (**70k,l**, **75f,g** e **76a**; **67v**, **86m** e **91k**), espera-se que estes sejam avaliados *in vivo* e que sejam determinadas as suas propriedades farmacocinéticas, nomeadamente absorção, biodistribuição, biodisponibilidade, metabolização e excreção. Esta informação será fundamental para se continuar o design de novas moléculas e o desenvolvimento desta nova família de compostos ativos contra *L. infantum* e *T. brucei*.

5. Procedimentos Experimentais

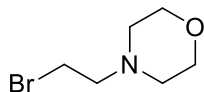
5.1. Síntese química

5.1.1. Agentes alquilantes

Procedimento geral para a síntese de Appel [48,49]:

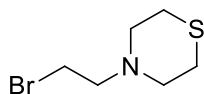
A uma solução de um álcool primário em DCM, nas quantidades indicadas, a 0°C e sob agitação vigorosa, adicionou-se primeiro 1,1 eq. de CBr₄ e em seguida 1,1 eq. de PPh₃ lentamente em pequenas porções. Quando se verificou a ausência de reagente de partida, por TLC, a mistura foi concentrada até à secura. O crude obtido foi tratado com n-hexano. O precipitado formado foi filtrado e descartado e o líquido-mãe foi concentrado até eliminar todo o n-hexano. O produto foi isolado como uma solução de CHBr₃.

4-(2-bromoetil)morfolina **54a**



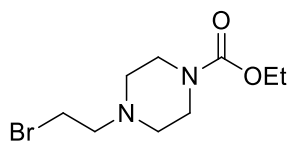
53a (1,06 g; 8,09 mmol); 10 mL de DCM, seguiu-se o procedimento geral. Obteve-se um óleo rosa claro identificado como **54a** (1,20 g, 6,18 mmol, 76%) de acordo com os seus dados físicos e espectroscópicos.

4-(2-bromoetil)tiomorfolina **54b**



53b (1,49 g; 10,11 mmol); 10 mL de DCM, seguiu-se o procedimento geral. Obteve-se um óleo amarelo claro identificado como **54b** (1,08 g, 5,16 mmol, 52%) de acordo com os seus dados físicos e espectroscópicos.

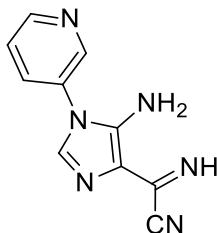
4-(2-bromoetil)piperazina-1-carboxilato **54c**



53c (0,75 g; 3,71 mmol); 10 mL de DCM, seguiu-se o procedimento geral. Obteve-se um óleo laranja identificado como **54c** (0,54 g, 2,05 mmol, 55%) de acordo com os seus dados físicos e espectroscópicos.

5.1.2. Imidazoles **60**

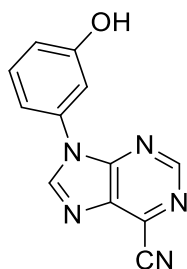
5-amino-1-(piridin-3-il)-1H-imidazole-4-carbimidoil cianeto **60i**



A uma suspensão de **57** (2,97 g; 18,47 mmol), em 15 mL de EtOH, adicionou-se 1,02 eq. de 3-aminopiridina, catálise ácida (PhNH₃Cl) e deixou-se a mistura sob agitação à temperatura ambiente (20-27°C) sob atmosfera inerte (N₂). Ao fim de 2d e 15h, quando o TLC mostrou a ausência de reagente de partida **57**, foram adicionados 50 mL de EtOH à suspensão e DBU (catálise). A reação continuou sob agitação eficiente durante 1h e 10 min a 25-27°C. A reação foi acompanhada por TLC e quando terminada a mistura foi arrefecida. O produto foi isolado por filtração e lavado no funil com uma mistura de EtOH/Et₂O (1:3), obtendo-se um sólido laranja claro, identificado como **60i** (2,90 g, 13,65 mmol, 75%) de acordo com os seus dados físicos e espectroscópicos.

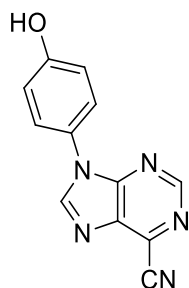
5.1.3. 6-cianopurinas **61** e **63**

9-(3-hidroxifenil)-9H-purina-6-carbonitrilo **61a**



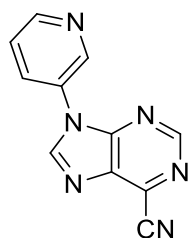
Suspendeu-se **59b** (1,85 g; 8,15 mmol) em 5,0 eq. de TEOF e colocou-se a mistura sob agitação magnética eficiente a 115°C. Ao fim de 18 min, por TLC, verificou-se a ausência de reagente de partida. Adicionou-se 15 mL de n-hexano, formou-se uma pasta negra que se levou aos ultrassons. Do crude precipitou um sólido que foi isolado por filtração e lavado com n-hexano e Et₂O. O sólido cinza claro foi identificado como **61a** (1,75 g, 7,38 mmol, 90%) por comparação do seu espectro de ¹H RMN com um padrão.

9-(4-hidroxifenil)-9H-purina-6-carbonitrilo **61b**



Suspendeu-se **59b** (4,00 g; 17,93 mmol) em 5,0 eq. de TEOF e colocou-se a mistura sob agitação magnética eficiente a 115°C. Ao fim de 32 min, por TLC, verificou-se a ausência de reagente de partida. Adicionou-se 15 mL de n-hexano, formou-se uma pasta negra que se levou aos ultrassons. Do crude precipitou um sólido que foi isolado por filtração e lavado com n-hexano e Et₂O. O sólido cinza claro foi identificado como **61b** (3,82 g, 16,10 mmol, 90%) por comparação do seu espectro de ¹H RMN com um padrão.

9-(piridin-3-il)-9H-purina-6-carbonitrilo **61i**



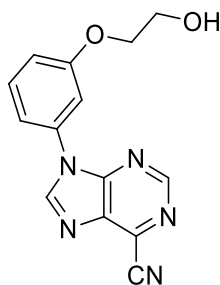
A uma suspensão de **60i** (0,56 g; 2,62 mmol) em 5,0 eq. de TEOF e colocou-se a mistura sob agitação magnética eficiente a 115°C. Ao fim de 18 min, por TLC, verificou-se a ausência de reagente de partida. Da mistura arrefecida cristalizou um sólido que foi isolado por filtração e lavado com Et₂O. Obteve-se um sólido bege cristalino identificado como **61i** (0,25 g, 1,13 mmol, 82%) de acordo com os seus dados físicos e espectroscópicos.

Procedimento geral para a síntese de **63**:

Método A - Alquilação: A uma suspensão de (**61**) em CH₃CN adicionou-se a quantidade indicada de uma base inorgânica e deixou-se a mistura sob agitação a 80°C durante alguns minutos, em sistema fechado. À mistura adicionou-se o haleto de alquila **52/54** na quantidade indicada e deixou-se continuar a 80°C em sistema fechado. Quando o TLC mostrou a ausência de reagente de partida, a mistura foi diluída com CH₃CN, filtrada na sílica e a solução resultante concentrada no evaporador rotativo. O resíduo foi tratado com o(s) solvente(s) indicado(s) e o produto **63** foi isolado por filtração e lavado com o(s) solvente(s) indicado(s).

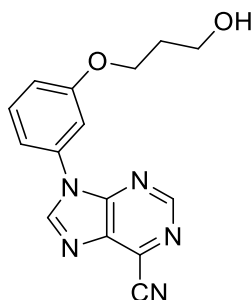
Método B - Acilação: A uma suspensão de (**61**) em CH₃CN seco adicionou-se o cloreto de acilo na quantidade indicada, 4 eq. de Et₃N e deixou-se a mistura sob agitação a 80°C em sistema fechado. Quando o TLC mostrou a ausência de reagente de partida, a mistura foi arrefecida tratada com H₂O fria. Da suspensão resultante isolou-se o produto **63** por filtração e lavou-se com H₂O, CH₃CN e ET₂O.

9-(3-(2-hidroxi)fenil)-9H-purina-6-carbonitrilo **63a**



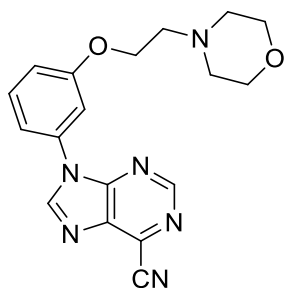
A: 61a (1,00 g; 4,23 mmol); 1,4 eq. de Cs₂CO₃; 10 mL de CH₃CN; 80°C durante 10 min. Adicionou-se 10 eq. de 2-bromo-1-etanol **52a**; 80°C durante 2 dias. A mistura foi diluída com 20 mL CH₃CN e seguiu-se o procedimento geral. Tratou-se o crude com 5 mL de Et₂O a 0°C. Do crude isolou-se um sólido amarelo claro por filtração e lavagem com Et₂O que se identificou como **63a** (1,10 g, 4,04 mmol, 96%) de acordo com os seus dados físicos e espectroscópicos.

9-(3-(2-hidroxi)propoxi)fenil)-9H-purina-6-carbonitrilo **63b**



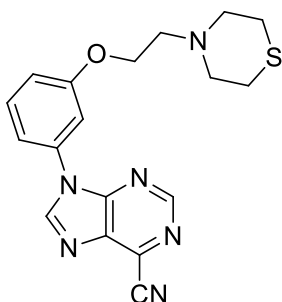
A: 61a (0,42 g; 1,76 mmol); 4,0 eq. de K₂CO₃; 20 mL de CH₃CN; 80°C durante 10 min. Adicionou-se 1,02 eq. de 3-bromo-1-propanol **52b**; 80°C durante 7 h. A mistura foi diluída com 20 mL CH₃CN e seguiu-se o procedimento geral. Tratou-se o crude com 5 mL de Et₂O a 0°C. Do crude isolou-se um sólido amarelo claro por filtração e lavagem com Et₂O que se identificou como **63b** (0,17 g, 0,56 mmol, 32%) de acordo com os seus dados físicos e espectroscópicos.

9-(3-(2-morfolino)etoxi)fenil)-9H-purina-6-carbonitrilo **63c**



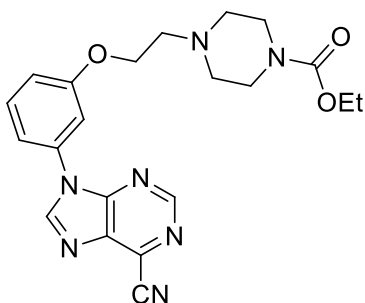
A: 61a (0,43 g; 1,81 mmol); 1,0 eq. de Cs₂CO₃; 5 mL de CH₃CN; 80°C durante 10 min. Adicionou-se 1,5 eq. de 4-(2-bromoetil)morfolina **54a**; 80°C durante 1 h. A mistura foi diluída com 20 mL CH₃CN e seguiu-se o procedimento geral. Tratou-se o crude com 5 mL de Et₂O a 0°C. Do crude isolou-se um sólido verde claro por filtração e lavagem com Et₂O que se identificou como **63c** (0,45 g, 1,32 mmol, 73%) de acordo com os seus dados físicos e espectroscópicos.

9-(3-(2-tiomorfolinoetoxi)fenil)-9H-purina-6-carbonitrilo **63d**



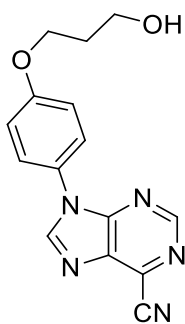
A: 61a (0,51 g; 2,13 mmol); 1,0 eq. de Cs₂CO₃; 10 mL de CH₃CN; 80°C durante 7 min. Adicionou-se 2,4 eq. de 4-(2-bromoetil)tiomorfolina **54c**; 80°C durante 2 h e 20 min. A mistura foi diluída com 20 mL CH₃CN e seguiu-se o procedimento geral. Tratou-se o crude com 5 mL de Et₂O a 0°C. Do crude isolou-se um sólido castanho claro por filtração e lavagem com Et₂O que se identificou como **63d** (0,31 g, 0,86 mmol, 40%) de acordo com os seus dados físicos e espectroscópicos.

Etil 4-(2-(3-(6-ciano-9H-purin-9-il)fenoxi)etil)piperazina-1-carboxilato **63e**



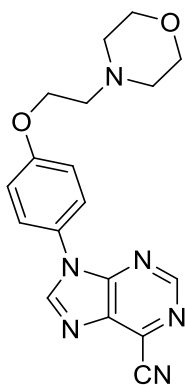
A: 61a (0,32 g; 1,36 mmol); 1,5 eq. de Cs₂CO₃; 5 mL de CH₃CN; 80°C durante 10 min. Adicionou-se 1,5 eq. de 4-(2-bromoetil)piperazina-1-carboxilato **54b**; 80°C durante 2 h. A mistura foi diluída com 15 mL CH₃CN e seguiu-se o procedimento geral. Tratou-se o crude com 5 mL de Et₂O a 0°C. Do crude isolou-se um sólido bege claro por filtração e lavagem com Et₂O que se identificou como **63e** (0,40 g, 0,96 mmol, 71%) de acordo com os seus dados físicos e espectroscópicos.

9-(4-(2-hidroxipropoxi)fenil)-9H-purina-6-carbonitrilo **63f**



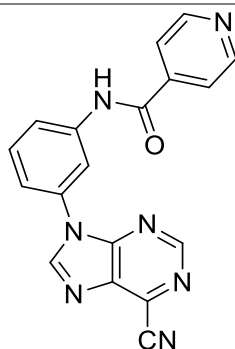
A: 61b (0,31 g; 1,31 mmol); 1,0 eq. de Cs₂CO₃; 5 mL de CH₃CN; 80°C durante 10 min. Adicionou-se 2,0 eq. de 3-bromo-1-propanol **52b**; 80°C durante 1 h e 30 min. A mistura foi diluída com 10 mL CH₃CN e seguiu-se o procedimento geral. Tratou-se o crude com 5 mL de Et₂O a 0°C. Do crude isolou-se um sólido amarelo claro por filtração e lavagem com Et₂O que se identificou como **63f** (0,24 g, 0,82 mmol, 64%) de acordo com os seus dados físicos e espectroscópicos.

9-(4-(2-morfolinoetoxi)fenil)-9H-purina-6-carbonitrilo **63g**



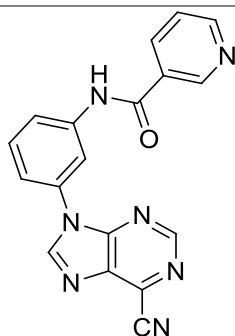
A: 61b (1,0 0g; 4,22 mmol); 1,0 eq. de Cs_2CO_3 ; 5 mL de CH_3CN ; 80°C durante 10 min. Adicionou-se 1,5 eq. de 4-(2-bromoetil)morfolina **54a**; 80°C durante 1 h. A mistura foi diluída com 25 mL CH_3CN e seguiu-se o procedimento geral. Tratou-se o crude com 5 mL de Et_2O a 0°C . Do crude isolou-se um sólido verde claro por filtração e lavagem com Et_2O que se identificou como **63g** (0,98 g, 2,86 mmol, 68%) de acordo com os seus dados físicos e espectroscópicos.

N-(3-(6-ciano-9H-purin-9-il)fenil)isonicotinamida **63h**



B: 61c (0,61 g; 2,57 mmol); 1,5 eq. de **62a**; 4,0 eq. de Et_3N ; 5 mL de CH_3CN ; 80°C durante 1h e 35 min. Seguiu-se o procedimento geral. Isolou-se um sólido bege claro por filtração e lavagem com H_2O , CH_3CN e Et_2O que se identificou como **63i** (0,78 g, 2,28 mmol, 89%) de acordo com os seus dados físicos e espectroscópicos.

N-(3-(6-ciano-9H-purin-9-il)fenil)nicotinamida **63i**



B: 61c (0,61 g; 2,57 mmol); 1,5 eq. de **62b** 4,0 eq. de Et_3N ; 5 mL de CH_3CN ; 80°C durante 1h e 40 min. Seguiu-se o procedimento geral. Isolou-se um sólido bege claro por filtração e lavagem com H_2O , CH_3CN e Et_2O que se identificou como **63h** (0,60 g, 1,75 mmol, 68%) de acordo com os seus dados físicos e espectroscópicos.

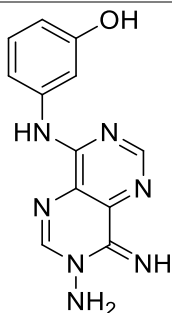
5.1.4. Dihidropirimidopirimidinas **65**

Procedimento geral:

A: A uma suspensão de **61/63** no solvente indicado adicionou-se, sob agitação vigorosa, hidrazina (em EtOH se necessário) e deixou-se a mistura a 27°C. Quando o TLC mostrou a ausência de reagente de partida o produto **65** foi isolado por filtração e lavado com o(s) solvente(s) indicado(s).

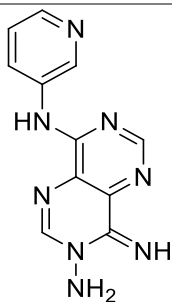
B: A uma suspensão de **61** em CH₃CN adicionou-se a quantidade indicada de uma base inorgânica e deixou-se a mistura sob agitação a 80°C durante alguns minutos em sistema fechado. À mistura adicionou-se o haleto de alquila **52/54** na quantidade indicada e deixou-se continuar a 80°C em sistema fechado. Quando o TLC mostrou a ausência de reagente de partida, a mistura foi diluída com CH₃CN, filtrada numa coluna de sílica de 1 cm de altura e concentrada no evaporador rotativo. O crude foi diluído em CH₃CN e tratado, sob agitação vigorosa, com uma solução de hidrazina em EtOH e deixado a 27°C. O produto **65** foi isolado por filtração e lavado com o(s) solvente(s) indicado(s).

3-((7-amino-8-imino-7,8-dihidropirimido[5,4-d]pirimidin-4-il)amino)fenol **65a**



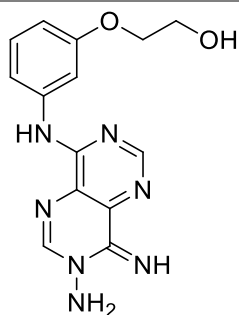
A: 61a (0,95 g; 4,0 mmol); 5 mL de EtOH; 2,5 eq. de hidrazina; 27°C durante 13 min. Da mistura precipitou o produto que foi isolado por filtração e lavado com EtOH e Et₂O. Obteve-se um sólido bege claro que se identificou como o composto **65a** (1,12 g, 3,99 mmol, 99%) de acordo com os seus dados físicos e espectroscópicos.

4-imino-N⁸-(piridin-3-il)pirimido[5,4-d]pirimidine-3,8(4H)-diamina



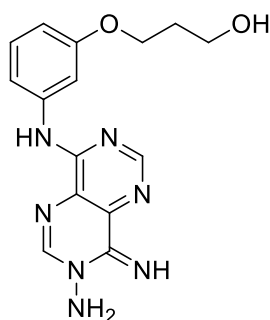
A: 61j (0,81 g; 3,61 mmol); 5 mL de EtOH; 2,5 eq. de hidrazina; 27°C durante 13 min. Da mistura precipitou o produto que foi isolado por filtração e lavado com EtOH e Et₂O. Obteve-se um sólido bege claro que se identificou como o composto **65g** (0,85 g, 3,33 mmol, 92%) de acordo com os seus dados físicos e espectroscópicos.

2-(3-((7-amino-8-imino-7,8-dihidropirimido[5,4-d]pirimidino-4-il)amino)fenoxi)etanol **65h**



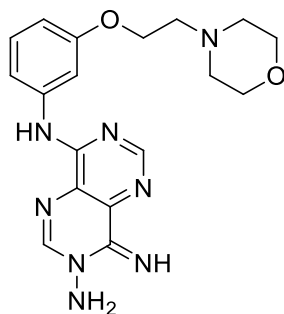
A: 63a (0,80 g; 2,94 mmol); 3 mL de EtOH; 2,5 eq. de hidrazina; 27°C durante 15 min. Da mistura precipitou o produto que foi isolado por filtração e lavado com EtOH e Et₂O. Obteve-se um sólido amarelo claro que se identificou como o composto **65h** (0,74 g, 2,42 mmol, 82%) de acordo com os seus dados físicos e espectroscópicos.

2-(3-((7-amino-8-imino-7,8-dihidropirimido[5,4-d]pirimidino-4-il)amino)fenoxi)propanol **65i**



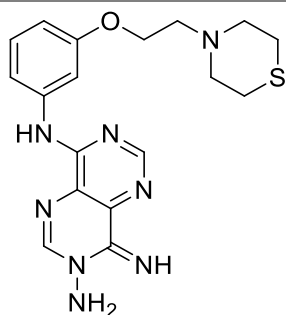
B: 61a (0,80 g; 3,38 mmol); 1,0 eq. de Cs₂CO₃; 5 mL de CH₃CN; 80°C durante 10 min. Adicionou-se 2,0 eq. de 3-bromo-1-propanol **52c**; 80°C durante 1 h. A mistura foi diluída com 20 mL de CH₃CN e seguiu-se o procedimento geral. Juntou-se 3 mL de CH₃CN ao crude; 2,5 eq. de hidrazina em 1 mL de EtOH; 27°C durante 1 h. O produto foi isolado por filtração e lavado com EtOH e Et₂O. Obteve-se um sólido cinza arroxeadado que se identificou como sendo **65i** (1,10 g, 3,36 mmol, 99%) de acordo com os seus dados físicos e espectroscópicos.

4-imino-N⁸-(3-(2-morfolinoetoxi)fenil)pirimido[5,4-d]pirimidina-3,8(4H)-diamina **65j**



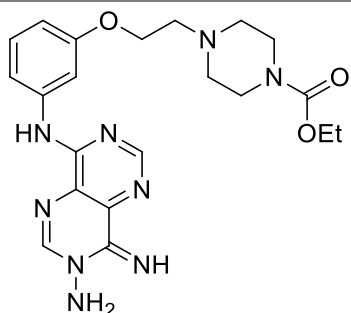
B: 61a (0,20 g; 0,84 mmol); 4,0 eq. de K₂CO₃; 5 mL de CH₃CN; 80°C durante 10 min. Adicionou-se 1,2 eq. de 4-(2-bromoetil)morfolina **54a**; 80°C durante 5 h e 10 min. A mistura foi diluída com 20 mL CH₃CN e seguiu-se o procedimento geral. Diluiu-se o crude com 3 mL de CH₃CN; 2,5 eq. de hidrazina em 1 mL de EtOH; 27°C durante 20 min. O produto foi isolado por filtração e lavado com EtOH e Et₂O. Obteve-se um sólido cinza claro que se identificou como o composto **65j** (0,29 g, 0,76 mmol, 90%) de acordo com os seus dados físicos e espectroscópicos.

4-imino-N⁸-(3-(2-tiomorfolinoetoxi)fenil)pirimido[5,4-d]pirimidina-3,8(4H)-diamina **65k**



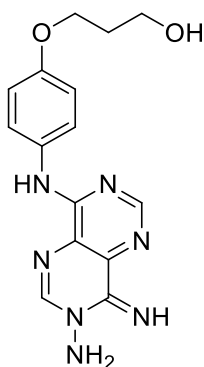
A: 63d (0,23 g; 0,64 mmol); 5 mL de EtOH; 2,5 eq. de hidrazina; 27°C durante 1h e 40 min. Da mistura precipitou o produto que foi isolado por filtração e lavado com EtOH e Et₂O. Obteve-se um sólido bege claro que se identificou como o composto **65k** (0,21 g, 0,52 mmol, 82%) de acordo com os seus dados físicos e espectroscópicos.

Etil-4-(2-(3-((7-amino-8-imino-7,8-dihidropirimido[5,4-d]pirimidin-4-il)amino)fenoxi)etil)piperazina-1-carboxilato **65l**



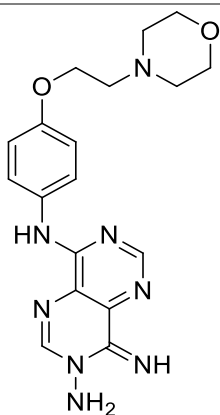
A: 63 (0,36 g; 0,86 mmol); 2 mL de EtOH; 2,5 eq. de hidrazina; 27°C durante 45 min. Da mistura precipitou o produto que foi isolado por filtração e lavado com EtOH e Et₂O. Obteve-se um sólido bege alaranjado que se identificou como o composto **65l** (0,35 g, 0,78 mmol, 90%) de acordo com os seus dados físicos e espectroscópicos.

2-(4-((7-amino-8-imino-7,8-dihidropirimido[5,4-d]pirimidino-4-il)amino)fenoxi)propanol **65m**



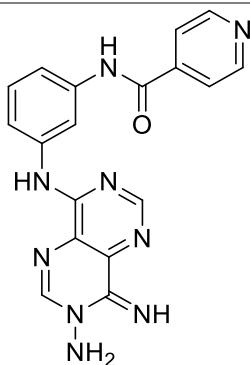
B: 61b (0,59 g; 2,49 mmol); 1,0 eq. de Cs₂CO₃; 5 mL de CH₃CN; 80°C durante 10 min. Adicionou-se 2,0 eq. de 3-bromo-1-propanol; 80°C durante 2 h. A mistura foi diluída com 20 mL CH₃CN e seguiu-se o procedimento geral. Diluiu-se o crude com 3 mL de CH₃CN; 2,5 eq. de hidrazina em 1 mL de EtOH; 27°C durante 1 h. O produto foi isolado por filtração e lavado com EtOH e Et₂O. Obteve-se um sólido amarelo claro que se identificou como o composto **65m** (0,68 g, 2,08 mmol, 84%) de acordo com os seus dados físicos e espectroscópicos.

4-imino-N⁸-(4-(2-morfolinoetoxi)fenil)pirimido[5,4-d]pirimidina-3,8(4H)-diamina **65n**



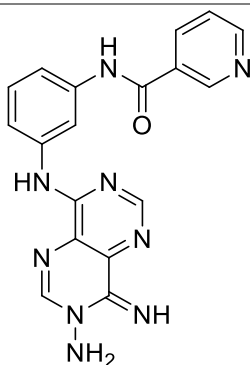
A: **63g** (0,81 g; 2,36 mmol); 4 mL de CH₃CN/EtOH (3:1); 2,5 eq. de hidrazina; 27°C durante 52 min. Da mistura precipitou o produto que foi isolado por filtração e lavado com EtOH e Et₂O. Obteve-se um sólido bege claro que se identificou como o composto **65n** (0,81 g, 2,16 mmol, 92%) de acordo com os seus dados físicos e espectroscópicos.

N-(3-((7-amino-8-imino-7,8-dihidropirimido[5,4-d]pirimidin-4-il)amino)fenil)isonicotinamida **65o**



A: **63h** (0,39 g; 1,16 mmol); 2 mL de DMSO; 2,5 eq. de hidrazina; 27°C durante 1h. Da mistura precipitou o produto que foi isolado por filtração e lavado com EtOH e Et₂O. Obteve-se um sólido branco que se identificou como o composto **65o** (0,37 g, 0,98 mmol, 85%) de acordo com os seus dados físicos e espectroscópicos.

N-(3-((7-amino-8-imino-7,8-dihidropirimido[5,4-d]pirimidin-4-il)amino)fenil)nicotinamida **65p**



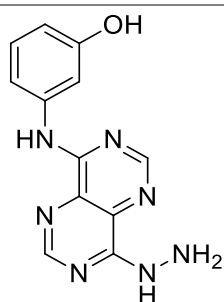
A: **63i** (0,60 g; 1,75 mmol); 3 mL de DMSO; 2,5 eq. de hidrazina; 27°C durante 1h. Da mistura precipitou o produto que foi isolado por filtração e lavado com EtOH e Et₂O. Obteve-se um sólido amarelo que se identificou como o composto **65p** (0,59 g, 1,59 mmol, 91%) de acordo com os seus dados físicos e espectroscópicos.

5.1.5. 4-Hidrazinopirimidopirimidinas **67**

Procedimento geral:

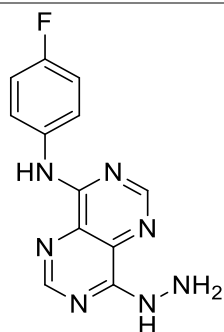
A uma suspensão de **65**, no solvente indicado, adicionou-se a quantidade indicada de piperina **66** e deixou-se a mistura sob agitação em sistema fechado a 80°C. Evaporou-se o excesso de piperidina, o produto **67** foi precipitado com os solventes indicados, isolado por filtração e lavado com o(s) solvente(s) indicado(s).

3-((8-hidrazinilpirimido[5,4-d]pirimidin-4-il)amino)fenol **67a**



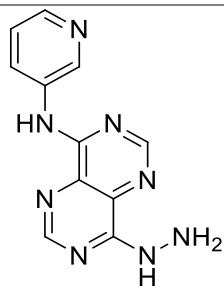
65a (0,24 g; 0,90 mmol); 0,3 mL de DMSO; adicionou-se 2,0 eq. de piperidina; 80°C durante 45 min. O produto foi precipitado por adição de 5 mL de H₂O. Este foi isolado por filtração e lavado com EtOH. Obteve-se um sólido castanho claro que se identificou como o composto **67a** (0,22g, 0,80 mmol, 89%) de acordo com os seus dados físicos e espectroscópicos.

N-(4-fluorofenil)-8-hidrazinilpirimido[5,4-d]pirimidina-4-amina **67e**



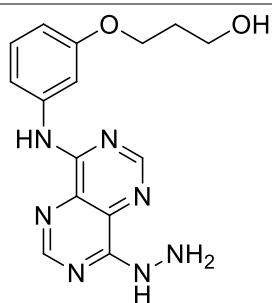
65e (0,65 g; 2,27 mmol); 5 mL de DMSO; 2,0 eq. de piperidina; 80°C durante 4 h. O produto foi precipitado por adição de 5 mL de EtOH. Este foi isolado por filtração e lavado com EtOH. Obteve-se um sólido laranja que se identificou como o composto **67e** (0,60 g, 2,10 mmol, 92,4%) de acordo com os seus dados físicos e espectroscópicos.

8-hidrazinil-N-(piridino-3-il)pirimido[5,4-d]pirimidina-4-amina **67g**



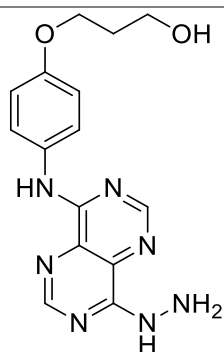
65g (0,15 g; 0,65 mmol); 0,5 mL de DMSO; 2,0 eq. de piperidina; 80°C durante 2 h. O produto foi precipitado por adição de 5 mL de H₂O. Este foi isolado por filtração e lavado com H₂O. Obteve-se um sólido laranja que se identificou como o composto **67g** (0,11 g, 0,43 mmol, 65%) de acordo com os seus dados físicos e espectroscópicos.

3-(3-((8-hidrazinilpirimido[5,4-d]pirimidin-4-il)amino)fenoxi)propan-1-ol **67h**



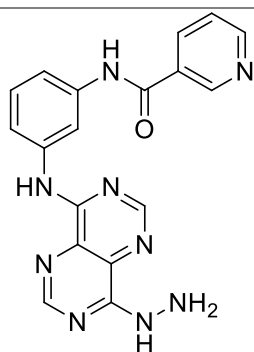
65h (1,35 g; 4,11 mmol); 10 mL de EtOH; 2,0 eq. de piperidina; 80°C durante 14h. Este foi isolado por filtração e lavado com CH₃CN. Obteve-se um sólido laranja salmão que se identificou como o composto **67h** (0,99 g, 3,04 mmol, 74%) de acordo com os seus dados físicos e espectroscópicos.

3-(4-((8-hidrazinilpirimido[5,4-d]pirimidin-4-il)amino)fenoxi)propan-1-ol **67m**



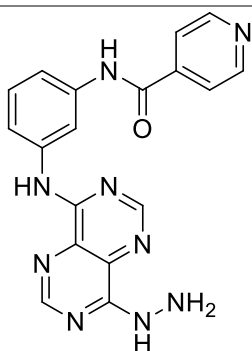
65m (1,02 g; 3,06 mmol); 10 mL de EtOH; 2,0 eq. de piperidina; 80°C durante 25 h. O produto precipitou por adição de 20 mL de CH₃CN. Este foi isolado por filtração e lavado com CH₃CN. Obteve-se um sólido amarelo alaranjado que se identificou como o composto **67m** (0,80 g, 2,44 mmol, 80%) de acordo com os seus dados físicos e espectroscópicos.

N-(3-((8-hidrazinilpirimido[5,4-d]pirimidin-4-il)amino)fenil)nicotinamida **67o**



65o (0,60 g; 1,59 mmol); 1 mL de DMSO; 2,0 eq. de piperidina; 80°C durante 2 h. O produto precipitou por adição de 10 mL de CH₃CN. Este foi isolado por filtração e lavado com CH₃CN. Obteve-se um sólido laranja que se identificou como o composto **67o** (0,49 g, 1,31 mmol, 83%) de acordo com os seus dados físicos e espectroscópicos.

N-(3-((8-hidrazinilpirimido[5,4-d]pirimidin-4-il)amino)fenil)isonicotinamida **67p**



65p (0,21 g; 0,57 mmol); 0,5 mL de DMSO; 2,0 eq. de piperidina; 80°C durante 1 h. O produto precipitou por adição de 10 mL de CH₃CN. Este foi isolado por filtração e lavado com CH₃CN. Obteve-se um sólido laranja que se identificou como o composto **67p** (0,21 g, 0,57 mmol, 99%) de acordo com os seus dados físicos e espectroscópicos.

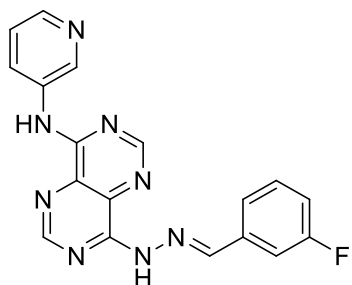
5.1.6. 4-Hidrazonopirimidopirimidinas **69-82**

Procedimento geral:

Método A: A uma suspensão de **67**, em DMSO/EtOH, adicionou-se a quantidade indicada de aldeído. A mistura foi tratada com catálise ácida, sob agitação, a 30°C. O produto foi precipitado com o solvente indicado, isolado por filtração e lavado com H₂O.

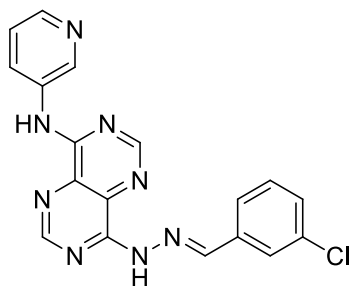
Método B: A uma suspensão de **65**, em DMSO/EtOH, adicionou-se a quantidade indicada de aldeído e a mistura foi deixada sob agitação magnética alguns min a t.a. (20-30°C). Adicionou-se piperina na quantidade indicada e deixou-se a mistura sob agitação a 80°C durante o tempo indicado. Os solventes foram eliminados no evaporador rotativo, o produto foi precipitado com o(s) solvente(s) indicado(s), isolado por filtração e lavado com o(s) solvente(s) indicado(s).

(E)-8-(2-(3-fluorobenzilideno)hidrazinil)-N-(piridin-3-il)pirimido[5,4-d]pirimidin-4-amina **69d**



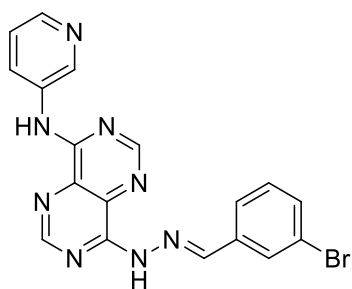
B: **65g** (0,21 g; 0,83 mmol); 0,5 mL de DMSO; 1,5 eq. de 3-fluorobenzaldeído **68d**; durante 10 min; 2,0 eq. de piperina; 80°C durante 1h. O produto foi precipitado por adição de 5 mL de CH₃CN e 5 mL de H₂O, e isolado por filtração. O sólido bege amarelado foi lavado com H₂O e Et₂O e identificado como **69d** (0,27 g, 0,74 mmol, 89%) de acordo com os seus dados físicos e espectroscópicos.

(E)-8-(2-(3-clorobenzilideno)hidrazinil)-N-(piridin-3-il)pirimido[5,4-d]pirimidin-4-amina **69f**



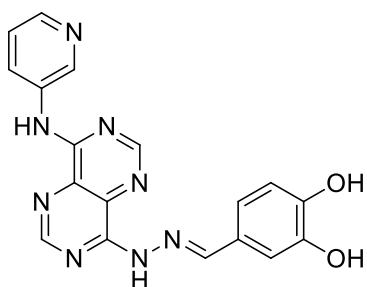
B: **65g** (0,20 g; 0,78 mmol); 0,5 mL de DMSO; 1,5 eq. de 3-clorobenzaldeído **68f**; durante 10 min; 2,0 eq. de piperina; 80°C durante 1h. O produto foi precipitado por adição de 5 mL de CH₃CN e isolado por filtração. O sólido amarelo vivo foi lavado com H₂O, CH₃CN e Et₂O e identificado como **69f** (0,26 g, 0,68 mmol, 88%) de acordo com os seus dados físicos e espectroscópicos.

(E)-8-(2-(3-bromobenzilideno)hidrazinil)-N-(piridin-3-il)pirimido[5,4-d]pirimidin-4-amina **69g**



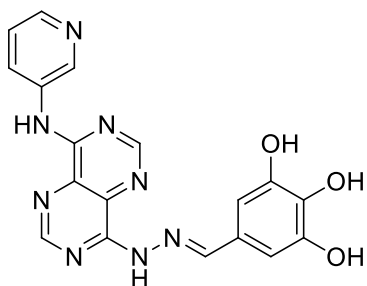
B: 65g (0,21 g; 0,83 mmol); 0,5 mL de DMSO; 1,5 eq. de 3-bromobenzaldeído **68g**; durante 10 min; 2,0 eq. de piperina; 80°C durante 1h. O produto foi precipitado por adição de 5 mL de CH₃CN e isolado por filtração. O sólido bege amarelado foi lavado com H₂O, CH₃CN e Et₂O e identificado como **69g** (0,26 g, 0,68 mmol, 88%) de acordo com os seus dados físicos e espectroscópicos.

(E)-4-((2-(8-(piridin-3-ilamino)pirimido[5,4-d]pirimidin-4-il)hidrazono)metil)benzeno-1,2-diol **69k**



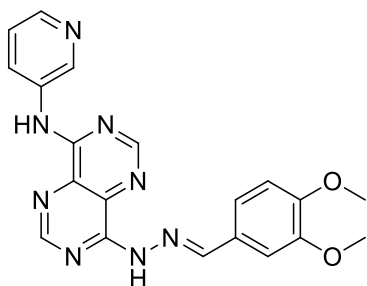
B: 65g (0,18 g; 0,71 mmol); 0,5 mL de DMSO; 1,02 eq. de 3,4-dihidroxibenzaldeído **68k**; durante 10 min; 2,0 eq. de piperina; 80°C durante 1h. O produto foi precipitado por adição de 5 mL de H₂O, e isolado por filtração. O sólido amarelo torrado foi lavado com H₂O e Et₂O e identificado como **69k** (0,17 g, 0,46 mmol, 65%) de acordo com os seus dados físicos e espectroscópicos.

(E)-5-((2-(8-(piridin-3-ilamino)pirimido[5,4-d]pirimidin-4-il)hidrazono)metil)benzeno-1,2,3-triol **69l**



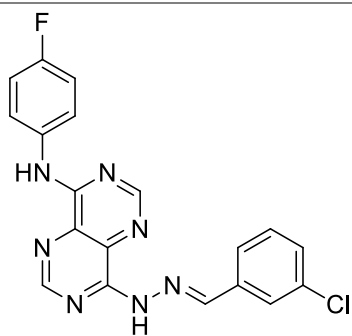
A: 67g (0,07 g; 0,28 mmol); 0,5 mL de DMSO adicionou-se 1,02 eq. de 3,4,5-trihidroxibenzaldeído **68l**; H₂SO₄ (cat.). Deixou-se a mistura sob agitação a 30°C durante 12 min. O produto foi precipitado por adição 5 mL de H₂O e isolado por filtração. O sólido laranja foi lavado com H₂O e identificado como **69l** (0,10 g, 0,25 mmol, 91%) de acordo com os seus dados físicos e espectroscópicos.

(E)-8-(2-(3,4-dimetoxibenzilideno)hidrazinil)-N-(piridin-3-il)pirimido[5,4-d]pirimidina-4-amina **69o**



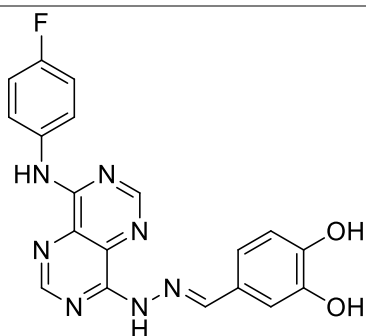
B: 65g (0,15 g; 0,58 mmol); 0,5 mL de DMSO; 1,02 eq. de 3,4-dimetoxibenzaldeído **68o**; durante 10 min; 2,0 eq. de piperina; 80°C durante 25 min. O produto foi precipitado por adição de 5 mL de H₂O e isolado por filtração. O sólido amarelo foi lavado com H₂O e identificado como **69l** (0,14 g, 0,40 mmol, 69%) de acordo com os seus dados físicos e espectroscópicos.

(E)-8-(2-(3-clorobenzilideno)hidrazinil)-N-(4-fluorofenil)pirimido[5,4-d]pirimidin-4-amina **70f**



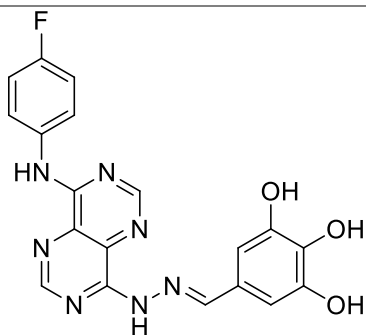
A: **67e** (0,07 g; 0,26 mmol); 2 mL de DMSO adicionou-se 1,5 eq. de 3-clorobenzaldeído **68f**; H₂SO₄ (cat.). Deixou-se a mistura sob agitação a 30°C durante 20 min. O produto foi precipitado por adição 5 mL de H₂O e isolado por filtração. O sólido amarelo foi lavado com H₂O e identificado como **70f** (0,10 g, 0,25 mmol, 96%) de acordo com os seus dados físicos e espectroscópicos.

(E)-4-((2-(8-((4-fluorofenil)amino)pirimido[5,4-d]pirimidin-4-il)hidrazono)metil)benzeno-1,2-diol **70k**



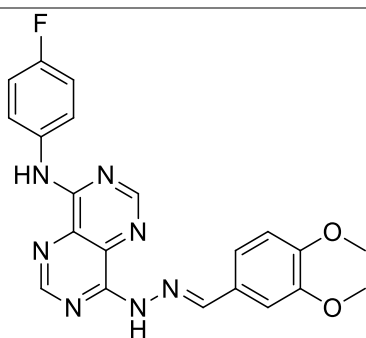
A: **67e** (0,20 g; 0,75 mmol); 3 mL de DMSO; 1,1 eq. de 3,4-dihidroxibenzaldeído **68k**; H₂SO₄ (cat.), 30°C durante 1 h. O produto foi precipitado por adição 5 mL de H₂O e isolado por filtração. O sólido laranja vivo foi lavado com H₂O e identificado como **70k** (0,28 g, 0,74 mmol, 98%) de acordo com os seus dados físicos e espectroscópicos.

(E)-5-((2-(8-((4-fluorofenil)amino)pirimido[5,4-d]pirimidin-4-il)hidrazono)metil)benzeno-1,2,3-triol **70l**



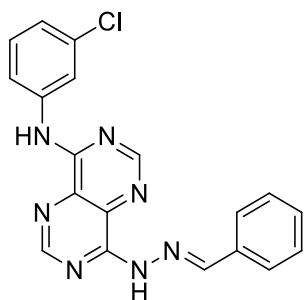
A: **67e** (0,15 g; 0,54 mmol); 3 mL de DMSO; 1,2 eq. de 3,4,5-trihidroxibenzaldeído **68l**; H₂SO₄ (cat.); 30°C durante 2 h. O produto foi precipitado por adição 5 mL de H₂O e isolado por filtração. O sólido laranja vivo foi lavado com H₂O e identificado como **70l** (0,22 g, 0,53 mmol, 99%) de acordo com os seus dados físicos e espectroscópicos.

(E)-8-(2-(3,4-dimetoxibenzilideno)hidrazinil)-N-(4-fluorofenil)pirimido[5,4-d]pirimidin-4-amina **70o**



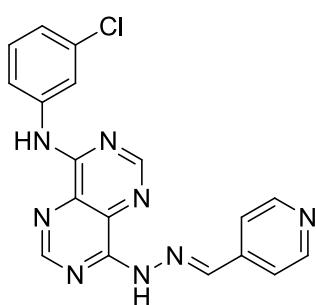
A: **67e** (0,06 g; 0,22 mmol); 3 mL de DMSO; 1,2 eq. de 3,4-dimetoxibenzaldeído **68o**; H₂SO₄ (cat.); 30°C durante 2h. O produto foi precipitado por adição 5 mL de H₂O e isolado por filtração. O sólido laranja vivo foi lavado com H₂O e identificado como **70o** (0,09 g, 0,21 mmol, 96%) de acordo com os seus dados físicos e espectroscópicos.

(E)-8-(2-benzilidenehidrazinil)-N-(3-clorofenil)pirimido[5,4-d]pirimidin-4-amina **71a**



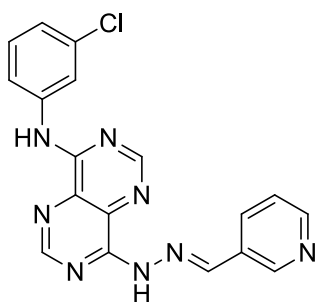
B: **65f** (0,23 g; 0,78 mmol); 0,2 mL de DMSO; 1,5 eq. de benzaldeído **68a**; durante 14 min; 2,0 eq. de piperina; 80°C durante 15 min. O produto foi precipitado por adição de 5 mL de CH₃CN e isolado por filtração. O sólido amarelo foi lavado com H₂O, CH₃CN e Et₂O e identificado como **71a** (0,24 g, 0,66 mmol, 83%) de acordo com os seus dados físicos e espectroscópicos.

(E)-N-(3-clorofenil)-8-(2-(piridin-4-ilmetileno)hidrazinil)pirimido[5,4-d]pirimidin-4-amina **71b**



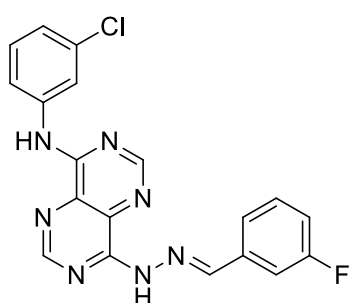
B: **65f** (0,20 g; 0,71 mmol); 0,2 mL de DMSO; 1,5 eq. de 4-piridinacarboxaldeído **68b**; durante 30 min; 2,0 eq. de piperina; 80°C durante 30 min. O produto foi precipitado por adição de 5 mL de CH₃CN e isolado por filtração. O sólido amarelo foi lavado com CH₃CN e Et₂O e identificado como **71b** (0,26 g, 0,68 mmol, 96%) de acordo com os seus dados físicos e espectroscópicos.

(E)-N-(3-clorofenil)-8-(2-(piridin-3-ilmetileno)hidrazinil)pirimido[5,4-d]pirimidin-4-amina **71c**



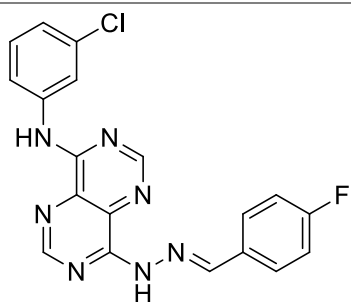
B: **65f** (0,19 g; 0,66 mmol); 0,2 mL de DMSO; 1,5 eq. de 3-piridinacarboxaldeído **68c**; durante 30 min; 2,0 eq. de piperina; 80°C durante 30 min. O produto foi precipitado por adição de 5 mL de CH₃CN e isolado por filtração. O sólido amarelo foi lavado com CH₃CN e Et₂O e identificado como **71c** (0,20 g, 0,54 mmol, 82%) de acordo com os seus dados físicos e espectroscópicos.

(E)-N-(3-clorofenil)-8-(2-(3-fluorobenzilideno)hidrazinil)pirimido[5,4-d]pirimidin-4-amina **71d**



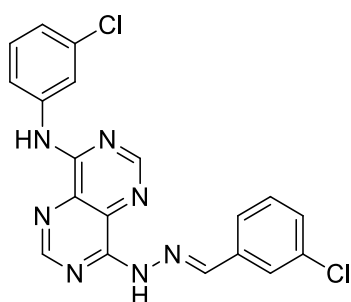
A: **67f** (0,16 g; 0,54 mmol); 2 mL de DMSO; 1,5 eq. de 3-fluorobenzaldeído **68d**; H₂SO₄ (cat.); 30°C durante 1h. O produto foi precipitado por adição 5 mL de H₂O e isolado por filtração. O sólido laranja vivo foi lavado com H₂O e identificado como **71d** (0,110 g, 0,28 mmol, 52%) de acordo com os seus dados físicos e espectroscópicos.

(E)-N-(3-clorofenil)-8-(2-(4-fluorobenzilideno)hidrazinil)pirimido[5,4-d]pirimidin-4-amina **71e**



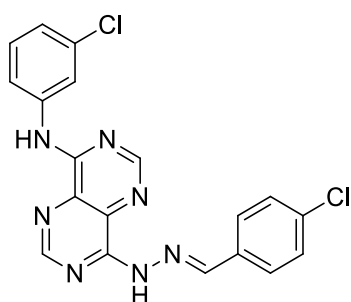
A: 67f (0,18 g; 0,62 mmol); 1 mL de DMSO; 1,2 eq. de 4-fluorobenzaldeído **68e**; H₂SO₄ (cat.); 30°C durante 2h. O produto foi precipitado por adição 5 mL de H₂O e isolado por filtração. O sólido laranja vivo foi lavado com H₂O e identificado como **71e** (0,23 g, 0,59 mmol, 95%) de acordo com os seus dados físicos e espectroscópicos.

(E)-8-(2-(3-clorobenzilideno)hidrazinil)-N-(3-clorofenil)pirimido[5,4-d]pirimidin-4-amina **71f**



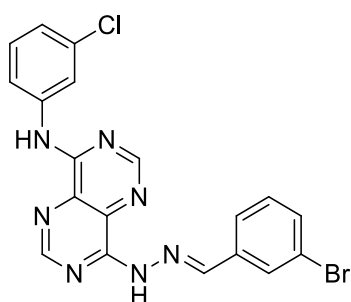
B: 65f (0,21 g; 0,74 mmol); 0,2 mL de DMSO; 1,5 eq. de 3-clorobenzaldeído **68f**; durante 30 min; 2,0 eq. de piperina; 80°C durante 30 min. O produto foi precipitado por adição de 5 mL de CH₃CN e isolado por filtração. O sólido amarelo foi lavado com CH₃CN e Et₂O e identificado como **71f** (0,24 g, 0,58 mmol, 78%) de acordo com os seus dados físicos e espectroscópicos.

(E)-8-(2-(4-clorobenzilideno)hidrazinil)-N-(3-clorofenil)pirimido[5,4-d]pirimidin-4-amina **71g**



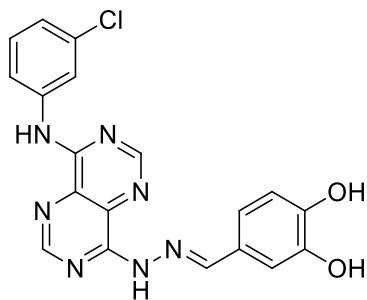
B: 65f (0,19 g; 0,67 mmol); 0,2 mL de DMSO; 1,5 eq. de 4-clorobenzaldeído **68g**; durante 30 min; 2,0 eq. de piperina; 80°C durante 30 min. O produto foi precipitado por adição de 5 mL de CH₃CN e isolado por filtração. O sólido amarelo foi lavado com CH₃CN e Et₂O e identificado como **71g** (0,21 g, 0,51 mmol, 77%) de acordo com os seus dados físicos e espectroscópicos.

(E)-N-(3-clorofenil)-8-(2-(4-fluorobenzilideno)hidrazinil)pirimido[5,4-d]pirimidin-4-amina **71h**



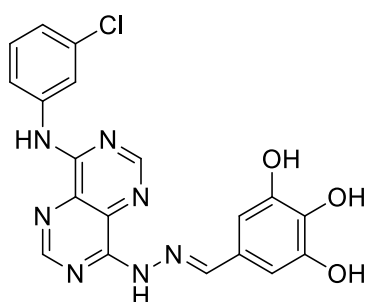
A: 67f (0,15 g; 0,52 mmol); 2 mL de DMSO; 1,5 eq. de 3-bromobenzaldeído **68h**; H₂SO₄ (cat.); 30°C durante 2h. O produto foi precipitado por adição 5 mL de H₂O e isolado por filtração. O sólido laranja vivo foi lavado com H₂O e identificado como **71h** (0,25 g, 0,52 mmol, 99%) de acordo com os seus dados físicos e espectroscópicos.

(E)-4-((2-(8-((3-clorofenil)amino)pirimido[5,4-d]pirimidin-4-il)hidrazono)metil)benzeno-1,2-diol **71k**



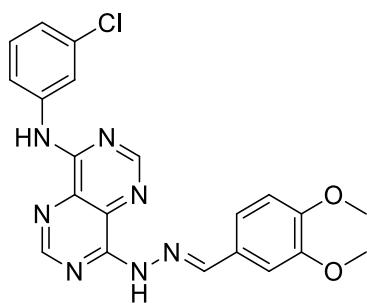
B: 65f (0,21 g; 0,72 mmol); 0,2 mL de DMSO; 1,5 eq. de 3,4-dihidroxibenzaldeído **68k**; durante 30 min; 2,0 eq. de piperina; 80°C durante 10 min. O produto foi precipitado por adição de 5 mL de CH₃CN e isolado por filtração. O sólido amarelo foi lavado com H₂O e identificado como **71k** (0,23 g, 0,56 mmol, 77%) de acordo com os seus dados físicos e espectroscópicos.

(E)-5-((2-(8-((3-clorofenil)amino)pirimido[5,4-d]pirimidin-4-il)hidrazono)metil)benzeno-1,2,3-triol **71l**



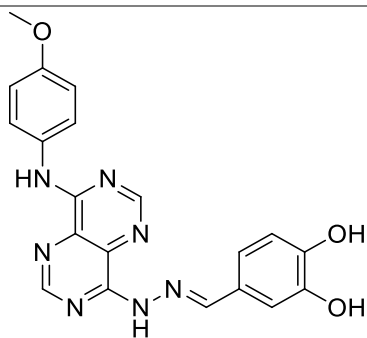
A: 67f (0,18 g; 0,64 mmol); 2 mL de DMSO; 1,05 eq. de 3,4,5-trihidroxibenzaldeído **68l**; H₂SO₄ (cat.); 30°C durante 26 min. O produto foi precipitado por adição 10 mL de H₂O e isolado por filtração. O sólido laranja foi lavado com H₂O e identificado como **71l** (0,24 g, 0,56 mmol, 88%) de acordo com os seus dados físicos e espectroscópicos.

(E)-N-(3-clorofenil)-8-(2-(3,4-dimetoxibenzilideno)hidrazinil)pirimido[5,4-d]pirimidin-4-amina **71o**



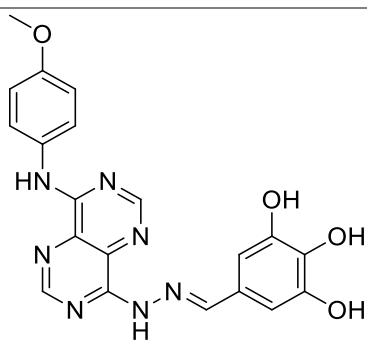
B: 65f (0,18 g; 0,63 mmol); 0,2 mL de DMSO; 1,5 eq. de 3,4-dimetoxibenzaldeído **68o**; durante 30 min; 2,0 eq. de piperina; 80°C durante 30 min. O produto foi precipitado por adição de 5 mL de CH₃CN e isolado por filtração. O sólido amarelo foi lavado com H₂O e Et₂O e identificado como **71o** (0,254 g, 0,585 mmol, 92%) de acordo com os seus dados físicos e espectroscópicos.

(E)-4-((2-(8-((4-metoxifenil)amino)pirimido[5,4-d]pirimidin-4-il)hidrazono)metil)benzeno-1,2-diol **72k**



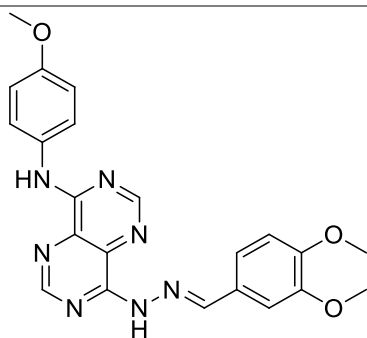
A: 67d (0,20 g; 0,67 mmol); 2 mL de DMSO; 1,1 eq. de 3,4-dihidroxibenzaldeído **68k**; H₂SO₄ (cat.); durante 1 h. O produto foi precipitado por adição 10 mL de H₂O e isolado por filtração. O sólido laranja foi lavado com H₂O dando o produto **72k** puro (0,27 g, 0,67 mmol, 99%) confirmado por métodos físicos e espectroscópicos.

(E)-5-((2-(8-((4-metoxifenil)amino)pirimido[5,4-d]pirimidin-4-il)hidrazono)metil)benzeno-1,2,3-triol **72i**



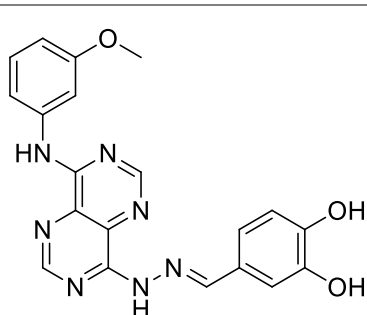
A: **67d** (0,22 g; 0,75 mmol); 2 mL de DMSO; 1,1 eq. de 3,4,5-trihidroxibenzaldeído **68i**; H₂SO₄ (cat.); 30°C durante 1 h. O produto foi precipitado por adição 10 mL de H₂O e isolado por filtração. O sólido laranja avermelhado foi lavado com H₂O e identificado como **72i** (0,317 g, 0,75 mmol, 99%) de acordo com os seus dados físicos e espectroscópicos.

(E)-8-(2-(3,4-dimetoxibenzilideno)hidrazinil)-N-(4-metoxifenil)pirimido[5,4-d]pirimidin-4-amina **72o**



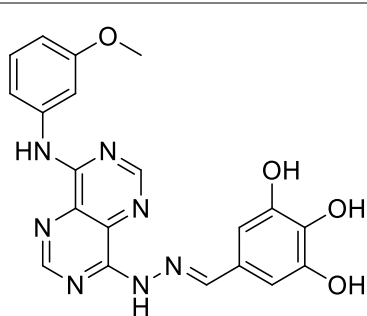
A: **67d** (0,18 g; 0,64 mmol); 2 mL de DMSO; 1,2 eq. de 3,4-dimetoxibenzaldeído **68o**; H₂SO₄ (cat.); 30°C durante 2 h. O produto foi precipitado por adição 10 mL de H₂O e isolado por filtração. O sólido laranja foi lavado com H₂O e identificado como **72o** (0,27 g, 0,63 mmol, 99%) de acordo com os seus dados físicos e espectroscópicos.

(E)-4-((2-(8-((3-metoxifenil)amino)pirimido[5,4-d]pirimidin-4-il)hidrazono)metil)benzeno-1,2-diol **73k**



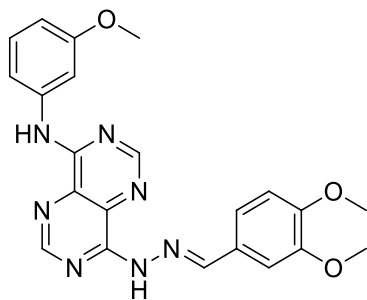
A: **67c** (0,20 g; 0,68 mmol); 0,5 mL de DMSO; 1,02 eq. de 3,4-dihidroxibenzaldeído **68k**; H₂SO₄ (cat.); 30°C durante 1 h e 20 min. O produto foi precipitado por adição 10 mL de H₂O e isolado por filtração. O sólido laranja foi lavado com H₂O e identificado como **73k** (0,28 g, 0,67 mmol, 99%) de acordo com os seus dados físicos e espectroscópicos.

(E)-5-((2-(8-((3-metoxifenil)amino)pirimido[5,4-d]pirimidin-4-il)hidrazono)metil)benzeno-1,2,3-triol **73i**



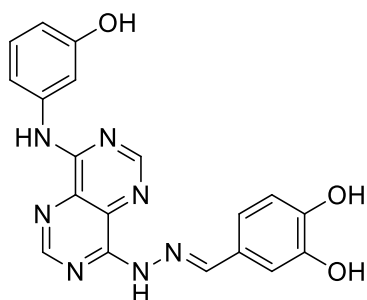
A: **67c** (0,14 g; 0,48 mmol); 1 mL de DMSO; 1,1 eq. de 3,4,5-trihidroxibenzaldeído **68i**; H₂SO₄ (cat.); 30°C durante 1 h. O produto foi precipitado por adição 10 mL de H₂O e isolado por filtração. O sólido laranja avermelhado foi lavado com H₂O e identificado como **73i** (0,20 g, 0,48 mmol, 99%) de acordo com os seus dados físicos e espectroscópicos.

(E)-8-(2-(3,4-dimetoxibenzilideno)hidrazinil)pirimido[5,4-d]pirimidin-4-amina **73o**



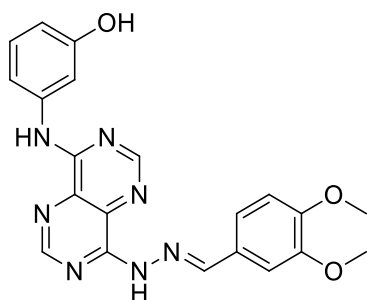
B: 65c (0,16 g; 0,57 mmol); 0,5 mL de DMSO; 1,02 eq. de 3,4-dimetoxibenzaldeído **68o**; durante 10 min. Adicionou-se 2,0 eq. de piperina; 80°C durante 35 min. O produto foi precipitado por adição de 2 mL de CH₃CN, 5 mL de H₂O e isolado por filtração. O sólido laranja claro foi lavado com H₂O e Et₂O e identificado como **73o** (0,15 g, 0,35 mmol, 61%) de acordo com os seus dados físicos e espectroscópicos.

(E)-4-((2-(8-((3-hidroxifenil)amino)pirimido[5,4-d]pirimidin-4-il)hidrazono)metil)benzeno-1,2-diol **74k**



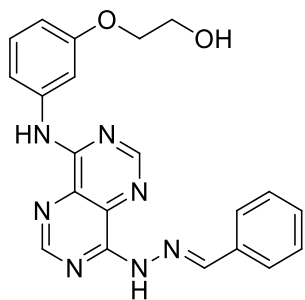
A: 67a (0,20 g; 0,76 mmol); 1 mL de DMSO; 1,02 eq. de 3,4-dihidroxibenzaldeído **68k**; H₂SO₄ (cat.); 30°C durante 1 h. O produto foi precipitado por adição 10 mL de H₂O e isolado por filtração. O sólido laranja avermelhado foi lavado com H₂O e identificado como **74k** (0,26 g, 0,68 mmol, 89%) de acordo com os seus dados físicos e espectroscópicos.

(E)-3-((8-(2-(3,4-dimetoxibenzilideno)hidrazinil)pirimido[5,4-d]pirimidin-4-il)amino)fenol **74o**



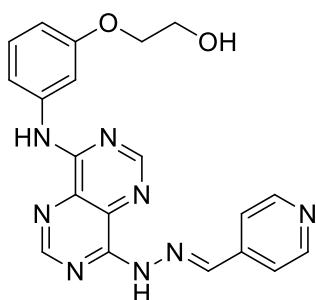
B: 65a (0,15 g; 0,56 mmol); 0,5 mL de DMSO; 1,02 eq. de 3,4-dimetoxibenzaldeído **68o**; durante 10 min. Adicionou-se 2,0 eq. de piperina; 80°C durante 1 h e 7 min. O produto foi precipitado por adição de 2 mL de CH₃CN, 5 mL de H₂O e isolado por filtração. O sólido laranja claro foi lavado com H₂O e Et₂O e identificado como **74o** (0,16 g, 0,39 mmol, 70%) de acordo com os seus dados físicos e espectroscópicos.

(E)-2-(3-((8-(2-benzilidenhidrazinil)pirimido[5,4-d]pirimidin-4-il)amino)fenoxi)etanol **75a**



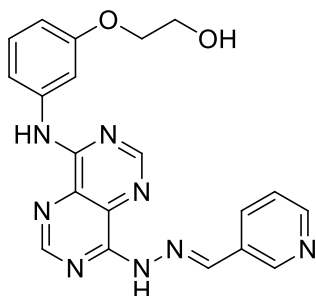
B: 65h (0,12 g; 0,40 mmol); 0,2 mL de DMSO; 1,5 eq. de benzaldeído **68a**; durante 10 min. Adicionou-se 2,0 eq. de piperina; 80°C durante 1 h e 10 min. O produto foi precipitado por adição de 2 mL de CH₃CN, 5 mL de H₂O e isolado por filtração. O sólido amarelo claro foi lavado com H₂O e Et₂O e identificado como **75a** (0,16 g, 0,40 mmol, 99%) de acordo com os seus dados físicos e espectroscópicos.

(E)-2-(3-((8-(2-(piridino-4-ilmetileno)hidrazinil)pirimido[5,4-d]pirimidin-4-il)amino)fenoxi)etanol **75b**



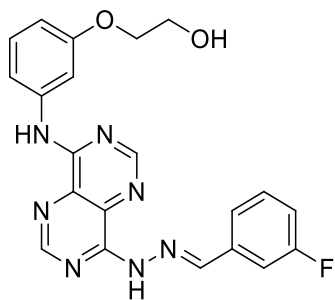
B: 65h (0,16 g; 0,52 mmol); 0,2 mL de DMSO; 1,5 eq. de 4-piridinocarboxaldeído **68b**; durante 10 min. Adicionou-se 2,0 eq. de piperina; 80°C durante 1 h e 13 min. O produto foi precipitado por adição de 2 mL de CH₃CN, 5 mL de H₂O e isolado por filtração. O sólido laranja claro foi lavado com H₂O e Et₂O e identificado como **75b** (0,18 g, 0,47 mmol, 90%) de acordo com os seus dados físicos e espectroscópicos.

(E)-2-(3-((8-(2-(piridino-3-ilmetileno)hidrazinil)pirimido[5,4-d]pirimidin-4-il)amino)fenoxi)etanol **75c**



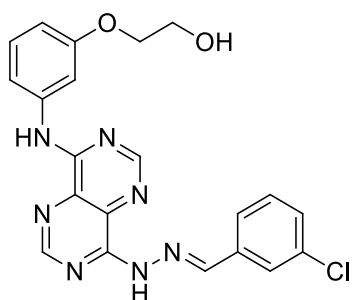
B: 65h (0,22 g; 0,69 mmol); 0,5 mL de DMSO; 1,5 eq. de 3-piridinocarboxaldeído **68c**; durante 10 min. Adicionou-se 2,0 eq. de piperina; 80°C durante 1 h e 20 min. O produto foi precipitado por adição de 5 mL de CH₃CN, 10 mL de H₂O e isolado por filtração. O sólido amarelo claro foi lavado com H₂O e Et₂O e identificado como **75c** (0,16 g, 0,47 mmol, 59%) de acordo com os seus dados físicos e espectroscópicos.

(E)-2-(3-((8-(2-(3-fluorobenzilideno)hidrazinil)pirimido[5,4-d]pirimidin-4-il)amino)fenoxi)etanol **75d**



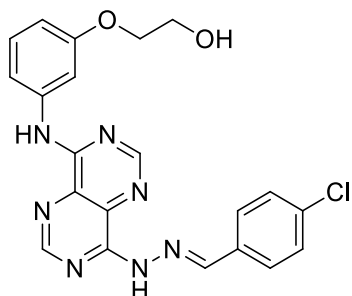
B: **65h** (0,18 g; 0,56 mmol); 0,5 mL de DMSO; 1,5 eq. de 3-fluorobenzaldeído **68d**; durante 10 min. Adicionou-se 2,0 eq. de piperina; 80°C durante 40 min. O produto foi precipitado por adição de 5 mL de CH₃CN e isolado por filtração. O sólido amarelo claro foi lavado com H₂O, CH₃CN e Et₂O e identificado como **75d** (0,16 g, 0,39 mmol, 70%) de acordo com os seus dados físicos e espectroscópicos.

(E)-2-(3-((8-(2-(3-clorobenzilideno)hidrazinil)pirimido[5,4-d]pirimidin-4-il)amino)fenoxi)etanol **75f**



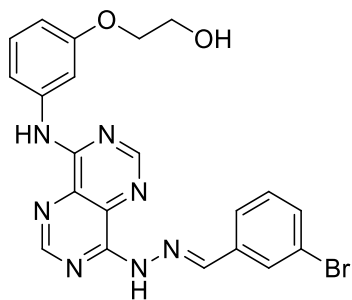
B: **65i** (0,193 g; 0,616 mmol); 0,5 mL de DMSO; 1,5 eq. de 3-clorobenzaldeído **68f**; durante 10 min. Adicionou-se 2,0 eq. de piperina; 80°C durante 1 h e 30 min. O produto foi precipitado por adição de 10 mL de CH₃CN, 5 mL de H₂O e isolado por filtração. O sólido amarelo claro foi lavado com H₂O e Et₂O e identificado como **75f** (0,22 g, 0,51 mmol, 83%) de acordo com os seus dados físicos e espectroscópicos.

(E)-2-(3-((8-(2-(4-clorobenzilideno)hidrazinil)pirimido[5,4-d]pirimidin-4-il)amino)fenoxi)etanol **75g**



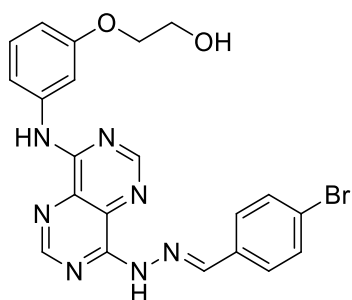
B: **65h** (0,09 g; 0,28 mmol); 0,2 mL de DMSO; 1,5 eq. de 4-clorobenzaldeído **68g**; durante 10 min. Adicionou-se 2,0 eq. de piperina; 80°C durante 1 h e 5 min. O produto foi precipitado por adição de 5 mL de CH₃CN, 5 mL de H₂O e isolado por filtração. O sólido amarelo claro foi lavado com H₂O e Et₂O e identificado como **75g** (0,09 g, 0,20 mmol, 73%) de acordo com os seus dados físicos e espectroscópicos.

(E)-2-(3-((8-(2-(3-bromobenzilideno)hidrazinil)pirimido[5,4-d]pirimidin-4-il)amino)fenoxy)etanol **75h**



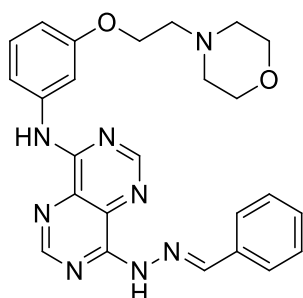
B: **65h** (0,17 g; 0,54 mmol); 0,5 mL de DMSO; 1,5 eq. de 3-bromobenzaldeído **68h**; durante 10 min. Adicionou-se 2,0 eq. de piperina; 80°C durante 30 min. O produto foi precipitado por adição de 5 mL de CH₃CN, 5 mL de H₂O e isolado por filtração. O sólido bege amarelado foi lavado com H₂O e Et₂O e identificado como **75h** (0,18 g, 0,38 mmol, 71%) de acordo com os seus dados físicos e espectroscópicos.

(E)-2-(3-((8-(2-(4-bromobenzilideno)hidrazinil)pirimido[5,4-d]pirimidin-4-il)amino)fenoxy)etanol **75i**



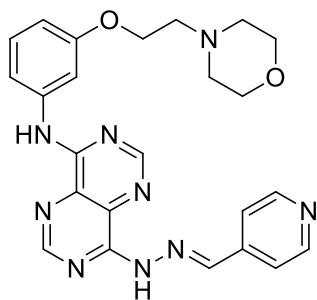
B: **65h** (0,15 g; 0,49 mmol); 0,5 mL de DMSO; 1,5 eq. de 4-clorobenzaldeído **68i**; durante 10 min. Adicionou-se 2,0 eq. de piperina; 80°C durante 1h. O produto foi precipitado por adição de 5 mL de CH₃CN, 5 mL de H₂O e isolado por filtração. O sólido amarelo claro foi lavado com H₂O e Et₂O e identificado como **75i** (0,18 g, 0,38 mmol, 77%) de acordo com os seus dados físicos e espectroscópicos.

(E)-8-(2-benzilidenohidrazinil)-N-(3-(2-morfolinoetoxi)fenil)pirimido[5,4-d]pirimidin-4-amina **76a**



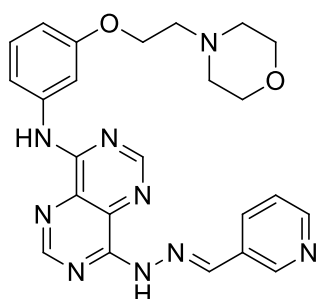
B: **65j** (0,10 g; 0,26 mmol); 0,2 mL de DMSO; 1,5 eq. de benzaldeído **68a**; durante 10 min. Adicionou-se 2,0 eq. de piperina; 80°C durante 1h e 40 min. O produto foi precipitado por adição de 1 mL de CH₃CN, 5 mL de H₂O e isolado por filtração. O sólido amarelo claro foi lavado com H₂O e Et₂O e identificado como **76a** (0,07 g, 0,14 mmol, 54%) de acordo com os seus dados físicos e espectroscópicos.

(E)-N-(3-(2-morfolinoetoxi)fenil)-8-(2-(piridin-4-ilmetileno)hidrazinil)pirimido[5,4-d]pirimidin-4-amina **76b**



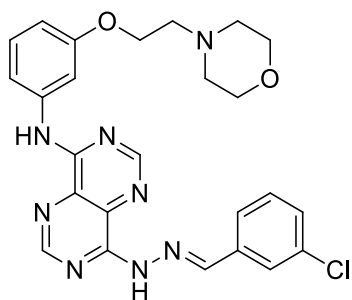
B: 65j (0,10 g; 0,26 mmol); 0,2 mL de DMSO; 1,5 eq. de 4-piridinacarboxaldeído **68b**; durante 10 min. Adicionou-se 2,0 eq. de piperina; 80°C durante 2 h. O produto foi precipitado por adição de 10 mL de H₂O e isolado por filtração. O sólido laranja claro foi lavado com H₂O e Et₂O e identificado como **76b** (0,08 g, 0,17 mmol, 65%) de acordo com os seus dados físicos e espetroscópicos.

(E)-N-(3-(2-morfolinoetoxi)fenil)-8-(2-(piridin-3-ilmetileno)hidrazinil)pirimido[5,4-d]pirimidin-4-amina **76c**



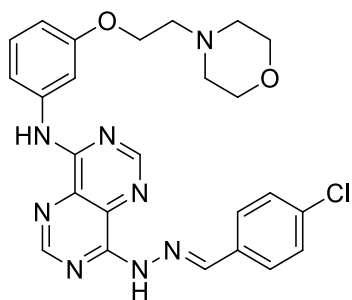
B: 65j (0,10 g; 0,26 mmol); 0,2 mL de DMSO; 1,5 eq. de 3-piridinacarboxaldeído **68c**; durante 10 min. Adicionou-se 2,0 eq. de piperina; 80°C durante 2 h. O produto foi precipitado por adição de 10 mL de CH₃CN e isolado por filtração. O sólido bege claro foi lavado com H₂O e Et₂O e identificado como **76c** (0,09 g, 0,18 mmol, 69%) de acordo com os seus dados físicos e espetroscópicos.

(E)-8-(2-(3-clorobenzilideno)hidrazinil)-N-(3-(2-morfolinoetoxi)fenil)pirimido[5,4-d]pirimidin-4-amina **76f**



B: 65j (0,09 g; 0,24 mmol); 0,2 mL de DMSO; 1,5 eq. de 3-clorobenzaldeído **68f**; durante 10 min. Adicionou-se 2,0 eq. de piperina; 80°C durante 1h. O produto foi precipitado por adição de 5 mL de CH₃CN e isolado por filtração. O sólido bege amarelado foi lavado com H₂O, Et₂O e identificado como **76f** (0,10 g, 0,19 mmol, 80%) de acordo com os seus dados físicos e espetroscópicos.

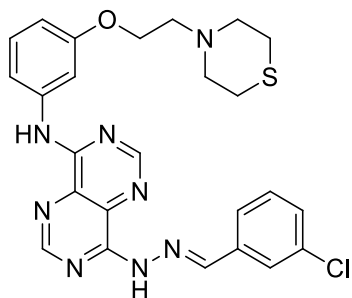
(E)-8-(2-(4-clorobenzilideno)hidrazinil)-N-(3-(2-morfolinoetoxi)fenil)pirimido[5,4-d]pirimidin-4-amina **76g**



B: 65j (0,09 g; 0,24 mmol); 0,2 mL de DMSO; 1,5 eq. de 4-clorobenzaldeído **68g**; durante 10 min. Adicionou-se 2,0 eq. de piperina; 80°C durante 2h. O produto foi precipitado por adição de 1 mL de CH₃CN e isolado por filtração. O sólido amarelo claro foi lavado com H₂O e Et₂O e identificado como **76g** (0,07 g, 0,13 mmol, 54%) de acordo com os seus dados físicos e espetroscópicos.

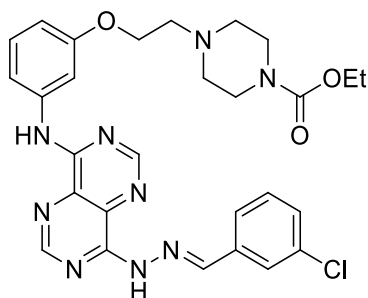
(E)-8-(2-(3-clorobenzilideno)hidrazinil)-N-(3-(2-tiomorfolinoetoxi)fenil)pirimido[5,4-d]pirimidin-4-amina

77f



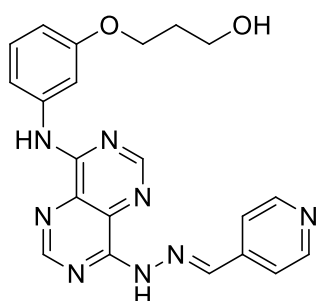
B: **65k** (0,16 g; 0,41 mmol); 0,4 mL de DMSO; 1,5 eq. de 3-clorobenzaldeído **68f**; durante 10 min. Adicionou-se 2,0 eq. de piperina; 80°C durante 1h. O produto foi precipitado por adição de 5 mL de CH₃CN e isolado por filtração. O sólido amarelo claro foi lavado com H₂O, CH₃CN e Et₂O e identificado como **77f** (0,19 g, 0,36 mmol, 87%) de acordo com os seus dados físicos e espectroscópicos.

(E)-ethyl-4-(2-(3-((8-(2-(3-clorobenzilideno)hidrazinil)pirimido[5,4-d]pirimidin-4-il)amino)fenoxi)etil)piperazina-1-carboxilato **78f**



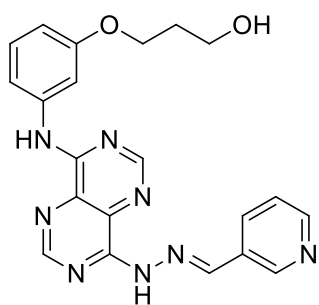
B: **65i** (0,12 g; 0,23 mmol); 0,5 mL de DMSO; 1,5 eq. de 3-clorobenzaldeído **68f**; durante 10 min. Adicionou-se 2,0 eq. de piperina; 80°C durante 40 min. O produto foi precipitado por adição de 5 mL de CH₃CN e isolado por filtração. O sólido amarelo claro foi lavado com H₂O, CH₃CN e Et₂O e identificado como **78f** (0,08 g, 0,14 mmol, 60%) de acordo com os seus dados físicos e espectroscópicos.

(E)-3-(3-((8-(2-(piridin-4-ilmetileno)hidrazinil)pirimido[5,4-d]pirimidin-4-il)amino)fenoxi)propan-1-ol **79b**



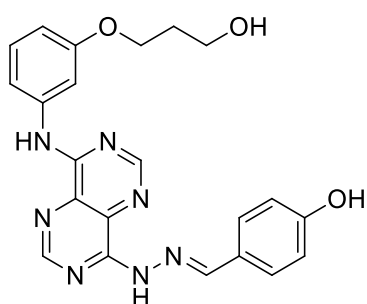
B: **65i** (0,22 g; 0,69 mmol); 0,5 mL de DMSO; 1,5 eq. de 4-piridinocarboxaldeído **68b**; durante 10 min. Adicionou-se 2,0 eq. de piperina; 80°C durante 3 h e 30 min. O produto foi precipitado por adição de 10 mL de H₂O e isolado por filtração. O sólido amarelo esverdeado foi lavado com H₂O e Et₂O e identificado como **79b** (0,13 g, 0,30 mmol, 44%) de acordo com os seus dados físicos e espectroscópicos.

(E)-3-(3-((8-(2-(piridin-3-ilmetileno)hidrazinil)pirimido[5,4-d]pirimidin-4-il)amino)fenoxi)propan-1-ol **79c**



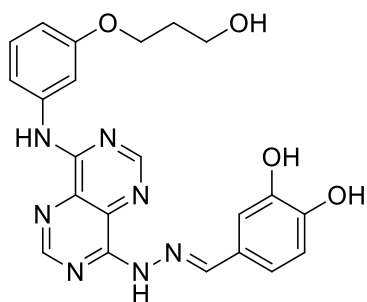
B: 65i (0,24 g; 0,75 mmol); 0,5 mL de DMSO; 1,5 eq. de 3-piridinocarboxaldeído **68c**; durante 10 min. Adicionou-se 2,0 eq. de piperina; 80°C durante 3 h e 30 min. O produto foi precipitado por adição de 10 mL de H₂O e isolado por filtração. O sólido amarelo foi lavado com H₂O e Et₂O e identificado como **79c** (0,18 g, 0,47 mmol, 90%) de acordo com os seus dados físicos e espetroscópicos.

(E)-4-((2-(8-((3-(3-hidroxipropoxi)fenil)amino)pirimido[5,4-d]pirimidin-4-il)hidrazono)metil)fenol **79j**



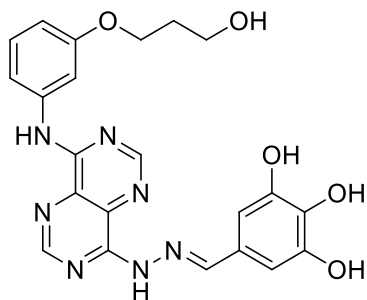
A: 67i (0,20 g; 0,61 mmol); 3 mL de EtOH; 1,02 eq. de 4-hidroxibenzaldeído **68j**; H₂SO₄ (cat.); 30°C durante 2 h e 30 min. O produto foi precipitado por adição 10 mL de H₂O e isolado por filtração. O sólido laranja foi lavado com H₂O e identificado como **79j** (0,19 g, 0,44 mmol, 72%) de acordo com os seus dados físicos e espetroscópicos.

(E)-4-((2-(8-((3-(3-hidroxipropoxi)fenil)amino)pirimido[5,4-d]pirimidin-4-il)hidrazono)metil)benzeno-1,2-diol **79k**



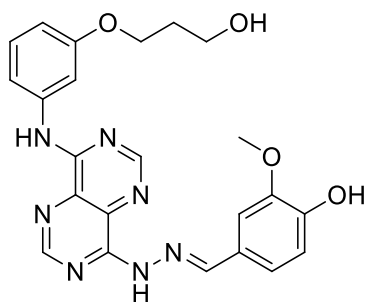
A: 67i (0,06 g; 0,18 mmol); 2 mL de EtOH; 1,2 eq. de 3,4-dihidroxibenzaldeído **68k**; H₂SO₄ (cat.); 30°C durante 1h. O produto foi precipitado por adição 10 mL de H₂O e isolado por filtração. O sólido laranja avermelhado foi lavado com H₂O e identificado como **79k** (0,08 g, 0,17 mmol, 96%) de acordo com os seus dados físicos e espetroscópicos.

(E)-5-((2-(8-((3-(3-hidroxiopropoxi)fenil)amino)pirimido[5,4-d]pirimidin-4-il)hidrazono)metil)benzeno-1,2,3-triol **79l**



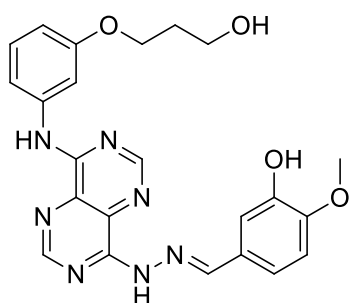
A: 67i (0,20 g; 0,61 mmol); 3 mL de EtOH; 1,02 eq. de 3,4,5-trihidroxi-benzaldeído **68l**; H₂SO₄ (cat.); 30°C durante 1 h e 17 min. O produto foi precipitado por adição 10 mL de H₂O e isolado por filtração. O sólido laranja avermelhado foi lavado com H₂O e identificado como **79l** (0,28 g, 0,61 mmol, 99%) de acordo com os seus dados físicos e espectroscópicos.

(E)-4-((2-(8-((3-(3-hidroxiopropoxi)fenil)amino)pirimido[5,4-d]pirimidin-4-il)hidrazono)metil)-2-metoxifenol **79m**



A: 67i (0,15 g; 0,46 mmol); 3 mL de EtOH; 1,2 eq. de 4-hidroxi-3-metoxibenzaldeído **68m**; H₂SO₄ (cat.); 30°C durante 30 min. O produto foi precipitado por adição 10 mL de H₂O e isolado por filtração. O sólido laranja avermelhado foi lavado com H₂O e identificado como **79m** (0,2 g, 0,43 mmol, 95%) de acordo com os seus dados físicos e espectroscópicos.

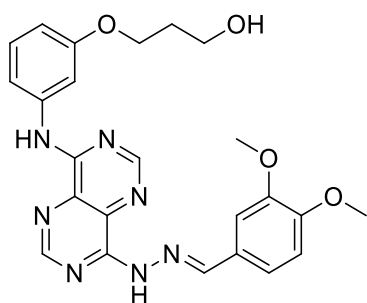
(E)-5-((2-(8-((3-(3-hidroxiopropoxi)fenil)amino)pirimido[5,4-d]pirimidin-4-il)hidrazono)metil)-2-metoxifenol **79n**



B: 65i (0,250 g; 0,760 mmol); 3 mL de EtOH; 1,3 eq. de 3-hidroxi-4-metoxibenzaldeído **68n**; durante 10 min. Adicionou-se 2,0 eq. de piperina; 80°C durante 3 h e 40 min. O produto foi isolado por filtração. O sólido amarelo claro foi lavado com H₂O e Et₂O e identificado como **78f** (0,08 g, 0,180 mmol, 24%) de acordo com os seus dados físicos e espectroscópicos.

(E)-3-(3-((8-(2-(3,4-dimetoxibenzilideno)hidrazinil)pirimido[5,4-d]pirimidin-4-il)amino)fenoxi)propan-1-ol

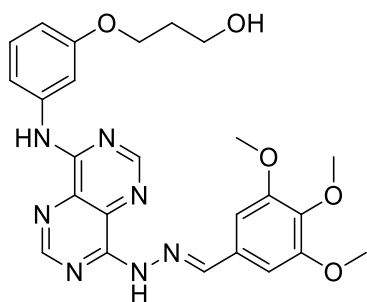
79o



A: 67i (0,20 g; 0,61 mmol); 5 mL de EtOH; 1,02 eq. de 3,4-dimetoxibenzaldeído **68o**; H₂SO₄ (cat.); 25°C durante 1 h e 30 min. O produto foi precipitado por adição 10 mL de H₂O e isolado por filtração. O sólido laranja foi lavado com H₂O e identificado como **79o** (0,29 g, 0,61 mmol, 99%) de acordo com os seus dados físicos e espectroscópicos.

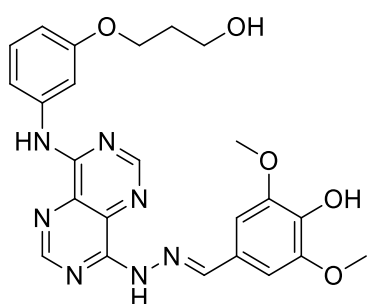
(E)-3-(3-((8-(2-(3,4,5-trimetoxibenzilideno)hidrazinil)pirimido[5,4-d]pirimidin-4-il)amino)fenoxi)propan-1-

ol **79p**



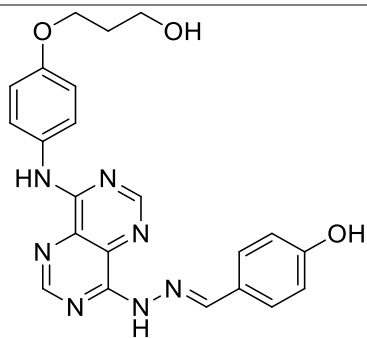
A: 67i (0,15 g; 0,46 mmol); 3 mL de EtOH; 1,2 eq. de 3,4,5-trimetoxibenzaldeído **68p**; H₂SO₄ (cat.); 30°C durante 42 min. O produto foi precipitado por adição 10 mL de H₂O e isolado por filtração. O sólido laranja claro foi lavado com H₂O e identificado como **79p** (0,23 g, 0,45 mmol, 99%) de acordo com os seus dados físicos e espectroscópicos.

(E)-4-((2-(8-((3-(3-hidroxiopropoxi)fenil)amino)pirimido[5,4-d]pirimidin-4-il)hidrazono)metil)-2,6-dimetoxifenol **79q**



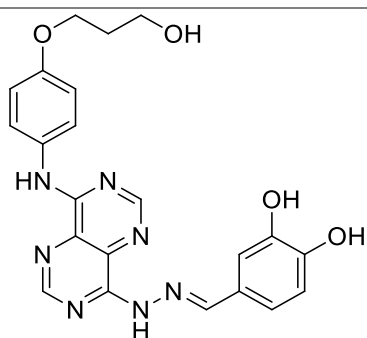
A: 67i (0,15 g; 0,46 mmol); 5 mL de EtOH; 1,2 eq. de 3,5-dimetoxi-4-hidroxi-benzaldeído **68q**; H₂SO₄ (cat.); 30°C durante 42 min. O produto foi precipitado por adição 10 mL de H₂O e isolado por filtração. O sólido laranja claro foi lavado com H₂O e identificado como **79q** (0,20 g, 0,40 mmol, 88%) de acordo com os seus dados físicos e espectroscópicos.

(E)-4-((2-(8-((4-(3-hidroxiopropoxi)fenil)amino)pirimido[5,4-d]pirimidin-4-il)hidrazono)metil)fenol **80j**



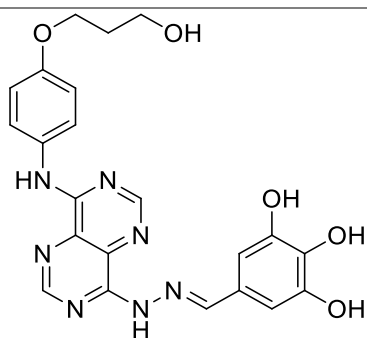
A: 67m (0,20 g; 0,60 mmol); 0,5 mL de DMSO; 1,02 eq. de 4-hidroxi-benzaldeído **68j**; H₂SO₄ (cat.); 30°C durante 21 min. O produto foi precipitado por adição 10 mL de H₂O e isolado por filtração. O sólido laranja foi lavado com H₂O e identificado como **80j** (0,19 g, 0,45 mmol, 76%) de acordo com os seus dados físicos e espectroscópicos.

(E)-4-((2-(8-((4-(3-hidroxiopropoxi)fenil)amino)pirimido[5,4-d]pirimidin-4-il)hidrazono)metil)benzeno-1,2-diol **80k**



A: 67m (0,19 g; 0,59 mmol); 0,5 mL de DMSO; 1,02 eq. de 3,4-dihidroxi-benzaldeído **68k**; H₂SO₄ (cat.); 30°C durante 10 min. O produto foi precipitado por adição 10 mL de H₂O e isolado por filtração. O sólido laranja claro foi lavado com H₂O e identificado como **80k** (0,23 g, 0,50 mmol, 86%) de acordo com os seus dados físicos e espectroscópicos.

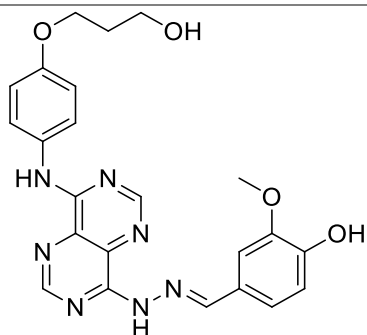
(E)-5-((2-(8-((4-(3-hidroxiopropoxi)fenil)amino)pirimido[5,4-d]pirimidino-4-il)hidrazono)metil)benzeno-1,2,3-triol **80l**



A: 67m (0,16 g; 0,50 mmol); 0,5 mL de DMSO; 1,02 eq. de 3,4,5-trihidroxi-benzaldeído **68l**; H₂SO₄ (cat.); 25°C durante 40 min. O produto foi precipitado por adição 10 mL de H₂O e isolado por filtração. O sólido laranja foi lavado com H₂O e identificado como **80l** (0,20 g, 0,42 mmol, 85%) de acordo com os seus dados físicos e espectroscópicos.

(E)-4-((2-(8-((4-(3-hidroxiopropoxi)fenil)amino)pirimido[5,4-d]pirimidin-4-il)hidrazono)metil)-2-metoxifenol

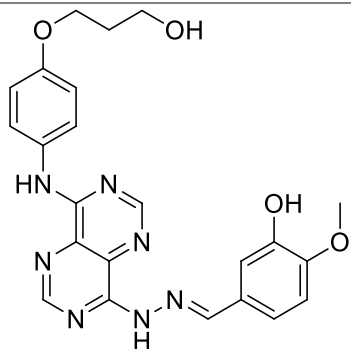
80m



A: 67m (0,06 g; 0,12 mmol); 2 mL de EtOH; 1,2 eq. de 3-hidroxi-4-metoxibenzaldeído **68m**; H₂SO₄ (cat.); 30°C durante 1 h. O produto foi precipitado por adição 10 mL de H₂O e isolado por filtração. O sólido laranja claro foi lavado com H₂O e identificado como **80m** (0,08 g, 0,17 mmol, 93%) de acordo com os seus dados físicos e espectroscópicos.

(E)-5-((2-(8-((4-(3-hidroxiopropoxi)fenil)amino)pirimido[5,4-d]pirimidin-4-il)hidrazono)metil)-2-metoxifenol

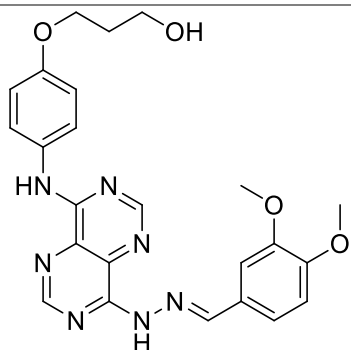
80n



A: 67m (0,20 g; 0,61 mmol); 2 mL de DMSO; 1,2 eq. de 3,4-dimetoxibenzaldeído **68n**; H₂SO₄ (cat.); 30°C durante 50 min. O produto foi precipitado por adição 5 mL de H₂O e isolado por filtração. O sólido laranja claro foi lavado com H₂O e identificado como **80n** (0,08 g, 0,17 mmol, 28%) de acordo com os seus dados físicos e espectroscópicos.

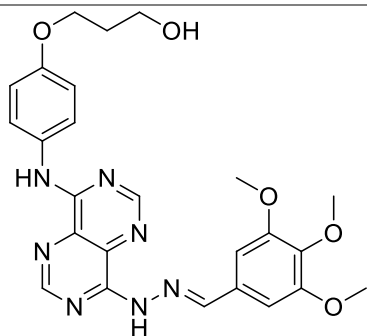
(E)-3-(4-((8-(2-(3,4-dimetoxibenzilideno)hidrazinil)pirimido[5,4-d]pirimidin-4-il)amino)fenoxi)propan-1-ol

80o



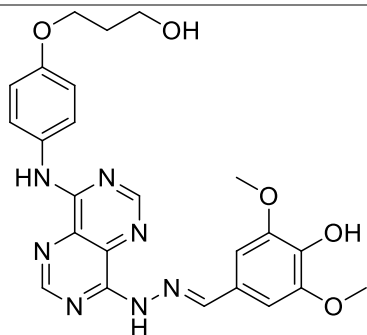
A: 67m (0,20 g; 0,61 mmol); 2 mL de DMSO; 1,2 eq. de 3,4-dimetoxibenzaldeído **68o**; H₂SO₄ (cat.); 30°C durante 40 min. O produto foi precipitado por adição 5 mL de H₂O e isolado por filtração. O sólido laranja claro foi lavado com H₂O e identificado como **80o** (0,09 g, 0,18 mmol, 30%) de acordo com os seus dados físicos e espectroscópicos.

(E)-3-(4-((8-(2-(3,4,5-trimetoxibenzilideno)hidrazinil)pirimido[5,4-d]pirimidin-4-il)amino)fenoxi)propan-1-ol **80p**



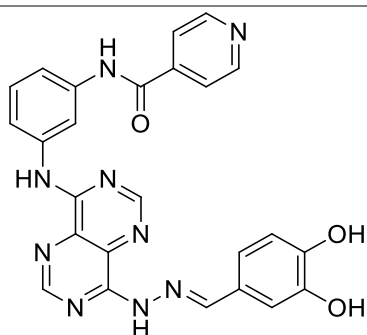
A: 67m (0,15 g; 0,46 mmol); 2 mL de EtOH; 1,2 eq. de 3,4,5-trimetoxibenzaldeído **68p**; H₂SO₄ (cat.); 25°C durante 30 min. O produto foi precipitado por adição 5 mL de H₂O e isolado por filtração. O sólido laranja claro foi lavado com H₂O e identificado como **80p** (0,15 g, 0,30 mmol, 66%) de acordo com os seus dados físicos e espectroscópicos.

(E)-4-((2-(8-((4-(3-hidroxipropoxi)fenil)amino)pirimido[5,4-d]pirimidin-4-il)hidrazono)metil)-2,6-dimetoxifenol **80q**



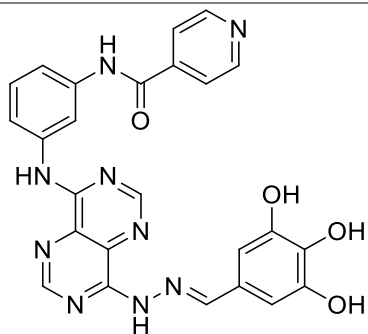
B: 65m (0,18 g; 0,56 mmol); 3 mL de EtOH; 1,2 Eq. de 3,5-dimetoxi-4-hidroxibenzaldeído **68q**; durante 10 min. Adicionou-se 2,0 eq. de piperina; 80°C durante 4 h e 30 min. O produto foi isolado por filtração. O sólido amarelo foi lavado com H₂O e Et₂O e identificado como **80q** (0,13 g, 0,28 mmol, 66%) de acordo com os seus dados físicos e espectroscópicos.

(E)-N-(3-((8-(2-(3,4-dihidroxibenzilideno)hidrazinil)pirimido[5,4-d]pirimidin-4-il)amino)fenil)isonicotinamida **81k**



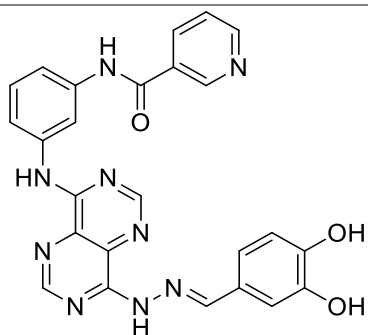
B: 65o (0,15 g; 0,39 mmol); 0,2 mL de DMSO; 1,2 eq. de 3,4-dihidroxibenzaldeído **68k**; durante 17 min. Adicionou-se 2,0 eq. de piperina; 80°C durante 20 min. O produto foi precipitado por adição de 5 mL de CH₃CN e isolado por filtração. O sólido amarelo foi lavado com H₂O e Et₂O e identificado como **81k** (0,15 g, 0,30 mmol, 76%) de acordo com os seus dados físicos e espectroscópicos.

(E)-N-(3-((8-(2-(3,4,5-trihidroxibenzilideno)hidrazinil)pirimido[5,4-d]pirimidin-4-il)amino)fenil)isonicotinamida **81l**



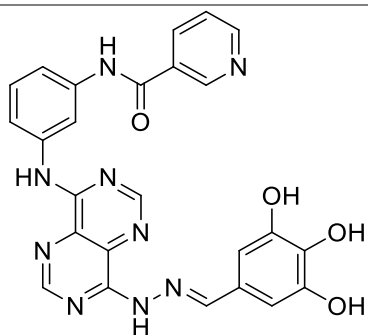
A: 67o (0,14 g; 0,38 mmol); 1 mL de DMSO; 1,02 eq. de 3,4,5-trihidroxibenzaldeído **68l**; H₂SO₄ (cat.); 30°C durante 30 min. O produto foi precipitado por adição 10 mL de H₂O e isolado por filtração. O sólido laranja claro foi lavado com H₂O e identificado como **81l** (0,19 g, 0,37 mmol, 97%) de acordo com os seus dados físicos e espectroscópicos.

(E)-N-(3-((8-(2-(3,4-dihidroxibenzilideno)hidrazinil)pirimido[5,4-d]pirimidin-4-il)amino)fenil)nicotinamida **82k**



A: 67p (0,17 g; 0,45 mmol); 2 mL de DMSO; 1,05 eq. de 3,4-dihidroxibenzaldeído **68k**; H₂SO₄ (cat.); 30°C durante 30 min. O produto foi precipitado por adição 10 mL de H₂O e isolado por filtração. O sólido laranja claro foi lavado com H₂O e identificado como **82k** (0,21 g, 0,43 mmol, 96%) de acordo com os seus dados físicos e espectroscópicos.

(E)-N-(3-((8-(2-(3,4,5-trihidroxibenzilideno)hidrazinil)pirimido[5,4-d]pirimidin-4-il)amino)fenil)nicotinamida **82l**



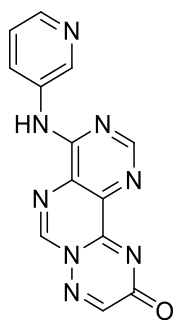
A: 67p (0,15 g; 0,39 mmol); 2 mL de DMSO; 1,05 eq. de 3,4,5-trihidroxibenzaldeído **68l**; H₂SO₄ (cat.); 30°C durante 30 min. O produto foi precipitado por adição 10 mL de H₂O e isolado por filtração. O sólido laranja claro foi lavado com H₂O e identificado como **82l** (0,20 g, 0,39 mmol, 99%) de acordo com os seus dados físicos e espectroscópicos.

5.1.7. Triazinopirimidopirimidinas **84**

Procedimento Geral

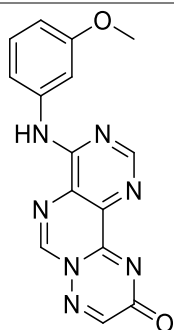
A uma suspensão de **65** no(s) solvente(s) indicados adicionou-se 2 eq. de **62**. Lentamente, adicionou-se 10 eq. de ácido acético (CH₃COOH) e deixou-se a mistura sob agitação a 45°C. Quando o TLC mostrou a ausência de reagente de partida o produto **84** foi isolado por filtração e lavado com o(s) solvente(s) indicado(s).

4-(piridin-3-ilamino)-10H-pirimido[5',4':4,5]pirimido[1,6-b][1,2,4]triazin-10-ona **84g**



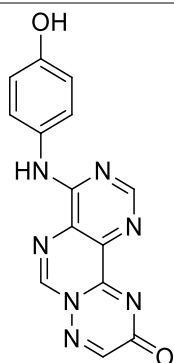
65g (0,18 g; 0,69 mmol); 2 mL de DMSO/EtOH (1:1); 2,0 eq. de etil 2-oxoacetato **62c**; CH₃COOH (10 eq.); 40°C durante 2h. O produto foi precipitado por adição 1 mL de CH₃CN e isolado por filtração. O sólido verde foi lavado com CH₃CN, H₂O e Et₂O e identificado como **84g** (0,17 g, 0,57 mmol, 83%) de acordo com os seus dados físicos e espectroscópicos.

4-((3-metoxifenil)amino)-10H-pirimido[5',4':4,5]pirimido[1,6-b][1,2,4]triazin-10-ona **84c**



65c (0,06 g; 0,20 mmol); 5 mL de EtOH; 2,0 eq. de etil 2-oxoacetato **62c**; CH₃COOH (10 eq.); 40°C durante 4h. O produto foi isolado por filtração. O sólido verde foi lavado com H₂O e Et₂O e identificado como **84c** (0,03 g, 0,09 mmol, 47%) de acordo com os seus dados físicos e espectroscópicos.

4-((4-hidroxifenil)amino)-10H-pirimido[5',4':4,5]pirimido[1,6-b][1,2,4]triazin-10-ona **84b**



65b (0,17 g; 0,64 mmol); 2 mL de DMSO/EtOH (1:1); 2,0 eq. de etil 2-oxoacetato **62c**; CH₃COOH (10 eq.); 40°C durante 2h. O produto foi precipitado por adição 5 mL de H₂O e isolado por filtração. O sólido verde foi lavado com CH₃CN, H₂O e Et₂O e identificado como **84b** (0,11 g, 0,26 mmol, 57%) de acordo com os seus dados físicos e espectroscópicos.

5.2. Avaliação biológica

5.2.1. Ensaios de rastreio de moléculas em *L. infantum* (promastigotas) e *T. brucei*

Este protocolo descreve um ensaio não automatizado de viabilidade parasitária baseada num processo de fluorescência [63,64]. O objetivo do ensaio é determinar a atividade antiparasitária de compostos químicos contra as formas promastigotas de *L. infantum* ou formas sanguíneas de *T. brucei*. Os dados de viabilidade são obtidos por medição da fluorescência da resorufina (metabolito da rezasurina) em parasitas metabolicamente ativos.

Ensaio de viabilidade de formas promastigotas *L. infantum* ou formas sanguíneas de *T. brucei*

Os compostos são avaliados com base na viabilidade parasitária após 3 dias de exposição medida por fluorescência, resultado da metabolização mitocondrial da rezasurina.

Em primeiro lugar, a uma placa de 96 poços adicionou-se 100 µL do(s) composto(s) de interesse no dobro da concentração final desejada em Schneider e HMI-9, dependendo o parasita usado, cuja concentração final de DMSO dentro do poço não deverá exceder 0,5%. Para os controlos positivos de 100% de atividade antiparasitária usou-se Miltefosina (25 µM) ou Pentamidina (1nM), para *L. infantum* e *T. brucei*, respetivamente.

De seguida, preparou-se uma suspensão de formas promastigotas de *L. infantum* (10⁶ células/mL) ou formas sanguíneas de *T. brucei* (10⁴ células/mL) em Schneider e HMI-9, respetivamente e adicionou-se 100 µL da suspensão a cada poço da placa já com os compostos. Para *T. brucei* incubou-se a placa por 72 horas a 37°C, 5% CO₂. Enquanto que, para *L. infantum* a placa foi selada com parafilme e deixada a incubar 72h a 27°C.

Revelação do ensaio

Para a revelação do ensaio adicionou-se 20 µL de uma solução de rezasurina em HMI-9 ou Schneider para uma concentração final no poço de 45,5 µM. Para *T. brucei*, deixou-se incubar por 4 h a 37°C, 5% CO₂. Para *L. infantum*, a placa foi novamente selada com parafilme e deixada a incubar 4h a 27°C.

Após o tempo de incubação transferiu-se 190 µL do conteúdo de cada poço para uma placa preta de 96 poços de fundo transparente e leu-se a placa no Synergy 2 (Biotek). A leitura é efetuada no modo “endpoint” em comprimento de onda de excitação e emissão a 544 e 590 nm, respetivamente.

Para o cálculo da atividade é determinada a média dos valores dos controlos positivos (EC₁₀₀ da Miltefosina ou Pentamidina) (Mean Pos), a média dos valores dos controlos negativos (Mean Neg) e por

fim a % atividade antiparasitária é calculada de acordo com a fórmula seguinte:

$$\% \text{ Atividade antiparasitária} = [1 - ((\text{Test Value} - \text{Mean Pos}) / (\text{Mean Neg} - \text{Mean Pos}))] \times 100$$

Validação dos resultados - Curva Dose-resposta IC₅₀ (DRC)

Com os dados obtidos, a extrapolação dos IC₅₀ das diferentes moléculas foi feita a partir do GraphPad Prism 8. Assim, são traçadas as respetivas curvas de dose resposta (DRC) de acordo com o modelo logístico de 4 parâmetros. Neste, a atividade é dada pelo y, x é a concentração correspondente e caso se justifique certos outliers podem ser removidos para ajuste da DRC.

A equação correspondente para este modelo é:

$$y = bot + \frac{(top - bot)}{1 + (x/IC_{50})^{slope}}$$

5.2.2. Ensaios de citotoxicidade em macrófagos da linha celular THP1

Este protocolo descreve um ensaio não automatizado de viabilidade celular. O objetivo do ensaio é determinar a citotoxicidade de compostos químicos em macrófagos da linha celular THP1 [63,64]. Os dados de viabilidade são obtidos usando valores de absorção de um metabolito do MTT (formazan) quando as células estão metabolicamente ativas.

Ensaio de citotoxicidade em macrófagos da linha celular THP1

Os compostos são avaliados com base na viabilidade celular após 3 dias de exposição medida por absorção de um metabolito do MTT, resultado da sua redução mitocondrial.

Em primeiro lugar, é necessário semear e diferenciar as células (THP1). Para isso, preparou-se uma suspensão de monócitos THP1 em RPMIc e adicionou-se PMA (1:25000). Semeou-se as células a 1×10^5 células por poço para um volume final de 100 µL numa placa de 96 poços de fundo raso. Estas foram deixadas a diferenciar por 18h a 37°C, 5% CO₂. Após a diferenciação, renovou-se o meio de cultura substituindo-o com mais 100 µL RPMIc para remover totalmente o PMA e deixou-se as células nas mesmas condições. Ao fim de 24h removeu-se o meio e adicionou-se 100 µL do(s) composto(s) de interesse na concentração final desejada em RPMIc às células THP1. A concentração final de DMSO dentro do poço não deverá exceder 1%. Incubou-se a placa por 72 horas a 37°C, 5% CO₂.

Revelação do ensaio

Para a revelação do ensaio removeu-se o meio e adicionou-se 200 µL de uma solução de MTT (0,5

mg/mL) em RPMI base acabada de fazer. Esta solução é também adicionada a 4 poços sem células para funcionarem como brancos. A placa foi deixada a incubar 4h a 37°C, 5% CO₂. Após a incubação, removeu-se cuidadosamente 160 µL de cada poço e adicionou-se 160 µL de isopropanol. Tendo-se homogeneizado bem a placa esta foi lida no Synergy 2 (Biotek) a 570nm.

Para o cálculo da atividade é determinada a média dos valores dos controlos negativos (Mean Neg) e por fim a % de viabilidade é calculada de acordo com a fórmula seguinte usando os valores com os brancos subtraídos:

$$\% \text{ viabilidade} = \left[\frac{\text{Test Value}}{\text{Mean Neg}} \right] \times 100$$

5.2.3. Ensaio de rastreio de moléculas em amastigotas intramacrofágicos

Este protocolo descreve um ensaio não automatizado de viabilidade parasitária baseada num processo de luminescência [63,64]. O objetivo do ensaio é determinar a atividade antiparasitária de compostos químicos contra formas de amastigotas de *L. infantum* intramacrofágicos (principal causa de leishmaniose visceral). Os dados de viabilidade são obtidos usando valores de luminescência em bruto (contagens por minuto, C.P.M.) por leitura da radiação gerada quando a luciferina é monooxigenada pela enzima luciferase de parasitas metabolicamente ativos na presença Mg²⁺, ATP e O₂.

Limitações do ensaio

Este ensaio deteta compostos ativos contra as formas de amastigotas de *L. infantum*, porém não deteta nem mede a citotoxicidade nas células hospedeiras (macrófagos da linha celular THP1) sendo necessário recorrer ao ensaio anterior para avaliar essa particularidade.

Ensaio de viabilidade de formas amastigotas intramacrofágicos Luc+

Os compostos são avaliados com base na viabilidade parasitária após 3 dias de exposição medida por quimiluminescência, resultado da ação da luciferase. Em primeiro lugar, é necessário, à semelhança do ensaio anterior, semear e diferenciar as células hospedeiras (THP1). Para isso, preparou-se uma suspensão de THP1 em RPMIc e adicionou-se PMA (1:25000). Semeou-se as células a 1 x 10⁵ células por poço para um volume final de 100 µL numa placa de 96 poços. Estas foram deixadas a diferenciar por 18h a 37°C, 5% CO₂.

Após a diferenciação, renovou-se o meio de cultura substituindo-o com mais 100 µL RPMIc para remover totalmente o PMA e deixou-se as células nas mesmas condições. Ao fim de 24h, removeu-se o meio e adicionou-se a suspensão dos parasitas Luc⁺ *L. infantum* com cerca de 4/5 dias com rácio

célula:parasita de 1:20 previamente preparada para um volume final dentro do poço de 100 µL. Incubou-se por 4h a 37°C, 5% CO₂ de maneira a permitir infeção das células pelos parasitas.

Por fim, lavou-se as células infetadas 3-5x com RPMI e adicionou-se 100 µL do(s) composto(s) de interesse na concentração final desejada em RPMIc às células THP1 infetadas. A concentração final de DMSO dentro do poço não deverá exceder 1%. Para os controlos positivos de 100% de atividade antiparasitária usou-se Miltefosina a 10 µM em RPMIc. Incubou-se a placa por 72 horas a 37°C, 5% CO₂.

Revelação do ensaio

Para a revelação do ensaio lavou-se os poços 2x com PBS deixando na última lavagem 100 µL de PBS em cada poço. Adicionou-se 25 µL do tampão de lise e agitou-se a placa a t.a. durante 10 min. De seguida, adicionou-se 30 µL da solução do substrato (luciferina) e agitou-se durante 15 min a t.a. no escuro. Após o tempo de incubação transferiu-se 100 µL do conteúdo de cada poço para uma placa branca de 96 poços de fundo opaco. Por fim, a leitura da luminescência produzida pela luciferase foi detetada no Synergy 2 (Biotek). A leitura é efetuada no modo “endpoint” com sensibilidade de 175.

Para o cálculo da atividade é determinada a média dos valores dos controlos positivos (EC₁₀₀ da Miltefosina) (Mean Pos), a média dos valores dos controlos negativos (Mean Neg) e por fim a % atividade antiparasitária é calculada de acordo com a fórmula seguinte:

$$\% \text{ Atividade antiparasitária} = [1 - ((\text{Test Value} - \text{Mean Pos}) / (\text{Mean Neg} - \text{Mean Pos}))] \times 100$$

Validação dos resultados - Curva Dose-resposta IC₅₀ (DRC)

Com os dados obtidos, são traçadas as respetivas curvas de dose resposta (DRC) de acordo com o modelo logístico de 4 parâmetros. Neste, a atividade é dada pelo y, x é a concentração correspondente e caso se justifique certos outliers podem ser removidos para ajuste da DRC.

A equação correspondente para este modelo é:

$$y = bot + \frac{(top - bot)}{1 + (x/IC_{50})^{slope}}$$

6. Referências bibliográficas

1. World Health Organization: *Leishmaniasis*, <http://www-who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>, [Acesso, 7 de dezembro, 2019].
2. R. Ross, Further notes on Leishman's bodies, *The British Medical Journal*, **1903**, 2, 2239, 1401
3. A. Kumar, Drugs and Diagnosis for Leishmaniasis, *Immunology* **3**, **2013**, 37-48.
4. J. Farrell, Leishmania, *Kluwer Academic Pub.*, **2002**.
5. J. P. Dedet, F. Pratlong, G. C. Cook and A. L. Zumla, *Manson's Tropical Diseases*, **2009**, 22.
6. J. Chakravarty and S. Sundar, Drug resistance in leishmaniasis, *J Glob Infect Dis*, **2010**, 2, 167–176
7. E. Díaz, M. Padrón-Nieves and Ponte-Sucre A., *Drug resistance in Leishmania parasites*, **2013**.
8. E. M. Moore and D. N. Lockwood, Treatment of visceral leishmaniasis, *J. Glob. Infect. Dis.*, **2010**, 2, 151–158.
9. S. Sundar, J and Chakravarty, Liposomal amphotericin B and leishmaniasis: dose and response, *J. Glob. Infect. Dis.*, **2010**, 2, 159–166.
10. R. N. Davidson, Practical Guide for the Treatment of Leishmaniasis, *Drugs*, **1998**, 56(6), 1009-1018.
11. P. J. Guerin, P. Olliaro, S. Sundar, M. Boelaert, S. L. Croft, P. Desjeux, M. K. Wasunna and A. D. Bryceson, Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda, *Lancet Infect. Dis.*, **2002**, 494-501.
12. A. Berghuis, G. Matlashewski, M. Wainberg and D. Sheppard, *Handbook of Antimicrobial Resistance*, **2017**.
13. D. H. Molyneux, V. Pentreath and F. Doua, African trypanosomiasis in man, *Manson's Tropical Diseases*, **1996**, 20, 1171-1196.
14. World Health Organization: Control of human African trypanosomiasis: a strategy for the African region, **2005**, AFRO, AFR/RC55/11.
15. F. A. Kuzoe, Current situation of African trypanosomiasis, *Acta Trop*, **1993**, 54, 153-162.
16. World Health Organization: African trypanosomiasis (sleeping sickness), World Health Organ Fact Sheet, <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/trypanosomiasis-human-african-sleeping-sickness>, [Acesso, 19 janeiro, 2020]
17. D. Steverding, The history of African trypanosomiasis, *Parasit. Vectors*, **2008**, 1(3).
18. F. Bosch and L. Rosich, The contributions of Paul Ehrlich to Pharmacology: a tribute on the occasion of the centenary of his Nobel Prize, *Pharmacology*, **2008**, 82, 171-179.

19. J. Williamson, Review of chemotherapeutic and chemoprophylactic agents: The African trypanosomiasis, **1970**, 125-221.
20. Drugs for Neglected Diseases initiative: Sleeping sickness, <https://www.dndi.org/diseases-projects/hat/hat-current-treatments/>, [Acesso, 10 de janeiro, 2020]
21. J. T. Pierson, A. Dumetre, S. Hutter, F. Delmas, M. Laget, J. P. Finet, N. Azas and S. Combes, Synthesis and characterization of new diiodocoumarin derivatives with promising antimicrobial activities, *Eur. J. Med. Chem.*, **2010**, 45, 864–869.
22. Z. Nazarian, S. Emami, S. Heydari, S. K. Ardestani, M. Nakhjiri, F. Poorrajab, A. Shafiee and A. Foroumadi, Novel antileishmanial chalconoids: synthesis and biological activity of 1- or 3-(6-chloro-2H-chromen-3-yl)propen-1-ones, *Eur. J. Med. Chem.*, **2010**, 45, 1424–1429.
23. A. Foroumadi, S. Emami, M. Sorkhi, M. Nakhjiri, Z. Nazarian, S. Heydari, S. K. Ardestani, F. Poorrajab and A. Shafiee, Chromene-based synthetic chalcones as potent antileishmanial agents: synthesis and biological activity, *Chem. Biol. Drug Des.*, **2010**, 75, 590–596.
24. R. Shivahare, V. Korthikunta, H. Chandasana, M. K. Suthar, P. Agnihotri, P. Vishwakarma, T. K. Chaitanya, P. Kancharla, T. Khaliq, S. Gupta, R. S. Bhatta, J. V. Pratap, J. K. Saxena, S. Gupta and N. Tadigoppula, Synthesis, Structure–Activity Relationships, and Biological Studies of Chromenochalcones as Potential Antileishmanial Agents, *J. Med. Chem.*, **2014**, 57, 3342–3357.
25. S. Gupta, R. Shivahare, V. Korthikunta, R. Singh, S. Gupta and N. Tadigoppula, *Eur. J. Med. Chem.*, **2014**, Synthesis and biological evaluation of chalcones as potential antileishmanial agents, 81, 359-366.
26. R. Dietze, S. F. Carvalho, L. C. Valli, J. Berman, T. Brewer, W. Milhous, J. Sanchez, B. Schuster and M. Groggl, Phase 2 trial of WR6026, an orally administered 8-aminoquinoline, in the treatment of visceral leishmaniasis caused by *Leishmania chagasi*, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **2001**, 65, 685-689.
27. H. Liu and L. Nolan, Antileishmanial mode of action of derivatives of the quinoline alkaloid (QUININE) from the bark of *Cinchona Ledgeriana*, *Acta Hort.*, *International Symposium on Medicinal and Aromatic Plants*, **1996**, 1.
28. L. Paloque, P. Verhaeghe, M. Casanova, C. Castera-Ducros, A. Dumètre, L. Mbatchi, S. Hutter, M. Kraiem-M'Rabet, M. Laget, V. Remusat, S. Rault, P. Rathelot, N. Azas and P. Vanelle, Discovery of a new antileishmanial hit in 8-nitroquinoline series, *Eur. J. Med. Chem.*, **2012**, 54, 75-86.
29. A. M. L. Carmo, F. M. C. Silva, P. A. Machado, A. P. S. Fontes, F. R. Pavan, C. Q. F. Leite, S. R. de A. Leite, E. S. Coimbra and A. D. Da Silva, Synthesis of 4-aminoquinoline analogues and their platinum(II) complexes as new antileishmanial and antitubercular agents, *Biomed. Pharmacother.*, **2011**, 65, 204–209.
30. P. M. Loiseau, S. Gupta, A. Verma, S. Srivastava, S. K. Puri, F. Sliman, M. Normand-Bayle and D. Desmaele, *In Vitro* Activities of New 2-Substituted Quinolines against *Leishmania donovani*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2011**, 55, 1777–1780.
31. V. S. Gopinath, J. Pinjari, R. T. Dere, A. Verma, P. Vishwakarma, R. Shivahare, M. Moger, P. S. Kumar Goud, V. Ramanathan, P. Bose, M. V. Rao, S. Gupta, S. K. Puri, D. Launay and D. Martin, Design, synthesis

and biological evaluation of 2-substituted quinolines as potential antileishmanial agents, *Eur. J. Med. Chem.*, **2013**, 69, 527-536.

32. V. S. Gopinath, M. Rao, R. Shivahare, P. Vishwakarma, S. Ghose, A. Pradhan, R. Hindupur, K. D. Sarma, S. Gupta, S. K. Puri, D. Launay and D. Martin, Design, synthesis, ADME characterization and antileishmanial evaluation of novel substituted quinoline analogs, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2014**, 24, 2046–2052.

33. S. Kumar, N. Shakya, S. Gupta, J. Sarkar and D. P. Sahu, Synthesis and biological evaluation of novel 4-(hetero) aryl-2-piperazino quinazolines as anti-leishmanial and anti-proliferative agents, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2009**, 19, 2542–2545.

34. J. D. Berman, M. King and N. Edwards, Antileishmanial activities of 2,4-diaminoquinazoline putative dihydrofolate reductase inhibitors, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1989**, 33, 1860-1863.

35. A. K. Bhattacharjee, D. J. Skanchy, B. Jennings, T. H. Hudson, J. J. Brendle and K. A. Werbovetz, Analysis of stereoelectronic properties, mechanism of action and pharmacophore of synthetic indolo[2,1-b]quinazoline-6,12-dione derivatives in relation to antileishmanial activity using quantum chemical, cyclic voltammetry and 3-D-QSAR CATALYST procedures, *Bioorg. Med. Chem.*, **2002**, 10, 1979–1989.

36. K. S. Van Horn, X. Zhu, T. Pandharkar, S. Yang, B. Vesely, M. Vanaerschot, J. C. Dujardin, S. Rijal, D. E. Kyle, M. Z. Wang, K. A. Werbovetz and R. Manetsch, Antileishmanial Activity of a Series of N²,N⁴-Disubstituted Quinazoline-2,4-diamines, *J. Med. Chem.*, **2014**, 57, 5141-5156.

37. Hannah N. Corman, Douglas A. Shoe, Brianna Norris-Mullins, Bruce J. Melancon, Miguel A. Morales and Mary Ann McDowell, Development of a target-free high-throughput screening platform for the discovery of antileishmanial compounds, *Int. J. Antimicrob. Agents*, **2019**, 54(4), 496-501

38. L. T. D. Tonin, M. R. Panice, C. V. Nakamura, K. J. P. Rocha, A. O. dos Santos, T. Ueda-Nakamura, W. F. da Costaa and M. H. Sarragiotto, Synthesis, Antitumor, Antitrypanosomal And Antileishmanial Activities Of Benzo[4,5]canthin-6-ones Bearing The N'-(substituted Benzylidene)- Carbohydrazide And N-alkylcarboxamide Groups At C-2, *Biomed. Pharmacother.*, **2010**, 64, 386–389.

39. K. C. Agarwal, V. Sharma, N. Shakya and S. Gupta, Design and synthesis of novel substituted quinazoline derivatives as antileishmanial agents, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2009**, 19, 5474–5477.

40. M. Taha, M. S. Baharudin, N. H. Ismail, K. M. Khan, F. M. Jaafar, Samreen, S. Siddiqui and M. I. Choudhary, Synthesis of 2-methoxybenzoylhydrazone and evaluation of their antileishmanial activity, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2013**, 23, 3463–3466.

41. D. G. Rando, M. A. Avery, B. L. Tekwani, S. I. Khan and E. I. Ferreira, Antileishmanial activity screening of 5-nitro-2-heterocyclic benzylidene hydrazides, *Bioorg. Med. Chem.*, **2008**, 16, 6724–6731.

42. C. G. Corboa, R. A. Velilla, R. M. Reguera, C. G. Estradab, M. Cushmanc, R. B. Foucea, Y. P. Pertejo, Topoisomerase IB poisons induce histone H2A phosphorylation as a response to DNA damage in *Leishmania infantum*, *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.*, **2019**, 11, 39-48.

43. S. N. Suryawanshi, S. Kumar, R. Shivahare, S. Pandey, A. Tiwari and S. Gupta, Design, synthesis and biological evaluation of aryl pyrimidine derivatives as potential leishmanicidal agents, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2013**, 23, 5235–5238.

44. A. Spaulding, M. F. Gallerstein, and L. Ferrins, *Neglected Tropical Diseases: Drug Discovery and Development*, **2019**, 77, 115-137.
45. C. Borsari, N. Santarém, S. Macedo, M. D. J. Antón, J. J. Torrado, A. I. O. Molero, M. J. Corral, S. Ferrari, A. Tait, L. Costantino, R. Luciani, G. Ponterini, S. Gul, M. Kuzikov, B. Ellinger, B. Behrens, J. Reinshagen, J. M. Alunda, A. Cordeiro da Silva and M. P. Costi, SAR Studies and Biological Characterization of a Chromen-4-one Derivative as an Anti- *Trypanosoma brucei* Agent, *ACS Med. Chem. Lett.*, **2019**, 10(4) 528-533
46. J. L. Woodring, G. Patel, J. Erath, R. Behera, P. J. Lee, S. E. Leed, A. Rodriguez, R. J. Sciotti, K. M. Wilmot and M. P. Pollastri, Protozoan Parasite Growth Inhibitors Discovered by Cross-Screening Yield Potent Scaffolds for Lead Discovery, *Medchemcomm*, **2015**, 6, 339-346.
47. B. Singh, J. A. Bernatchez, L. I. McCall, C. M. Calvet, J. Ackermann, J. M. Souza, D. Thomas, E. M. Silva, K. A. Bachovchin, D. M. Klug, H. B. Jalani, M. J. Buskes, S. E. Leed, N. E. Roncal, E. C. Penn, J. Erath, A. Rodriguez, R. J. Sciotti, R. F. Campbell, J. McKerrow, J. L. Siqueira-Neto, L. Ferrins, and M. P. Pollastri, Scaffold and Parasite Hopping: Discovery of New Protozoal Proliferation Inhibitors, *ACS Med. Chem. Lett.*, **2020**.
48. R. Appel, Tertiary Phosphane/Tetrachloromethane, a Versatile Reagent for Chlorination, Dehydration, and P-N Linkage, *Angewandte Chemie International Edition in English*, **1975**; 14 (12); 801–811.
49. T. W. Baughman, J. C. Sworen, K. B. Wagener, The facile preparation of alkenyl metathesis synthons, *Tetrahedron*, **2004**, 60, 10943-10948
50. a) National Center for Biotechnology Information, PubChem Compound Summary for CID 228934, Ethyl 4-(2-hydroxyethyl)piperazine-1-carboxylate, *PubChem*, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ethyl-4-2-hydroxyethyl-piperazine-1-carboxylate>. [Acesso, 19 de agosto, 2020].
51. National Center for Biotechnology Information, PubChem Patent View for Patent US2018312508, *PubChem*, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/patent/US2018312508>. [Acesso, 19 agosto, 2020].
52. M. Takase, F. Komatsu; Method for production of n-(2-amino-1,2-dicyanovinyl)imidates, method for production of n-(2-amino-1,2-dicyanovinyl)formamidine, and method for production of aminoimidazole derivatives, *US Patent 00876*, **2010**.
53. M. J. Alves, B. L. Booth, M. A. Carvalho, R. G. Pritchard, M. F. Proença, Synthesis of 2-(aminophenyl)adenine derivatives: a simple protocol using the classical iron powder/ acetic acid reduction methodology, *J. Heterocycl. Chem.*, **1997**, 34, 739-743.
54. J. Alves, M. A. Carvalho, M. F. Proença, Reactivity studies of ethyl(Z)-N-(2-amino-1,2-dicyanovinyl) formimidate with carbonyl compounds in the presence of base, *J. Heterocycl. Chem.*, **2000**, 37, 1041.
55. A. Al-Azmi, B. L. Booth, R. A. Carpenter, M. A. Carvalho, E. Marrelec, R. G. Pritchard, M. F. Proença, Facile synthesis of 6-cyano-9-substituted-9H-purines and their ring expansion to 8-(arylamino)-4-imino-3-methylpyrimidino[5,4-d]pyrimidines, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, **2001**, 1, 2532-2537.
56. M. A. Carvalho, T. M. Esteves, M. F. Proença, B. L. Booth, Efficient conversion of 6-cyanopurines into 6-alkoxyformimidoylpurines, *Org. Biomol. Chem.*, **2004**, 2, 1019–1024.

57. M. A. Carvalho, M. E. A. Zaki, Y. Àlvares, M. F. Proença, B. L. Booth, Synthesis of novel 6-enaminopurines, *Org. Biomol. Chem.*, **2004**, 2, 2340–2345.
58. A. Ribeiro, M. A. Carvalho, M. F. Proença, A Mild Approach to the Synthesis of 4Amino8-(arylamino)pyrimido[5,4-d]pyrimidine 3Oxides, *Eur. J. Org. Chem.*, **2009**, 4867–4872.
59. A. H. Bacelar, M. A. Carvalho, M. F. Proença, Synthesis and in vitro evaluation of substituted pyrimido[5,4-d]pyrimidines as a novel class of anti-Mycobacterium tuberculosis agents, *Eur. J. Med. Chem.*, **2010**, 45, 3234-3239.
60. A. Rocha, A. H. Bacelar, J. Fernandes, M. F. Proença, M. A. Carvalho, Reactivity of 6-imidatopurines with benzylhydrazine, *Synlett*, **2014**, 25, 343–348.
61. S. Teixeira, Dissertação de Mestrado em Química Medicinal, **2020**.
62. Resultados não publicados, Maria Alice Carvalho.
63. C. Martins, Dissertação de Mestrado em Bioquímica em Saúde – Ramo em Bioquímica Aplicada, **2020**.
64. N. Santarém, J. Tavares, A. Cordeiro da Silva, *In Vitro* Infections of Macrophage-Like Cell Lines with *Leishmania infantum* for Drug Screening, *Leishmania. Methods in Molecular Biology*, **2019**, 1971.
65. A. H. D. Bacelar, Tese de Doutoramento em Ciências - Especialidade de Química, **2012**.
66. National Center for Biotechnology Information, PubChem Compound Summary for CID 291354, 4-(Piperidin-1-yl)benzaldehyde, *PubChem*, https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4-Piperidin-1-yl_benzaldehyde. [Acesso, 30 janeiro, 2021].