



Universidade do Minho
Escola de Ciências

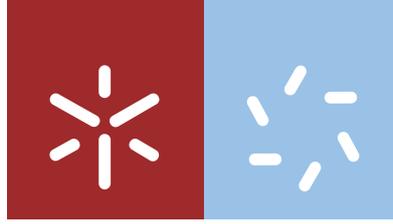
Ana Sofia Pêra de Sousa

**Novos Análogos de Purina como
Candidatos a Sondas Fluorescentes
para Sistemas Biológicos**

Ana Sofia Pêra de Sousa **Novos Análogos de Purina como Candidatos a Sondas Fluorescentes para Sistemas Biológicos**

UMinho | 2021

julho 2021



Universidade do Minho
Escola de Ciências

Ana Sofia Pêra de Sousa

**Novos Análogos de Purina como
Candidatos a Sondas Fluorescentes
para Sistemas Biológicos**

Dissertação de Mestrado
Mestrado em Técnicas de Caracterização e Análise Química

Trabalho efetuado sob a orientação da
Doutora Alice Maria Esteves Dias
e da
Doutora Elisabete M.S.C. Coutinho

julho 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



Atribuição-NãoComercial-SemDerivações
CC BY-NC-ND

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

Agradecimentos

À Doutora Alice M. Dias, um grande agradecimento pela oportunidade de realizar este trabalho e por todos os ensinamentos adquiridos.

À Doutora Elizabete Coutinho, pela disponibilidade e cooperação na realização deste trabalho.

Às técnicas Elisa Pinto e Vânia Azevedo, pela disponibilidade para a realização dos espectros de RMN.

Aos meus pais, pelo apoio e incentivo ao longo do meu percurso pessoal e académico.

À Dantas, pela amizade, por todas as brincadeiras e pelo companheirismo ao longo do meu percurso académico.

Ao José, pelo amor e carinho recebido e por todo incentivo em não desistir do meu sonho.

À Margarida, pela amizade e por todas as aventuras.

Aos escuteiros, em especial ao chefe Júlio, pelas experiências partilhadas e pelo meu crescimento pessoal.

Aos colegas de laboratório, pelo apoio prestado e amizade.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização desta dissertação.

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.

Novos análogos de purina como candidatos a sondas fluorescentes para sistemas biológicos

Resumo

A 2-aminopurina (2AP) tem sido uma das moléculas mais utilizadas como sonda fluorescente, devido à sua elevada fluorescência em soluções neutras e ao decréscimo elevado dessa fluorescência quando incorporada nos ácidos nucleicos. Contudo, os métodos utilizados para síntese da 2AP não são simples e a necessidade de encontrar novos análogos, com propriedades fotofísicas melhoradas e métodos de síntese mais eficientes, continua a ser um desafio para a comunidade científica.

Neste trabalho realizou-se a síntese de análogos à 2AP numa sequência reacional de quatro etapas e a partir de reagentes comerciais simples e acessíveis. O trabalho experimental iniciou-se com a reação entre o diaminomaleonitrilo e o ortoformiato de etilo para formar o *N*[(*Z*)-2-amino-1,2-dicianovinil]formimidato de etilo, que é o primeiro reagente de partida do processo. Posteriormente fez-se reagir este imidato com aminas primárias alquílicas e arílicas para formar os 5-amino-4-cianoformimidazolimidazoles numa sequência reacional de duas etapas. Uma vez obtidos os correspondentes *N*¹-alquil e *N*¹-arilimidazoles, realizou-se a reação destes intermediários com cianamida para obter os 5-amino-*N*¹-cianoimidazole-4-carbimidoilnitrilos por adição nucleofílica ao carbono imínico do grupo 4-cianoformimidazol, seguida de eliminação de HCN. Por fim, converteram-se estes 5-amino-*N*¹-cianoimidazole-4-carbimidoilnitrilos em 2-aminopurina-6-carbonitrilos, os análogos à 2AP que constituem as moléculas alvo deste projeto. Após a síntese dos 2-aminopurina-6-carbonitrilos, estudou-se as condições reacionais para a modificação na posição 6 destas purinas, de modo a obter outros derivados de purina fluorescentes. Adicionalmente, foi sintetizada uma nova estrutura de pirimidina, que também demonstrou propriedades fluorescentes e, portanto, investigaram-se as melhores condições reacionais para a sua síntese.

Na etapa final do trabalho, procedeu-se à caracterização fotofísica das purinas sintetizadas em diferentes solventes (diclorometano, dioxano, acetonitrilo e etanol) e soluções tampão com diferentes valores de pH (pH=7,3 e 5,6). Avaliaram-se as propriedades fotofísicas, nomeadamente a absorção no UV/visível e a emissão de fluorescência, de cada solução preparada, que foram comparadas com as do seu análogo 2AP. Além disso, à semelhança das purinas, foi realizado o estudo das propriedades fotofísicas da nova molécula e ainda se realizaram medidas de fluorescência em membranas modelo, para inferir a possibilidade de o composto ser usado como sonda de biomembranas.

Verificou-se que alguns dos análogos possuem propriedades muito promissoras, tais como um elevado rendimento quântico de fluorescência, um desvio de Stokes apreciável e uma emissão sensível à polaridade do meio em que a molécula se encontra.

Palavras-chave

Análogos de 2-aminopurina, Desvio de Stokes, Espectroscopia de fluorescência, Sondas fluorescentes.

New Purine Analogues as Fluorescent Probes for Biological Systems

Abstract

2-Aminopurine (2AP) has been one of the most used molecules as a fluorescent probe, due to its high fluorescence in neutral solutions and the high decrease in fluorescence when incorporated into nucleic acids. However, the methods used for the synthesis of 2AP are not simple and the need to find new analogues, with improved photophysical properties and more efficient synthesis methods, remains a challenge for the scientific community.

In this work, the synthesis of 2AP analogues was carried out in a reaction sequence of four steps and from simple and accessible commercial reagents. The experimental work began with the reaction between diaminomaleonitrile and ethyl orthoformate to form ethyl *N*[(*Z*)-2-amino-1,2-dicyanovinyl]formimidate, which is the first reagent of the work. Then this imidate reacted with primary alkyl and aryl amines to form the 5-amino-4-cyanoformimidoylimidazoles in a two-step reaction sequence. Once the corresponding *N*¹-alkyl and *N*¹-aryl imidazoles were obtained, these intermediates were reacted with cyanamide to obtain the 5-amino-*N*-cyanoimidazole-4-carbimidoylnitriles by nucleophilic addition to the imine carbon of 4-cyanoformimidoyl group, followed by elimination of HCN. Finally, these 5-amino-*N*-cyanoimidazole-4-carbimidoylnitriles were converted into 2-aminopurine-6-carbonitriles, the 2AP analogues that constitute the target molecules of this project. After the synthesis of 2-aminopurine-6-carbonitriles, the reaction conditions for the modification in position 6 of these purines were studied, in order to obtain other fluorescent purine derivatives. Additionally, a new pyrimidine structure was synthesized, which also demonstrated fluorescent properties and, therefore, the best reaction conditions for its synthesis were investigated.

In the final stage of the work, the photophysical characterization of the synthesized purines in different solvents (dichloromethane, dioxane, acetonitrile and ethanol) and buffer solutions with different pH values (pH=7.3 and 5.6) was carried out. The photophysical properties, namely UV/visible absorption and fluorescence emission, of each prepared solution were evaluated and compared with those of 2AP analogue. In addition, similarly to purines, the study of the photophysical properties of the new pyrimidine molecule was carried out and fluorescence measurements were also carried out in model membranes, to infer the possibility of using this compound as a biomembrane probe.

Some of the analogues were found to have very promising properties, such as a high quantum yield of fluorescence, an appreciable Stokes shift and an emission sensitive to the polarity of the medium in which the molecule finds itself.

Key words

2-Aminopurine Analogues, Fluorescent Probes, Fluorescence Spectroscopy, Stokes Shift.

Índice

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Ácidos nucleicos.....	2
1.2. Sondas Fluorescentes	5
1.2.1. Modificações na estrutura da pirimidina	11
1.2.1.1. Modificações de substituintes da pirimidina	12
1.2.1.2. Análogos estendidos através de ligações conjugadas.....	14
1.2.1.3. Fusões do anel de pirimidina	15
1.2.2. Modificações na estrutura da purina	17
1.2.2.1. Modificações da estrutura do anel de purina	17
1.2.2.2. Análogos estendidos através de ligações conjugadas.....	18
1.2.2.3. Fusões do anel de purina	19
1.2.2.4. Modificações de substituintes da purina.....	20
1.3. Introdução geral sobre purinas	22
1.3.1. Purina.....	22
1.3.1. Síntese de purinas.....	23
1.4. 2-Aminopurina (2AP)	26
2. Resultados e discussão	33
2.1. Introdução	34
2.1.1. Síntese de <i>N</i> [(<i>Z</i>)-2-amino-1,2-dicianovinil] formimidato de etilo (1).	36
2.1.2. Síntese de 4-cianoformimidimidazoles (3).....	37
2.1.3. Síntese dos 5-amino- <i>N</i> -cianoimidazole-4-carbimidoilnitrilos (4).....	39
2.1.4. Síntese de 2-aminopurina-6-carbonitrilos (5).	41
2.1.5. Caracterização espectroscópica dos 2-aminopurina-6-carbonitrilos (5).	43
2.1.6. Propriedades fotofísicas dos 2-aminopurina-6-carbonitrilos (5).....	46
2.1.7. Síntese de 2-aminopurina-6-carboxamidas (6).	50
2.1.8. Caracterização espectroscópica das 2-aminopurina-6-carboxamidas (6).....	53
2.1.9. Síntese de 2-aminopurina-6-carbimidato de etilo (7).	54
2.1.10. Caracterização espectroscópica das 2-aminopurina-6-carbimidato de etilo (7).....	57
2.1.11. Propriedades fotofísicas de 2-aminopurina-6-carboxamidas (6) e de 2-aminopurina-6-carbimidato de etilo (7).....	59
2.2. Síntese de 2-amino-9- <i>H</i> -purina-6-carbonitrilo (5g).....	63

2.2.1.	Síntese de (Z)-N'((Z)-2-amino-1,2-dicianovinil) formimidamida (2g).	64
2.2.2.	Caraterização espectroscópica da (Z)-N'((Z)-2-amino-1,2-dicianovinil) formimidamida (2g).	66
2.2.3.	Síntese de 5,6-diaminopirimidina-4-carbonitrilo (8).	67
2.2.3.1.	Síntese de 5,6-diaminopirimidina-4-carbonitrilo (8) a partir do imidato (1).	68
2.2.3.2.	Síntese de 5,6-diaminopirimidina-4-carbonitrilo (8) a partir da amidina (2g).	73
2.2.3.3.	Caraterização espectroscópica de 5,6-diaminopirimidina-4-carbonitrilo (8).	75
2.2.4.	Síntese de 5-amino-1H-imidazole-4-cianoformimidoilimidazole (3g).	76
2.2.5.	Caraterização espectroscópica do 5-amino-1H-imidazole-4-cianoformimidoilimidazole (3g).	81
2.2.6.	Síntese de 2-amino-9H-purina-6-carbonitrilo (5g).	82
2.2.7.	Caraterização espectroscópica de 2-amino-9H-purina-6-carbonitrilo (5g).	83
2.2.8.	Propriedades fotofísicas de 2-amino-9H-purina-6-carbonitrilo (5g).	84
2.2.8.1.	Propriedades fotofísicas de 5,6-diaminopirimidina-4-carbonitrilo (8).	87
3.	Parte experimental	90
3.1.	Técnicas gerais – Primeira parte do trabalho experimental	90
3.2.	Síntese do reagente de partida	90
3.2.1.	Síntese de N'[(Z)-2-amino-1,2-dicianoetenil] formimidato de etilo (1)	90
3.2.2.	Síntese dos 5-amino-4-cianoformimidoil imidazoles (3)	91
3.2.2.1.	Síntese de 5-amino-4-cianoformimidoil-1-(metil)imidazole (3a)	91
3.2.2.2.	Síntese de 5-amino-4-cianoformimidoil-1-(ciclopentil)imidazole (3b)	91
3.2.2.3.	Síntese de 5-amino-4-cianoformimidoil-1-(benzil)imidazole (3c)	92
3.2.2.4.	Síntese de 5-amino-4-cianoformimidoil-1-(4'-fluorofenil)imidazole (3d)	92
3.2.2.5.	Síntese de 5-amino-4-cianoformimidoil-1-(4-metoxifenil)imidazole (3e)	92
3.2.2.6.	Síntese de 5-amino-4-cianoformimidoil-1-(2',3'-di-hidroxipropil)imidazole (3f)	92
3.2.3.	Síntese de 5-amino-N'cianoimidazole-4-carbimidoilnitrilos (4)	93
3.2.3.1.	Síntese de 5-amino-N'ciano-1-(metil)imidazole-4-carbimidoilnitrilo (4a)	93
3.2.3.2.	Síntese de 5-amino-N'ciano-1-(ciclopentil)imidazole-4-carbimidoilnitrilo (4b)	93
3.2.3.3.	Síntese de 5-amino-N'ciano-1-(benzil)imidazole-4-carbimidoilnitrilo (4c)	93
3.2.3.4.	Síntese de 5-amino-N'ciano-1-(4'-fluorofenil)imidazole-4-carbimidoilnitrilo (4d)	94
3.2.3.5.	Síntese de 5-amino-N'ciano-1-(4'-metoxifenil)imidazole-4-carbimidoilnitrilo (4e)	94
3.2.4.	Síntese de 2-aminopurina-6-carbonitrilo (5)	94
3.2.4.1.	Síntese de 2-amino-9-(metil)purina-6-carbonitrilo (5a)	94
3.2.4.2.	Síntese de 2-amino-9-(ciclopentil)purina-6-carbonitrilo (5b)	95

3.2.4.3.	Síntese de 2-amino-9-(benzil)purina-6-carbonitrilo (5c).....	95
3.2.4.4.	Síntese de 2-amino-9-(4-fluorofenil)purina-6-carbonitrilo (5d).....	95
3.2.4.5.	Síntese de 2-amino-9-(4-metoxifenil)purina-6-carbonitrilo (5e)	96
3.2.4.6.	Síntese de 2-amino-9-(2,3-di-hidroxipropil)purina-6-carbonitrilo (5f)	96
3.2.5.	Síntese de 2-aminopurina-6-carboxamidas (6)	96
3.2.5.1.	Síntese de 2-amino-9-(metil)purina-6-carboxamidas (6a)	97
3.2.5.2.	Síntese de 2-amino-9-(ciclopentil)purina-6-carboxamidas (6b)	97
3.2.6.	Síntese de 2-aminopurina-6-carbimidato de etilo (7)	97
3.2.6.1.	Síntese de 2-amino-9-(metil)purina-6-carbimidato de etilo (7a)	98
3.2.6.2.	Síntese de 2-amino-9-(ciclopentil)purina-6-carbimidato de etilo (7b)	98
3.2.7.	Síntese de (Z)-N'((Z)-2-amino-1,2-dicianovinil)formimidamida (2g)	98
3.2.8.	Síntese de 5-amino-1Himidazole-4-cianoformimidoilimidazole (3g)	99
3.2.9.	Síntese de 2-amino-9Hpurina-6-carbonitrilo (5g)	99
3.2.10.	Síntese de 5,6-diaminopirimidina-4-carbonitrilo (8)	99
3.3.	Técnicas gerais – Fluorescência	100
4.	Conclusões.....	101
5.	Referências.....	103

Índice de figuras

Figura 1: a) Estrutura e componentes de um nucleótido: grupo fosfato, pentose e base nitrogenada; b) Formação de um segmento de DNA através de ligações fosfodiéster [3], [7].....	2
Figura 2: a) Estrutura das bases nitrogenadas; b) Emparelhamento Watson-Crick da adenina com a timina e da guanina com a citosina [3], [7], [9], [10].....	3
Figura 3: Diagrama de Jablonski: transições radiativas e não radiativas entre os estados eletrônicos de uma molécula no estado excitado em solução [3], [14].....	6
Figura 4: Estruturas de dois exemplos de marcadores fluorescentes utilizados como intercaladores de DNA [4].....	7
Figura 5: Alguns exemplos de sondas utilizadas na marcação extrínseca (a) e intrínseca (b) de ácidos nucleicos [4].	8
Figura 6: Sistema <i>push-pull</i> entre dois grupos (D e A) num sistema π conjugado [29].	9
Figura 7: Exemplos de potenciais locais de modificação canónica de pirimidinas (a) e purinas (b). A cor azul destaca as estruturas modificadas e as ligações e átomos a rosa correspondem a porções da base natural [9].	10
Figura 8: Exemplos de nucleobases fluorescentes não canónicas [9].....	11
Figura 9: Estratégias moleculares para o design de análogos fluorescentes de pirimidina. a) numeração do esqueleto de pirimidina. b) possíveis locais de modificação da timina e citosina, representados pelas setas a laranja [9].....	12
Figura 10: Estratégias moleculares para o design de análogos de pirimidina fluorescentes. a) Estruturas de duas pirimidinas encontradas nos ácidos nucleicos. b) Modificação dos substituintes de pirimidina na posição 5. c) Modificação dos substituintes de pirimidina nas posições 5 e 6. As extensões formam um novo anel de seis membros contendo heteroátomos, que podem ser posteriormente expandidos [9].	13
Figura 11: Estratégias moleculares para o design de análogos de pirimidina fluorescentes. a) Estruturas de duas pirimidinas encontradas nos ácidos nucleicos. b) Extensão dessas pirimidinas através da conjugação com grupos ligantes [9].....	15
Figura 12: Estratégias moleculares para o design de análogos de pirimidina fluorescentes. a) Estruturas de duas pirimidinas encontradas nos ácidos nucleicos. b) Estruturas de pirimidinas modificadas por fusão de anel [9].	16

Figura 13: Estratégias moleculares para o design de análogos fluorescentes de purina. a) Numeração do esqueleto de purina. b) Possíveis locais de modificação da adenina e guanina, representados pelas setas a laranja [9].	17
Figura 14: Estratégias moleculares para o design de análogos fluorescentes de purina. a) Estruturas das duas purinas encontradas nos ácidos nucleicos; b) Exemplos de modificações da estrutura do anel de purina [9].	18
Figura 15: Estratégias moleculares para o design de análogos fluorescentes de purina. a) Estruturas das duas purinas encontradas nos ácidos nucleicos; b) Exemplos de análogos estendidos através de ligações conjugadas [9].	19
Figura 16: Estratégias moleculares para o design de análogos fluorescentes de purina. a) Estruturas das duas purinas encontradas nos ácidos nucleicos; b) Exemplos de modificações do tipo fusão de anel [9].	20
Figura 17: Estratégias moleculares para o design de análogos fluorescentes de purina. a) Estruturas das duas purinas encontradas nos ácidos nucleicos; b) Exemplos de modificações de substituintes do anel de purina [9].	21
Figura 18: Estrutura da purina e alguns exemplos de derivados de purina encontrados na natureza [32], [33].	22
Figura 19: Estrutura da adenina e guanina e do seu análogo 2-aminopurina [11], [17], [42].	26
Figura 20: Espectro de absorção (azul) e espectro de emissão (laranja) da 2AP numa solução tampão de pH=7,3.	31
Figura 21: Representação da transferência de lacunas (esquerda) e transferência de elétrões (direita) como etapas elementares de transferência de carga [14]. LUMO: do inglês <i>Lowest Unoccupied Molecular Orbital</i> .	32
Figura 22: Exemplos de análogos da 2AP e das nucleobases naturais e respetivas propriedades fotofísicas [3].	32
Figura 23: Espectros de absorção normalizados de soluções 1×10^{-5} M do composto 5a em vários solventes (Percurso ótico: 1,0 cm).	47
Figura 24: Espectros de absorção normalizados de soluções 1×10^{-5} M do composto 2AP em vários solventes (Percurso ótico: 1,0 cm).	47
Figura 25: Espectros de fluorescência normalizados (no máximo de emissão) de soluções 1×10^{-5} M do composto 5a em vários solventes ($\lambda_{exc} = 350$ nm).	49

Figura 26: Espectros de fluorescência normalizados (no máximo de emissão) de soluções 1×10^{-5} M do composto 2AP em vários solventes ($\lambda_{exc} = 300-310$ nm).	49
Figura 27: Espectros de absorção normalizados de soluções 1×10^{-5} M do composto 7a em vários solventes (Percurso ótico: 1,0 cm).	60
Figura 28: Espectros de fluorescência normalizados (no máximo de emissão) de soluções 1×10^{-5} M do composto 6a em vários solventes ($\lambda_{exc} = 330 - 350$ nm).	61
Figura 29: Espectros de fluorescência normalizados (no máximo de emissão) de soluções 1×10^{-5} M do composto 7a em vários solventes ($\lambda_{exc} = 330 - 350$ nm).	61
Figura 30: Estrutura do composto 9 e respectivos dados de ^1H e ^{13}C RMN (δ em ppm), a vermelho e azul respetivamente.	70
Figura 31: Estruturas dos compostos 10 na forma neutra (10.1) e na forma protonada (10.2) e respectivos dados de ^1H e ^{13}C RMN (δ em ppm), a vermelho e azul respetivamente.	78
Figura 32: Espectros de absorção normalizados de soluções 1×10^{-5} M do composto 5g em vários solventes (Percurso ótico: 1,0 cm).	85
Figura 33: Espectros de fluorescência normalizados (no máximo de emissão) de soluções 1×10^{-5} M do composto 5g em vários solventes ($\lambda_{exc} = 350$ nm).	86
Figura 34: Espectros de absorção normalizados de soluções 1×10^{-5} M do composto 8 em vários solventes (Percurso ótico: 1,0 cm).	87
Figura 35: Espectros de fluorescência normalizados (no máximo de emissão) de soluções 1×10^{-5} M do composto 8 em vários solventes ($\lambda_{exc} = 310 - 330$ nm).	88
Figura 36: Espectros de fluorescência normalizados (no máximo de emissão) de soluções 1×10^{-6} M do composto 8 em água e em lipossomas ($\lambda_{exc} = 330$ nm).	89

Índice de esquemas

Esquema 1: Síntese da purina a partir do ácido úrico [33].	23
Esquema 2: Síntese de dois exemplos de análogos de purina a partir de duas pirimidinas [32].	24
Esquema 3: Síntese de dois exemplos de análogos de purina a partir do imidazole (1.3.1.7) [32].	24
Esquema 4: Síntese de análogos de purinas a partir de uma purina ativada [32].	25
Esquema 5: Esquema de síntese utilizado para a preparação de fosforamidite de 2-aminopurina protegida (1.4.6). (a) DIPEA/TPS-Cl/DMAP; (b) NH ₂ -NH ₂ ; (c) Ag ₂ O; (d) NaOH; (e) DMT-Cl/clorofosfina [47].	27
Esquema 6: Esquema de síntese utilizado para a preparação do derivado de 2-aminopurina-2'-desoxirribósido através da redução da 6-cloroguanosina. (a) 1,3-dicloro-1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano/piridina/DMF; (b) Ph(=S)OCl/DMAP/acetonitrilo; (c) fluoreto de tetra-n-butilamônio/THF/dioxano; (d) hidreto de tri-butilestanho/ABN/benzeno [44].	28
Esquema 7: Esquema de síntese utilizado para a preparação de fosforamidite de 2-aminopurina (a) níquel de Raney/H ₂ O; (b) cloreto de trimetilsililo/piridina; (c) cloreto de isobutirilo; (d) NH ₄ OH; (e) 1,3-dicloro-1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano/piridina; (f) fenilclorotiocarbonato/ 4-N,N-dimetilaminopiridina/acetonitrilo; (g) hidreto de tri-n-butilestanho /2,2'-azobis(2-metilpropanitrilo)/tolueno; (h) fluoreto de tetra-n-butilamônio; (i) cloreto de 4,4'-dimetoxitritilo/ piridina; (j) 2-cianoetil-N,N'-diisopropilclorofosforamidite/diisopropiletilamina/acetonitrilo [46].	29
Esquema 8: Sequência reacional prevista para a síntese dos compostos 5, 6 e 7 a partir do imidato 1.	34
Esquema 9: Sequência reacional prevista para a síntese 2-amino-9H-purina-6-carbonitrilo (5g) a partir do imidato 1.	35
Esquema 10: Síntese do imidato 1 a partir dos reagentes comerciais DAMN e TEOF.	36
Esquema 11: Mecanismo reacional proposto para a síntese do imidato 1 a partir dos reagentes comerciais DAMN e TEOF.	36
Esquema 12: Esquema reacional da síntese dos 4-cianoformimidoilimidazoles 3.	37
Esquema 13: Mecanismo reacional proposto para a síntese dos 4-cianoformimidoilimidazoles 3 a partir do imidato 1.	37
Esquema 14: Síntese dos N-cianoiminonitrilos 4 a partir dos 4-cianoformimidoilimidazoles 3.	39

Esquema 15: Mecanismo reacional proposto para a síntese dos <i>N</i> -cianoiminonitrilos 4 a partir dos 4-cianoformimidoilimidazoles 3	40
Esquema 16: Síntese de 2-aminopurina-6-carbonitrilos 5 a partir de <i>N</i> -cianoiminonitrilos 4	41
Esquema 17: Mecanismo reacional proposto para a síntese de 2-aminopurina-6-carbonitrilos 5 a partir de <i>N</i> -cianoiminonitrilos 4	41
Esquema 18: Síntese de 2-aminopurina-6-carboxamida 6 a partir de 2-aminopurina-6-carbonitrilos 5 .	51
Esquema 19: Caminhos possíveis na síntese do composto 6 e estrutura dos compostos isolados na mistura.	52
Esquema 20: Mecanismo reacional proposto para a síntese de 2-aminopurina-6-carboxamida 6 a partir de 2-aminopurina-6-carbonitrilos 5	52
Esquema 21: Síntese de 2-aminopurina-6-carbimidato de etilo 7 a partir de 2-aminopurina-6-carbonitrilos 5	54
Esquema 22: Mecanismo reacional proposto para a síntese do 2-aminopurina-6-carbimidato de etilo 7 a partir de 2-aminopurina-6-carbonitrilos 5	57
Esquema 23: Sequência reacional prevista para a síntese 5-amino-1 <i>H</i> imidazole-4-cianoformimidoilimidazole (3g) a partir do imidato 1	63
Esquema 24: Sequência reacional prevista para a síntese do imidazole 3g e formação do 5,6-diaminopirimidina-4-carbonitrilo (8) a partir do imidato 1	63
Esquema 25: Síntese da amidina 2g a partir do imidato 1	64
Esquema 26: Mecanismo reacional proposto para a síntese da amidina 2g a partir do imidato 1	64
Esquema 27: Sequência reacional dos dois métodos encontrados para a síntese do 5,6-diaminopirimidina-4-carbonitrilo (8) a partir do imidato 1 e a partir da amidina 2g	68
Esquema 28: Síntese de 5,6-diaminopirimidina-4-carbonitrilo (8) a partir do imidato 1	68
Esquema 29: a) Proposta de estruturas que podem ser encontradas na síntese da pirimidina 8 . b) Reação do imidazole 3g com o acetato de amônio para provar a formação do composto 9 na síntese da pirimidina 8	71
Esquema 30: Síntese de 5,6-diaminopirimidina-4-carbonitrilo (8) a partir da amidina 2g	73
Esquema 31: Mecanismo reacional proposto para a síntese de 5,6-diaminopirimidina-4-carbonitrilo (8) a partir da amidina 2g	75

Esquema 32: Síntese do 5-amino-1 <i>H</i> -imidazole-4-cianoformimidoilimidazoles (3g) a partir da amidina 2g	76
Esquema 33: a) Obtenção do composto 10.1 durante a síntese do imidazole 3g ; (b) Reação do imidazole 3g com etanol e ácido fórmico para gerar o composto 10.2	78
Esquema 34: Síntese dos 2-amino-9 <i>H</i> -purina-6-carbonitrilo (5g) numa reação em duas etapas a partir do imidazole 3g	82

Índice de tabelas

Tabela 1: Propriedades espectroscópicas como o comprimento de onda máximo de absorção e emissão (λ_{abs} e λ_{em}), rendimento quântico de fluorescência (Φ_{F}) e tempo de vida do estado excitado (τ), dos nucleótidos em água [3].	4
Tabela 2: Comprimento de onda máximo de emissão (λ_{em}) e rendimento quântico (Φ_{F}) da 9-etil-2-aminopurina em diferentes solventes [48].	30
Tabela 3: Condições reacionais utilizadas na síntese dos 4-cianoformimidoilimidazoles 3 .	38
Tabela 4: Condições reacionais utilizadas na síntese dos 5-amino- <i>N</i> -cianoimidazole-4-carbimidoilnitrilos 4 .	40
Tabela 5: Condições reacionais utilizadas na síntese dos 2-aminopurina-6-carbonitrilos 5 .	42
Tabela 6: Dados espectroscópicos de ^1H RMN para os 2-aminopurina-6-carbonitrilos 5 . (400 MHz, DMSO- d_6).	44
Tabela 7: Dados espectroscópicos de ^{13}C RMN para os 2-aminopurina-6-carbonitrilos (5). (100 MHz, DMSO- d_6).	45
Tabela 8: Comprimentos de onda de absorção máxima (λ_{abs}) para os compostos 5a-5f e 2AP em diferentes solventes.	46
Tabela 9: Comprimentos de onda de emissão máxima (λ_{em}) para os compostos 5a-5f e 2AP em diferentes solventes.	48
Tabela 10: Rendimentos quânticos de fluorescência (Φ_{F}) e desvio de Stokes (S) para os compostos 5a-5f e 2AP em solventes diferentes.	50
Tabela 11: Condições reacionais usadas na síntese das 2-aminopurina-6-carboxamida 6 .	51
Tabela 12: Dados espectroscópicos de ^1H RMN para as 2-aminopurina-6-carboxamidas 6 . (400 MHz, DMSO- d_6).	53
Tabela 13: Dados espectroscópicos de ^{13}C RMN para as 2-aminopurina-6-carboxamidas 6 . (100 MHz, DMSO- d_6).	54
Tabela 14: Condições reacionais usadas na síntese de 2-aminopurina-6-carbimidato de etilo 7 .	55
Tabela 15: Dados espectroscópicos de ^1H RMN para as 2-aminopurina-6-carbimidato de etilo 7 . (100 MHz, DMSO- d_6).	58

Tabela 16: Dados espectroscópicos de ^{13}C RMN para as 2-aminopurina-6-carbimidato de etilo 7 . (100 MHz, DMSO- d_6).....	58
Tabela 17: Comprimentos de onda de absorção máxima (λ_{abs}) para os compostos 5a , 6a e 7a em solventes diferentes.....	59
Tabela 18: Comprimentos de onda de emissão máxima (λ_{em}) para os compostos 5a , 6a e 7a em solventes diferentes.....	60
Tabela 19: Rendimentos quânticos de fluorescência (Φ_F) para os compostos 5a , 6a e 7a em solventes diferentes.....	62
Tabela 20: Condições reacionais usadas na síntese da amidina 2g	65
Tabela 21: Dados espectroscópicos de ^1H RMN para a (Z)-N'-(Z)-2-amino-1,2-dicianovinil formimidamida (2g). (400 MHz, DMSO- d_6).....	67
Tabela 22: Dados espectroscópicos de ^{13}C RMN para a (Z)-N'-(Z)-2-amino-1,2-dicianovinil formimidamida (2g). (100 MHz, DMSO- d_6).....	67
Tabela 23: Condições reacionais usadas na síntese de 5,6-diaminopirimidina-4-carbonitrilo (8) a partir do imidato 1 em diferentes solventes.....	69
Tabela 24: Condições reacionais usadas na síntese de 5,6-diaminopirimidina-4-carbonitrilo (8) a partir do imidato 1 em acetonitrilo.....	71
Tabela 25: Condições reacionais usadas na síntese de 5,6-diaminopirimidina-4-carbonitrilo (8) a partir da amidina 2g em diferentes solventes.....	73
Tabela 26: Dados espectroscópicos de ^1H RMN para o 5,6-diaminopirimidina-4-carbonitrilo (8). (400 MHz, DMSO- d_6).....	75
Tabela 27: Dados espectroscópicos de ^{13}C RMN para o 5,6-diaminopirimidina-4-carbonitrilo (8). (100 MHz, DMSO- d_6).....	76
Tabela 28: Síntese do 5-amino-1 <i>H</i> imidazole-4-cianoformimidoilimidazole (3g), a partir da amidina 2g com hidróxido de bário octa-hidratado, em diferentes solventes.....	76
Tabela 29: Síntese do 5-amino-1 <i>H</i> imidazole-4-cianoformimidoilimidazole (3g), a partir da amidina 2g com diferentes bases, em vários solventes.....	79
Tabela 30: Condições reacionais usadas na síntese do 5-amino-1 <i>H</i> imidazole-4-cianoformimidoilimidazole (3g), a partir da amidina 2g e hidróxido de bário octahidratado, em etanol 95%.....	80

Tabela 31: Dados espectroscópicos de ^1H RMN para o 5-amino-1 <i>H</i> imidazole-4-cianoformimidoilimidazole (3g). (400 MHz, DMSO- d_6).....	81
Tabela 32: Dados espectroscópicos de ^{13}C RMN para o 5-amino-1 <i>H</i> imidazole-4-cianoformimidoilimidazole (3g). (100 MHz, DMSO- d_6).....	81
Tabela 33: Condições reacionais usadas na síntese de 2-amino-9 <i>H</i> purina-6-carbonitrilo (5g).....	82
Tabela 34: Dados espectroscópicos de ^1H RMN para o 2-amino-9 <i>H</i> purina-6-carbonitrilo (5g). (400 MHz, DMSO- d_6).....	83
Tabela 35: Dados espectroscópicos de ^{13}C RMN para o 2-amino-9 <i>H</i> purina-6-carbonitrilo (5g). (100 MHz, DMSO- d_6).....	84
Tabela 36: Comprimentos de onda de absorção máxima (λ_{abs}) para os compostos 5g em solventes diferentes.	84
Tabela 37: Comprimentos de onda de absorvância máxima (λ_{em}) para os compostos 5g e 2AP em solventes diferentes.	85
Tabela 38: Rendimentos quânticos de fluorescência (Φ_{F}) para os compostos 5g em solventes diferentes.	86
Tabela 39: Comprimentos de onda máximos de absorção (λ_{abs}) e emissão (λ_{em}), desvio de stokes (S) e rendimentos quânticos de fluorescência (Φ_{F}) para o composto 8 em vários solventes.	87

Abreviaturas

2AP	2-aminopurina
¹³ C RMN	Ressonância magnética nuclear de carbono-13
¹ H RMN	Ressonância magnética nuclear de próton
ACN	Acetonitrilo
Aq	Aquoso
Ar	Arilo
Bn	Benzilo
Cp	Ciclopentilo
d	Dupleto
dd	Duplo dupleto
DAMN	Diaminomaleonitrilo
DBU	1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno
DPPC	1,2-Dipalmitoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfocolina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO- <i>d</i> ₆	Dimetilsulfóxido deuterado
DNA	Ácido desoxirribonucleico
egg-PC	1,2-diacil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfocolina (lecitina do ovo)
eq.	Equivalente
h	Horas
HMBC	Do inglês, Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HMQC	Do inglês, Heteronuclear Multiple Quantum Correlation
IV	Infravermelho
m	Multiplete
Me	Metilo
min	Minutos
OMe	Metoxilo
<i>p</i>	<i>para</i>
p.f	Ponto de fusão
q	Quarteto

qi	Quinteto
RMN	Ressonância magnética nuclear
RNA	Ácido ribonucleico
s	Singleto
Sol.	Solução
sl	Singleto largo
S ₀	Estado Eletrônico Fundamental
S ₁	Primeiro Estado Eletrônico Excitado Singleto
t	Tripleto
Ta	Temperatura ambiente
TC	Transferência de carga
TEOF	Ortoformiato de etilo
TFA	Ácido trifluoracético
THF	Tetra-hidrofurano
TLC	Cromatografia em camada fina (do inglês Thin Layer Chromatography)
UV-Vis	Ultravioleta-visível
η	Rendimento da reação
λ	Comprimento de onda
λ _{abs}	Comprimento de onda máximo de absorção
λ _{em}	Comprimento de onda máximo de emissão
Φ _F	Rendimento quântico de fluorescência
τ	Tempo de vida do estado excitado
°C	Graus Celsius
Δ	Refluxo
δ	Desvio químico (expresso em unidades de ppm)

1. INTRODUÇÃO

1.1. Ácidos nucleicos

Os ácidos nucleicos (DNA e RNA) são biopolímeros indispensáveis para quase todos os organismos vivos, uma vez que estes são moléculas centrais na realização de uma infinidade de funções celulares vitais como o armazenamento e transferência de informações genéticas através da replicação, transcrição e tradução [1]–[6]. Os blocos de construção destes biopolímeros designam-se por nucleótidos e são compostos por três componentes químicos: um grupo fosfato, um açúcar com cinco carbonos (pentose) e quatro nucleobases (pirimidinas e purinas) [3], [7], [8]– **Figura 1a**.

Nos ácidos nucleicos, o grupo fosfato é responsável por ligar dois ou mais nucleótidos através de ligações fosfodiéster (**Figura 1b**). A pentose, no caso do DNA é a desoxirribose enquanto para o RNA é a D-ribose – **Figura 1a**.

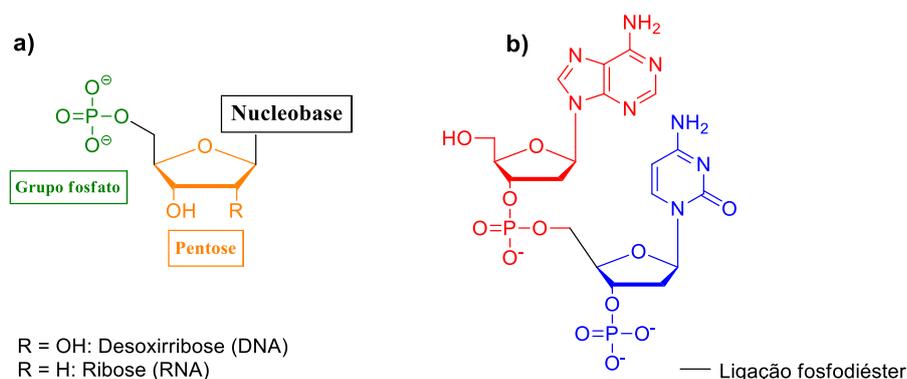


Figura 1: a) Estrutura e componentes de um nucleótido: grupo fosfato, pentose e base nitrogenada; b) Formação de um segmento de DNA através de ligações fosfodiéster [3], [7].

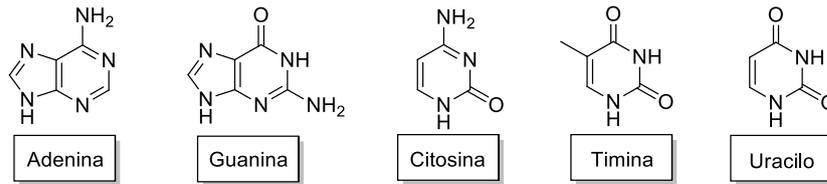
Existem cinco nucleobases: adenina, guanina, citosina, timina e uracilo. As duas primeiras bases mencionadas apresentam uma estrutura característica de uma purina (dois anéis heterocíclicos fundidos, um de cinco e outro de seis membros), enquanto as três últimas apresentam uma estrutura característica de uma pirimidina (anel heterocíclico de seis membros) – **Figura 2a**. As três primeiras nucleobases podem ser encontradas em ambos os ácidos nucleicos, contudo a timina é encontrada no DNA enquanto o uracilo é encontrado no RNA [3], [7], [8].

Como parte da sua função como materiais hereditários universais, uma característica central das nucleobases canónicas no DNA e no RNA é a capacidade de emparelhar através de interações específicas formadas por ligações de pontes de hidrogénio (**Figura 2b**). Este emparelhamento, conhecido como

“Watson-Crick”, ocorre de tal forma que a adenina normalmente emparelha com a timina ou o uracilo por duas ligações de hidrogénio, enquanto a guanina emparelha com a citosina por três ligações de hidrogénio.

Esta forma de emparelhamento permitiu que os organismos desenvolvessem mecanismos para reconhecer e passar a informação genética através de gerações [7]–[9].

a)



b)

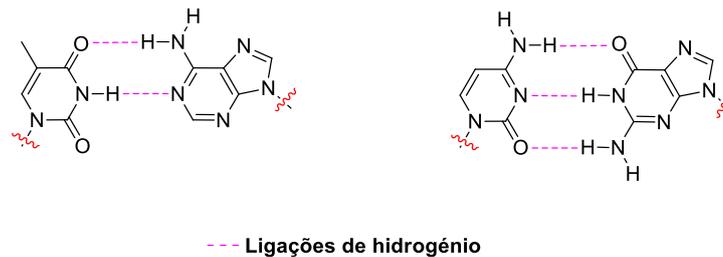


Figura 2: a) Estrutura das bases nitrogenadas; b) Emparelhamento Watson-Crick da adenina com a timina e da guanina com a citosina [3], [7], [9], [10].

O RNA difere do DNA em ambas as características estruturais e funcionais. Ao contrário do DNA, que forma uma estrutura ordenada e regular, o RNA pode adotar diversas formas estruturais, incluindo estruturas tridimensionais que exibem atividade catalítica. Além do armazenamento da informação genética, o RNA também participa na transferência desta informação e na codificação de proteínas. Sob condições fisiológicas especiais, os ácidos nucleicos adotam organizações espaciais distintas, dando origem a conformações não canónicas suportadas por ligações de hidrogénio diferentes do tipo Watson-Crick. Estudos recentes indicam que essas estruturas não canónicas dos ácidos nucleicos são necessárias para desempenhar diversas funções na regulação e catálise de vários processos biológicos. Além disso, também foi proposto que estas estruturas não canónicas têm uma função no controlo da expressão genética e são consideradas os novos alvos para o diagnóstico e para a terapêutica [2], [7].

Os estudos sobre a fotoestabilidade das bases do DNA e do RNA após a absorção da luz ultravioleta iniciaram-se nos anos 70, quando o *quenching* da fluorescência do DNA, à temperatura ambiente, foi relatada pela primeira vez [11]. Apesar dos estudos iniciais sugerirem que as nucleobases e os ácidos nucleicos são fluorescentes, as purinas e pirimidinas comumente encontradas nos ácidos nucleicos são praticamente não emissivas em condições aquosas neutras. Medições precisas revelaram rendimentos quânticos de fluorescência extremamente baixos para as nucleobases naturais ($\Phi_F = 5-10 \times 10^{-5}$) associadas a tempos de vida no estado excitado de picossegundos (Tabela 1) [3], [12]–[17].

Tabela 1: Propriedades espectroscópicas como o comprimento de onda máximo de absorção e emissão (λ_{abs} e λ_{em}), rendimento quântico de fluorescência (Φ_F) e tempo de vida do estado excitado (τ), dos nucleótidos em água [3].

Nucleobase	λ_{abs} (nm)	λ_{em} (nm)	$\Phi_F (\times 10^{-5})$	τ (ps)
Adenina	260	310	5	0,53
Guanina	253	-	-	0,69
Citosina	271	324	7	0,76
Timina	267	327	10	0,70

Foi argumentado que a evolução selecionou estes blocos de construção, uma vez que o código genético é protegido de danos fotoinduzidos pelos tempos de vida do estado de excitação extremamente curtos das nucleobases [3], [12], [13], [18], [19]. Além do facto de o DNA possuir um rendimento quântico de fluorescência muito baixo, o acoplamento eletrónico entre as diferentes bases torna a interpretação da sua fluorescência muito complexa [18]. Embora isso seja vantajoso para a vida, é um inconveniente para a ciência, pois a compreensão da dinâmica e função das estruturas do DNA e RNA requer ferramentas que possam avaliar seletivamente essas biomoléculas [3], [9], [11], [13], [19].

Ao longo dos anos, várias ferramentas analíticas têm sido empregues para estudar as estruturas do DNA e as suas interações com moléculas pequenas, como marcadores radioativos, espectroscopia de absorção UV-Vis, eletroforese em gel, análise de espectrometria de massa, raios-X e espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) [1], [2], [8], [14], [20]. No entanto, a maioria dessas ferramentas espectroscópicas funcionam apenas *in vitro* e são inadequadas em condições *in vivo* [1], [2]. O elevado custo e a dificuldade no manuseamento do equipamento, assim como a perda de informação devido à quantidade de material de uma célula ser por vezes insuficiente para uma análise precisa, gerou a necessidade de desenvolver métodos de deteção mais rápidos e precisos [8], [18], [21], [22].

De entre as técnicas experimentais que demonstraram a sua utilidade para um grande número de disciplinas, a espectroscopia de fluorescência é, de longe, a técnica mais atrativa, pois é de fácil acesso, versátil e fornece informações em tempo real com grande sensibilidade [1], [3], [4], [14], [17], [23], [24].

Nos últimos anos, testemunhou-se o crescente desenvolvimento e exploração de técnicas de fluorescência. Estas foram estimuladas pela descoberta, *design* e síntese de novas moléculas fluorescentes, as quais forneceram meios poderosos para a observação direta de fenómenos químicos, bioquímicos e biológicos [6], [9]. Em particular, com o objetivo de observar as estruturas, interações, propriedades de reconhecimento e funções de biomacromoléculas não emissivas, como proteínas e ácidos nucleicos, vários grupos fluorescentes (por exemplo, aminoácidos e nucleósidos) foram desenvolvidos e incorporados em oligómeros como sondas fluorescentes [6], [8], [9], [20], [25].

Centenas de sondas fluorescentes estão hoje disponíveis comercialmente e são usadas rotineiramente, e mais ainda são desenvolvidas a cada ano que passa. O progresso nesta área dependerá, em última análise, da capacidade dos químicos projetarem racionalmente os fluoróforos com parâmetros que sejam ótimos para os métodos de deteção e, ao mesmo tempo, possuam unidades de reconhecimento para uma gama mais ampla de aplicações [4].

1.2. Sondas Fluorescentes

As moléculas podem sofrer vários processos diferentes durante a absorção de luz. Conforme mostrado na **Figura 3**, após a excitação do estado fundamental, S_0 , para um estado excitado de energia superior, o eletrão relaxa rapidamente para o estado excitado mais baixo, denominado S_1 (1º estado eletrónico excitado singuleto). A partir desse estado excitado, os eletrões regressam ao seu estado fundamental (S_0) através de processos não radiativos, como a conversão interna, ou por processos radiativos, como a fosforescência ou a fluorescência. A fluorescência ocorre quando a molécula se encontra no estado excitado (S_1) e regressa ao estado fundamental (S_0) emitindo um fóton de luz de frequência mais baixa do que o fóton que provocou a sua excitação. Este processo ocorre muito rapidamente depois da excitação (entre 10^{-6} e 10^{-9} s) não sendo possível, portanto, para o olho humano registar a fluorescência após remoção da fonte de excitação [14].

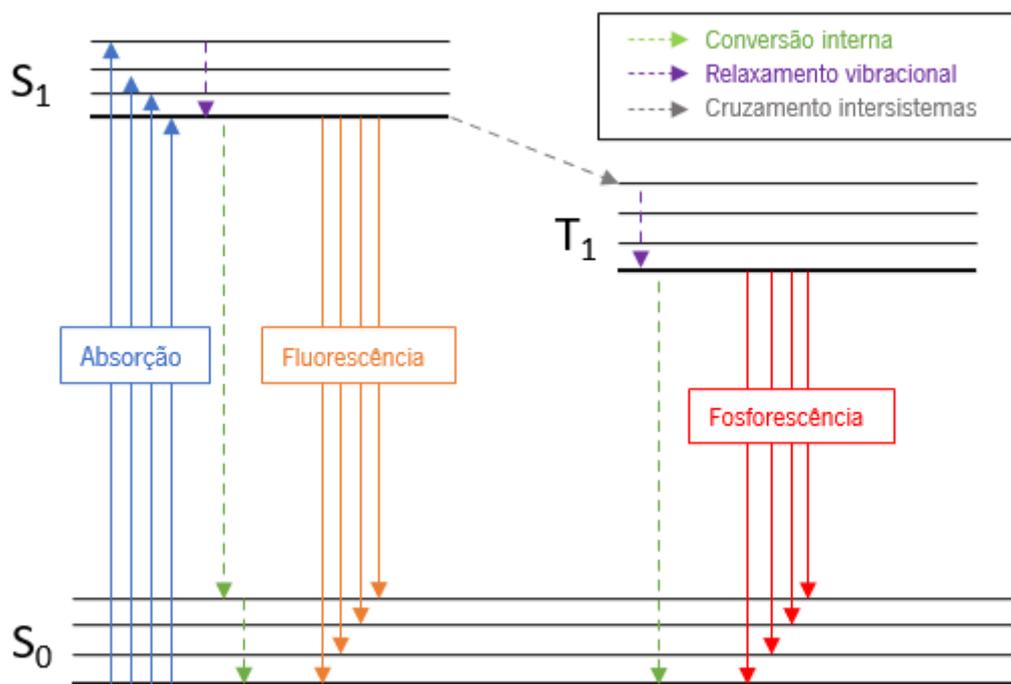


Figura 3: Diagrama de Jablonski: transições radiativas e não radiativas entre os estados eletrônicos de uma molécula no estado excitado em solução [3], [14].

Devido à elevada sensibilidade, rapidez e simplicidade da espectroscopia de fluorescência, as sondas fluorescentes tornaram-se revolucionárias para o estudo de vários sistemas, como a detecção de proteínas, interações substrato/enzima, detecção de analitos, entre outras aplicações [3], [6], [21], [25], [26]. As sondas fluorescentes são moléculas compostas por fluoróforos que mudam as suas propriedades fotofísicas, como a intensidade da fluorescência emitida, tempo de vida e o comprimento de onda, em resposta a um evento de ligação, reação química ou mudança no meio ambiente em que estão inseridas [3], [25], [26]. Existe uma grande variedade de sondas fluorescentes disponíveis comercialmente, que permite a escolha de uma sonda consoante as necessidades do investigador, com base nas suas propriedades fotofísicas e localização no sistema biológico a estudar [2], [6].

Uma sonda fluorescente ideal para a visualização de componentes celulares apresenta, normalmente, uma estrutura rígida com sistemas conjugados, que deve exibir propriedades como uma elevada seletividade para a biomolécula ou sistema biológico de interesse, uma boa permeabilidade celular e solubilidade em água (exceto quando se pretendem estudar ambientes hidrofóbicos, como as membranas celulares), elevada fotoestabilidade, rendimento quântico elevado, e não apresentar toxicidade após a ligação ao local de interesse [1], [2], [4]. As sondas fluorescentes podem variar entre sondas moleculares pequenas a proteínas fluorescentes, nanopartículas inorgânicas e nanocristais, e

têm sido empregues para visualizar vários componentes biológicos. Em particular, as sondas fluorescentes utilizadas para visualização dos ácidos nucleicos tornaram-se ferramentas indispensáveis em diversos campos, que vão desde a biologia celular, biologia molecular, biologia e química, ao diagnóstico clínico e descoberta de fármacos.

Os fluoróforos podem ser introduzidos de duas maneiras distintas para tornar os ácidos nucleicos fluorescentes: marcação não covalente ou covalente. A marcação não covalente usa corantes orgânicos de baixo peso molecular denominados de intercaladores de DNA. Alguns exemplos, como os corantes Hoechst e o brometo de etídio, encontram-se na **Figura 4**. Os fluoróforos ligados não covalentemente são usados principalmente para visualizar DNA em eletroforese em gel ou em microscopia celular e para monitorizar as interações dos ácidos nucleicos com os seus alvos, mas não são capazes de fornecer dados específicos do local e apresentam muitas outras limitações [4].

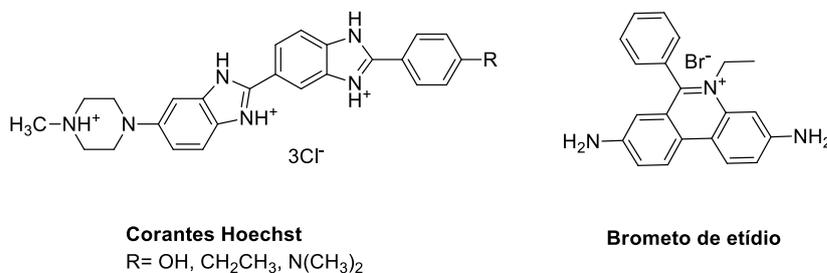


Figura 4: Estruturas de dois exemplos de marcadores fluorescentes utilizados como intercaladores de DNA [4].

Em contrapartida, a marcação covalente pode ser realizada ligando a sonda na extremidade, ou no interior, de uma sequência oligonucleotídica (fragmento curto de nucleótidos de DNA e RNA), não afetando a estrutura nativa dos ácidos nucleicos, ou substituindo uma nucleobase [4], [20], [27]. Os fluoróforos covalentemente ligados à estrutura numa extremidade, ou no meio da estrutura do ácido nucleico, são denominados como modificações extrínsecas, enquanto a substituição de uma nucleobase dentro do ácido nucleico é considerada uma modificação intrínseca (**Figura 5**). A marcação extrínseca com fluoróforos clássicos, como rodamina, cianina e corantes de fluoresceína, ligados ao nucleósido é muito comum. Esses corantes são muito emissivos e são usados principalmente na sequenciação do DNA, estudo de mudanças conformacionais de ácidos nucleicos e interações com proteínas [4].

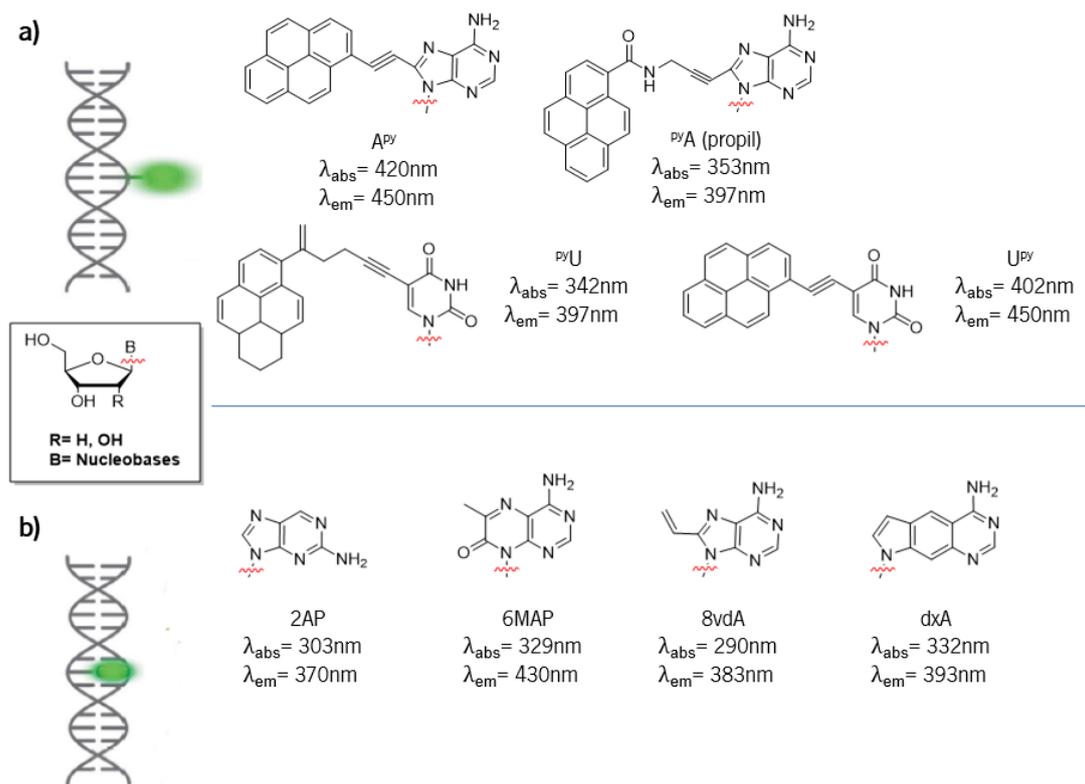


Figura 5: Alguns exemplos de sondas utilizadas na marcação extrínseca (a) e intrínseca (b) de ácidos nucleicos [4].

No entanto, a maior parte destas sondas fluorescentes sofrem de problemas comuns, como o facto de não serem seletivas, apresentarem baixa solubilidade em solução aquosa, impermeabilidade celular, absorção e emissão na região de baixos comprimentos de onda do espetro UV-Vis, toxicidade celular, baixo rendimento quântico de fluorescência e fotoestabilidade insuficiente. Além disso, a autofluorescência de biomoléculas celulares resulta num sinal de fundo elevado, limitando o seu potencial uso em aplicações biológicas [2].

O *design* criativo de sondas é importante, pois permite ajustar as propriedades químicas e fotofísicas, minimizando a interferência de outras moléculas fluorescentes e não fluorescentes [2], [3]. Em muitos dos fluoróforos, existe uma característica estrutural apelidada de sistema *push-pull*. Esta característica estrutural reúne a presença de grupos dadores (D) e grupos aceitadores (A) de eletrões conjugados entre si por meio de um sistema de eletrões π interveniente (**Figura 6**) [28], [29]. A combinação apropriada de unidades D e A ligadas por uma cadeia de eletrões π conjugados (D – π - A), assim como a modificação da estrutura e do número de ligações duplas conjugadas entre grupos dadores e aceitadores, podem fornecer uma nova abordagem para ajustar os comprimentos de onda de absorção e emissão [2], [28].

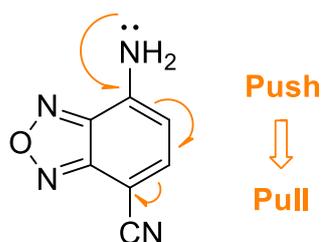


Figura 6: Sistema *push-pull* entre dois grupos (D e A) num sistema π conjugado [29].

Para determinar com precisão a dinâmica estrutural e conformacional do DNA e do RNA e para compreender as interações dos ácidos nucleicos com as proteínas, novas abordagens e novas sondas fluorescentes são urgentemente necessárias. Para o *design* de uma sonda ideal devem ser considerados alguns requisitos como elevado rendimento quântico, comprimento de onda de absorção perto do visível, mínima perturbação na estrutura e função nativa dos ácidos nucleicos, para além de que deve ser seletivamente excitada num comprimento de onda diferente do dos ácidos nucleicos e das proteínas [1], [4].

Com estes objetivos em mente, as nucleobases fluorescentes demonstraram ser sensíveis ao ambiente e merecem atenção especial como ferramentas poderosas em bioanálise, especialmente devido ao crescente desenvolvimento desta tecnologia [1], [4], [8], [9]. As nucleobases fluorescentes são análogos quimicamente modificados do DNA e RNA, que não apenas retêm as suas funcionalidades químicas e biológicas, mas também potencializam propriedades de fluorescência para a análise de ácidos nucleicos [9]. Uma vantagem clara de vários desses análogos é que eles mantêm o tamanho e a complementaridade da ligação por ponte de hidrogénio de Watson-Crick das bases nativas e, portanto, podem ser especificamente incorporados em oligonucleótidos alvo com perturbações estruturais mínimas [1]. Além destas vantagens, as nucleobases fluorescentes também beneficiam de uma boa solubilidade em água e provaram ser ferramentas úteis para a amplificação do sinal não só do DNA, como de outras moléculas alvo [25]. Essas moléculas surgiram como uma categoria extraordinariamente útil de ferramentas químicas e biológicas para a compreensão das estruturas, atividade, localizações e interações dos ácidos nucleicos [9].

Como as nucleobases naturais são essencialmente não fluorescentes, modificações significativas na estrutura das nucleobases nativas são necessárias, antes que possam ser utilizadas como ferramentas emissivas. Essas modificações podem ser feitas com o objetivo de preservar algumas propriedades das nucleobases nativas – análogos fluorescente canónicos – ou podem ser realizadas mudanças mais

profundas na arquitetura das nucleobases, resultando em *designs* não canônicos (**Figura 7**) [4], [9].

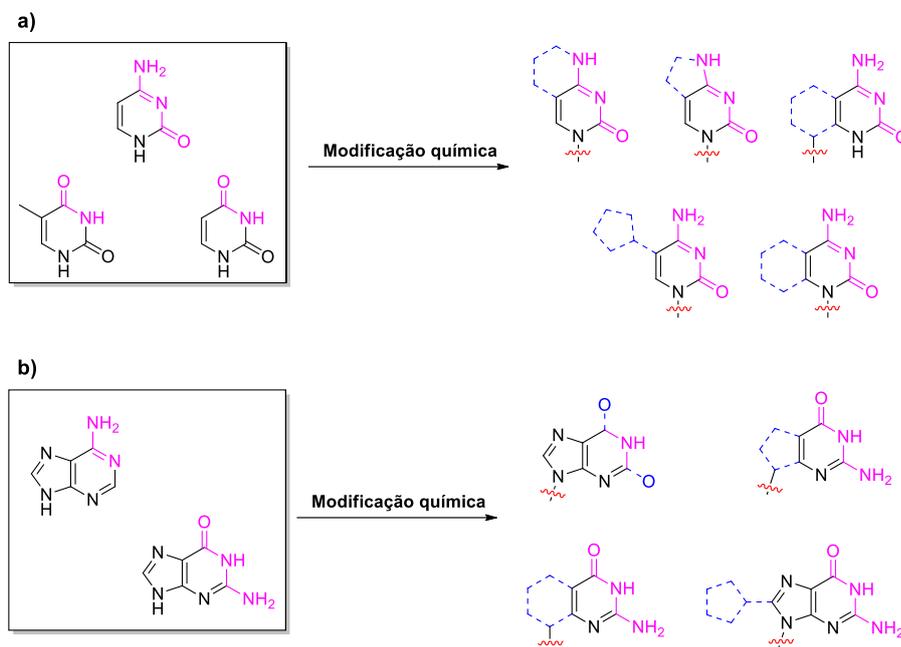


Figura 7: Exemplos de potenciais locais de modificação canônica de pirimidinas (a) e purinas (b). A cor azul destaca as estruturas modificadas e as ligações e átomos a rosa correspondem a porções da base natural [9].

As nucleobases não canônicas foram desenvolvidas para aplicações químicas e biológicas; contudo estas têm uma estrutura mais variada, uma vez que não estão limitadas às mesmas restrições que as nucleobases canônicas. Para nucleobases fluorescentes não canônicas, uma grande vantagem foi a síntese de uma ampla variedade de compostos de tamanhos e formas moleculares diferentes (**Figura 8**). Com a introdução destes sistemas altamente conjugados, podem gerar-se análogos de nucleobases que exibem uma emissão mais deslocada para o vermelho, evitando assim a toxicidade e emissão de fundo da excitação na região do ultravioleta. As nucleobases fluorescentes não canônicas conseguem evitar a necessidade de aderir ao esqueleto molecular das purinas e pirimidinas e até mesmo ao emparelhamento de bases. Ao contornar estas limitações estruturais, os investigadores conseguem sintetizar diversos análogos com uma ampla gama de propriedades de fluorescência.

Contudo, ao evitar as restrições às estruturas de purinas/pirimidinas, estes análogos podem apresentar algumas limitações como, por exemplo, o facto de não poderem ser utilizadas como sondas fluorescentes intrínsecas [9].

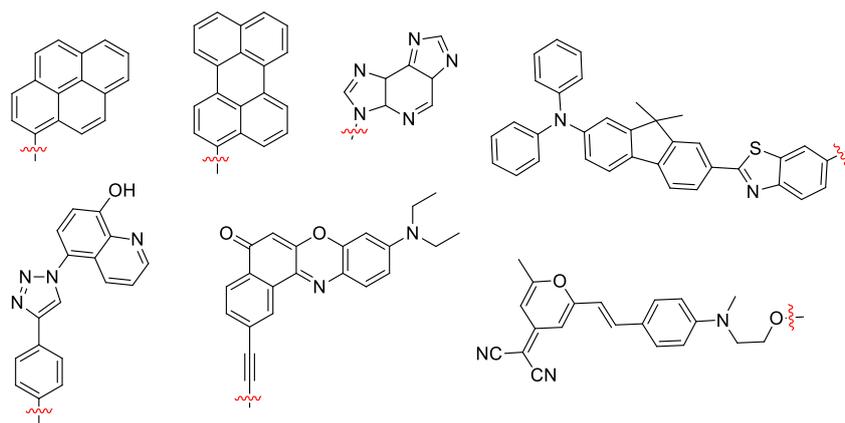


Figura 8: Exemplos de nucleobases fluorescentes não canônicas [9].

Em contrapartida, as nucleobases fluorescentes canônicas são análogos que conseguem reter algumas ou a maioria das propriedades das nucleobases nativas, como o emparelhamento Watson-Crick, ou o reconhecimento de enzimas e proteínas. Os análogos de nucleobases canônicos são restringidos por (1) uma arquitetura subjacente de purina ou pirimidina e (2) retenção de, pelo menos, dois grupos de ligações Watson-Crick, permitindo-lhes formar pares ligados por pontes de hidrogênio com uma base complementar. Como resultado dessas restrições, as posições de modificação são limitadas às regiões das bases que não bloqueiam este potencial de emparelhamento. A vantagem destas restrições pode ser o aumento do potencial para formar pares de bases ou agir como um substrato de uma enzima. Para aplicações de nucleobases fluorescentes *in vivo*, muitas vezes é desejável alterar os seus comprimentos de onda de excitação e emissão, deslocando-os para o vermelho. Essa estratégia ajuda a evitar a emissão de fundo por compostos nativos na célula, bem como a citotoxicidade decorrente da irradiação ultravioleta [9].

1.2.1. Modificações na estrutura da pirimidina

Em contraste com os análogos de purina, existem menos locais de modificação na estrutura da pirimidina, devido ao menor tamanho e maior simplicidade do sistema de anel. As modificações podem ser feitas nas posições 4, 5 e 6, deixando as posições 2 e 3 abertas para o emparelhamento (**Figura 9**). As modificações estruturais para gerar análogos de pirimidina podem ser divididas em três categorias: modificações de substituintes da purina e fusões do anel de purina, formação de análogos estendidos através de ligações conjugadas e fusões do anel de pirimidina [9].

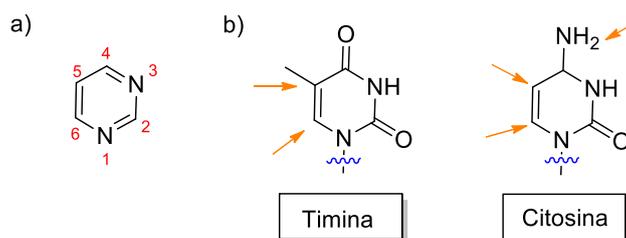


Figura 9: Estratégias moleculares para o design de análogos fluorescentes de pirimidina. a) numeração do esqueleto de pirimidina. b) possíveis locais de modificação da timina e citosina, representados pelas setas a laranja [9].

1.2.1.1. Modificações de substituintes da pirimidina

As modificações dos substituintes da pirimidina representam o maior grupo de nucleobases fluorescentes com base na estrutura da pirimidina. Num dos primeiros exemplos, m^5K (**Figura 10b**), é removido o grupo amino da posição 4 da citosina e adicionado um grupo metilo na posição 5 para fornecer uma estrutura isomórfica simples. O máximo de absorção desvia-se ligeiramente para o vermelho (de 271 para 280 nm), mas o máximo de emissão aumenta drasticamente de 324 para 400 nm. A formação de uma estrutura eletrônica *push-pull* fraca, com o grupo metilo como dador e o grupo carbonilo como aceitador, é a causa deste desvio para o vermelho na emissão.

Numa outra estratégia, a nucleobase fluorescente fraca C^{FU} pode ser sintetizada ao anexar-se um grupo furano à posição 5. Esta modificação altera significativamente as propriedades fotofísicas (desvio dos comprimentos de onda máximos de 271 para 310 nm na absorção e de 324 para 443 nm na emissão) (**Figura 10b**). Contudo, a rotação livre em torno da ligação simples entre o furano e a citosina provavelmente dissipa a energia do estado excitado, resultando num baixo rendimento quântico de fluorescência ($\Phi_F = 0,01$) [9].

Ainda dentro das modificações mais simples na estrutura da pirimidina, são de considerar os derivados de uracilo onde são empregues substituintes, como o tiofeno, o 4-metoxifenilo e o clorofenilo na posição 5 da nucleobase encontrada no RNA (**Figura 10b**). Entre esses derivados, o uso de *designs* eletrônicos *push-pull* produz resultados especialmente úteis. Por exemplo, o análogo com o substituinte 4-metoxifenilo emite com máximo a 444 nm, enquanto a nucleobase substituída pelo grupo fenilo emite a um comprimento de onda mais curto (403 nm). Tais casos deixam claro que abordar a estrutura eletrônica específica da nucleobase é importante no projeto do fluoróforo [9].

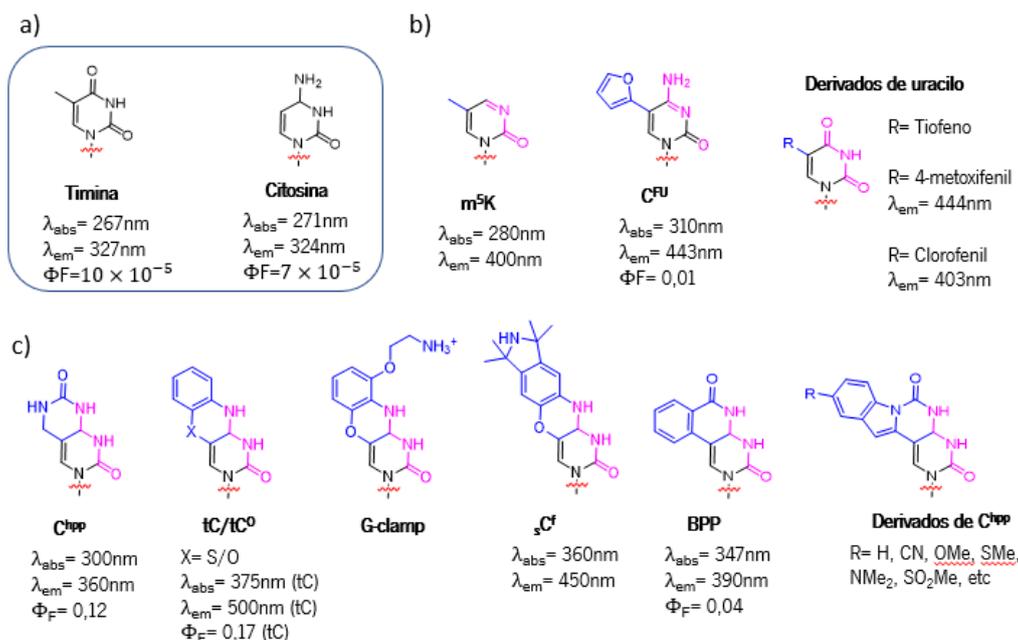


Figura 10: Estratégias moleculares para o *design* de análogos de pirimidina fluorescentes. a) Estruturas de duas pirimidinas encontradas nos ácidos nucleicos. b) Modificação dos substituintes de pirimidina na posição 5. c) Modificação dos substituintes de pirimidina nas posições 5 e 6. As extensões formam um novo anel de seis membros contendo heteroátomos, que podem ser posteriormente expandidos [9].

Na literatura podem encontrar-se ainda outras modificações de substituintes de pirimidina, originando uma grande diversidade de nucleobases fluorescentes. O C^{hpp} é um derivado da citosina com uma estrutura de uma ureia contendo um anel de seis membros anexado nas posições 4 e 5, de modo a gerar uma maior conjugação (Figura 10c). O seu máximo de absorção aumenta de 271 nm (citosina) para 300 nm, enquanto o comprimento de onda de emissão aumenta de 324 para 360 nm. O rendimento quântico também sofre um aumento de quatro ordens de magnitude, em relação à base natural ($\Phi_F = 0,12$) [9]. Geralmente, este é o caso em que o aumento da conjugação, combinado com a rigidez induzida do segundo anel, contribui significativamente para otimizar as propriedades óticas da nucleobase. O princípio de extensão do anel pode ser alterado por modificação adicional, de que é exemplo o importante análogo denominado de tC. Quando é anexado mais um grupo fenilo ao anel de seis membros contendo um átomo de enxofre, a absorção e emissão de tC sofre desvios ainda maiores para o vermelho (absorção a 375 nm, emissão a 500 nm) e aumento do rendimento quântico (Figura 10c). Esta estrutura básica também é incorporada no análogo "G-clamp", que emparelha fortemente com a citosina (Figura 10c).

A introdução do substituinte fenilo pode resultar em compostos fluorescentes adicionais, como sC^f que absorve a 360 nm e emite a 450 nm, ou como o BPP cuja absorção apresenta um máximo de

347nm e a emissão ocorre a 390nm (**Figura 10c**). Foram ainda estudados os efeitos eletrônicos usando os derivados de C^{hpp} (**Figura 10c**). Verificou-se, por exemplo, que quando o grupo R nos derivados de C^{hpp} muda de grupos doadores de elétrons (OMe, SMe) para aceptores de elétrons (CN, SO_2Me , NMe^{3+}), a densidade eletrônica nos análogos de citosina diminui e são alcançados rendimentos quânticos de fluorescência mais elevados [9].

1.2.1.2. Análogos estendidos através de ligações conjugadas

A extensão dos módulos fluorescentes na estrutura da pirimidina através de grupos ligantes conjugados é outra abordagem importante na modificação das pirimidinas. O uso de ligantes como o etinilo, anéis aromáticos ou heterociclos, de entre os quais se incluem o pireno, a fluorenona ou os corantes boro-dipirrometeno (BODIPY), permite que uma diversidade de cromóforos seja anexada às nucleobases naturais (**Figura 11b**). Até ao momento, quase toda a extensão ocorreu na posição 5 do anel de pirimidina para evitar a perturbação do emparelhamento de bases e para tirar vantagem da conjugação com o nitrogénio N^1 e com a ligação dupla 5,6. No caso do 5-etinilpireno U, a nucleobase possui as propriedades óticas do pireno, mas com uma absorção com desvio para o vermelho em 392 nm e emissão em 400 e 424 nm (**Figura 11b**). Verifica-se que a presença de diferentes substituintes no fluoróforo estendido influencia as propriedades fotofísicas, de acordo com os seus efeitos eletrônicos. Por exemplo, o 5-EPU absorve a 320 nm e emite a 400 nm; contudo, quando a posição *-para* do anel fenilo é substituída por um grupo dimetilamino dador (5-EDMAU), a absorvância desvia-se para 330 nm e a emissão muda para 450 nm. Por outro lado, ocorrem deslocamentos para o azul (ou seja, para menores comprimentos de onda) na presença de grupos de aceptores de elétrons ligados ao fenilo (5-EBNU) (**Figura 11b**).

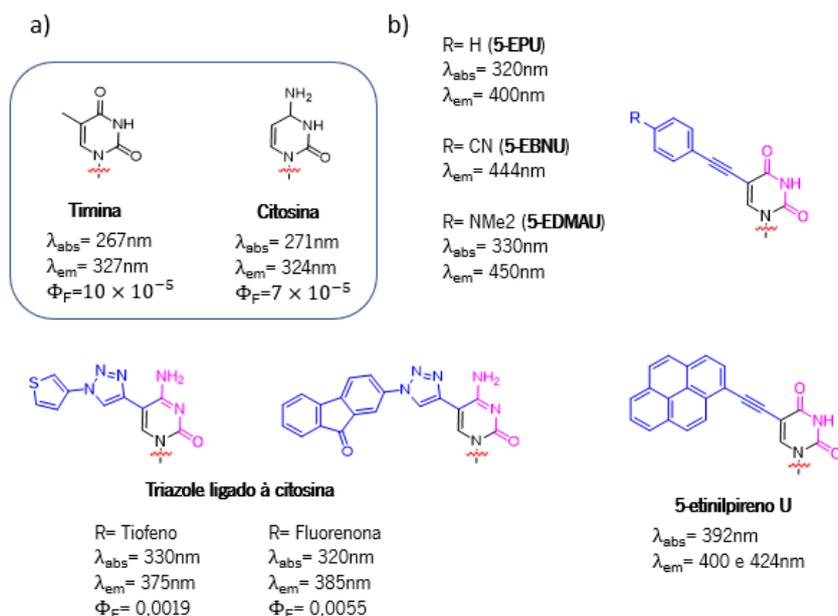


Figura 11: Estratégias moleculares para o *design* de análogos de pirimidina fluorescentes. a) Estruturas de duas pirimidinas encontradas nos ácidos nucleicos. b) Extensão dessas pirimidinas através da conjugação com grupos ligantes [9].

No entanto, nos casos atualmente relatados de citosina ligada a triazoles (**Figura 11b**), apenas é observada uma emissão de fluorescência muito fraca, possivelmente devido à ocorrência de rotação de ligações e/ou deficiência de elétrons do anel de triazole. Assim, a nucleobase ligada ao tiofeno absorve a 330 nm e emite a 375 nm, com um rendimento quântico de 0,0019 e a nucleobase ligada à fluorenona absorve a 320 nm e emite a 385 nm, com um rendimento quântico de 0,0055. Dada a baixa emissão desses compostos, seria útil uma otimização adicional para melhorar a sua aplicação prática [9].

1.2.1.3. Fusões do anel de pirimidina

A última categoria de modificações da pirimidina é a fusão do anel, que pode ser realizada nas posições 5 e 6 ou nas posições 4 e 5 sem perturbar adversamente o emparelhamento de bases. O anel adicionado pode influenciar muito as propriedades fluorescentes da nucleobase natural. Por exemplo, quando o tiofeno é fundido às posições 5 e 6 do uracilo, o análogo resultante (tieno-dU) absorve a 304 nm e emite a 412 nm, com um rendimento quântico de 0,48 (**Figura 12b**). Além disso, quando a estrutura de naftaleno é fundida à timina, o composto resultante (BgQ) exibe propriedades de fluorescência notáveis, com um rendimento quântico de 0,82 e um máximo de emissão de 434 nm (**Figura 12b**). Em comparação com o outro análogo de purina fundido com a estrutura de naftaleno (NDA,

Figura 16), que exibe estrutura não plana e, portanto, emite pouco (rendimento quântico inferior a 0,1), a forte fluorescência de BgQ pode ser atribuída à estrutura tricíclica rígida e plana [9].

xC é um exemplo de um análogo de uma nucleobase C-glicosídica de anel fundido, que pode ser excitado a um comprimento de onda curto no ultravioleta (260 nm) ou no ultravioleta mais longo (320–330 nm), e emite a um comprimento de onda 388 nm com um rendimento quântico de 0,52 (**Figura 12b**) [9].

As posições 4 e 5 das pirimidinas também podem ser facilmente expandidas através de fusões com o anel de pirrole. Por exemplo, quando o pC é excitado com luz ultravioleta a 350 nm de comprimento, este exibe um rendimento quântico moderado de 0,2 com uma emissão de 460 nm, (**Figura 12b**). O análogo com a estrutura de tiofeno exibe uma absorção com desvio para o vermelho ainda maior (370 nm) e emissão a 471 nm, com rendimento quântico de 0,42 (**Figura 12b**, tiofen-2-il pC). Finalmente, muito recentemente, um grupo dimetilaminofenilo foi fundido às posições 5 e 6 da timina, com a capacidade de quelação com o mercúrio por meio de interações eletrostáticas com outra timina (**Figura 12b**, ^{DMAT}). O par de bases com ponte metálica exibe uma maior estabilidade cinética do que o par de bases naturais e pode ser utilizado para explorar o metabolismo do mercúrio em células vivas [9].

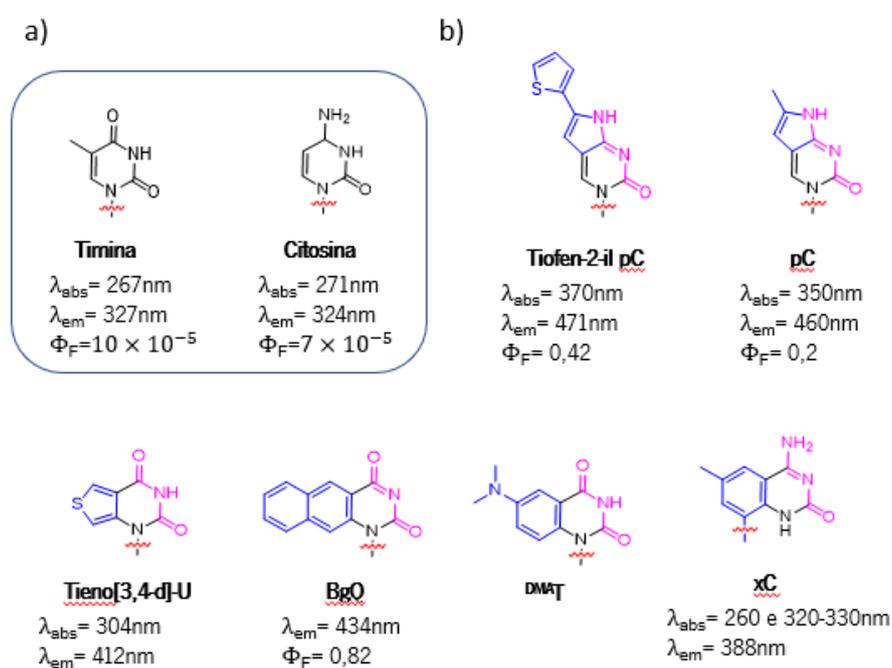


Figura 12: Estratégias moleculares para o *design* de análogos de pirimidina fluorescentes. a) Estruturas de duas pirimidinas encontradas nos ácidos nucleicos. b) Estruturas de pirimidinas modificadas por fusão de anel [9].

1.2.2. Modificações na estrutura da purina

As modificações estruturais que aumentam a fluorescência das nucleobases ocorrem principalmente no anel de cinco membros, na posição 8 da adenina e nas posições 7 e 8 da guanina (**Figura 13**). As posições 1, 2 ou 6 do anel de seis membros não são, na maioria dos casos, modificadas na classe canônica de nucleobases fluorescentes, porque o emparelhamento de bases ocorre nesses locais. No entanto, na literatura já se encontram alguns exemplos de extensão na posição 2 da adenina. Para comparar e discutir os padrões de modificação, dividiram-se as nucleobases modificadas em quatro categorias principais: modificações da estrutura do anel de purina, análogos estendidos através de ligações conjugadas, modificações de substituintes da purina e fusões do anel de purina [9].

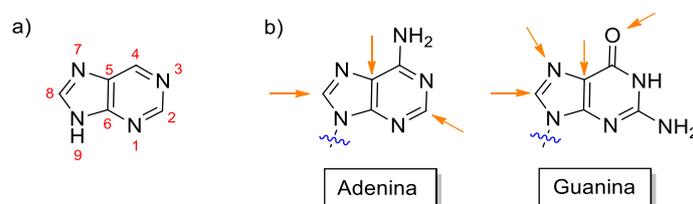


Figura 13: Estratégias moleculares para o design de análogos fluorescentes de purina. a) Numeração do esqueleto de purina. b) Possíveis locais de modificação da adenina e guanina, representados pelas setas a laranja [9].

1.2.2.1. Modificações da estrutura do anel de purina

A modificação do anel de purina é bem exemplificada pelas pteridinas, uma classe de nucleobases com dois anéis de seis membros fundidos, um anel de pirimidina e um anel de pirazina (**Figura 14b**). Ambos os comprimentos de onda de absorção e emissão das pteridinas exibem mudanças batocrômicas significativas numa gama de 100 nm, em comparação com as nucleobases naturais. Também os seus rendimentos quânticos aumentam em quatro ordens de magnitude [9].

Além disso, podem ser feitas modificações nas posições 1 e 8 das pteridinas, como acontece com os análogos 3-MI, 6-MI, 6MAP e DMAP, que têm grupos metilo num desses locais (**Figura 14b**). Comumente, as pteridinas perdem a fluorescência quando se aproximam das nucleobases canônicas, especialmente das purinas. A perda de fluorescência pode ser um fator limitante se a visualização da

fluorescência for necessária, ao passo que se o objetivo for relatar a estrutura local esta propriedade pode ser útil [9].

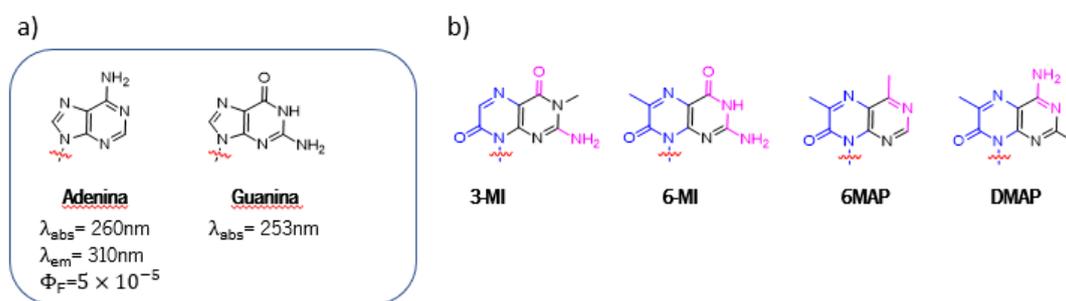


Figura 14: Estratégias moleculares para o design de análogos fluorescentes de purina. a) Estruturas das duas purinas encontradas nos ácidos nucleicos; b) Exemplos de modificações da estrutura do anel de purina [9].

1.2.2.2. Análogos estendidos através de ligações conjugadas

A extensão do sistema conjugado do anel de purina é outra importante estratégia de modificação de purinas, que apresenta um elevado potencial para deslocar o espectro de emissão. A maioria das extensões são feitas nas posições 2 ou 8, uma vez que são sinteticamente mais fáceis de alcançar e porque o emparelhamento de bases ainda pode ocorrer em alguns casos.

O fluoróforo pireno ligado à adenina (A^{PY} , A^{P} e G^{P}) permitiu que essas nucleobases fossem excitadas em intervalos que vão de comprimentos de onda ultravioleta longos a azuis curtos (380 a 420 nm), enquanto emitiam luz azul (450 a 480 nm) (**Figura 15b**) [9].

Em alguns casos mais raros, a posição 7 também pode ser modificada com extensões que conferem fluorescência e que envolvem a substituição do nitrogênio por um carbono na posição 7, de modo preservar a aromaticidade. Um exemplo é a ligação de um fluoróforo bi-piridilo de rutênio à posição 7 da guanina através de um grupo alquino (**Figura 15b**). Alternativamente, pontes ligantes fenilo e dieno foram também relatados (**Figura 15b**, A^{BG} , D^{ABG}). Essas nucleobases preservam a conjugação entre a porção estendida e o sistema eletrônico do anel original, permitindo assim que o emparelhamento de bases e o ambiente local afetem as propriedades óticas de todo o fluoróforo. Essa sensibilidade ambiental, decorrente da transferência de carga interna entre a extensão e a nucleobase natural, resulta em desvios para o vermelho e mudanças no rendimento quântico de fluorescência. Por exemplo, o A^{P} emite a 430 nm em metanol com um rendimento quântico de 0,73, ao passo que por incorporação numa cadeia de

DNA, o comprimento de onda de emissão desloca-se para o vermelho (450-480 nm), com uma queda no rendimento quântico [9].

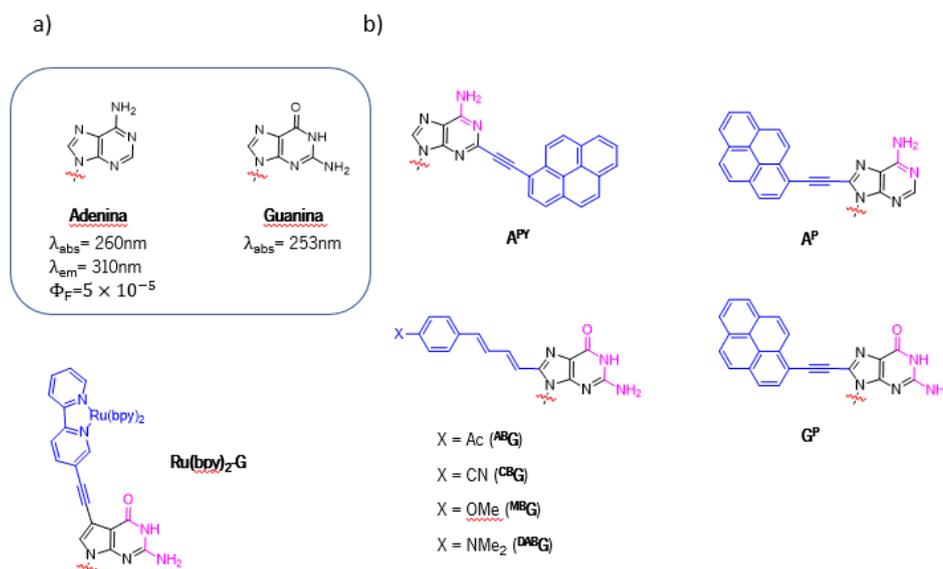


Figura 15: Estratégias moleculares para o *design* de análogos fluorescentes de purina. a) Estruturas das duas purinas encontradas nos ácidos nucleicos; b) Exemplos de análogos estendidos através de ligações conjugadas [9].

1.2.2.3. Fusões do anel de purina

Uma outra estratégia de modificação das purinas é a fusão de um outro anel com o anel de purina. A maioria das fusões é realizada nas posições 7 e 8 do anel de imidazole, de modo a evitar uma perturbação no emparelhamento de bases (**Figura 13**). Essas modificações foram projetadas de modo a obter sistemas com tamanhos variados, envolvendo anéis/substituintes tais como o benzeno ou o naftaleno. Uma exceção importante, feita por Leonard [30], foi a obtenção da benzopurina, que envolveu a inserção de um grupo fenilo entre os anéis de imidazole e de pirimidina (**Figura 16b**, xA e xG). A introdução da estrutura tricíclica expandiu significativamente a conjugação aromática, resultando no aumento da intensidade de fluorescência e desvios nos comprimentos de onda para o vermelho [9].

Os sistemas fundidos ^{MDI}, ^{MDA} e NDA emitem por volta dos 380–420 nm (**Figura 16b**). No entanto, estes são menos fluorescentes (rendimentos quânticos por volta de 12%) devido, possivelmente, à dissipação de energia rotacional do grupo metoxilo ou à distorção estrutural do anel tetracíclico. Os derivados de adenina e de guanina xA e xG, respetivamente, são fortemente fluorescentes, exibindo rendimentos quânticos acima de 40% [9].

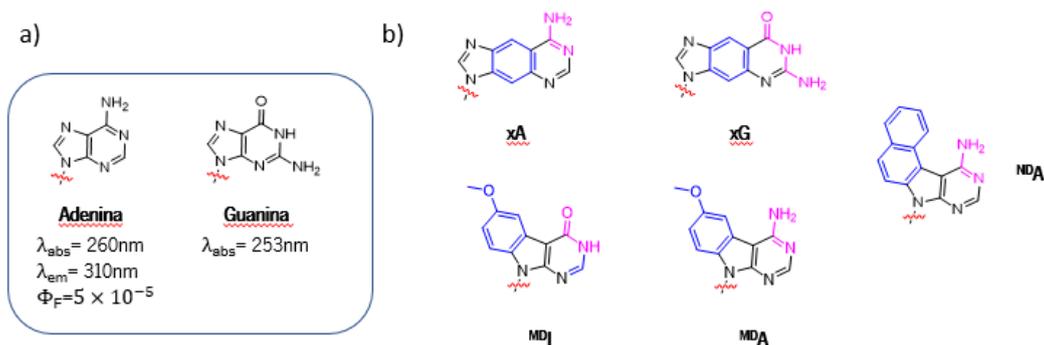


Figura 16: Estratégias moleculares para o *design* de análogos fluorescentes de purina. a) Estruturas das duas purinas encontradas nos ácidos nucleicos; b) Exemplos de modificações do tipo fusão de anel [9].

1.2.2.4. Modificações de substituintes da purina

A modificação do substituinte na purina é, atualmente, a categoria mais utilizada no *design* de nucleobases fluorescentes. As modificações focam-se tanto na permuta dos substituintes originais da purina por novos grupos funcionais, quanto na adição de substituintes na estrutura central da purina.

Uma das primeiras modificações a ser realizada e que, até aos dias hoje, tem sido recorrentemente utilizada consistiu na obtenção do análogo da adenina 2-aminopurina (2AP). Em relação à nucleobase natural, este análogo difere apenas na posição do grupo amina (posição 2 na 2AP e posição 6 na adenina). Após a modificação que deu origem à 2AP, também foi descoberto um outro análogo, a 2,6-diaminopurina (DAP), que adiciona um segundo grupo amino na posição 2 da adenina (**Figura 17b**). A 2AP e a DAP sofrem um desvio no comprimento de onda para o vermelho em relação à adenina de cerca de 50 e 30 nm, respetivamente.

Entre os análogos de guanina preparados, destacam-se a substituição do carbono na posição 8 por um nitrogénio (8-AzaG) e a substituição do nitrogénio na posição 7 por um enxofre (4-tieno [3,2-*d*]-R) (**Figura 17b**). Embora ambas as nucleobases emitam em comprimentos de onda semelhantes (cerca de 347 e 351 nm, respetivamente), os seus máximos de absorção diferem consideravelmente (256 e 294 nm, respetivamente).

As propriedades fotofísicas das purinas também podem ser facilmente ajustadas acrescentando pequenos grupos funcionais. Por exemplo, ao adicionar um grupo vinilo à posição 8 de qualquer adenina (8vA) ou guanina (8vG), a emissão pode mudar para o vermelho (382 nm ou 400 nm) e resultar em rendimentos quânticos notáveis de 0,66 e 0,72, respetivamente (**Figura 17b**) [9].

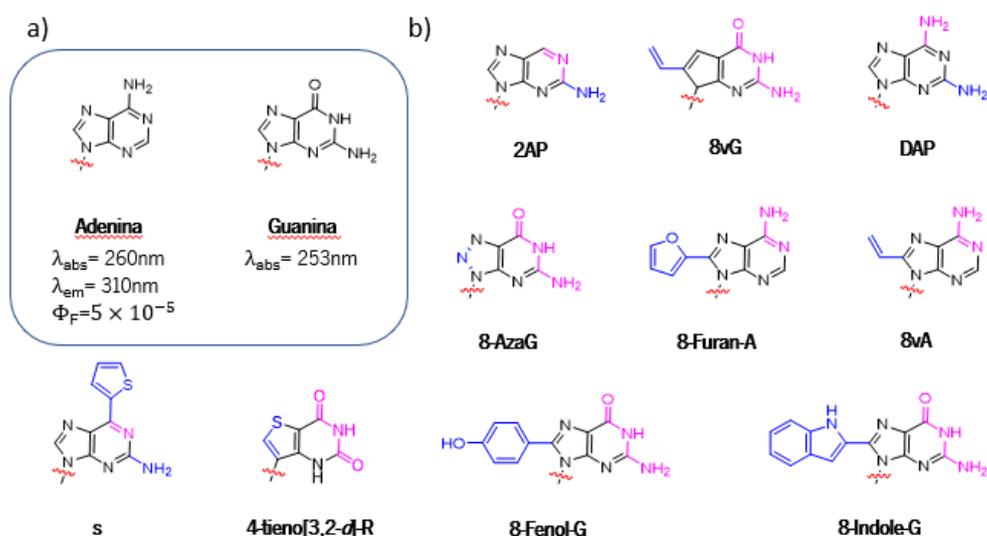


Figura 17: Estratégias moleculares para o *design* de análogos fluorescentes de purina. a) Estruturas das duas purinas encontradas nos ácidos nucleicos; b) Exemplos de modificações de substituintes do anel de purina [9]

Outra modificação importante é a adição de estruturas aromáticas não emissivas e externas às nucleobases naturais. A maioria das modificações acontece na posição 8 com algumas exceções na posição 6. Quando um grupo tiofeno é colocado na posição 6 da guanina, o comprimento de onda de absorção da nucleobase aumenta para 348 nm, enquanto a emissão aumenta para 434 nm (**Figura 17b, s**). Adicionalmente, quando o grupo furano é anexado à posição 8 da adenina, o seu comprimento de onda de emissão também aumenta para 374 nm, enquanto os grupos fenol ou indole desviam para o vermelho a emissão da guanina (para cerca de 390 nm) (**Figura 17b, 8-Furan-A, 8 Fenol-G e 8-Indol-G**). Nestes casos, as evidências (principalmente, a sensibilidade ao meio ambiente) sugerem que o mecanismo de transferência de carga interna resulta no aumento dos rendimentos quânticos e em desvios para maiores comprimentos de onda [9].

1.3. Introdução geral sobre purinas

1.3.1. Purina

A purina ou imidazo[4,5-*d*]pirimidina é um composto orgânico heterocíclico aromático, constituído por um anel de pirimidina fundido com um anel de imidazole (**Figura 18**). As purinas, incluindo as substituídas e os seus tautómeros, são o tipo mais abundante de compostos heterocíclicos de nitrogénio, presentes na natureza [31]–[34]. Esta estrutura foi descoberta no final do século XIX por Emil Fischer,, que demonstrou ainda, através de uma série de transformações, que os compostos naturais como a adenina, guanina, cafeína, entre outros, correspondem a diferentes derivados desta estrutura fundamental (**Figura 18**) [32], [33].

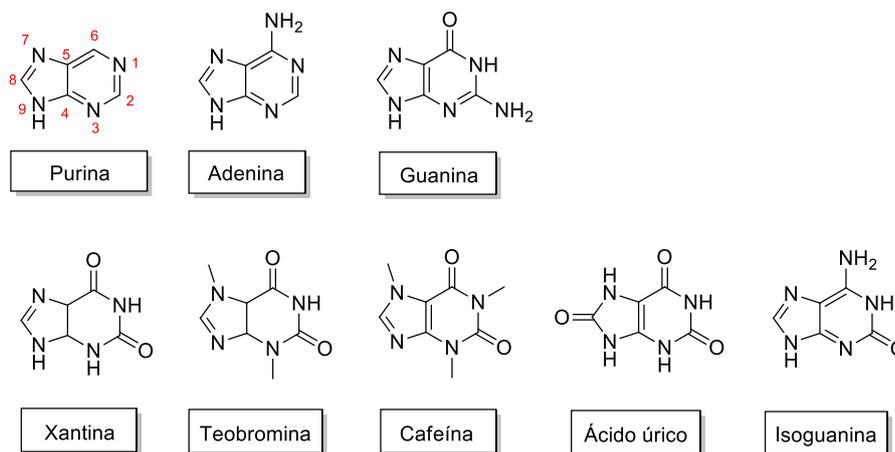
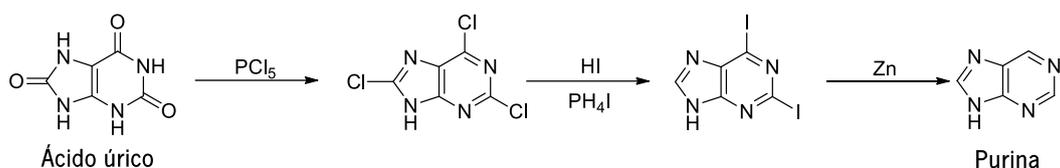


Figura 18: Estrutura da purina e alguns exemplos de derivados de purina encontrados na natureza [32], [33].

Em 1899, Emil Fischer sintetizou pela primeira vez a purina fazendo reagir o ácido úrico com PCl_3 para obter a 2,6,8-tricloropurina, a qual foi posteriormente convertida na 2,6-diiodopurina através da utilização de HI e PH_4I . Por fim, a redução desta diiodopurina com zinco, possibilitou o isolamento da purina (**Esquema 1**) [33].



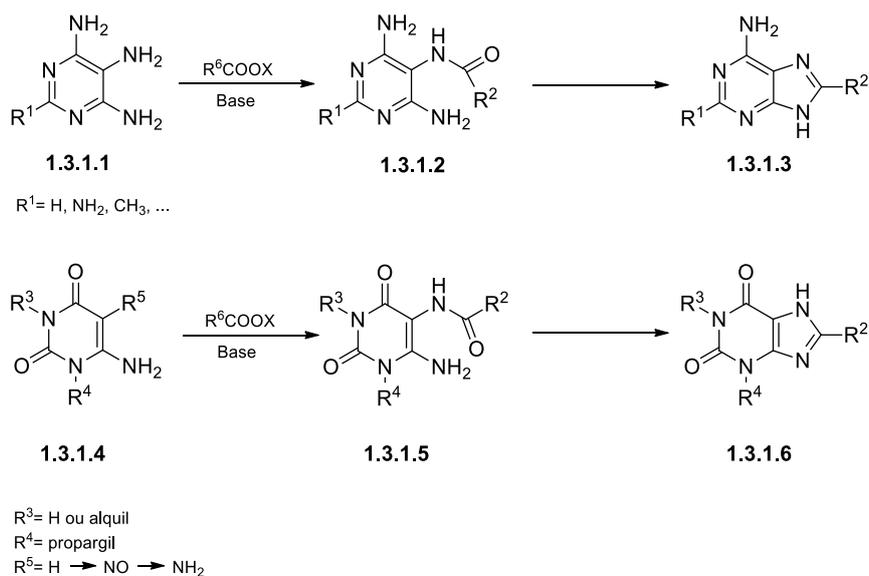
Esquema 1: Síntese da purina a partir do ácido úrico [33].

1.3.1. Síntese de purinas

Sendo um dos heterociclos mais estudados na química medicinal devido à sua abundância na natureza e por ser uma estrutura que faz parte da constituição dos ácidos nucleicos (DNA e RNA), a purina tornou-se um alvo atraente para a modificação química [31], [33].

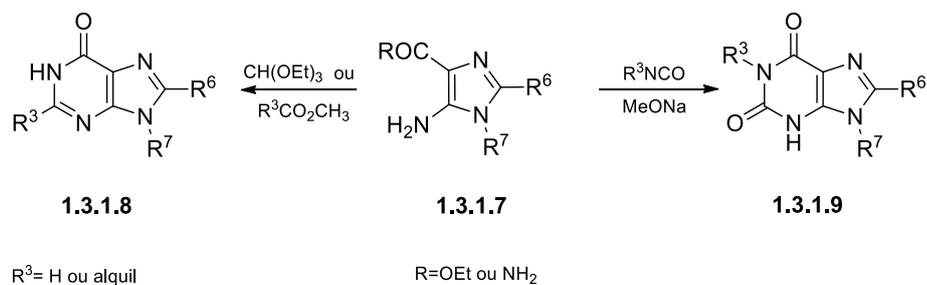
Em geral, existem três estratégias sintéticas que são aplicadas para realizar modificações estruturais na purina. Uma das estratégias consiste na modificação de um anel de purina ativada para o ataque nucleofílico. Alternativamente, as outras duas estratégias consistem na ciclização intramolecular de precursores de pirimidina ou de imidazole, gerando o segundo heterociclo (imidazole ou pirimidina) constituinte da estrutura da purina [31].

(1) Síntese de purinas a partir de pirimidinas. Uma das abordagens para a síntese de purinas a partir de um precursor do tipo pirimidina é denominada de *N*-acilação de diaminopirimidinas (1.3.1.1 e 1.3.1.4). Esta síntese é iniciada pela formação dos intermediários *N*-acilados (1.3.1.2 e 1.3.1.5) e seguida pela ciclização intramolecular do anel, originando as adeninas 2,8-dissubstituídas (1.3.1.3) e análogos de teofilinas e xantinas (1.3.1.6) - **Esquema 2** [32].



Esquema 2: Síntese de dois exemplos de análogos de purina a partir de duas pirimidinas [32].

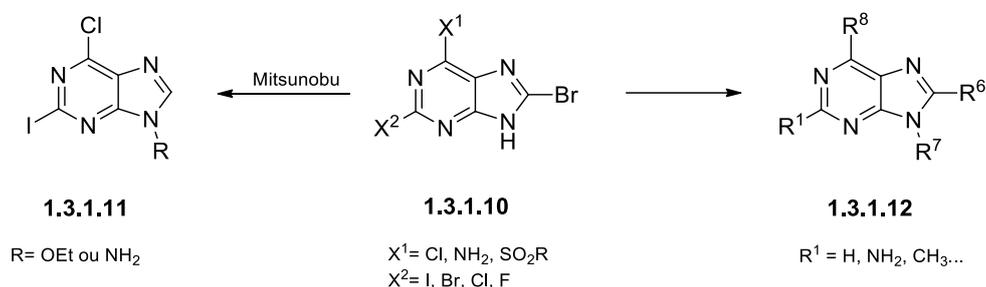
(2) **Síntese de purinas a partir de imidazoles.** Alternativamente, o anel de seis membros pode ser obtido a partir do derivado do ácido 5-aminoimidazole-4-carboxílico (**1.3.1.7**) com isocianatos, obtendo assim purinas substituídas do tipo **1.3.1.9**. Quando são utilizados derivados de éster ou ortoformatos, o substituinte R, que poderá ser H ou alquilo, é introduzido no produto em C-2 do anel de purina **1.3.1.8** (**Esquema 3**) [32].



Esquema 3: Síntese de dois exemplos de análogos de purina a partir do imidazole (**1.3.1.7**) [32].

(3) **Síntese de purinas a partir de uma purina ativada.** As purinas substituídas nas posições 2, 6 e 8 (**1.3.1.12**) também são obtidas através da reação de intermediários de purina adequadamente ativados (**1.3.1.10**) para sofrerem reações de substituição nucleofílica aromática, reações de alquilação e reações de acoplamento catalisadas por metais de transição. Reações de *N*-alquilação/acilação e outras reações eletrofílicas, também podem ser usadas para introduzir substituintes diferentes no átomo de nitrogênio

(1.3.1.11) (Esquema 4). Um exemplo dessa metodologia é a alquilação de purinas em *N*-9, sob condições de Mitsunobu [32].



Esquema 4: Síntese de análogos de purinas a partir de uma purina ativada [32].

Os métodos aqui descritos são os mais relatados na literatura e são os que apresentam vias de síntese já bem estabelecidas. Contudo, estes métodos trazem algumas desvantagens como, por exemplo, o elevado custo de reagentes comerciais, utilização de catalisadores metálicos (no caso do ponto 3), a instabilidade de alguns reagentes que podem ser facilmente oxidados e até mesmo a dificuldade de introdução de substituintes mais complexos [32].

Grandes avanços foram feitos nos últimos anos para explorar as propriedades biológicas das purinas e, atualmente, existe um número impressionante de derivados de purina promissores para o tratamento de cancro, asma, diabetes, depressão, entre outras aplicações. Contudo, devido a algumas desvantagens apresentadas por estes derivados, é necessário que esta estrutura tão fundamental continue a ser explorada. Além disso, o aumento de técnicas analíticas poderá promover a descoberta de novos derivados com diferentes aplicações e vantagens em relação ao que já existe atualmente [31], [32].

1.4. 2-Aminopurina (2AP)

A 2-aminopurina (2AP), um análogo da adenina e da guanina, foi um dos primeiros nucleósidos fluorescentes a surgir. Difere estruturalmente da adenina apenas na posição do grupo amino exocíclico, e da guanina apenas no grupo da posição C-6, apresentando uma fluorescência mais elevada do que as bases naturais (**Figura 19**) [9], [11], [41], [42], [17], [19], [35]–[40].

A 2AP tem sido extensivamente estudada devido à sua capacidade de gerar mutações genéticas em sistemas procariotas [35], [43]. Contudo, mais recentemente, a 2AP tem sido utilizada como uma sonda específica do local da estrutura e dinâmica dos ácidos nucleicos, devido à sua capacidade de formar pares de bases Watson-Crick com a timina e o uracilo. Uma das vantagens da 2AP é que esta apresenta fluorescência a um pH neutro, sendo que pode ser utilizada como sonda fluorescente em estudo de mudanças conformacionais do DNA [36]–[42]. Desta forma, diferentes rotas de síntese do nucleósido ribose e correspondente 2'-desoxirribose da 2-aminopurina foram sendo desenvolvidas [44], [45].

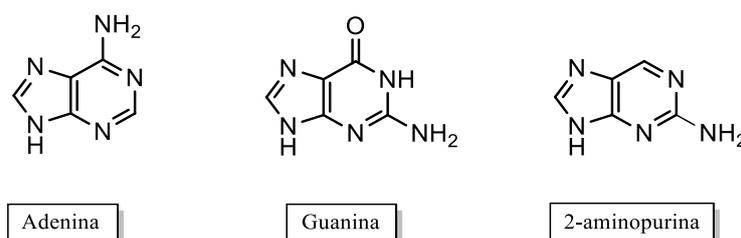
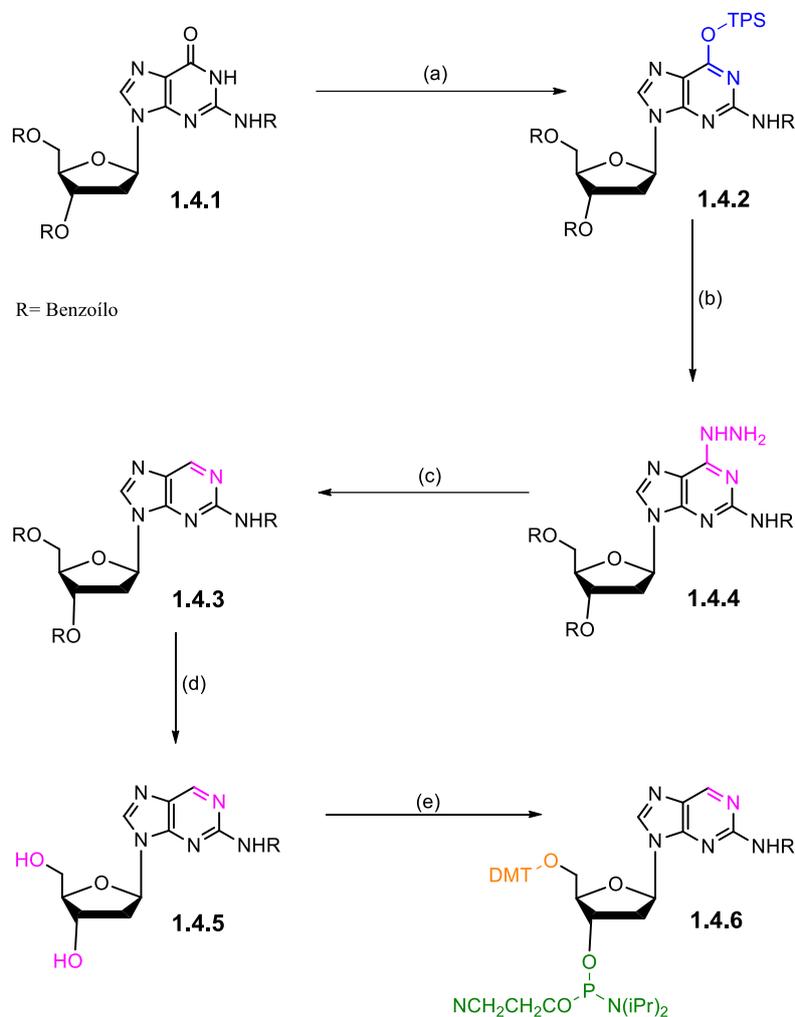


Figura 19: Estrutura da adenina e guanina e do seu análogo 2-aminopurina [11], [17], [42].

Os oligonucleotídeos contendo 2-aminopurina foram sintetizados pela primeira vez por Eritja, no final do século XX, que descreveu a síntese do derivado benzilado *N*²-Bz-2-aminopurina-2'-desoxirribósido a partir da 2'-desoxiguanosina [46].

Esta síntese (**Esquema 5**) inicia-se com a proteção dos grupos hidroxilo das posições 3' e 5' e do grupo 2-amino, com o grupo benzilo, no derivado da 2'-desoxiguanosina (**1.4.1**). De seguida, a posição 6 é ativada com o grupo triisopropilbenzenosulfonilo (TPS) para obter o derivado **1.4.2**, que é convertido na 6-hidrazinopurina correspondente **1.4.3** após a reação com a hidrazina. A redução da 6-hidrazinopurina **1.4.3** com óxido de prata gera o composto **1.4.4** que, após hidrólise com NaOH, forma o *N*²-ibu-2'-aminopurina-2'-desoxirribósido **1.4.5**. A reação com cloreto de 4,4'-dimetoxitritilo seguida de

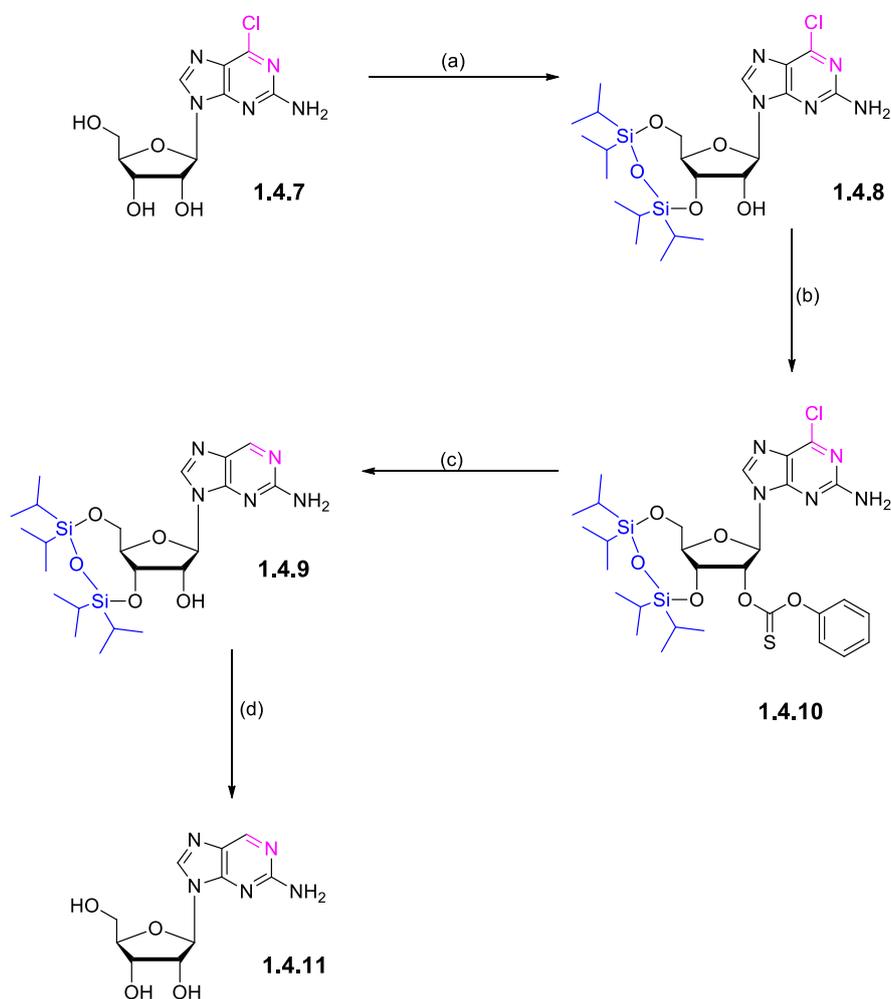
tratamento com a 2-cianoetil-*N,N*-diisopropilclorofosforamidite e diisopropiletilamina permitiu gerar a fosforamidite de 2-aminopurina **1.4.6** [47].



Esquema 5: Esquema de síntese utilizado para a preparação de fosforamidite de 2-aminopurina protegida (**1.4.6**). (a) DIPEA/TPS-Cl/DMAP; (b) $\text{NH}_2\text{-NH}_2$; (c) Ag_2O ; (d) NaOH ; (e) DMT-Cl/clorofosfina [47].

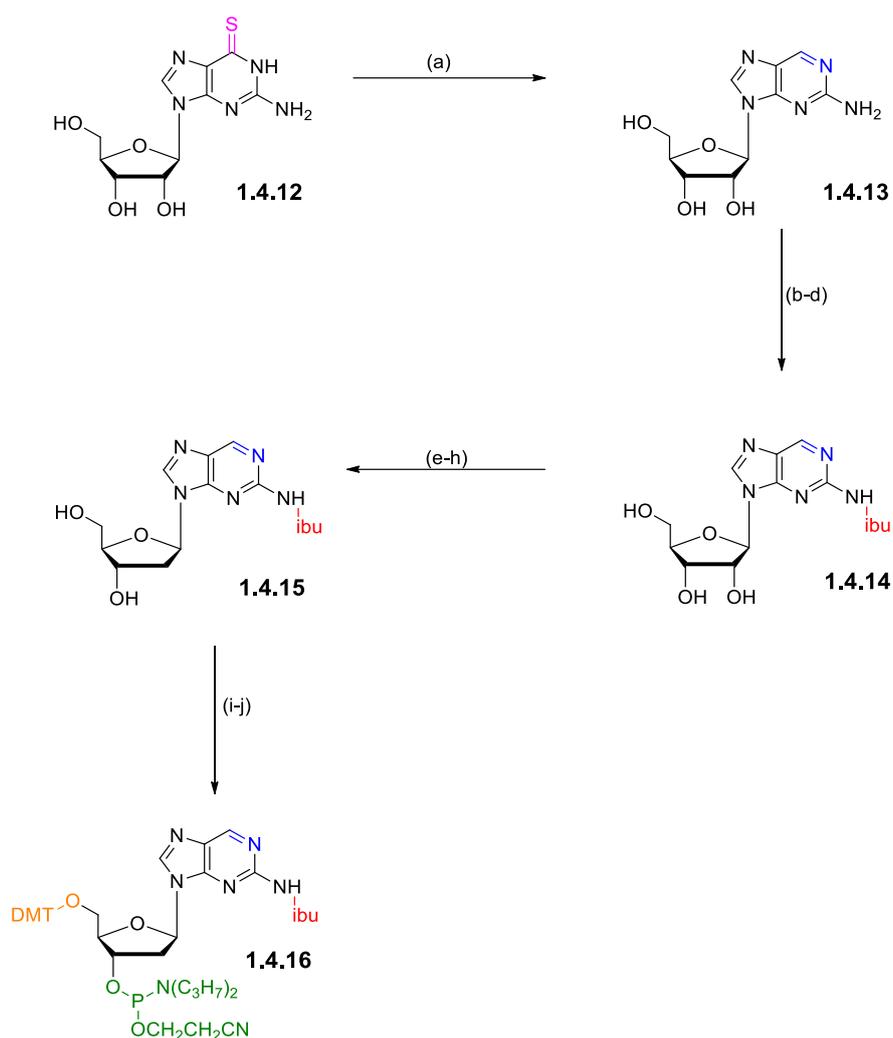
Outro método descrito na literatura demonstra uma síntese mais eficiente do 2-aminopurina-2'-desoxirribósido, que apresenta vantagens sobre os métodos existentes, tal como o facto do procedimento não requerer nenhuma proteção da função amina exocíclica no composto de partida. Os grupos 3'- e 5'- foram protegidos com 1,3-dicloro-1,1,3,3-tetraisopropildissiloxano (reagente Markiewicz) e o grupo hidroxilo 2' foi posteriormente transformado no tioéster fenoxitiocarbonilo (**Esquema 6, 1.4.10**). A

redução da posição 6' da base heterocíclica e da posição 2' do açúcar em simultâneo ocorre com a adição de hidreto de tri-butilestanho, originando a 2-aminopurina-2'-desoxirribose [44].



Esquema 6: Esquema de síntese utilizado para a preparação do derivado de 2-aminopurina-2'-desoxirribósido através da redução da 6-cloroguanosina. (a) 1,3-dicloro-1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano/piridina/DMF; (b) Ph(=S)OCl/DMAP/acetonitrilo; (c) fluoreto de tetra-*n*-butilamónio/THF/dioxano; (d) hidreto de tri-butilestanho/ABN/benzeno [44].

Outro método descrito parte da tioguanosina (1.4.12), que é reduzida com níquel de Raney para obter o ribonucleósido de 2-aminopurina (1.4.13). Neste método, o grupo 2-amino do ribonucleósido é protegido com cloreto de trimetilsililo (TMSCl) e, de seguida, com cloreto de isobutirilo (Esquema 7, 1.4.14). O ribonucleósido protegido é convertido em desoxirribonucleósido (1.4.15) por desoxigenação seletiva do grupo 2'-hidroxilo que, posteriormente, foi convertido na *N*-isobutiril-2-aminopurina-2'-desoxirribonucleósido-5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)-3'-O-(2-cianoetil)-*N,N*-diisopropilfosforamidite (1.4.16). Esta foi convertida na fosforamidite de 2-aminopurina pelo método padrão [46].



Esquema 7: Esquema de síntese utilizado para a preparação de fosforamidite de 2-aminopurina (a) níquel de Raney/H₂O; (b) cloreto de trimetilsililo/piridina; (c) cloreto de isobutirilo; (d) NH₄OH; (e) 1,3-dicloro-1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano/piridina; (f) fenilclorotionocarbonato/ 4-*N,N*-dimetilaminopiridina/acetoneitrilo; (g) hidreto de tri-*n*-butilestanho /2,2'-azobis(2-metilpropanitrilo)/tolueno; (h) fluoreto de tetra-*n*-butilamônio; (i) cloreto de 4,4'-dimetoxitritilo/ piridina; (j) 2-cianoetil-*N,N'*-diisopropilclorofosforamidite/diisopropiletilamina/acetoneitrilo [46].

Ao contrário da adenina (6-aminopurina), o seu isômero 2AP é a nucleobase mais estudada por ser fortemente fluorescente em água ($\Phi_F = 0,66$). É comumente utilizado para substituir a adenina no DNA em estudos da estrutura e dinâmica dos ácidos nucleicos, devido à sua capacidade de formar pares de bases Watson-Crick com a timina e o uracilo [11], [36], [40], [42]. A 2AP mostra ainda um tempo de vida relativamente longo ($\tau \approx 11$ ns) em solução aquosa, enquanto que o seu tempo de vida diminui em solventes polares apróticos e também em solventes não polares [40].

A adenina é conhecida por tautomerizar através da transferência de um próton entre *N*7 e *N*9 e ambas as estruturas estão presentes em solventes polares [13], [17], [48]. De forma a evitar esse tautomerismo, foi introduzido um grupo etilo na posição *N*9 da 2-aminopurina. Pela **Tabela 2** verifica-se que ocorre uma diminuição do comprimento de onda máximo de emissão e do rendimento quântico de fluorescência, à medida que diminui a polaridade do solvente [48].

Tabela 2: Comprimento de onda máximo de emissão (λ_{em}) e rendimento quântico (Φ_F) da 9-etil-2-aminopurina em diferentes solventes [48].

Solvente	λ_{em} (nm)	Φ_F
Água	370	0,680
Etanol absoluto	366	0,350
Dioxano	360	0,130
Clorofórmio	355	0,085
Ciclohexano	344	0,010
Benzeno	345	0,013

A polaridade do solvente demonstrou ser importante para a fluorescência da 2AP [40]. A hipótese mais bem-sucedida ficou conhecida como efeito de proximidade, que interpreta a diminuição nas propriedades emissivas da 2AP, em solventes apolares, em termos de conversão interna causada pelo acoplamento vibracional entre os estados $\pi\pi^*$ e $n\pi^*$ [11], [40].

Os máximos de absorção e emissão da 2AP ($\lambda_{abs}=303$ nm e $\lambda_{em}=370$ nm a pH neutro) são desviados para o vermelho (**Figura 20**) em relação às bases naturais, o que permite a excitação seletiva mesmo em grandes fragmentos de DNA [36], [42].

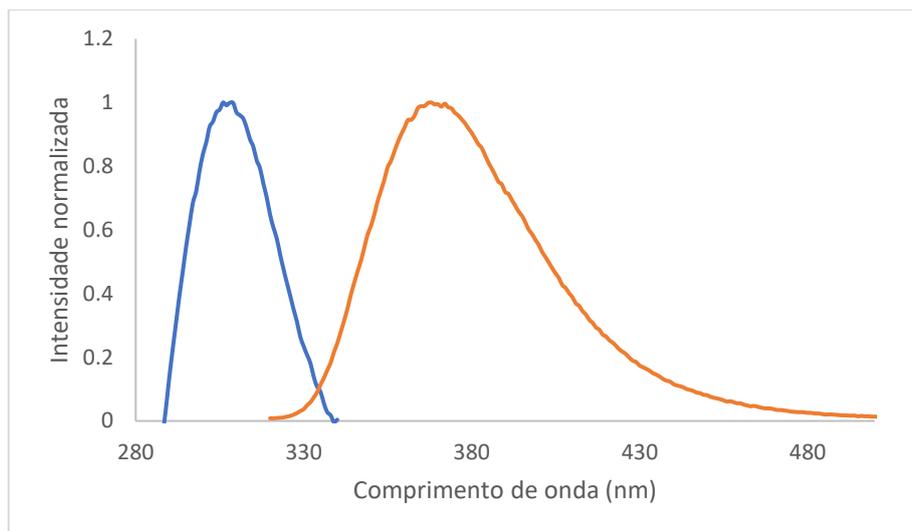


Figura 20: Espectro de absorção (azul) e espectro de emissão (laranja) da 2AP numa solução tampão de pH=7,3.

A fluorescência da 2AP sofre um decaimento quando incorporada no DNA. Esta redução na fluorescência é atribuída a interações de empilhamento com nucleobases vizinhas mais próximas e, portanto, esta propriedade foi explorada para estudar pares de bases incompatíveis e ligação de íons metálicos, bem como a termodinâmica e cinética de transições conformacionais do DNA induzidas por proteínas [36]–[42]. Os processos de transferência de carga (CT) foram recentemente utilizados para explicar os mecanismos de extinção da fluorescência da 2AP. A transferência de elétrons e/ou lacunas entre um par dador (D) e aceitador (A) são processos complementares de CT. Na **Figura 21** encontram-se esquematizados os processos de transferência de lacunas e de elétrons. No primeiro caso, a carga positiva (A^+) é transferida para um local com um potencial de ionização mais baixo (a guanina tem o potencial de ionização mais baixo das nucleobases), retirando um elétron da orbital HOMO (do inglês *Highest Occupied Molecular Orbital*) do dador (A^+ é considerada uma molécula aceitadora de elétrons). Por outro lado, no lado direito da figura, um elétron é transferido para um local de maior afinidade eletrônica (a timina tem a maior afinidade eletrônica das nucleobases). É sugerido que o decaimento da fluorescência da 2AP é devido à transferência de uma lacuna para purinas vizinhas, ou por transferência de elétrons para pirimidinas vizinhas [36], [42].

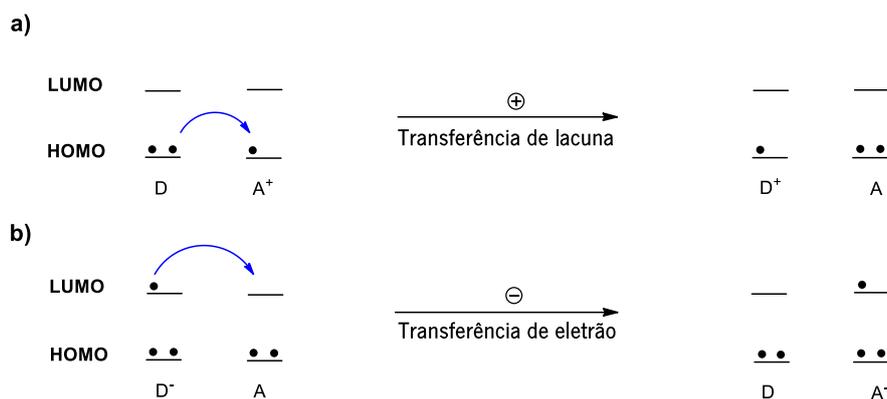


Figura 21: Representação da transferência de lacunas (esquerda) e transferência de elétrons (direita) como etapas elementares de transferência de carga [14]. LUMO: do inglês *Lowest Unoccupied Molecular Orbital*,

Uma vez que a 2AP apresenta vantagens em relação às bases naturais, a síntese de análogos deste isômero da adenina tornou-se um grande interesse da comunidade científica, uma vez que tornaria possível alargar os estudos devido às diferentes propriedades obtidas para cada análogo.

Ao longo dos anos, foram desenvolvidas novas sondas fluorescentes análogas à 2AP – **Figura 22** – com propriedades diferentes entre si [3].

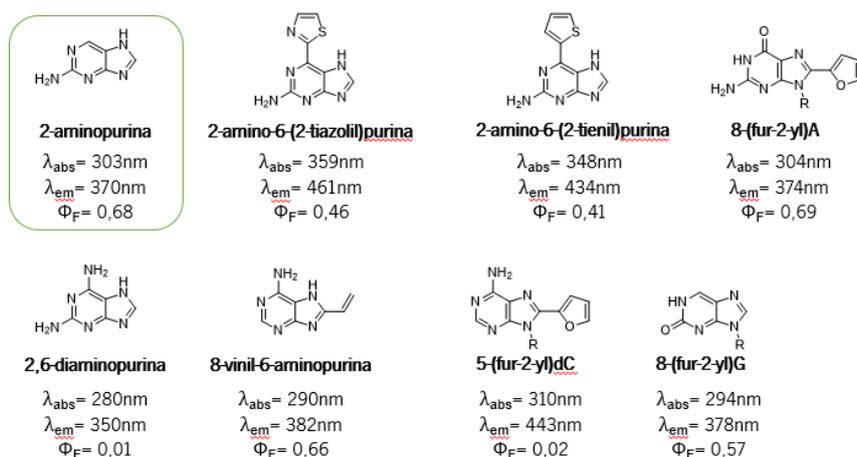


Figura 22: Exemplos de análogos da 2AP e das nucleobases naturais e respetivas propriedades fotofísicas [3].

Contudo, este campo de estudo ainda é recente e, portanto, a descoberta de novos análogos fluorescentes com propriedades de absorção e emissão deslocadas para o vermelho é de grande interesse para a ciência.

Neste sentido, o trabalho realizado consistiu na síntese de novos análogos da 2AP, de modo a alargar os estudos nesta área, tão importante para a continuidade da vida.

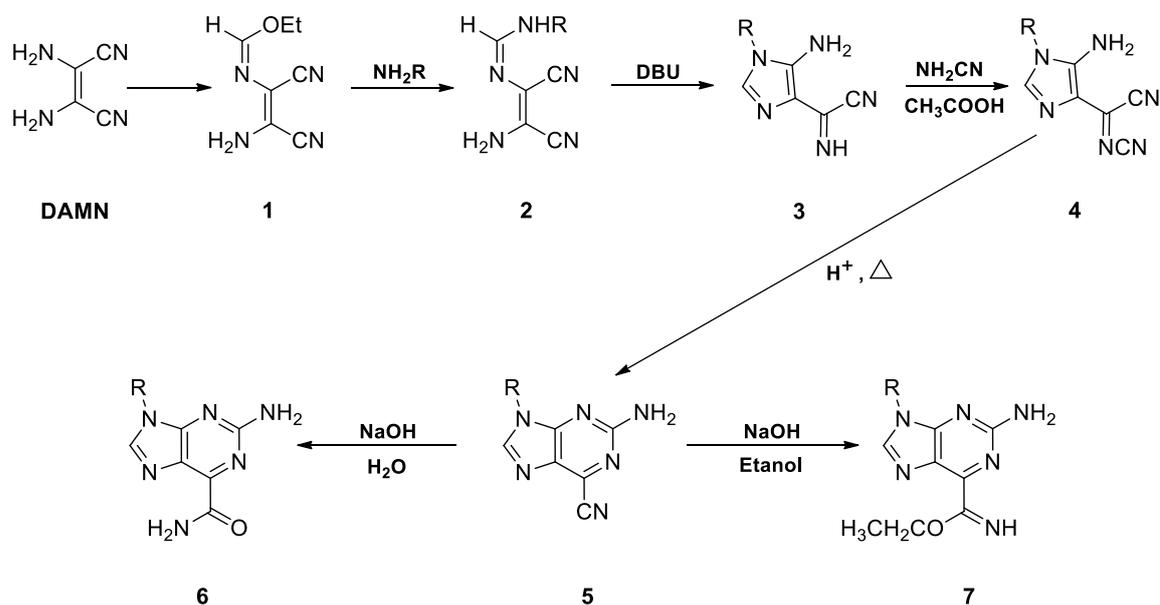
2. Resultados e discussão

2.1. Introdução

Este trabalho experimental foi dividido em duas tarefas. A primeira tarefa consistiu na síntese de novos análogos da 2-aminopurina (**Figura 19**) como potenciais sondas fluorescentes. A segunda tarefa envolveu a avaliação das propriedades fotofísicas dos compostos sintetizados na primeira parte do trabalho experimental.

O trabalho experimental realizado na primeira tarefa envolveu 7 etapas reacionais (**Esquema 8**). As cinco primeiras etapas envolvem sínteses já conhecidas dos compostos **1**, **3**, **4** e **5** [49]–[51] e todas as reações foram repetidas para diferentes substituintes (R), de modo a provar a reprodutibilidade dos métodos.

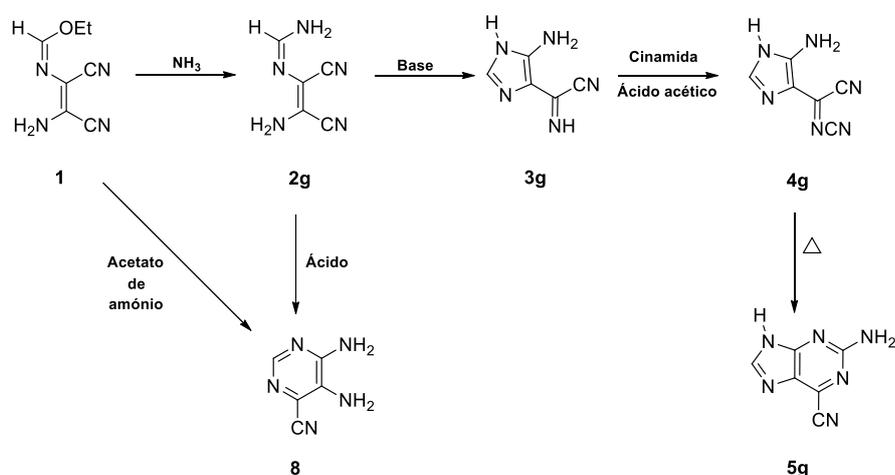
A última etapa consistiu no desenvolvimento de métodos para a síntese dos novos compostos **6** e **7**. Tratando-se de reações novas, foi necessário investigar as condições reacionais adequadas e repetir os ensaios para diferentes substituintes (R), de modo a provar a reprodutibilidade dos métodos de cada síntese.



Esquema 8: Sequência reacional prevista para a síntese dos compostos **5**, **6** e **7** a partir do imidato **1**.

Contudo, todos os compostos **5** sintetizados no início do trabalho possuem substituintes na posição *N*-9 que podem influenciar não só as propriedades físicas, tais como a solubilidade nos diferentes solventes, como também as propriedades fotofísicas. De modo a ser possível uma melhor comparação das propriedades fotofísicas dos compostos **5** com a 2AP, procedeu-se à síntese do composto **5g** que, em termos de estrutura, apenas difere da 2AP pela presença de um grupo nitrilo na posição C-6 do anel de purina.

Começou-se por investigar as condições mais adequadas para a síntese do 5-amino-4-cianoformimidoil-1*H*-imidazole (**3g**) a partir do imidato **1** e acetato de amónio. Durante este processo descobriu-se que esta reação não seguia o caminho da formação do composto **3g**, mas evoluía para a formação do composto **8** (Esquema 9). Uma vez que este composto demonstrava ser promissor devido à sua estrutura e ao facto de apresentar fluorescência, prosseguiu-se para o estudo das melhores condições reacionais para a sua síntese. Este estudo mostrou que o composto **8** também pode ser obtido por tratamento da amidina **2g** com ácido. Em paralelo, investigou-se também a reatividade de **2g** com base de modo a encontrar as melhores condições para obter o imidazole **3g**. A partir de **3g** foi possível incorporar a unidade de cianamida, para gerar a molécula alvo **5g** através do intermediário **4g**.



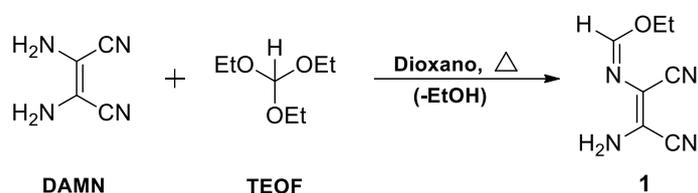
Esquema 9: Sequência reacional prevista para a síntese 2-amino-9*H*-purina-6-carbonitrilo (**5g**) a partir do imidato **1**.

Na segunda tarefa do trabalho foram preparadas soluções dos compostos **5**, **6a**, **7a** e **8**, em diferentes solventes e em soluções tampão com diferentes valores de pH. Em seguida, avaliaram-se as propriedades fotofísicas, nomeadamente a absorvância e a emissão de fluorescência de cada solução preparada. Também foi realizado um ensaio de fluorescência em membranas modelo, para inferir a possibilidade de o composto **8** ser usado como sonda de biomembranas.

2.1.1. Síntese de *N*[(*Z*)-2-amino-1,2-dicianovinil] formimidato de etilo (**1**).

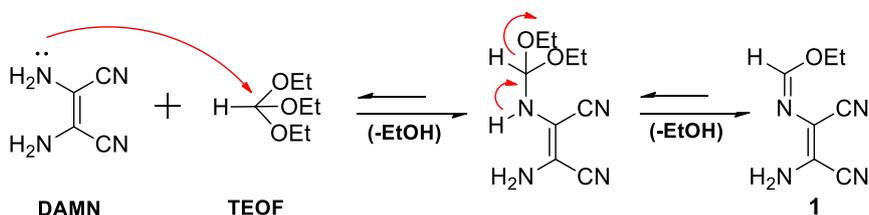
A síntese do imidato **1**, reagente de partida deste trabalho experimental, foi realizada por reação dos reagentes comerciais diaminomaleonitrilo (**DAMN**) e ortoformiato de etilo (**TEOF**) (Esquema 10) [49]. Neste primeiro passo a reação do **DAMN** com o **TEOF** ocorreu sob refluxo em dioxano durante cerca de 1 hora, acoplado a um sistema de destilação, de modo a eliminar o etanol formado.

Uma vez terminada a reação, procedeu-se a uma purificação da mistura reacional realizando-se uma filtração através de uma pequena coluna de sílica. Por adição de *n*-hexano, em banho de gelo, precipitou um sólido branco cristalino que provou ser o imidato **1**, por comparação em TLC com uma amostra padrão. O rendimento desta reação foi de 98%.



Esquema 10: Síntese do imidato **1** a partir dos reagentes comerciais **DAMN** e **TEOF**.

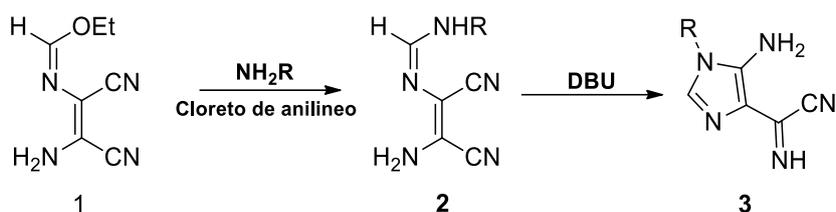
O mecanismo de reação para a síntese do imidato (Esquema 11) é iniciado pela formação de um intermediário tetraédrico, após um ataque nucleofílico de um dos grupos amina do diaminomaleonitrilo (**DAMN**) ao carbono central do orto éster. A formação do imidato **1**, por sua vez, ocorre por eliminação de uma molécula de etanol.



Esquema 11: Mecanismo reacional proposto para a síntese do imidato **1** a partir dos reagentes comerciais **DAMN** e **TEOF**.

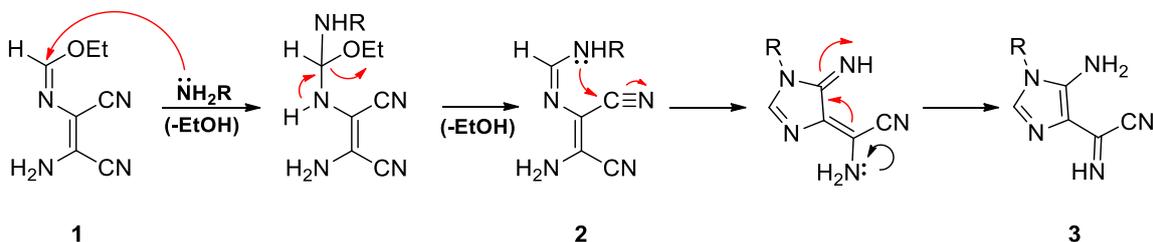
2.1.2. Síntese de 4-cianoformimidazolimidazoles (3).

Na etapa seguinte, foram sintetizados vários 4-cianoformimidazolimidazoles (3), de acordo com um método previamente desenvolvido [50], numa sequência de dois passos como mostra o **Esquema 12**. No primeiro passo faz-se a reação do imidato 1 com uma amina e catálise ácida (cloreto de anilíneo). No segundo passo, uma vez terminada a reação, a amidina 2 formada é ciclizada *in situ*, ao adicionar-se uma base (DBU) à mistura reacional, formando-se assim os 4-cianoformimidazolimidazoles 3.



Esquema 12: Esquema reacional da síntese dos 4-cianoformimidazolimidazoles 3.

O mecanismo reacional proposto para a síntese dos 4-cianoformimidazolimidazoles 3 – **Esquema 13** - inicia-se com a formação da amidina 2 através do ataque nucleofílico da amina primária ao carbono central do imidato 1. A segunda parte da síntese envolve uma reação da ciclização intramolecular da amidina 2 na presença de base (DBU). Esta ciclização, por sua vez, é explicada pelo ataque nucleofílico do nitrogénio N¹ da amidina 2 ao grupo nitrilo mais próximo, formando-se assim os 4-cianoformimidazolimidazoles 3.



Esquema 13: Mecanismo reacional proposto para a síntese dos 4-cianoformimidazolimidazoles 3 a partir do imidato 1.

Os imidazoles obtidos (**Tabela 3**) foram sintetizados a partir das aminas primárias: metilamina (**3a**), ciclopentilamina (**3b**), benzilamina (**3c**), *p*-fluoroanilina (**3d**), *p*-anisidina (**3e**) e 3-amino-1,2-propanediol (**3f**).

Tabela 3: Condições reacionais utilizadas na síntese dos 4-cianoformimidoilimidazoles **3**.

Composto	R	NH ₂ R (eq)	Condições Reacionais	η (%) *
3a	Me	3,0	i. Etanol; 0 °C; 27 min ii. DBU; Ta; 2 h	75
3b	Cp	1,2	i. Ta; 2 h ii. DBU; Ta; 5 h	73
3c	Bn	2,5	i. Ta; 6 h ii. DBU; Etanol; Éter de petróleo; Ta; 2 h	46
3d	Ar(<i>p</i>)F	1,0	i. Etanol; Ta; 6 h ii. DBU; Ta; 1 h	60
3e	Ar(<i>p</i>)OMe	1,2	i. Etanol; Ta; 6 h ii. DBU; Ta; 1 h	77
3f	C ₃ H ₇ O ₂	1,4	i. Etanol; 0 °C; 6 h ii. DBU; 0 °C; 1 h	66

*Rendimento global das 2 etapas de reação

Ao analisar a **Tabela 3** podemos concluir que a partir do imidato **1** foram sintetizados sete 4-cianoformimidoilimidazoles **3**. No primeiro passo, a reação de formação da amidina **2a** a partir do imidato e metilamina foi a reação mais rápida (27 min). Em contrapartida, no segundo passo, a conversão da amidina **2b** no imidazole **3b** foi a reação mais lenta (5 horas). Na síntese do imidazole **4c**, **4d** e **4e**, verifica-se o inverso, o primeiro passo é muito lento e segue-se um segundo passo muito rápido. Esta diferença pode ser explicada pelos efeitos eletrônicos dos substituintes das aminas usadas, uma vez que grupos dadores de elétrons favorecem o passo (i), enquanto os grupos retiradores facilitam o passo (ii). Assim, para as aminas aromáticas (**4c**, **4d** e **4e**) a primeira etapa é mais lenta porque o par de elétrons do átomo de nitrogénio da amina está deslocalizado pelo anel aromático, resultando numa menor disponibilidade desse par de elétrons para o ataque nucleofílico ao átomo de carbono central do imidato (exemplificado no **Esquema 13**). Na segunda etapa, a distribuição do par de elétrons do átomo de

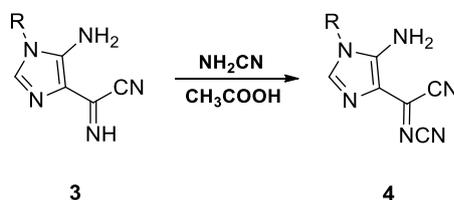
nitrogénio pelo anel de benzeno nas aminas aromáticas torna o hidrogénio ligado ao átomo de nitrogénio mais ácido e é mais facilmente captado pela base (DBU), tornando a ciclização da amidina mais rápida. Contudo, apesar de conter um substituinte alifático, o composto **4f** não cumpre esta regra. Isto pode ser explicado pela presença de dois grupos OH na molécula, o que torna a sua solubilidade em etanol maior. Isto faz com que maior quantidade da amidina intermediária permaneça em solução, o que faz com que a sua ciclização seja mais rápida.

As reações foram realizadas à temperatura ambiente sob agitação magnética, com exceção do imidazole **3a** e **3f** que foram obtidos a uma temperatura de 0 °C (banho de gelo). Os 4-cianoformimidoilimidazoles **3** foram isolados na forma de sólidos de cor bege, amarelo e branco ao fim de 3 - 8 horas com rendimentos que variaram de 46 – 77%. O rendimento mais baixo está associado à síntese do imidazole **3c**, o que pode ser explicado pelo uso excessivo de etanol na lavagem, durante a filtração do sólido.

Todos os sólidos obtidos foram comparados com amostras padrão, por TLC e por ¹H RMN, e os resultados demonstraram que todas as amostras estavam suficientemente puras para serem utilizadas na etapa seguinte.

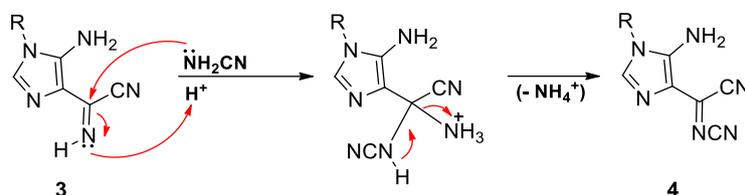
2.1.3. Síntese dos 5-amino-*N*-cianoimidazole-4-carbimidoilnitrilos (**4**).

Na terceira etapa foram sintetizados 5-amino-*N*-cianoimidazole-4-carbimidoilnitrilos **4** a partir dos 4-cianoformimidoilimidazoles **3**, por reação com cianamida, na presença de ácido acético em DMSO (Esquema 14) [51].



Esquema 14: Síntese dos *N*-cianoimidonitrilos **4** a partir dos 4-cianoformimidoilimidazoles **3**.

O mecanismo proposto para esta reação (**Esquema 15**) é iniciado pela presença de ácido na mistura reacional, que ativa o carbono imínico por protonação. Uma vez formada esta espécie ativa, ocorre um ataque nucleofílico do átomo de nitrogénio da cianamida ao átomo de carbono imínico formando-se um intermediário tetraédrico que, por libertação de amónia, origina os *N*-cianoiminonitrilos **4**.



Esquema 15: Mecanismo reacional proposto para a síntese dos *N*-cianoiminonitrilos **4** a partir dos 4-cianoformimidazolimidazoles **3**.

Tabela 4: Condições reacionais utilizadas na síntese dos 5-amino-*N*-cianoimidazole-4-carbimidoilnitrilos **4**.

Composto	R	NH ₂ CN (eq)	CH ₃ COOH (eq)	Condições Reacionais	η (%)
4a	Me	1,5	2,0	DMSO; Ta; 5 h	89
4b	Cp	1,7	2,0	DMSO; Ta; 7 h	77
4c	Bn	1,6	2,0	DMSO; Ta; 4 h	73
4d	Ar(<i>p</i>)F	1,5	2,0	DMSO; Ta; 5 h	64
4e	Ar(<i>p</i>)OMe	1,5	2,0	DMSO; Ta; 6 h	74

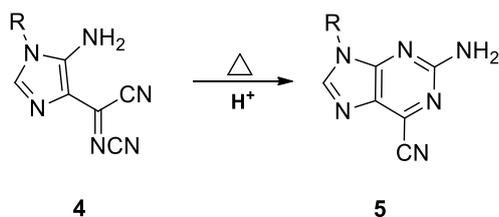
A **Tabela 4** demonstra que as sínteses dos *N*-cianoiminonitrilos **4a** – **4e** foram reprodutíveis nas condições utilizadas.

Os *N*-cianoiminonitrilos **4** foram isolados na forma de sólidos amarelos (**4b** – **4e**) e verde (**4a**). As reações, realizadas à temperatura ambiente sob agitação magnética, demoraram entre 4 a 7 horas e os produtos foram isolados com rendimentos entre 64% e 89%. Verifica-se que o produto **4d** apresenta menor rendimento, o que pode ser devido ao uso excessivo de solvente de lavagem durante a filtração.

A análise de TLC dos sólidos obtidos demonstrou que todos os produtos se encontravam puros para serem utilizados nas etapas seguintes.

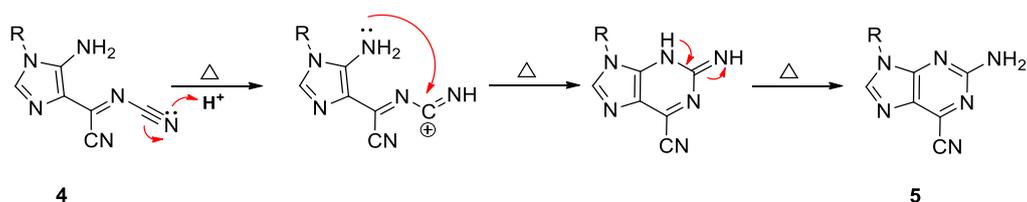
2.1.4. Síntese de 2-aminopurina-6-carbonitrilos (5).

Nesta etapa do trabalho, os *N*-cianoiminonitrilos **4**, preparados na etapa anterior, foram aquecidos sob pressão na presença de ácido, para promover a reação de ciclização, formando assim os 2-aminopurina-6-carbonitrilos **5**, tal como representado no **Esquema 16** [51].



Esquema 16: Síntese de 2-aminopurina-6-carbonitrilos **5** a partir de *N*-cianoiminonitrilos **4**.

O mecanismo proposto para esta reação (**Esquema 17**) inicia-se com a protonação do átomo de nitrogénio do grupo nitrilo favorecendo o ataque nucleofílico do átomo de nitrogénio do grupo 5-amino ao átomo de carbono central. Ocorre assim uma ciclização com formação de um anel de seis membros não aromático que deve evoluir rapidamente para a estrutura de purina aromática dos 2-aminopurina-6-carbonitrilos **5**.



Esquema 17: Mecanismo reacional proposto para a síntese de 2-aminopurina-6-carbonitrilos **5** a partir de *N*-cianoiminonitrilos **4**.

Tabela 5: Condições reacionais utilizadas na síntese dos 2-aminopurina-6-carbonitrilos **5**.

Composto	R	RP (mmol)	Ácido	Condições Reacionais	η (%)
5a	Me	4a (2,9)	TFA (4 gotas)	ACN; 80 °C; 27 h	63
5b	Cp	4b (1,4)	TFA (1 gota)	ACN; 80 °C; 19 h	90
5c	Bn	4c (2,2)	TFA (1 gota)	ACN/DMSO; 80 °C; 22 h	70
5d	Ar(<i>p</i>)F	4d (1,8)	TFA (1 gota)	ACN; 80 °C; 16 h	84
5e	Ar(<i>p</i>)OMe	4e (0,9)	CH ₃ COOH (1,5 eq)	ACN; 80 °C; 24 h	75
5f	C ₃ H ₇ O ₂	3f (3,4)	i. CH ₃ COOH (2,0 eq)	i. DMSO; NH ₂ CN (1,5 eq); Ta; 5 h ii. ACN; 80 °C; 6 h	47*

*Rendimento global das 2 etapas de reação

A **Tabela 5** demonstra que as sínteses dos 2-aminopurina-6-carbonitrilos **5a – 5d** foram reprodutíveis nas condições utilizadas. De notar, apenas, que a síntese de **5a** demorou mais tempo e este resultado poderá ser explicado pelo facto do reagente de partida **4a** não se dissolver facilmente, uma vez que a reação é mais rápida se o sólido estiver em solução. O mesmo aconteceu com a síntese do composto **5c**. No entanto, neste caso recorreu-se ao DMSO para facilitar a dissolução do reagente de partida **4c**, sendo que no final o DMSO não atrapalharia a precipitação do sólido **5c** devido a este ter um substituinte aromático que por si precipita melhor do que os produtos com substituintes alifáticos. No caso do composto **5e** foi utilizado um ácido diferente devido ao facto de, na altura em que foi realizada a reação, o ácido utilizado nas experiências anteriores não estar disponível. Verificou-se que o ácido acético foi utilizado com sucesso, como demonstra a reação do composto **5f**.

O 2-aminopurina-6-carbonitrilo **5f** foi sintetizado em duas etapas. A primeira etapa corresponde à formação do *N*-cianoiminonitrilo **4f** a partir do 4-cianoformimidazolimidazole **3f**. Contudo, como não foi possível isolar o intermediário **4f** por ser muito solúvel, prosseguiu-se para a etapa seguinte realizando a reação ciclização do *N*-cianoiminonitrilo **4f** de modo a formar o 2-aminopurina-6-carbonitrilo **5f** *in situ*. Neste caso, como já havia presença de excesso ácido da primeira etapa, não houve a necessidade de adicionar uma catálise ácida como nas experiências anteriores.

Os 2-aminopurina-6-carbonitrilos **5** foram isolados na forma de sólidos de cores entre rosa-pálido, branco, bege e castanho. As reações foram realizadas sob pressão a temperatura de 80 °C, sob agitação magnética, e demoraram entre 11 e 27 horas. Obteve-se rendimentos entre 47% e 90%, verificando-se que o produto **5f** apresenta menor rendimento. Este resultado foi devido ao facto de se ter realizado uma reação em duas etapas, além de que foi ainda necessário realizar uma purificação da mistura reacional através de uma coluna de sílica.

A análise de TLC e a análise espectroscópica de ^1H e ^{13}C RMN dos sólidos obtidos demonstraram que todos os produtos se encontravam puros para serem utilizados na caracterização fotofísica.

2.1.5. Caracterização espectroscópica dos 2-aminopurina-6-carbonitrilos (**5**).

Realizaram-se análises espectroscópicas de ^1H RMN e ^{13}C RMN, recorrendo às técnicas de HMBC, HMQC e DEPT (**Tabela 6** e **Tabela 7**) para caracterizar os produtos obtidos. Os dados obtidos permitiram identificar os sólidos preparados nesta última etapa (secção 2.1.4) como sendo as estruturas esperadas de 2-aminopurina-6-carbonitrilos (**5**).

No espectro de ^1H RMN (**Tabela 6**), observa-se o sinal típico do próton 8-H de uma purina, surgindo como um singleto a δ 8,24 – 8,60 ppm, que integra para um próton. O singleto largo a integrar para dois prótons observado a δ 7,02 – 7,14 ppm confirma a presença do grupo 2-amino. A confirmação de cada estrutura é dada pelos sinais típicos de cada substituinte, conforme é demonstrado na **Tabela 6**.

Tabela 6: Dados espectroscópicos de ^1H RMN para os 2-aminopurina-6-carbonitrilos **5**. (400 MHz, DMSO- d_6).



Composto	R	8-H	2-NH ₂	R
5a	Me	8,27 (s; 1H)	7,04 (s; 2H)	3,64 (s; 3H)
5b	Cp	8,41 (s; 1H)	7,02 (s; 2H)	4,73 (qui; 7,2Hz; 1H) 2,15 – 2,06 (m; 2H) 2,00 – 1,79 (m; 4H) 1,71 – 1,60 (m; 2H)
5c	Bn	8,44 (s; 1H)	7,09 (s; 2H)	5,32 (s; 2H) 7,36 – 7,25 (m; 5H)
5d	Ar(ρ)F	8,68 (s; 1H)	7,20 (s; 2H)	7,84 (dd; 9,8Hz; 6,0Hz; 2H) 7,45 (t; 9,8Hz, 2H)
5e	Ar(ρ)OMe	8,60 (s; 1H)	7,14 (s; 2H)	3,81 (s; 3H) 7,11 (dd; 6,8Hz; 2,0Hz; 2H) 7,66 (dd; 6,8Hz; 2,4Hz; 2H)
5f	C ₃ H ₇ O ₂	8,24 (s; 1H)	7,04 (s; 2H)	5,12 (sl; 1H) 4,84 (sl; 1H) 4,21 (dd; 14,0Hz; 3,6Hz; 1H) 3,93 (dd; 14,0Hz; 8,8HzM; 1H) 3,82 (m, 1H) 3,41 (dd; 11,2Hz; 5,2Hz; 1H) 3,32 (dd; 11,2Hz; 6,4Hz; 1H)

No espectro de ^{13}C RMN (**Tabela 7**), para além dos sinais típicos da purina, observa-se o sinal do grupo nitrilo a δ 114- 115 ppm, confirmando a estrutura de 2-aminopurina-6-carbonitrilos. A confirmação de cada estrutura é dada pelos sinais típicos de cada substituinte, conforme é demonstrado na **Tabela 7**.

Tabela 7: Dados espectroscópicos de ^{13}C RMN para os 2-aminopurina-6-carbonitrilos (**5**). (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).



Composto	R	C-2	C-4	C-5	C-6	C-8	CN	R
5a	Me	160,45	155,46	128,24	129,33	147,14	114,59	29,35
5b	Cp	160,19	154,99	128,71	129,54	144,96	114,56	55,30; 31,55; 23,41
5d	Bn	160,57	155,06	128,18	129,82	146,43	114,49	136,27; 128,77; 127,86; 127,25; 45,98
5c	Ar(<i>p</i>)F	160,87	154,80	128,49	130,24	145,17	114,40	161,29 (d; 244,0Hz) 130,42 (d; 3,0Hz) 126,09 (d; 8,0Hz) 116,37 (d; 23,0Hz)
5e	Ar(<i>p</i>)OMe	160,85	154,91	128,51	130,12	145,51	115,51	158,97 126,82 125,56 114,56 55,59
5f	$\text{C}_3\text{H}_7\text{O}_2$	160,37	155,35	128,34	129,29	147,35	114,60	69,14 63,56 46,42

2.1.6. Propriedades fotofísicas dos 2-aminopurina-6-carbonitrilos (5)

As propriedades de absorção no UV/visível e de emissão de fluorescência dos compostos 2-aminopurina-6-carbonitrilos **5**, sintetizados na primeira parte do trabalho, foram medidas em vários solventes de diferentes polaridades e em soluções aquosas tampão de diferentes valores de pH. Analisou-se do mesmo modo a 2-aminopurina (2AP), que foi adquirida comercialmente para utilização como composto de referência. Os valores de comprimento de onda de absorção máxima, de emissão máxima, os rendimentos quânticos de fluorescência e o desvio de Stokes obtidos para cada composto estão representados na **Tabela 8**, **Tabela 9** e **Tabela 10**. Os espectros de absorção e emissão de fluorescência normalizados do composto **5a** e da 2AP (composto de referência) são mostrados na **Figura 23**, **Figura 24**, **Figura 25** e **Figura 26** respetivamente.

Tabela 8: Comprimentos de onda de absorção máxima (λ_{abs}) para os compostos **5a-5f** e 2AP em diferentes solventes.

Comp	R	Diclorometano	Dioxano	Acetonitrilo	Etanol	Sol. tampão pH=7,3	Sol. tampão pH=5,6
		λ_{abs} (nm)					
5a	Me	347	352	354	357	354	350
5b	Cp	348	353	353	354	352	353
5c	Bn	346	356	353	356	353	352
5d	Ar(p)F	349	355	352	356	a	a
5e	Ar(p)OMe	347	355	351	349	a	a
5f	C ₃ H ₇ O ₂	348	353	351	356	351	352
2AP		321	307	301	308	307	305

a) Não é solúvel

A partir da **Tabela 8** podemos verificar que o comprimento de onda máximo de absorção para os compostos **5**, varia entre 346 e 356nm. O gráfico representado na **Figura 23** é apresentado como um exemplo dos gráficos obtidos para esta série que ilustra bem o comportamento da generalidade dos compostos. Os valores de comprimento de onda máximo de absorção em diclorometano são os valores mais baixos, enquanto em etanol apresenta os valores mais altos. É de referir ainda que não foi realizada a análise dos compostos **5d** e **5e** nas duas soluções tampão, uma vez que estes não são solúveis nestas condições.

Ao comparar os espectros de absorção dos compostos **5** com a 2AP (**Tabela 8** e **Figura 24**), podemos concluir que há um desvio significativo para maiores comprimentos de onda, ou seja o comprimento de onda de absorção máxima dos compostos **5** aproxima-se bastante mais da região do espectro visível.

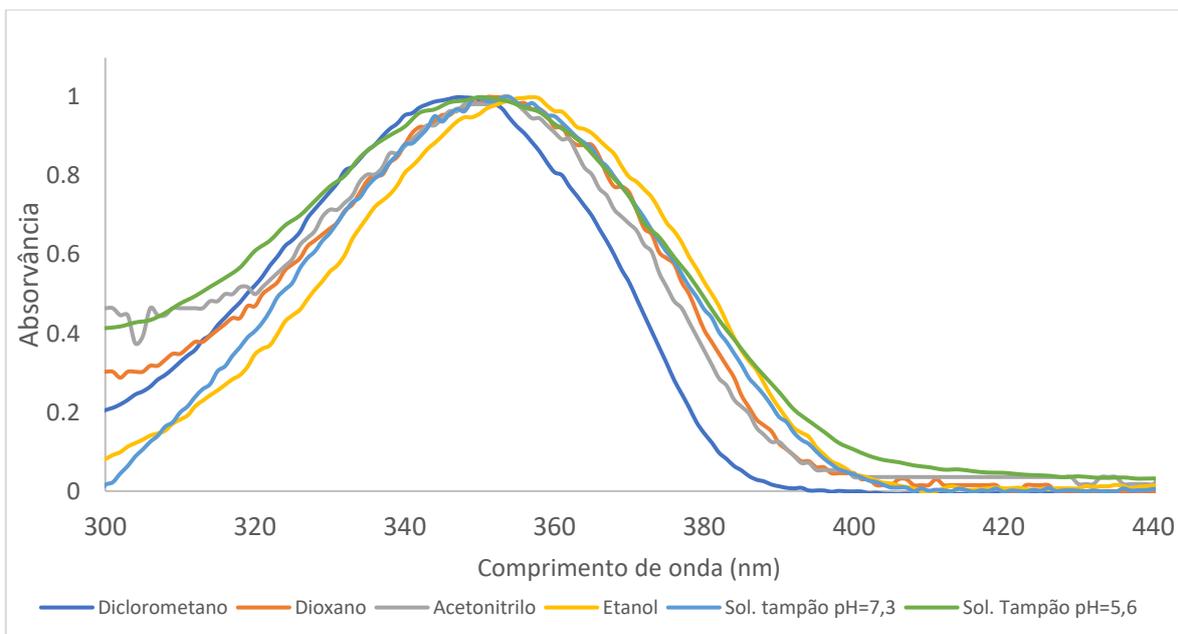


Figura 23: Espectros de absorção normalizados de soluções 1×10^{-5} M do composto **5a** em vários solventes (Percurso ótico: 1,0 cm).

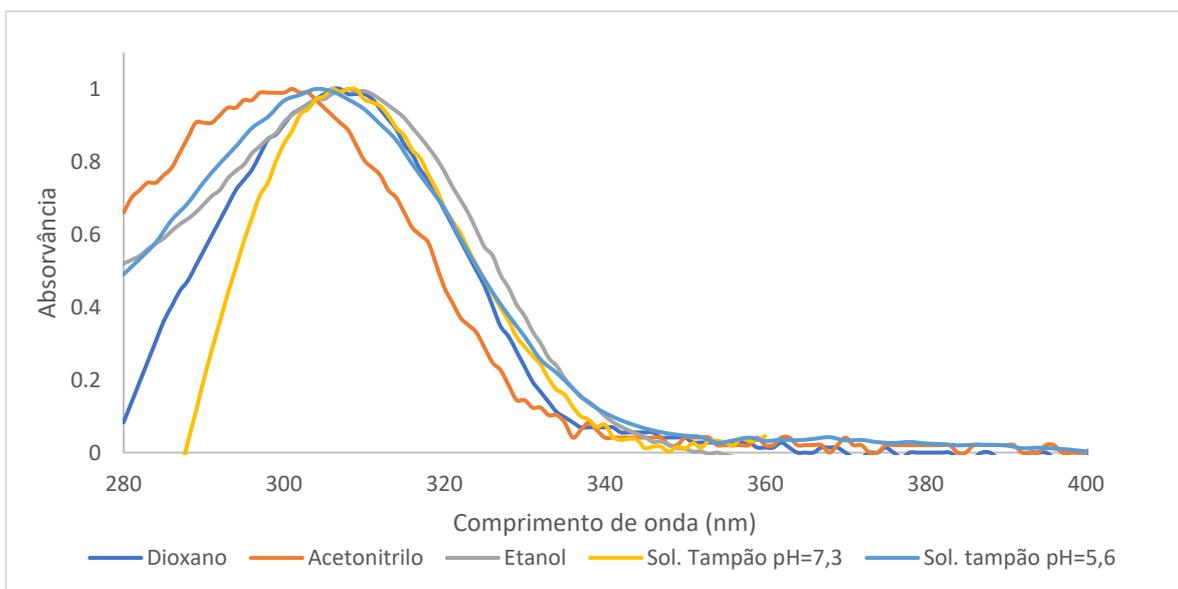


Figura 24: Espectros de absorção normalizados de soluções 1×10^{-5} M do composto **2AP** em vários solventes (Percurso ótico: 1,0 cm).

Tabela 9: Comprimentos de onda de emissão máxima (λ_{em}) para os compostos **5a-5f** e 2AP em diferentes solventes.

Comp	R	Diclorometano	Dioxano	Acetonitrilo	Etanol	Sol. tampão pH=7,3	Sol. tampão pH=5,6
		λ_{em} (nm)					
5a	Me	407	417	421	437	442	446
5b	Cp	408	419	425	440	443	445
5c	Bn	408	418	422	437	447	445
5d	Ar(<i>p</i>)F	409	418	425	440	a	a
5e	Ar(<i>p</i>)OMe	414	420	423	438	a	a
5f	C ₃ H ₇ O ₂	410	419	423	440	447	443
2AP		b	355	358	364	368	370

a) Não é solúvel; b) Não emite fluorescência

Ao analisar a **Tabela 9** pode observar-se que os valores de comprimento de onda máximo de emissão são semelhantes para os compostos **5**, concluindo-se que este parâmetro é independente da natureza do substituinte na posição *N*⁹. Pode ainda concluir-se que, à medida que aumenta a polaridade do solvente (do diclorometano para a água), os valores de comprimento de onda máximo de emissão também aumentam, contribuindo para um maior desvio de Stokes.

No caso da 2AP verifica-se a mesma tendência de aumento do comprimento de onda máximo de emissão à medida que aumenta a polaridade do meio, à exceção do valor obtido em diclorometano e acetonitrilo (onde a 2AP é pouco solúvel). Contudo, a diferença entre os valores máximos nos diferentes solventes para a 2AP é muito menor que nos compostos **5**, indicando uma muito menor sensibilidade ao solvente no caso da 2AP.

Para os compostos **5**, representam-se na figura seguinte o espectro de emissão normalizado do composto **5a** (**Figura 25**), uma vez que o efeito do solvente é semelhante, independentemente do substituinte. No espectro de emissão do composto **5a**, um deslocamento batocrômico significativo pode ser observado do diclorometano para a água (39 nm). Para a 2AP (**Figura 26**) verifica-se também um deslocamento batocrômico entre o dioxano e a solução tampão de pH igual a 5,6 (15 nm).

Nos espectros de absorção, os desvios para o vermelho são desprezáveis (**Tabela 8**), indicando uma importante contribuição do relaxamento do solvente após a fotoexcitação.

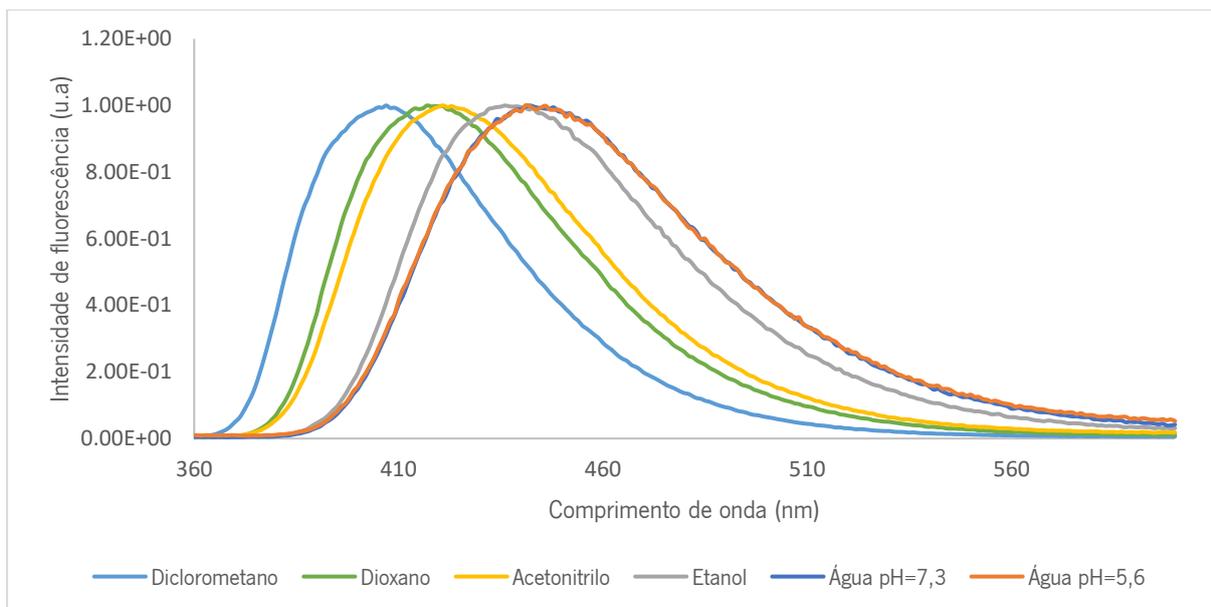


Figura 25: Espectros de fluorescência normalizados (no máximo de emissão) de soluções 1×10^{-5} M do composto **5a** em vários solventes ($\lambda_{exc} = 350$ nm).

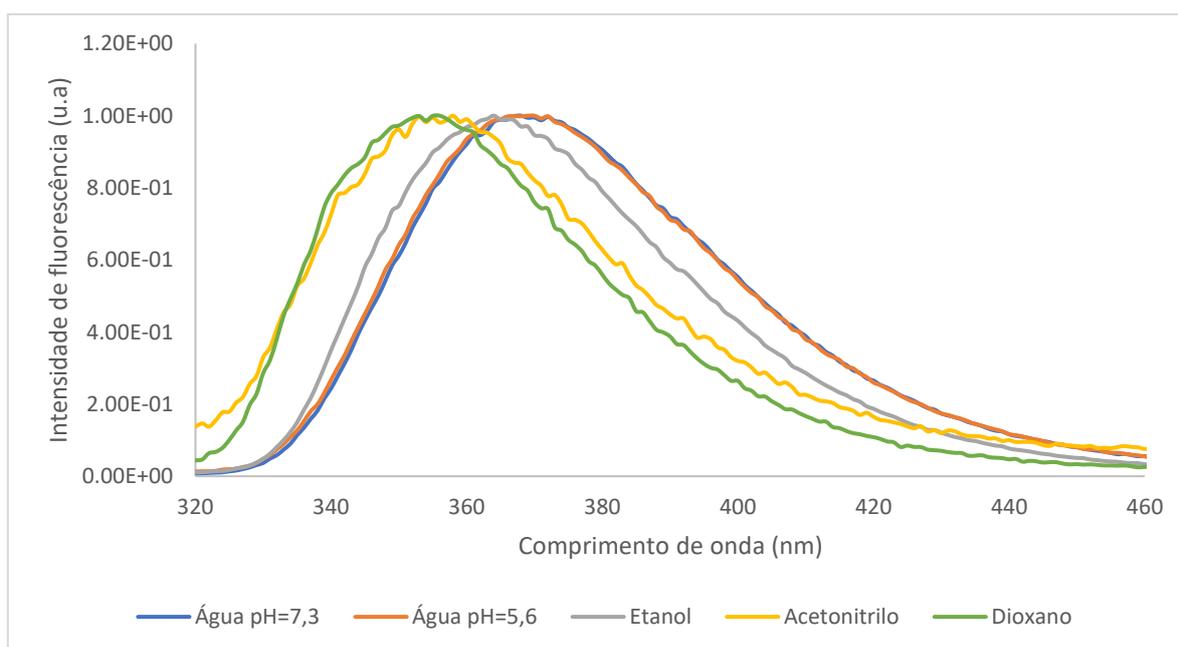


Figura 26: Espectros de fluorescência normalizados (no máximo de emissão) de soluções 1×10^{-5} M do composto **2AP** em vários solventes ($\lambda_{exc} = 300-310$ nm).

Tabela 10: Rendimentos quânticos de fluorescência (Φ_F) e desvio de Stokes (S) para os compostos **5a-5f** e 2AP em solventes diferentes.

*	R	Diclorometano		Dioxano		Acetonitrilo		Etanol		Sol. tampão pH=7,3		Sol. tampão pH=5,6	
		Φ_F	S	Φ_F	S	Φ_F	S	Φ_F	S	Φ_F	S	Φ_F	S
5a	Me	0,73	57	0,80	67	0,88	71	0,65	87	0,42	92	0,26	96
5b	Cp	0,67	58	0,81	69	0,98	75	0,83	80	0,46	93	0,34	95
5c	Bn	0,58	58	0,30	68	0,97	72	0,55	77	0,43	97	0,25	95
5d	Ar(<i>p</i>)F	0,59	59	0,86	68	0,85	75	0,59	90	0,21	85	a	
5e	Ar(<i>p</i>)OMe	0,10	64	0,65	70	0,002	73	0,01	88	0,04	75	a	
5f	C ₃ H ₇ O ₂	0,80	60	0,82	69	0,61	73	0,38	90	0,30	97	0,24	93
2AP		a		0,14	45	0,16	48	0,33	54	0,95	58	0,56	70

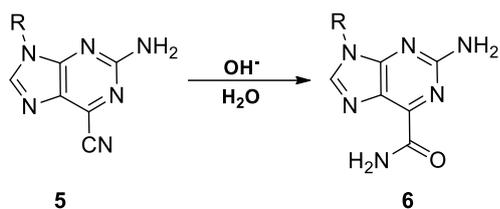
a) Não é solúvel; Erro para Φ_F cerca de 10%; S = desvio de Stokes (nm); *Composto

Ao analisar a **Tabela 10**, conclui-se que, para os compostos **5a-5f**, quanto maior a polaridade do solvente menor é o rendimento quântico de fluorescência (Φ_F). Contudo, a 2AP comporta-se de forma distinta, ou seja, os valores de rendimento quântico de fluorescência são maiores nos solventes polares, como é o caso em água [38], [40], [42], [48]. Também é de referir que a purina **5e** é o único composto que apresenta menores valores de rendimento quântico de fluorescência (Φ_F), verificando-se que o valor é muito baixo em acetonitrilo.

Os resultados obtidos em soluções tampão com diferentes valores de pH (5,6 e 7,3) também diferem entre eles. Em pH ácido, os valores obtidos são menores do que os valores em pH neutro, o que, possivelmente, poderá ser explicado pela protonação parcial dos compostos.

2.1.7. Síntese de 2-aminopurina-6-carboxamidas (**6**).

A síntese de 2-aminopurina-6-carboxamidas **6** foi realizada pela primeira vez neste trabalho. Começou-se por investigar as condições mais adequadas para esta síntese combinando os 2-aminopurina-6-carbonitrilos **5**, preparados na etapa anterior, com uma solução aquosa de hidróxido de sódio 4 M, à temperatura ambiente em diferentes solventes (**Esquema 18**). As reações foram monitorizadas por TLC e os resultados das experiências realizadas apresentam-se resumidos na **Tabela 11**.



Esquema 18: Síntese de 2-aminopurina-6-carboxamida **6** a partir de 2-aminopurina-6-carbonitrilos **5**.

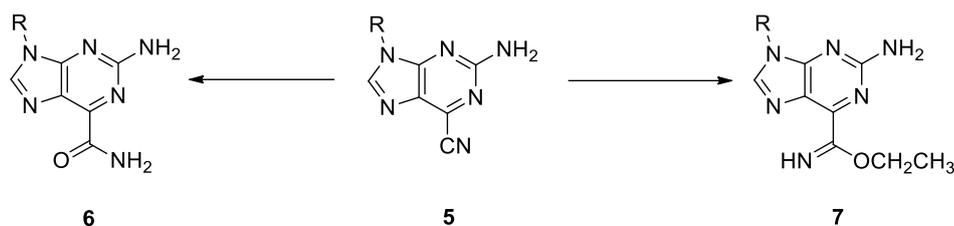
Tabela 11: Condições reacionais usadas na síntese das 2-aminopurina-6-carboxamida **6**.

Ensaio	R	RP (mmol)	Base (eq)	Condições Reacionais	Produto	η (%)
1	Me	5a (0,69)	i. NH ₃ aq (12 eq)	i. ACN (3 mL); Ta; 28 h	6a	38
			ii. Na ₂ CO ₃ .10H ₂ O (1 eq)	ii. Ta; 2 h		
			iii. NaOH 4 M (1 eq)	iii. Ta; 16 h		
2		5a (1,26)	NaOH 4 M (2,0 eq)	Etanol (5 mL); Ta; 14 h	6a	(a)
3		5a (1,27)	NaOH 4 M (1,5 eq)	Etanol (2 mL); H ₂ O (1 mL); Ta; 4 h	6a	45
4	Cp	5b (1,21)	NaOH 4 M (2,0 eq)	Etanol (4 mL); Ta; 31 h	6b	(a)
5		5b (0,96)	NaOH 4 M (1,5 eq)	Etanol (2 mL); H ₂ O (1 mL); Ta; 13 h	6b	31

a) Sólido isolado, contaminado com o produto **7**

A **Tabela 11** mostra os vários ensaios realizados para a síntese de apenas dois compostos (**6a** e **6b**). O primeiro ensaio foi realizado com a adição de uma base fraca (amónia aquosa) ao composto **5a**. Contudo, por TLC verificou-se que a reação não evoluía. Adicionou-se carbonato de sódio deca-hidratado e após 2 horas, a análise de TLC demonstrou o mesmo resultado. Prosseguiu-se com a adição de uma base mais forte (hidróxido de sódio) à mistura reacional. Após 16 horas, por TLC verificou-se que a reação estava completa.

Uma vez que já se conhecia a base a utilizar, na segunda tentativa foi feita a adição de hidróxido de sódio de hora em hora em três frações, de modo a verificar a quantidade de base que a reação necessitava. Os resultados obtidos demonstraram que o sólido isolado correspondia a uma mistura dos compostos **6** e **7** (**Esquema 19**), para ambos os ensaios 2 e 4.



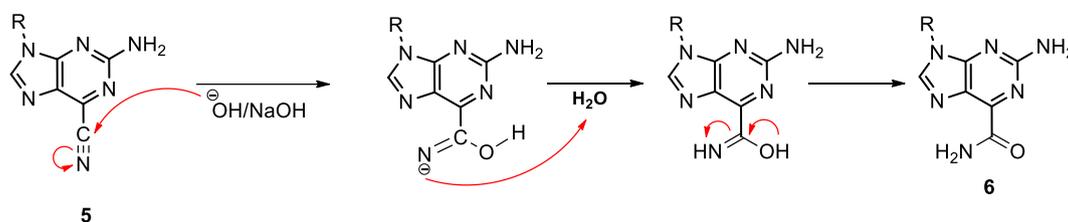
Esquema 19: Caminhos possíveis na síntese do composto **6** e estrutura dos compostos isolados na mistura.

No último ensaio, na tentativa de sintetizar os compostos **6** com melhores rendimentos, adicionou-se hidróxido de sódio em excesso e uma quantidade pequena de água, para facilitar a dissolução da base e a precipitação dos produtos **6**. Concluiu-se então que esta reação exigia o uso de uma base forte, como o hidróxido de sódio. Além disso, verificou-se que a reação seguia o caminho dos compostos **7** na presença de pequenas quantidades de base, enquanto que o excesso de base favorecia o caminho dos compostos **6** (**Esquema 19**).

As 2-aminopurina-6-carboxamidas (**6**) foram isoladas na forma de sólidos de cores rosa e branco. As reações foram realizadas à temperatura ambiente e demoraram entre 4 e 13 horas. Obteve-se rendimentos entre 31% e 45%, verificando-se que o produto **6b** apresenta menor rendimento, que se deve ao facto de ser mais solúvel em etanol.

A análise de TLC e a análise espectroscópica de ^1H e ^{13}C RMN dos sólidos obtidos demonstraram que todos os produtos se encontravam puros para serem utilizados na caracterização fotofísica.

O mecanismo proposto para esta reação (**Esquema 20**) inicia-se com o ataque nucleofílico da base ao grupo nitrilo da 2-aminopurina-6-carbonitrilo (**5**). É gerada uma espécie com carga negativa que pode captar um próton da água para dar uma estrutura tautomérica que rapidamente evolui para a 2-aminopurina-6-carboxamida esperada (**6**).



Esquema 20: Mecanismo reacional proposto para a síntese de 2-aminopurina-6-carboxamida **6** a partir de 2-aminopurina-6-carbonitrilos **5**.

2.1.8. Caracterização espectroscópica das 2-aminopurina-6-carboxamidas (6).

Realizaram-se análises espectroscópicas de ^1H RMN e ^{13}C RMN, recorrendo às técnicas de HMBC, HMQC e DEPT, (Tabela 12 e Tabela 13) que permitiram identificar os produtos obtidos como sendo as estruturas de 2-aminopurina-6-carboxamida **6** esperadas.

No espectro de ^1H RMN (Tabela 12), observa-se o sinal típico do próton 8-H como um singlete a δ 8,16 – 8,29 ppm, que integra para um próton, e um singlete largo a integrar para dois prótons a δ 6,68 – 6,70 ppm que confirma a presença do grupo 2-amino. A presença do grupo amida é demonstrada pelos dois singletos largos a integrar para um próton cada, a δ 7,89 – 7,90 ppm e δ 8,28 -8,30 ppm, que foram atribuídos ao grupo NH_2 , conforme é demonstrado na Tabela 12. A confirmação de cada estrutura é dada pelos sinais típicos de cada substituinte.

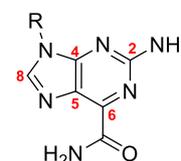


Tabela 12: Dados espectroscópicos de ^1H RMN para as 2-aminopurina-6-carboxamidas **6**. (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$).

Composto	R	8-H	2-NH ₂	CONH ₂	R
6a	Me	8,16 (s; 1H)	6,70 (s; 2H)	7,89 (s; 1H) 8,28 (s; 1H)	3,65 (s; 3H)
6b	Cp	8,29 (s; 1H)	6,68 (s; 2H)	7,90 (s; 1H) 8,30 (s; 1H)	4,75 (qui; 7,6Hz; 1H) 2,15 – 2,07 (m; 2H) 2,00 – 1,80 (m; 4H) 1,72 – 1,61 (m; 2H)

No espectro de ^{13}C RMN (**Tabela 13**), para além dos sinais típicos da purina, observa-se o sinal do grupo carbonilo a δ 164,60 ppm, confirmando a estrutura das 2-aminopurina-6-carboxamidas **6**. A confirmação de cada substituinte é dada pelos sinais típicos de cada um, conforme é demonstrado na **Tabela 13**.

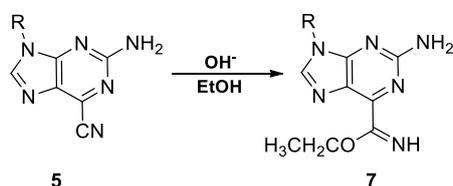
Tabela 13: Dados espectroscópicos de ^{13}C RMN para as 2-aminopurina-6-carboxamidas **6**. (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).



Composto	R	C-2	C-4	C-5	C-6	C-8	C=O	R
6a	Me	160,31	155,51	124,17	148,36	144,49	164,57	29,27
6b	Cp	160,08	155,04	124,60	148,63	142,22	164,59	55,05 31,68 23,44

2.1.9. Síntese de 2-aminopurina-6-carbimidato de etilo (**7**).

Os 2-aminopurina-6-carbimidato de etilo (**7**), à semelhança da síntese anterior, foram preparados pela primeira vez neste trabalho e, por isso, foi necessário investigar as condições reacionais apropriadas para esta reação. Começou-se por combinar os 2-aminopurina-6-carbonitrilos **5** com etanol e catálise básica (solução de hidróxido de sódio 4 M) a diferentes temperaturas (**Esquema 21**). As reações foram monitorizadas por TLC e os resultados das experiências realizadas apresentam-se resumidos na **Tabela 14**.



Esquema 21: Síntese de 2-aminopurina-6-carbimidato de etilo **7** a partir de 2-aminopurina-6-carbonitrilos **5**.

Tabela 14: Condições reacionais usadas na síntese de 2-aminopurina-6-carbimidato de etilo 7.

Ensaio	R	RP (mmol)	Base (eq)	Condições Reacionais	Resultado
1	Me	5a (1,18)	NaOH 4 M (1,0 eq)	Etanol (4 mL); Ta; 6 dias	(a)
2		5a (0,54)	NaOH 4 M (1,0 eq)	Etanol (3 mL); Ta; 6 h	7a (51%)
3		5a (1,27)	NaOH 4 M (0,2 eq)	Etanol (40 mL); Ta; 24 h	7a (63%)
4		5a (1,63)	NaOH 4 M (0,2 eq)	Etanol (5 mL); Ta; 18 h	7a (70%)
5	Cp	5b (0,87)	NaOH 4 M (0,2 eq)	Etanol (3 mL); Ta; 3 h	(a)
6		5b (1,11)	NaOH 4 M (0,5 eq)	Etanol (6 mL); Ta; 3 dias	(a)
7		5b (0,89)	NaOH 4 M (0,4 eq)	Etanol (20 mL); Ta; 36 h	7b (54%)
8	Ar(<i>p</i>)F	5d (1,33)	NaOH 4 M (0,4 eq)	Etanol (6 mL); THF (4 mL); Ta; 3 dias	(a)
9		5d (0,87)	NaOH 4 M (0,8 eq)	i. Etanol (6 mL); Azoto; Ta; 3 dias ii. THF (1 mL); 8 dias iii. DMSO (1 mL); Etanol (2 mL); Ta; 2 dias	(a)
10		5d (0,84)	i. t-butóxido (1,2 eq) ii. NaOH 4 M (0,2 eq)	i. Etanol (9 mL); DMSO (0,9 mL); Ta; 6 dias ii. 40 °C; 24 h iii. 60 °C; 8 h iv. 60 °C; 3 dias	(a)
11	C ₃ H ₇ O ₂	5f (0,91)	NaOH 4M (0,2 eq)	Etanol (3 mL); Ta; 3 dias	(b)

a) Mistura; não isolado b) Reagente de partida

O estudo das condições reacionais para esta síntese foi iniciado com o composto **5a**. Inicialmente fez-se reagir este composto com um equivalente de hidróxido de sódio, em etanol e à temperatura ambiente. Contudo, a análise espectroscópica de ¹H RMN do sólido isolado demonstrava ser uma mistura de compostos. Repetiu-se a experiência (Ensaio 2) diminuindo o tempo de reação e o produto isolado demonstrou ser o composto desejado por ¹H RMN. Na tentativa de melhorar o rendimento, diminuiu-se a quantidade de base na mistura reacional e testou-se diferentes volumes de solvente (Ensaio 3 e 4). Verificou-se que os resultados melhoraram significativamente (63% e 70 % de rendimento, respetivamente).

Em seguida, tentou-se reproduzir estas condições otimizadas na preparação do composto **5b**. No entanto, como é possível ver pela tabela, isolou-se uma mistura de compostos (Ensaio 5). Repetiu-se a

experiência (Ensaio 6) alterando a quantidade de base adicionada. Por TLC, verificou-se uma mistura de compostos e não foi possível isolar nenhum produto. Prosseguiu-se diminuindo a quantidade de base e aumentando o volume de solvente (Ensaio 7) e obteve-se um sólido puro com um rendimento moderado (54%).

Para o composto **5d**, foram realizados 3 ensaios. No ensaio 8 reproduziu-se as condições do ensaio 4, uma vez que este apresentava o melhor rendimento. No entanto, verificou-se a obtenção de uma mistura de reagente de partida e de produto (evidência de TLC). Após 3 dias, a reação não demonstrava evolução. Repetiu-se a experiência (ensaio 9) aumentando-se a quantidade de base. Mais uma vez, por TLC, verificou-se que a reação não evoluiu e colocou-se a hipótese de que seria devido à insolubilidade do reagente de partida. Num segundo e terceiro passo deste ensaio, adicionou-se solventes como THF e DMSO, na tentativa de promover a solubilidade e o consumo do reagente de partida. No entanto, após quase 2 semanas, verificou-se por TLC que houve formação de uma mistura de compostos. Repetiu-se a experiência (ensaio 10) substituindo o hidróxido de sódio por *n*-butóxido de sódio. Verificou-se o mesmo problema, o reagente de partida não se consumia. Aumentou-se a temperatura para 40 °C e posteriormente para 60 °C, contudo não se verificou nenhuma diferença no resultado. Adicionou-se hidróxido de sódio e manteve-se a reação a uma temperatura de 60 °C. Após 3 dias, verificou-se por TLC uma mistura complexa de compostos.

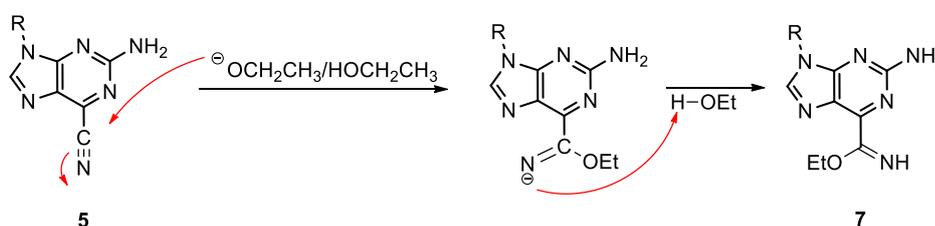
No caso do composto **5f**, realizou-se apenas 1 ensaio, reproduzindo as mesmas condições do ensaio 4 (com melhor rendimento). Por TLC, as manchas da mistura reacional e do reagente de partida apresentavam o mesmo R_f. Contudo, o sólido em suspensão na mistura reacional apresentava uma cor e aspeto diferente. Decidiu-se isolar o sólido em suspensão, contudo a análise espectroscópica de ¹H RMN mostrou que o sólido isolado era o reagente de partida.

De um modo geral, verificou-se que as condições reacionais para estas sínteses não são reprodutíveis para os diferentes compostos **5**. Nomeadamente, a quantidade de base adequada para a reação dos compostos **5a** e **5b**, parece ser diferente da quantidade de base utilizada para os compostos **5d** e **5f**, uma vez que nestes últimos dois compostos a reação não foi completa. Verificou-se ainda que nos ensaios em que o tempo excedeu os 2 dias, os sólidos obtidos apresentavam-se como uma mistura de compostos, o que vem revelar a instabilidade destes compostos.

Os 2-aminopurina-6-carbimidatos de etilo (**7a** e **7b**) foram isolados na forma de sólidos brancos. As reações foram realizadas à temperatura ambiente e demoraram entre 18 e 36 horas. Os rendimentos obtidos variaram entre 54% e 70%, verificando-se que o produto **7b** apresenta menor rendimento, que se deve ao facto de o substituinte da posição 9 promover a solubilidade do composto em etanol.

A análise de TLC e a análise espectroscópica de ^1H e ^{13}C RMN, dos sólidos obtidos, demonstrou que todos os produtos se encontravam puros para serem utilizados na caracterização fotofísica.

O mecanismo proposto para esta reação (**Esquema 22**) inicia-se com a desprotonação do etanol por parte da base, para gerar um nucleófilo mais forte. No passo seguinte, ocorre um ataque nucleofílico do átomo de oxigénio do etóxido ao grupo nitrilo do 2-aminopurina-6-carbonitrilo **5** gerando um intermediário com carga negativa, que, rapidamente capta um próton do etanol presente no meio reacional e evolui para a estrutura do 2-aminopurina-6-carbimidato de etilo **7**, regenerando assim a base.



Esquema 22: Mecanismo reacional proposto para a síntese do 2-aminopurina-6-carbimidato de etilo **7** a partir de 2-aminopurina-6-carbonitrilos **5**.

2.1.10. Caraterização espectroscópica das 2-aminopurina-6-carbimidato de etilo (**7**).

Realizaram-se análises espectroscópicas de ^1H RMN e ^{13}C RMN, recorrendo às técnicas de HMBC, HMQC e DEPT, (**Tabela 15** e **Tabela 16**) que permitiram a atribuir aos produtos obtidos as estruturas de 2-aminopurina-6-carbimidato de etilo **7**.

No espectro de ^1H RMN (**Tabela 15**), observa-se o sinal típico do próton 8-H como um singlete a δ 8,16 – 8,30 ppm, que integra para um próton, e um singlete largo a integrar para dois prótons a δ 6,73 – 6,74 ppm que confirma a presença do grupo 2-amino. Observam-se ainda os sinais de um quarteto que integra para dois prótons a δ 4,31 ppm e de um tripleto a integrar para três prótons a δ 1,32 ppm, confirmando a presença do grupo etoxilo. Conseguem-se ainda observar um sinal de um singlete a integrar para um próton a δ 9,70 ppm, que confirma o a presença do grupo imina.

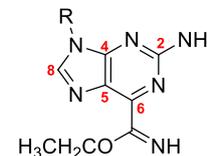
Tabela 15: Dados espectroscópicos de ^1H RMN para as 2-aminopurina-6-carbimidato de etilo **7**. (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).



Composto	R	8-H	2-NH ₂	NH	OCH ₂ CH ₃	R
7a	Me	8,16 (s; 1H)	6,74 (s; 2H)	9,68 (s; 1H)	4,31 (q; 7,2Hz; 2H) 1,32 (t; 7,2Hz; 3H)	3,64 (S; 3H)
7b	Cp	8,30 (s; 1H)	6,73 (s; 2H)	9,70 (s; 1H)	4,31 (q; 7,2Hz; 2H) 1,32 (t; 7,2Hz; 3H)	4,75 (qui; 7,6Hz; 1H) 2,15 – 2,07 (m; 2H) 1,99 – 1,80 (m; 4H) 1,72 – 1,62 (m; 2H)

No espectro de ^{13}C RMN (**Tabela 16**), para além dos sinais típicos do anel de purina, observam-se os sinais do grupo etoxilo a δ 61,09 – 61,21 ppm e δ 14,15 – 14,19 ppm e o sinal do carbono do grupo imina a δ 164 ppm, confirmando a estrutura das 2-aminopurina-6-carbimidato de etilo **7**. A confirmação de cada substituinte é dada pelos sinais típicos de cada um conforme é demonstrado na **Tabela 16**.

Tabela 16: Dados espectroscópicos de ^{13}C RMN para as 2-aminopurina-6-carbimidato de etilo **7**. (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).



Composto	R	C-2	C-4	C-5	C-6	C-8	C=NH	OCH ₂ CH ₃	R
7a	Me	160,17	155,54	124,19	145,16	144,90	164,20	61,21 14,19	29,27
7b	Cp	159,91	155,02	124,61	145,33	142,55	164,10	61,09 14,15	54,96 31,66 23,39

2.1.11. Propriedades fotofísicas de 2-aminopurina-6-carboxamidas (6) e de 2-aminopurina-6-carbimidato de etilo (7)

As propriedades de absorção e emissão de fluorescência dos compostos **6a** e **7a**, sintetizados anteriormente, foram medidas, à semelhança dos compostos **5**. Foram comparados os valores de comprimento de onda de absorção máxima, de emissão máxima, os rendimentos quânticos de fluorescência e o desvio de Stokes, para os compostos **5**, **6** e **7**, com o mesmo substituinte, e para a 2AP - Tabela 17, Tabela 18 e Tabela 19.

Tabela 17: Comprimentos de onda de absorção máxima (λ_{abs}) para os compostos **5a**, **6a** e **7a** em solventes diferentes.

Composto	R	Diclorometano	Dioxano	Acetonitrilo	Etanol	Sol. tampão pH=7,3	Sol. tampão pH=5,6
		λ_{abs} (nm)					
5a	Me	347	352	354	357	354	350
6a	Me	329	343	338	349	340	336
7a	Me	339	344	339	350	338	344

A partir da Tabela 17, da Figura 23 e da Figura 27, pode concluir-se que, com a modificação do grupo ciano dos compostos **5**, os valores de comprimento de onda de absorção máxima dos novos compostos (**6** e **7**) diminuem em relação aos dos compostos **5**. Observa-se também, com exceção dos valores obtidos em etanol, um desvio para o azul. Para a água (pH=5,6) e o dioxano, o desvio não é muito significativo (-10 nm). Em diclorometano, o comprimento de onda de absorção máxima já se assemelha ao da 2AP, verificando-se um desvio maior no máximo de absorvância para este solvente, para o acetonitrilo e para a água (pH=7,3) (-20 nm).

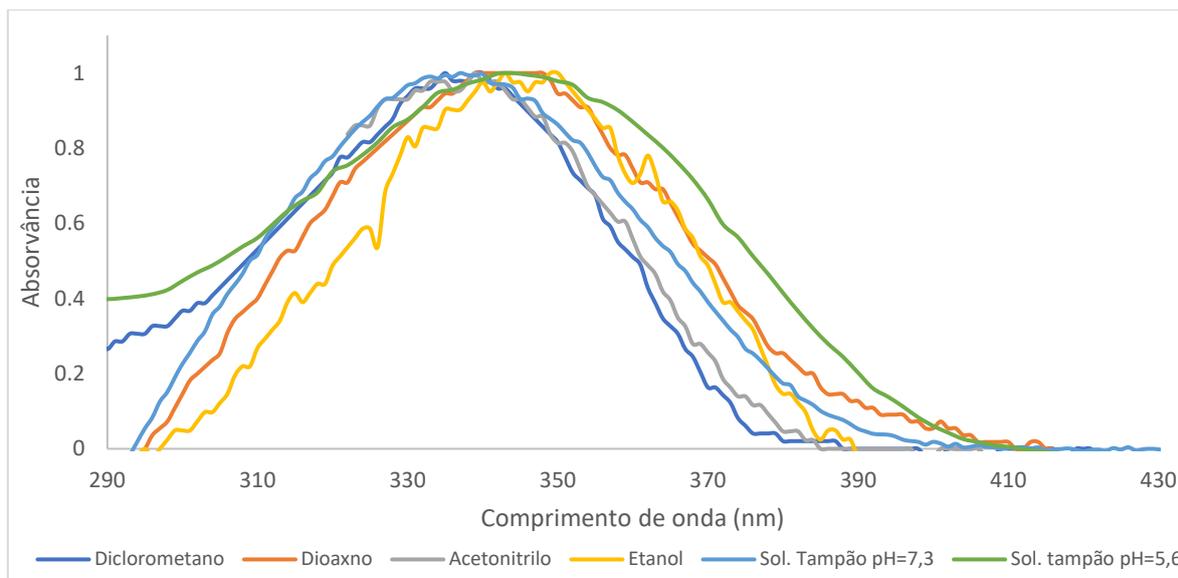


Figura 27: Espectros de absorção normalizados de soluções 1×10^{-5} M do composto **7a** em vários solventes (Percurso ótico: 1,0 cm).

Tabela 18: Comprimentos de onda de emissão máxima (λ_{em}) para os compostos **5a**, **6a** e **7a** em solventes diferentes.

Composto	R	Diclorometano	Dioxano	Acetonitrilo	Etanol	Sol. tampão pH=7,3	Sol. tampão pH=5,6
		λ_{em} (nm)					
5a	Me	407	417	421	437	442	446
6a	Me	407	415	432	446	457	455
7a	Me	402	410	418	433	443	467

Ao analisar a **Tabela 18**, pode concluir-se que os valores de comprimento de onda máximo de emissão em diclorometano são semelhantes para os compostos apresentados. No entanto, para os restantes solventes, o composto **6a** afasta-se dos compostos **5a** e **7a**. Pode ainda concluir-se que, à medida que aumenta a polaridade do solvente (do diclorometano para água), os valores de comprimento de onda máximo de emissão também aumentam, contribuindo para um maior desvio de Stokes (**Tabela 19**).

No espectro de emissão do composto **5a** (**Figura 23**) e do composto **6a** (**Figura 28**), um deslocamento batocrómico significativo pode ser observado do diclorometano para a água (35 e 50 nm, respetivamente). No caso do composto **7a** (**Figura 29**), o mesmo efeito é observado (65 nm). No entanto, verifica-se uma diferença significativa entre os resultados obtidos nas soluções tampão com valores de pH diferentes (24 nm). Isto poderá ser explicado pela alteração do momento dipolar da molécula, uma

vez que esta encontra-se parcialmente protonada (pH=5,6) provocando um aumento no valor máximo de emissão.

Nos espectros de absorção, os desvios para o vermelho são desprezáveis (Tabela 17), indicando uma importante contribuição do relaxamento do solvente após a fotoexcitação.

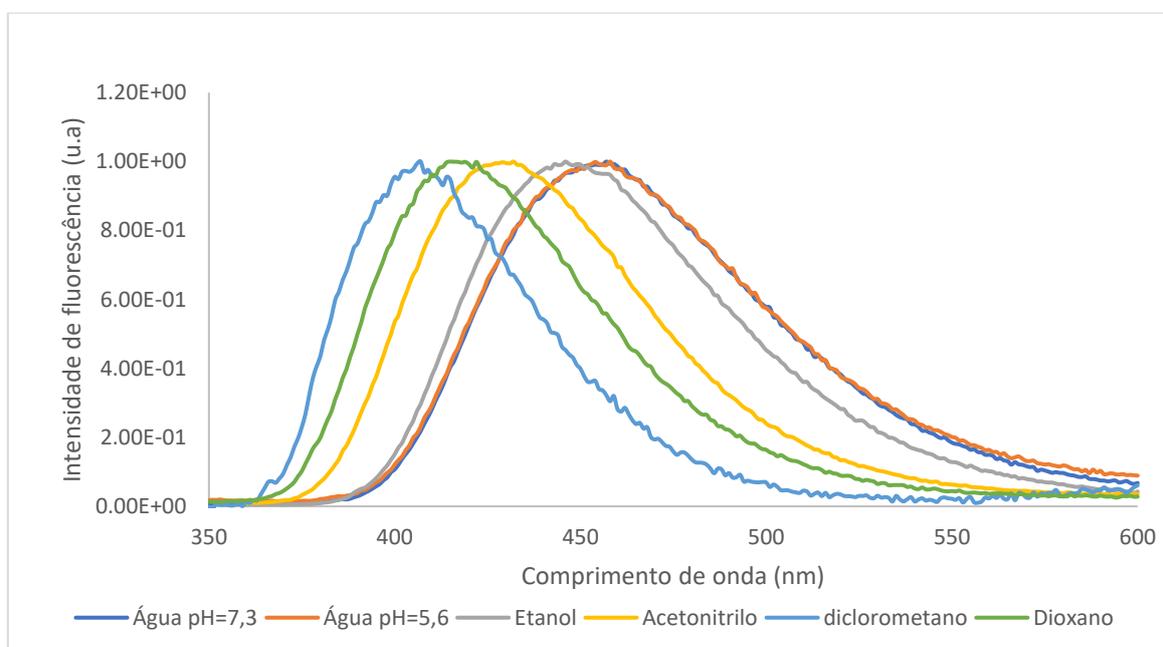


Figura 28: Espectros de fluorescência normalizados (no máximo de emissão) de soluções 1×10^{-5} M do composto **6a** em vários solventes ($\lambda_{exc} = 330 - 350$ nm).

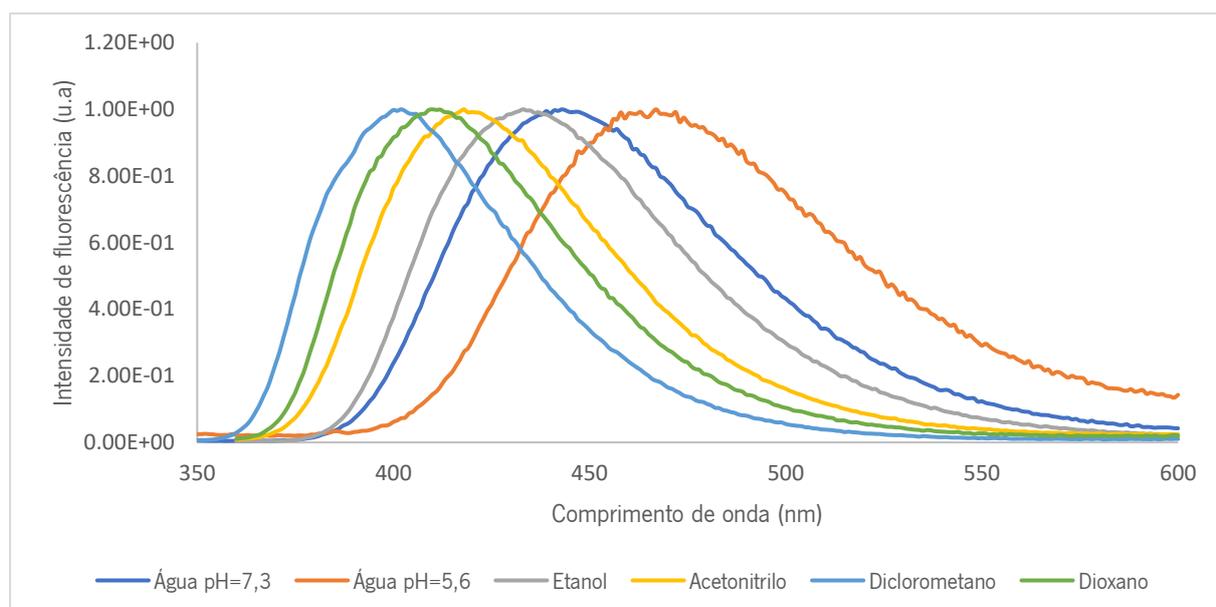


Figura 29: Espectros de fluorescência normalizados (no máximo de emissão) de soluções 1×10^{-5} M do composto **7a** em vários solventes ($\lambda_{exc} = 330 - 350$ nm).

Tabela 19: Rendimentos quânticos de fluorescência (Φ_F) para os compostos **5a**, **6a** e **7a** em solventes diferentes.

*	R	Diclorometano		Dioxano		Acetonitrilo		Etanol		Sol. tampão pH=7,3		Sol. tampão pH=5,6	
		Φ_F	S	Φ_F	S	Φ_F	S	Φ_F	S	Φ_F	S	Φ_F	S
5a	Me	0,73	57	0,80	67	0,88	71	0,65	87	0,42	92	0,26	96
6a	Me	0,25	77	0,30	65	0,66	82	0,71	96	0,33	117	0,24	115
7a	Me	0,89	72	0,41	60	0,79	72	0,99	83	0,46	103	0,17	127

Erro para Φ_F cerca de 10%; S = Desvio de Stokes (nm)

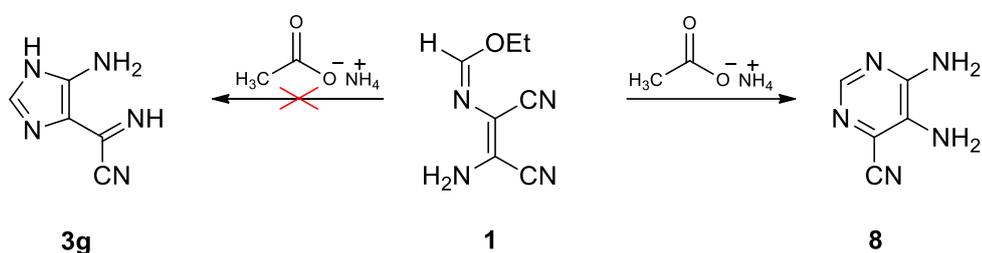
Ao analisar a **Tabela 19** conclui-se que, ao contrário dos compostos **5** e à semelhança da 2AP, quanto maior a polaridade do solvente menor é o rendimento quântico de fluorescência (Φ_F) do composto **6a**. No entanto, no solvente mais polar analisado (água), o valor de rendimento quântico de fluorescência (Φ_F) decresce, obtendo-se um dos valores mais baixos (0,24 – 0,33). Isto poderá ser explicado pela interação solvente-composto (como, por exemplo, estabelecimento de pontes de hidrogénio), que promovem uma alteração da distribuição eletrónica da molécula, podendo causar as diferenças no rendimento quântico de fluorescência (Φ_F).

Os resultados do composto **7a** não demonstraram influência da polaridade dos solventes nos valores de rendimento quântico de fluorescência (Φ_F), uma vez que tanto em solventes apolares (diclorometano) como num solvente mais polar (etanol) obtiveram-se resultados muito elevados (0,89 - 0,99).

À semelhança dos compostos **5**, os resultados em água com diferentes valores de pH (5,6 e 7,3) também diferem entre eles. A pH ácido, os valores obtidos são menores do que os valores observados a pH neutro. Isto pode ser devido ao facto de a pH ácido a formação de pontes de hidrogénio leva a que as interações composto-solvente diferem em relação às interações que acontecem a pH neutro.

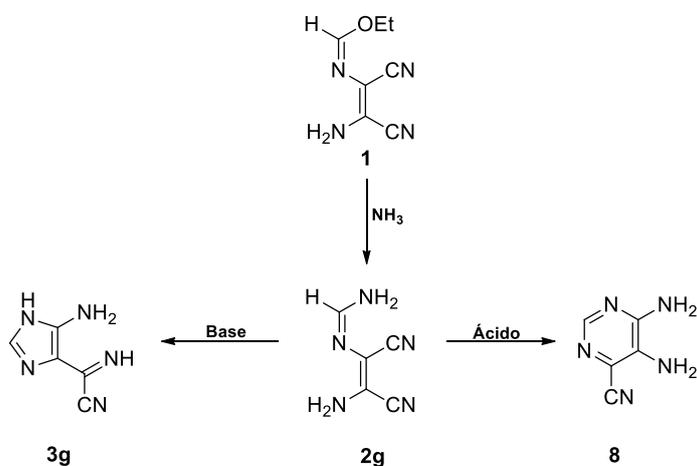
2.2. Síntese de 2-amino-9H-purina-6-carbonitrilo (5g).

Como mencionado no início deste capítulo, de modo a ser possível uma melhor comparação das propriedades fotofísicas com a 2AP procedeu-se à síntese do composto **5g**. Começou-se por investigar as condições mais adequadas para a síntese do 5-amino-4-cianoformimidóil-1H-imidazole **3g** a partir do imidato **1** e acetato de amónio. Durante este processo descobriu-se que a reação não seguia o caminho da formação do composto **3g**, mas evoluía para a formação do composto desconhecido que foi, entretanto, identificado como sendo o composto **8** (Esquema 23).



Esquema 23: Sequência reacional prevista para a síntese 5-amino-1H-imidazole-4-cianoformimidóilimidazole (**3g**) a partir do imidato **1**.

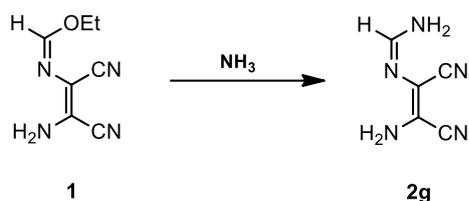
Uma vez que o composto **8** demonstrava propriedades fluorescentes e uma estrutura que permite modificações, prosseguiu-se para o estudo das condições reacionais que conduzem à formação deste produto. Foram realizados ensaios a partir do imidato **1** e, mais tarde, a partir da amidina **2g**. Em paralelo ao estudo desta reação, também foram feitos ensaios para atingir o objetivo inicial, ou seja, a síntese do imidazole **3g** (Esquema 24).



Esquema 24: Sequência reacional prevista para a síntese do imidazole **3g** e formação do 5,6-diaminopirimidina-4-carbonitrilo (**8**) a partir do imidato **1**.

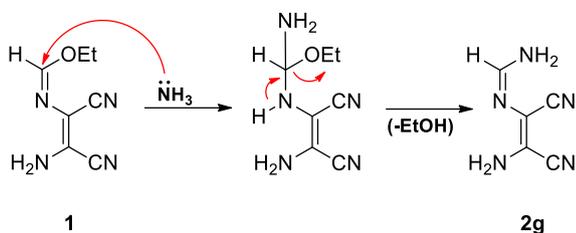
2.2.1. Síntese de (Z)-N'((Z)-2-amino-1,2-dicianovinil) formimidamida (2g).

Para a síntese da amidina **2g** foi necessário investigar as condições reacionais apropriadas para esta reação, uma vez que não havia experiência anterior nesta reação. Para o efeito, combinou-se o imidato **1** com um excesso de amônia aquosa (**Esquema 25**) em diferentes solventes e a diferentes temperaturas. As reações foram monitorizadas por TLC e os resultados das experiências realizadas apresentam-se resumidos na **Tabela 20**.



Esquema 25: Síntese da amidina **2g** a partir do imidato **1**.

O mecanismo reacional proposto para a síntese da amidina **2g** (**Esquema 26**) inicia-se com o ataque nucleofílico do amoníaco ao carbono central do imidato **1** para dar um intermediário tetraédrico que evolui para a amidina **2g**, por eliminação de uma molécula de etanol.



Esquema 26: Mecanismo reacional proposto para a síntese da amidina **2g** a partir do imidato **1**.

Tabela 20: Condições reacionais usadas na síntese da amidina **2g**.

Ensaio	RP (mmol)	NH ₃ aq (eq)	Condições experimentais	Resultados
1	1 (0,61)	10,1	i. THF (0,2 mL); Ta; 4 h ii. DBU (1 gota); Ta; 3 h iii. Cianamida (1,5 eq); Ácido acético (3,0 eq); Ta; 24 h	(a)
2	1 (3,08)	11,0	THF (0,4 mL); Ta; 2 h	2g (b)
3	1 (0,65)	10,0	Ta; 4 h	2g (c)
4	1 (0,66)	10,0	Cloreto de anilíneo; Ta; 4 h	2g (c)
5	1 (17,61)	7,0	ACN (3 mL); 15 °C; 4 h	2g (87%)
6	1 (19,00)	4,0	ACN (6 mL); Cloreto de anilíneo; 15 °C; 3 h	2g (60%)
7	1 (4,11)	4,0	Etanol (6 mL); Cloreto de anilíneo; 15 °C; 3 h	2g (55%)

a) Mistura complexa; b) Sólido contaminado; c) Não isolado

Iniciou-se esta etapa do trabalho pela experiência 1, com o objetivo de formar o imidazole **3g**. Seguiu-se o método utilizado nas sínteses dos compostos **3**, onde se fez reagir o imidato **1** com a amina correspondente, neste caso a amônia aquosa. Após a formação da amidina, adicionou-se DBU promovendo a sua ciclização, de modo a formar o imidazole **3g**. Contudo, não foi possível isolar o sólido e decidiu-se prosseguir para a etapa seguinte.

Tendo em vista a síntese do composto **4g**, fez-se a reação *in situ* adicionando-se cianamida e ácido acético à mistura reacional da reação anterior. Após 24 horas, por TLC verificou-se que não ocorreu a formação do composto **4g**, uma vez que não apresentava a mancha característica destes compostos.

Face a estes resultados, decidiu-se repetir a reação de modo a isolar a amidina **2g**. Conforme se pode ver na **Tabela 20**, no ensaio 2 obtiveram-se melhores resultados uma vez que foi possível isolar um sólido. Contudo, este veio contaminado com o reagente de partida e com um composto desconhecido.

Nas experiências 3 e 4 foram feitas duas tentativas sem solvente, uma na presença de cloreto de anilíneo como catalisador e outra na ausência de catalise. Pelos resultados demonstrados por TLC, foi possível concluir-se que a falta de solvente não permitiu o consumo total do imidato e que a presença da catalise ácida não teve efeito no tempo de reação.

Após algumas tentativas de reprodução dos ensaios anteriores, uma vez que os resultados se mantiveram semelhantes, decidiu-se alterar o solvente para acetonitrilo (Ensaio 5). Após 4 horas de reação, por TLC verificou-se conversão total do imidato **1** em amidina **2g** e o produto foi isolado com um rendimento muito bom (87%). Face a estes resultados, decidiu-se repetir esta reação testando-se a redução da quantidade de amónia para quatro equivalentes (Ensaio 6) e a utilização de etanol como solvente (Ensaio 7). Ambos os ensaios (6 e 7) foram realizados na presença de catálise ácida. Por TLC, os resultados das experiências 6 e 7 foram semelhantes, mas os rendimentos foram inferiores (60% e 55 %, respetivamente) ao obtido no ensaio anterior.

A amidina **2g** foi isolada na forma de um sólido cinza. De um modo geral, verifica-se que as reações ocorrem à temperatura ambiente e demoram entre 3 a 4 horas, obtendo-se rendimentos entre 55% e 87%.

A análise de TLC e a análise espectroscópica de ^1H e ^{13}C RMN dos sólidos obtidos demonstraram que todos os produtos se encontravam puros para serem utilizados posteriormente.

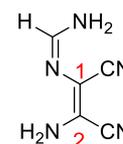
2.2.2. Caraterização espectroscópica da (Z)-N'-(Z)-2-amino-1,2-dicianovinil) formimidamida (2g).

Realizaram-se análises espectroscópicas de ^1H RMN, ^{13}C RMN e técnicas bidimensionais (HMBC, HMQC e DEPT) (Tabela 21 e Tabela 22).

Os dados obtidos permitiram identificar o produto obtido como sendo a estrutura de (Z)-N'-(Z)-2-amino-1,2-dicianovinil) formimidamida (**2g**).

No espetro de ^1H RMN (Tabela 21), observam-se os sinais da unidade amidina como um tripleto a δ 7,62 ppm, que integra para um protão (CH) e ainda um duplete a integrar para dois protões a δ 7,23 ppm (NH_2). Observa-se ainda o sinal de um singleto que integra para dois protões a δ 5,89 ppm que confirma a presença do grupo 2-amino.

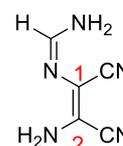
Tabela 21: Dados espectroscópicos de ^1H RMN para a (*Z*)-*N*-((*Z*)-2-amino-1,2-dicianovinil) formimidamida (**2g**). (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).



Composto	2-NH ₂	H	NH ₂
2g	5,89 (s; 2H)	7,62 (t; 8,8Hz; 1H)	7,23 (d; 8,8Hz; 2H)

No espectro de ^{13}C RMN (**Tabela 22**), além dos sinais dos dois grupos nitrilo a δ 115,13 – 116,13 ppm, observa-se ainda o sinal de C-1 e de C-2 a δ 106,91- 116,76 ppm. Também é possível ver o sinal do carbono do grupo amidina a 152,62 ppm, confirmando-se a estrutura **2g**.

Tabela 22: Dados espectroscópicos de ^{13}C RMN para a (*Z*)-*N*-((*Z*)-2-amino-1,2-dicianovinil) formimidamida (**2g**). (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).

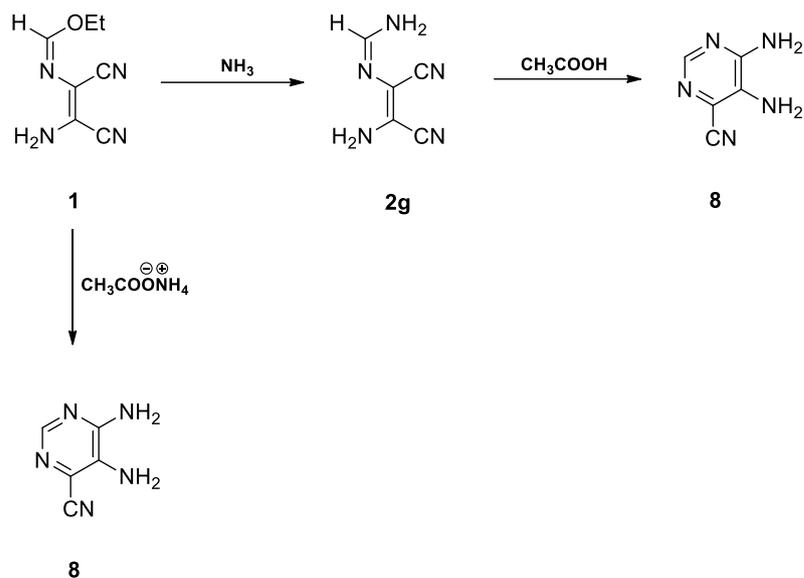


Composto	C-1	C-2	1-CN	2-CN	C=N
2g	106,91	116,76	115,13	116,13	152,62

2.2.3. Síntese de 5,6-diaminopirimidina-4-carbonitrilo (**8**).

Como foi dito anteriormente, no início do estudo das condições mais adequadas para a síntese do imidazole **3g** a partir do imidato **1** e acetato de amônio, verificou-se que a reação não seguia na direção da formação do composto **3g**, mas evoluía para um produto desconhecido que, no final de várias tentativas, foi identificado como sendo o composto **8**. Com base nisso, decidiu-se explorar esta síntese uma vez que este produto demonstrava um certo interesse por apresentar fluorescência e pela sua estrutura ser um possível precursor para a síntese de novas purinas.

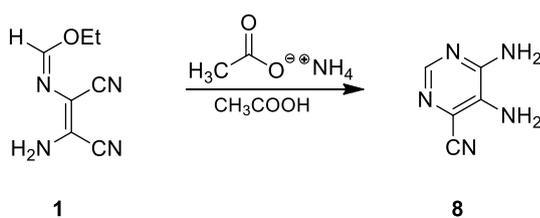
No estudo desta síntese foram encontrados dois métodos, a síntese a partir do imidato **1** por reação com acetato de amônio e a síntese a partir da amidina **2g** com ácido acético.



Esquema 27: Sequência reacional dos dois métodos encontrados para a síntese do 5,6-diaminopirimidina-4-carbonitrilo (**8**) a partir do imidato **1** e a partir da amidina **2g**.

2.2.3.1. Síntese de 5,6-diaminopirimidina-4-carbonitrilo (**8**) a partir do imidato (**1**).

Para o primeiro método de síntese do composto **8** combinou-se o imidato **1** com acetato de amônio (**Esquema 28**). As reações foram monitorizadas por TLC e os resultados das experiências realizadas apresentam-se resumidos na **Tabela 23** e na **Tabela 24**.



Esquema 28: Síntese de 5,6-diaminopirimidina-4-carbonitrilo (**8**) a partir do imidato **1**.

Tabela 23: Condições reacionais usadas na síntese de 5,6-diaminopirimidina-4-carbonitrilo (**8**) a partir do imidato **1** em diferentes solventes.

Ensaio	RP (mmol)	CH ₃ COONH ₄ (eq)	Solvente	Condições Reacionais	Resultados
1	1 (1,99)	1,0	DMSO (0,5 mL)	i. Ta; 3 h ii. 40 °C; 2 h	2g + 8 (a)
2	1 (1,93)	1,0	DMSO (0,5 mL)	i. 10 °C; 18 h ii. Ta; 6 h	1 + 2g + 8 (a e b)
3	1 (1,68)	3,0	DMSO/H ₂ O (0,5:0,1)	Ta; 6 dias	8 + 9 (a e b)
4	1 (2,08)	1,5	DMSO (1,0 mL)	i. 80 °C; 30 min ii. Ácido acético (3,0 eq); 80 °C; 6 h	8 (a)
5	1 (3,18)	3,0	ACN/EtOH (1:2)	40 °C; 15 h	8 + 9 (a)
6	1 (4,35)	2,0	ACN/H ₂ O (1:1)	40 °C; 6 h	8 + x (a)

(a) Não isolado; (b) Mistura complexa; x = produto desconhecido.

Na **Tabela 23** estão resumidas as reações mais representativas dos ensaios em DMSO para a síntese da pirimidina **8** a partir do imidato **1**.

No primeiro ensaio, foi adicionado acetato de amónio a uma solução de imidato em dimetilsufóxido, à temperatura ambiente. Após 3 horas, verificou-se por TLC que a reação não estava completa. Aumentou-se a temperatura para 40 °C e, decorridas 2 horas, foi possível observar a formação do intermediário **2g** e do produto **8**, contudo não foi possível isolar nenhum dos compostos. O ensaio 2 foi realizado a baixa temperatura (10 °C) com o intuito de gerar seletivamente apenas um dos produtos. No entanto, após 18 horas verificou-se por TLC que a reação não tinha evoluído. Face a este resultado, colocou-se a mistura reacional à temperatura ambiente, mas o resultado foi a formação de uma mistura de compostos que, mais uma vez, dificultou o isolamento.

O ensaio 3 foi realizado numa mistura de DMSO/água com o intuito de ajudar a dissociação do acetato de amónio. Por TLC, observou-se o consumo total do reagente de partida (**1**) e a formação da pirimidina **8** e de um produto secundário, que foi posteriormente identificado como sendo o composto **9** (**Figura 30**). Contudo, não foi possível isolar nenhum dos compostos formados. Prosseguiu-se para a caracterização da mistura por espectroscopia de RMN e verificou-se que, além da pirimidina **8**, a mistura continha um derivado de imidazole ao qual foi atribuída a estrutura da carboxamidina **9**, com base num trabalho anteriormente realizado onde foi obtido um composto análogo [52]. Seguindo as condições de obtenção desse composto, fez-se reagir o imidazole **3g** (**Esquema 29**) em acetato de amónio e isolou-se

um sólido que foi caracterizado por ^1H e ^{13}C RMN e técnicas 2D. Comparando os espectros de ^1H e ^{13}C RMN do sólido obtido com os espectros das misturas reacionais que se foi caracterizando, chegou-se à conclusão que se tratava do mesmo composto. Os desvios químicos dos sinais de próton e de carbono, observados nos espectros deste produto são apresentados na **Figura 30**.

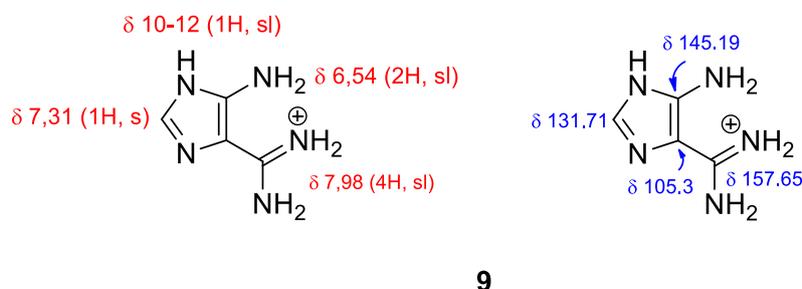


Figura 30: Estrutura do composto **9** e respectivos dados de ^1H e ^{13}C RMN (δ em ppm), a vermelho e azul respetivamente.

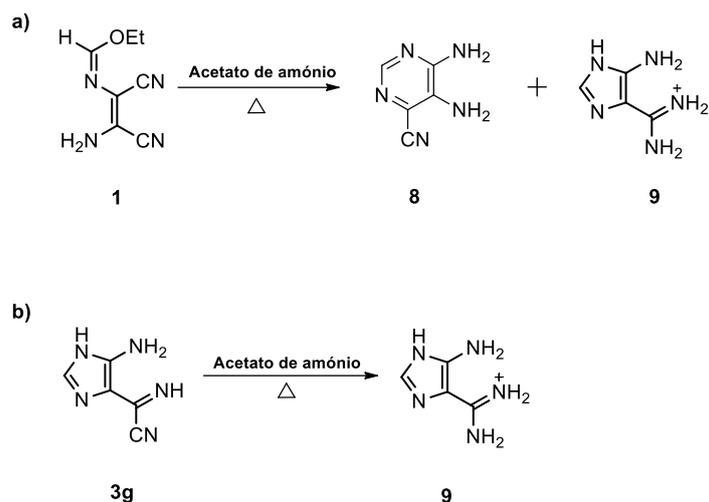
Tendo como objetivo encontrar as condições para a síntese seletiva do composto **8**, repetiu-se a reação usando apenas DMSO e aquecendo a $80\text{ }^\circ\text{C}$. Como não se observou evolução, adicionou-se então ácido acético (ensaio 4) à mistura, uma vez que se suspeitava que o composto **8** só se formava a temperaturas elevadas e com a adição de ácido. Ao fim de quase 7 horas, por TLC verificou-se a formação do composto **8**. No entanto, devido ao uso de dimetilsulfóxido não foi possível isolar o produto.

Foram ainda realizados dois ensaios utilizando misturas de solventes, nomeadamente misturas de acetonitrilo/etanol e acetonitrilo/água, com o intuito de ter ambos os reagentes em solução para promover a síntese do composto **8** (Ensaio 5 e 6).

A experiência **5**, realizada numa mistura de acetonitrilo/etanol, foi mantida sob agitação magnética a $40\text{ }^\circ\text{C}$. Após 15 horas, observou-se a formação de uma mistura da pirimidina **8** e de um outro composto, identificado como sendo o imidazole **9**, mas não foi possível isolar nenhum sólido.

A experiência **6** foi realizada à mesma temperatura do ensaio anterior, contudo o segundo solvente utilizado foi a água e aumentou-se a quantidade de acetato de amónio. À semelhança do resultado anterior, formou-se a pirimidina **8** e um composto desconhecido. Devido à presença da água, não foi possível isolar nenhum dos produtos.

Com base nestes resultados chegou-se à conclusão que era possível sintetizar o composto **8**, no entanto persistiam os problemas de falta de seletividade e/ou instabilidade dos produtos.



Esquema 29: a) Proposta de estruturas que podem ser encontradas na síntese da pirimidina **8**. b) Reação do imidazole **3g** com o acetato de amônio para provar a formação do composto **9** na síntese da pirimidina **8**.

Tabela 24: Condições reacionais usadas na síntese de 5,6-diaminopirimidina-4-carbonitrilo (**8**) a partir do imidato **1** em acetonitrilo.

Ensaio	RP (mmol)	CH ₃ CONH ₄ (eq)	Condições Reacionais	Resultados
7	1 (1,86)	1,7	ACN (1 mL); Ta; 4 h	1 + 2g + 8 (a)
8	1 (1,80)	1,6	ACN/H ₂ O (4:1); 60 °C; 24 h	9 (b)
9	1 (1,57)	-	i. ACN (13 mL); Amônia 25% (11,0 eq); Ácido acético (2,0 eq); 80 °C; 3 h ii. TFA (2 gotas); 80 °C; 8 h	9 (b)
10	1 (1,68)	1,0	i. ACN (6 mL); 80 °C; 1 h ii. Ácido acético (1,0 eq); 80 °C; 18 h	8 (2,5%)
11	1 (3,70)	1,2	ACN (7 mL); TFA (3 gotas); 80 °C; 6 h	8 (b)
12	1 (2,06)	1,6	i. ACN (10 mL); 60 °C; 5 h ii. Ácido acético (1,0 eq); 60 °C; 17 h	8 (28%)
13	1 (1,95)	1,5	ACN (10 mL); 80 °C (refluxo); 11 h	8 (30%)
14	1 (1,57)	1,0	i. ACN (18 mL); 80 °C; 1 h ii. Ácido acético (1,0 eq); 80 °C; 2 h iii. TFA (3 gotas); 80 °C; 11 h	8 (33%)
15	1 (3,41)	1,0	ACN (25 mL); Ácido acético (2,0 eq); 80 °C; 7 h	8 (33%)

a) Não isolado; b) Isolado, mas com a presença de compostos secundários

Tendo em conta os resultados anteriores, foram realizadas várias experiências utilizando acetonitrilo como solvente, mas apenas se apresentam aqui resumidos os 7 ensaios mais representativos deste estudo (**Tabela 24**). No ensaio 7 os reagentes foram mantidos sob agitação magnética à temperatura ambiente. Ao fim de 4 horas observou-se por TLC que a reação não tinha sido completa, uma vez que era detetada a presença do reagente de partida (**1**) e do intermediário (**2g**).

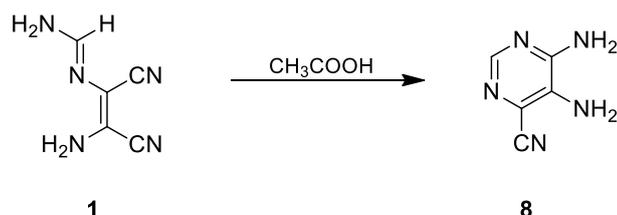
O ensaio 8 foi repetido com a mesma quantidade de acetato de amónio, utilizando uma mistura de acetonitrilo/água (4:1), para facilitar a dissolução do reagente, e a temperatura foi mantida a 60 °C. O ensaio 9 foi realizado com amónia aquosa e ácido acético e posteriormente adicionou-se um ácido mais forte (TFA). Observou-se que os dois ensaios originaram um produto, cujo espetro de ^1H e ^{13}C RMN demonstrou tratar-se da carboxamidina **9**, tal como tinha acontecido anteriormente.

Suspeitou-se que a reação poderia precisar de uma temperatura elevada e, por isso, os ensaios 12 a 15 foram realizadas a temperaturas mais elevadas (60 a 80 °C). Foram feitas mudanças na quantidade de acetato de amónio adicionado, na quantidade de solvente, na quantidade e natureza de ácido e nos tempos de reação. Em todos os ensaios foi observada a presença de misturas de compostos no meio reacional, tendo sido possível identificar como produtos maioritários os compostos **8** e **9**. No entanto, foi possível isolar sempre o produto **8** puro, embora com rendimentos baixos, à exceção do ensaio 11 em que o sólido veio contaminado com outros compostos. O rendimento mais elevado foi obtido nos ensaios 14 e 15 (33%). Face aos resultados, conclui-se que a síntese da pirimidina **8** a partir do imidato **1** e de acetato de amónio é favorecida a temperaturas elevadas e quando se utiliza excesso de ácido acético. Contudo, devido aos problemas de falta de seletividade e/ou instabilidade dos produtos, os rendimentos foram baixos.

A análise de TLC e a análise espetroscópica de ^1H e ^{13}C RMN, dos sólidos obtidos permitiu a confirmação da estrutura e pureza do 5,6-diaminopirimidina-4-carbonitrilo (**8**).

2.2.3.2. Síntese de 5,6-diaminopirimidina-4-carbonitrilo (**8**) a partir da amidina (**2g**).

Na tentativa de desenvolver um método alternativo para a síntese do composto **8**, combinou-se a amidina **2g**, preparada numa etapa anterior, com ácido acético (**Esquema 30**). As reações foram monitorizadas por TLC e os resultados das experiências realizadas apresentam-se resumidos na **Tabela 25**.



Esquema 30: Síntese de 5,6-diaminopirimidina-4-carbonitrilo (**8**) a partir da amidina **2g**.

Tabela 25: Condições reacionais usadas na síntese de 5,6-diaminopirimidina-4-carbonitrilo (**8**) a partir da amidina **2g** em diferentes solventes.

Ensaio	RP (mmol)	Solvente	CH ₃ COOH (eq)	Condições Reacionais	Resultados
1	2g (0,74)	ACN/Etanol (2:1)	6,0	40 °C; 8 h	8 + 10 (a)
2	2g (1,37)	ACN (4 mL)	1,0	40 °C; 24 h	8 + 2g (a)
3	2g (2,05)	Etanol (15 mL)	4,0	80 °C; 7 h	2g + 8 + 10 (a)
4	2g (0,90)	DMSO (0,4 mL)	6,0	40 °C; 4 h	8 (b)
5	2g (0,98)	DMSO/ACN (0,3:4)	1,5	80 °C; 6 h	8 (6%)

a) Não isolado; b) Isolado, mas contaminado com produtos secundários

A **Tabela 25** mostra as experiências mais representativas para a síntese da pirimidina **8** a partir da amidina **2g**. O estudo foi iniciado pelo ensaio 1, onde foi adicionado um excesso de ácido ao reagente de partida (**2g**) numa mistura de acetonitrilo/etanol, a uma temperatura de 40 °C. Ao fim de 8 horas, observou-se por TLC a presença do produto desejado **8** e de um outro composto ao qual, posteriormente, foi atribuída a estrutura do carboximidato de etilo **10** (evidência de ¹H RMN), contudo não foi possível isolar nenhum dos compostos. Repetiu-se a experiência (ensaio 2) diminuindo a quantidade de ácido adicionado e removendo o etanol da mistura reacional para evitar a formação do composto **10**. Ao fim de um dia verificou-se que a reação não foi completa e, mais uma vez, não se conseguiu isolar nenhum dos compostos.

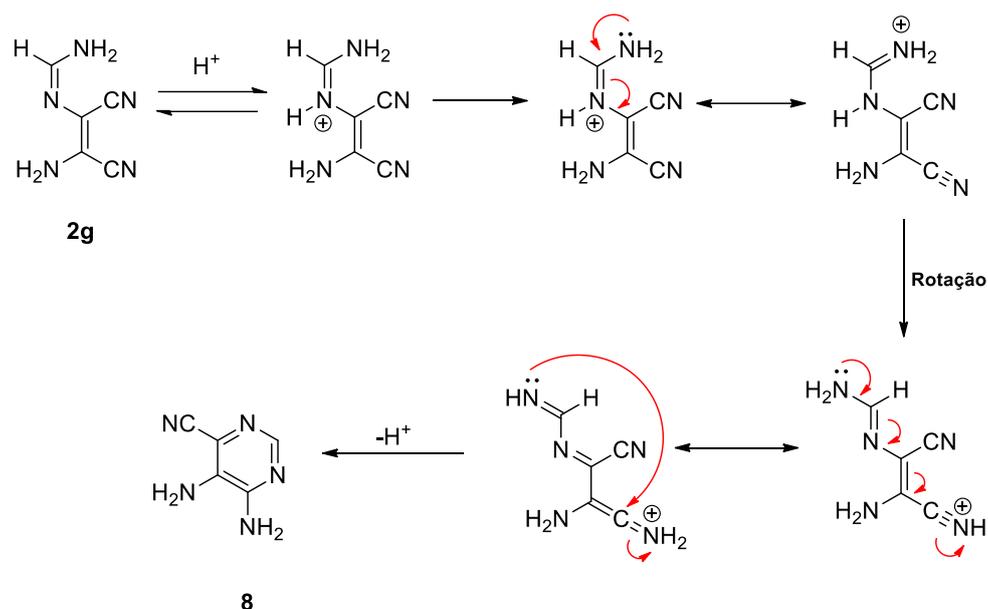
Para confirmar o resultado obtido na experiência 1, o ensaio 3 foi realizado só em etanol na presença de um excesso de ácido acético, a uma temperatura elevada (80 °C), e verificou-se que para além da reação não ter sido completa (presença do reagente de partida **2g**) formou-se maioritariamente o composto **10**, contudo não foi possível isolar este produto.

Na tentativa de averiguar se a solubilidade do reagente de partida era um fator importante na reação, fez-se um ensaio em dimetilsulfóxido. Os resultados foram melhores, uma vez que a reação foi completa e mais rápida, contudo devido à impossibilidade de evaporar o solvente, não foi possível isolar o produto.

Numa última tentativa de sintetizar a pirimidina **8** a partir da amidina, realizou-se um ensaio em DMSO/acetoneitrilo a 80 °C. Ao fim de 6 horas isolou-se o produto puro (evidência de ¹H RMN), contudo o rendimento da reação foi bastante baixo.

Com estes resultados conclui-se que é possível sintetizar o composto **8** a partir da amidina **2g**, contudo não é um método viável uma vez que na maior parte dos ensaios não foi possível isolar composto **8**, e nas experiências em que se isolou, o rendimento mais alto que se obteve foi de 6%.

O mecanismo proposto para a síntese do 5,6-diaminopirimidina-4-carbonitrilo (**8**) – **Esquema 31** - inicia-se com a formação a protonação da amidina **2g** na presença de ácido que deve favorecer a isomerização na unidade amidina. Poderá então ser estabelecido um equilíbrio tautomérico, seguido de uma rotação na ligação simples entre C-1 e C-2 que facilita o ataque nucleofílico intramolecular. Ocorre assim uma ciclização com formação de um anel de seis membros não aromático que deve evoluir rapidamente para a estrutura de pirimidina aromática correspondente de 5,6-diaminopirimidina-4-carbonitrilo (**8**).



Esquema 31: Mecanismo reacional proposto para a síntese de 5,6-diaminopirimidina-4-carbonitrilo (**8**) a partir da amidina **2g**.

2.2.3.3. Caracterização espectroscópica de 5,6-diaminopirimidina-4-carbonitrilo (**8**).

Realizaram-se análises espectroscópicas de ^1H RMN e ^{13}C RMN, recorrendo às técnicas de HMBC, HMQC e DEPT, (**Tabela 26** e **Tabela 27**) que identificaram o produto obtido como sendo a estrutura 5,6-diaminopirimidina-4-carbonitrilo (**8**).

No espectro de ^1H RMN, observa-se o sinal do próton 2-H como um singlete a δ 7,76 ppm, que integra para um próton, e dois singletos largos, a integrar para dois prótons cada, a δ 5,96 e 7,11 ppm que confirmam a presença dos grupos 5,6-amino (**Tabela 26**).

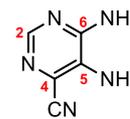
Tabela 26: Dados espectroscópicos de ^1H RMN para o 5,6-diaminopirimidina-4-carbonitrilo (**8**). (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$).



Composto	2-H	5-NH ₂	6-NH ₂	IV
8	7,76 (s; 1H)	5,96 (sl; 2H)	7,11 (sl; 2H)	3395m, 3300m, 3094f, 2225f

No espectro de ^{13}C RMN (**Tabela 27**) observa-se, para além dos carbonos do anel de pirimidina, o carbono do grupo nitrilo a δ 116,68 ppm.

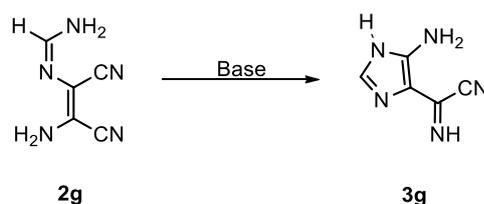
Tabela 27: Dados espectroscópicos de ^{13}C RMN para o 5,6-diaminopirimidina-4-carbonitrilo (**8**). (100 MHz, DMSO- d_6).



Composto	C-2	C-4	C-5	C-6	CN
8	146,95	132,96	113,19	153,54	116,68

2.2.4. Síntese de 5-amino-1H-imidazole-4-cianoformimidoilimidazole (**3g**).

A síntese do imidazole **3g** (Esquema 32), embora anteriormente publicada [50], foi reproduzida neste grupo de trabalho pela primeira vez, tal como referido para a amidina **2g**. Seguindo o método anteriormente reportado, neste estudo começou-se por combinar a amidina **2g** com hidróxido de bário octa-hidratado em etanol. Os ensaios foram monitorizados por TLC e os resultados das experiências realizadas apresentam-se resumidos na Tabela 28 e na Tabela 29.



Esquema 32: Síntese do 5-amino-1H-imidazole-4-cianoformimidoilimidazoles (**3g**) a partir da amidina **2g**.

Tabela 28: Síntese do 5-amino-1H-imidazole-4-cianoformimidoilimidazole (**3g**), a partir da amidina **2g** com hidróxido de bário octa-hidratado, em diferentes solventes.

Ensaio	RP (mmol)	Solvente	Ba(OH) $_2$.8H $_2$ O	Condições Reacionais	Resultados
1	2g (0,37)	Etanol 95% (5 mL)	i. 0,6 ii. 0,6	i. Ta; 2 h ii. Ta; 30 min	3g + 10 (a)
2	2g (0,35)	Etanol 95% (5 mL)	0,6	Ta; 3 h	3g (a)
3	2g (0,73)	DMSO (0,2)	0,2	Ta; 3 h	2g + 3g (a e b)

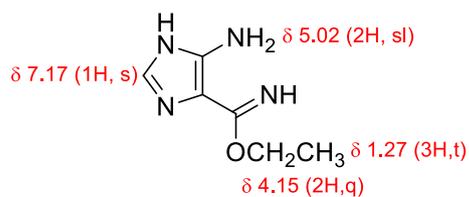
a) Não isolado; b) Mistura complexa

No ensaio 1, que foi realizado seguindo o método reportado [50], os reagentes foram dissolvidos parcialmente em etanol 95% e mantidos sob agitação à temperatura ambiente. Após 2 horas, visto que não se verificou a conversão total da amidina **2g** no imidazole **3g**, adicionou-se mais base. Ao fim de 30

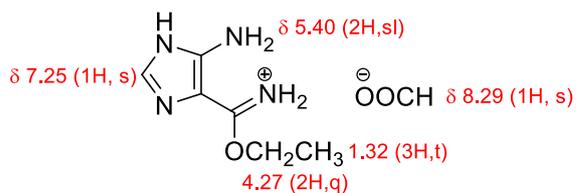
minutos, verificou-se por TLC o consumo total da amidina **2g** e a formação do produto **3g**, concluindo-se que a reação estava completa. No entanto, não foi possível isolar o produto devido à formação de outros produtos durante o passo em que é removido o excesso de solvente no evaporador rotativo. Repetiu-se a experiência, reproduzindo as condições utilizadas no primeiro passo (ensaio 2). No entanto, não se adicionou uma segunda quantidade de base, uma vez que se suspeitava que o excesso de base e o calor do evaporador rotativo favoreciam a evolução do produto de adição do etanol ao grupo cianoformimidoilo para dar o composto **10** (evidência de ^1H RMN). Ao fim de 3 horas, verificou-se por TLC que a reação estava terminada. Contudo, à semelhança do ensaio 1, não foi possível isolar o produto.

A experiência 3 foi realizada utilizando condições semelhantes às primeiras experiências. Alterou-se, porém, o solvente para DMSO. Na tentativa de entender a evolução desta síntese, decidiu-se que o ensaio 3 continuaria sob agitação magnética até se consumir totalmente a amidina **2g**. Após 1 a 2 horas, a análise de TLC detetou a presença de uma mistura complexa de compostos, onde se identificou a presença do reagente de partida (**2g**) e de um composto que se suspeitava ser o imidazole **3g**, contudo não foi possível isolar nenhum sólido.

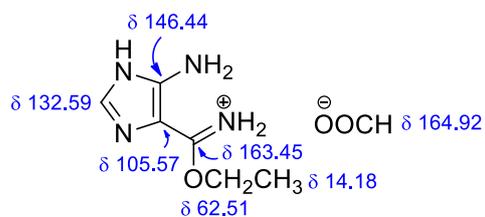
Com base nestes resultados, pode concluir-se que é possível gerar o imidazole **3g**, mas ele não é estável e acaba por evoluir para outros produtos, particularmente para o composto **10**, antes que a reação termine, o que dificulta a sua precipitação. De modo a comprovar esta hipótese, fez-se reagir o imidazole **3g** em etanol e ácido e isolou-se um sólido que foi caracterizado por espectroscopia de ^1H , ^{13}C e 2D RMN (**Esquema 33**). Comparando os espectros de ^1H e ^{13}C RMN do sólido obtido com os espectros das misturas reacionais que se foi caracterizando, chegou-se à conclusão que se tratava do mesmo composto. Os dados obtidos permitiram identificar a forma neutra (estrutura **10.1**) que aparecia nas caracterizações das misturas reacionais e a forma protonada (**10.2**) que se isolou da reação do imidazole **3g** com etanol e ácido.



10.1

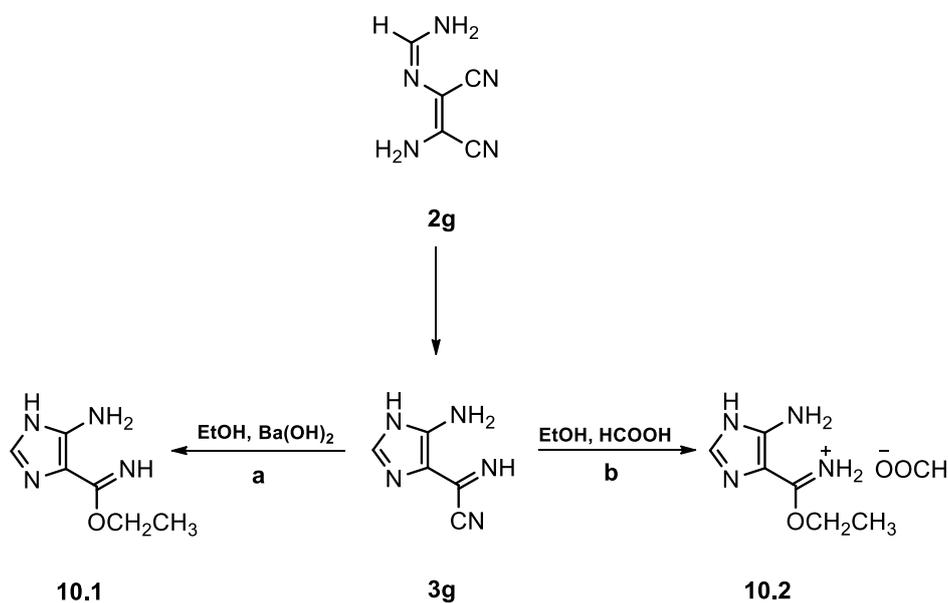


10.2



10.2

Figura 31: Estruturas dos compostos **10** na forma neutra (**10.1**) e na forma protonada (**10.2**) e respectivos dados de ¹H e ¹³C RMN (δ em ppm), a vermelho e azul respetivamente.



Esquema 33: a) Obtenção do composto **10.1** durante a síntese do imidazole **3g**; (b) Reação do imidazole **3g** com etanol e ácido fórmico para gerar o composto **10.2**.

Assim, nas reações seguintes decidiu-se investigar a síntese do imidazole **3g** a partir da reação da amidina com diferentes bases e diferentes solventes (**Tabela 29**).

Tabela 29: Síntese do 5-amino-1H-imidazole-4-cianoformimidazolimidazole (**3g**), a partir da amidina **2g** com diferentes bases, em vários solventes.

Ensaio	RP (mmol)	Solvente	Base	Condições Reacionais	Resultados
4	2g (2,10)	ACN	NaOH 4 M (1,2 eq)	Ta; 6 h	3g (a e b)
5	2g (1,98)	Acetato de etilo	DBU (1,5 eq)	Ta; 5 h	3g (a e b)
6	2g (0,87)	Etanol	DBU (1,0 eq)	10 °C; 2 h	3g + 10 (a)

a) Não isolado; b) Mistura complexa

Foram realizadas várias experiências, no entanto, na **Tabela 29** apresentam-se apenas as três experiências mais representativas. Após algumas tentativas falhadas de reprodução do método publicado, nas quais se utilizou hidróxido de bário, foram testadas 2 bases diferentes, o NaOH e o DBU. Na primeira experiência foi testado o NaOH à temperatura ambiente, no entanto, o resultado foi a formação de vários compostos, não tendo sido possível isolar sólido. Nos ensaios seguintes (experiências 5 e 6), optou-se por utilizar DBU em vez de hidróxido de sódio. Nestas experiências decidiu-se variar o solvente e a temperatura, tendo sido testados o acetato de etilo e o etanol. No entanto, por TLC, foi possível observar que no acetato de etilo ocorreu evolução da amidina **2g** para o imidazole **3g**, mas formou-se rapidamente uma mistura complexa, dificultando o isolamento do produto pretendido (**3g**). Na reação realizada em etanol, além da formação do imidazole **3g**, formou-se também o imidazole **10**.

Com base nestes resultados, pode concluir-se que é possível gerar o imidazole **3g** utilizando diferentes bases. No entanto, a maior parte das experiências resultou na mistura do produto **3g** com outros compostos que dificultaram a sua precipitação.

Na tentativa de isolar o imidazole **3g** na forma sólida, decidiu-se retomar o método reportado ([50]) e investigar a razão das falhas deste método para as poder contornar. Na **Tabela 30** pode observar-se o resumo das 7 experiências realizadas, nas quais o primeiro passo foi realizado em condições semelhantes. Os reagentes foram dissolvidos em etanol 95% e mantidos sob agitação magnética à temperatura ambiente, alterando-se apenas a quantidade de hidróxido de bário adicionada.

Tabela 30: Condições reacionais usadas na síntese do 5-amino-1H-imidazole-4-cianoformimidoilimidazole (**3g**), a partir da amidina **2g** e hidróxido de bário octahidratado, em etanol 95%.

* RP (mmol)	Etanol 95% (mL)	Ba(OH) ₂ .8H ₂ O	Condições Reacionais	Resultados
7 2g (0,78)	5,0	0,3	Ta; 2 h	3g (a e b)
8 2g (0,74)	5,0	0,6	Ta; 2 h	3g (a)
9 2g (1,70)	9,0	3,0	i. Ta; 1 h ii. Éter etílico (10mL); CO ₂	3g + 9 (a e b)
10 2g (0,80)	9,0	0,3	i. Ta; 1 h ii. Éter etílico (10mL); CO ₂	3g (a)
11 2g (1,85)	22,0	0,8	i. Ta; 2 h ii. Éter etílico (10mL); CO ₂	3g (a e b)
12 2g (1,00)	13,0	1,0	i. 15 °C; 1 h ii. Éter etílico (10mL); CO ₂	3g (14%)
13 2g (11,98)	145,0	1,0	i. 15 °C; 1 h ii. Éter etílico (10mL); CO ₂	3g (51%)

* Ensaio; a) Passo feito no evaporador rotativo

Nas experiências 7 a 11, por TLC, foi possível observar o consumo do reagente de partida (**2g**). No entanto, além da formação do produto pretendido (**3g**), observou-se também a formação de outros produtos (maioritariamente o produto **10**) durante o passo em que é removido o excesso de solvente no evaporador rotativo, dificultando o isolamento do imidazole **3g**.

Após algumas experiências concluiu-se que esta reação necessita de uma quantidade equivalente de hidróxido de bário e uma temperatura controlada. Repetiu-se a reação com estas alterações (ensaio 12 e 13) e, ao fim de 1 hora, isolou-se o imidazole **3g** na forma de um sólido verde com rendimento de 14% e 51%. A análise de TLC e a análise espectroscópica de ¹H e ¹³C RMN, dos sólidos obtidos, demonstrou que todos os produtos se encontravam puros para serem utilizados posteriormente.

2.2.5. Caracterização espectroscópica do 5-amino-1*H*-imidazole-4-cianoformimidazole (**3g**).

A pureza e estrutura do imidazole **3g** foi confirmada através das análises espectroscópicas de ^1H RMN, ^{13}C RMN, DEPT e técnicas 2D (HMBC e HMQC) (Tabela 31 e Tabela 32). Verifica-se que os seus sinais de ^1H RMN e ^{13}C RMN comparam com os valores anteriormente relatados para este composto [50]. Além disso, também estão de acordo com os sinais observados nos espectros dos restantes imidazoles (**3**) com diferentes substituintes (**R**).

No espectro de ^1H RMN, observa-se o próton 2-H do anel de imidazole a δ 7,18 ppm como um singleto a integrar para um próton, enquanto o grupo 5-amino aparece a δ 6,40 ppm a integrar para 2 prótons como um singleto largo. Também é possível observar os sinais do próton do grupo C=NH e do próton N^A -H como um singleto muito largo centrado a δ 10,73 ppm (Tabela 31).

Tabela 31: Dados espectroscópicos de ^1H RMN para o 5-amino-1*H*-imidazole-4-cianoformimidazole (**3g**). (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).



Composto	2-H	4-CNH	5-NH ₂	1-H
3g	7,18 (s; 1H)	10,73 (sl; 2H)	6,40 (sl; 2H)	10,73 (sl; 2H)

No espectro de ^{13}C RMN (Tabela 32), para além de se observar os sinais dos carbonos do anel de imidazole, também é possível ver os sinais do substituinte ligado a C-4 em que o carbono imínico surge a δ 144,85 ppm e o carbono do grupo nitrilo a δ 115,64 ppm, confirmando-se a estrutura do imidazole **3g**.

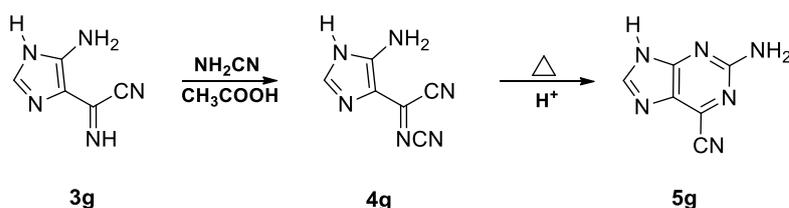
Tabela 32: Dados espectroscópicos de ^{13}C RMN para o 5-amino-1*H*-imidazole-4-cianoformimidazole (**3g**). (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)



Composto	C-2	C-4	C-5	C=NH	CN
3g	130,28	113,82	142,79	144,85	115,64

2.2.6. Síntese de 2-amino-9*H*-purina-6-carbonitrilo (**5g**).

A síntese do 2-aminopurina-6-carbonitrilo **5g**, à semelhança do análogo **5f**, foi feita numa reação em dois passos (**Esquema 34**), uma vez que não foi possível isolar o intermediário **4g**. Num primeiro passo, fez-se reagir o imidazole **3g** com cianamida e ácido acético, de forma a gerar o intermediário **4g**. De seguida, a reação foi aquecida sob pressão de forma a promover a ciclização do intermediário *in situ*, para formar o 2-amino-9*H*-purina-6-carbonitrilo (**5g**) desejado – **Tabela 33**.



Esquema 34: Síntese dos 2-amino-9*H*-purina-6-carbonitrilo (**5g**) numa reação em duas etapas a partir do imidazole **3g**.

Tabela 33: Condições reacionais usadas na síntese de 2-amino-9*H*-purina-6-carbonitrilo (**5g**).

Ensaio	RP (mmol)	NH_2CN (eq)	CH_3COOH (eq)	Solvente	Condições Reacionais	η (%)
1	2g (1,51)	iii. 1,5	iii. 1,5	Etanol 95%	i. $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ (eq); Ta; 2 h ii. Éter etílico (10 mL); CO_2 iii. DMSO; Ta; 5 h iv. ACN/EtOH; 80 °C; 15 h	22 (a)
2	3g (3,14)	1,5	1,5	DMSO	i. Ta; 3 h ii. ACN; 80 °C; 5 h	44 (b)

a) Rendimento global de 3 etapas de reação; b) Rendimento global de 2 etapas de reação

Na **Tabela 33** apresentam-se duas abordagens experimentais utilizadas para a síntese do 2-amino-9*H*-purina-6-carbonitrilo (**5g**). A experiência 1 foi feita ainda durante o estudo das condições para a síntese do imidazole **3g**, explicado na etapa anterior, enquanto a experiência 2 foi realizada após esse estudo.

Na experiência 1, preparou-se o imidazole **3g** a partir da amidina **2g** por reação com o hidróxido de bário e, não tendo sido possível a precipitação deste imidazole, continuou-se para o passo seguinte *in situ* devido à necessidade de ter o 2-amino-9*H*-purina-6-carbonitrilo (**5g**) para a parte final do trabalho. Tal como se procedeu para a síntese os restantes *N*-cianoiminonitrilos (compostos **4**), adicionou-se cianamida e excesso de ácido em DMSO. Após 5 horas, por TLC, verificou-se a formação de dois compostos, sendo que um dos compostos foi identificado com o produto desejado (intermediário **4g**).

Uma vez que também não foi possível isolar o intermediário **4g**, seguiu-se para o passo seguinte *in situ*. Adicionou-se acetonitrilo e aqueceu-se a reação sob pressão a uma temperatura de 80 °C. Obteve-se um rendimento global de 22%, que é bastante razoável tendo em conta que corresponde a uma reação em três etapas. Além disso, parte das perdas podem ser explicadas pela necessidade de se realizar uma purificação à mistura reacional, através de uma coluna de sílica.

A experiência 2 foi realizada a partir do imidazole **3g**, o qual se fez reagir com cianamida e ácido acético em DMSO. Após 3 horas, por TLC verificou-se que a reação estava completa. No entanto, foi necessário prosseguir para o passo seguinte *in situ* uma vez que, à semelhança da outra experiência, não foi possível isolar o intermediário **4g** devido à sua elevada solubilidade. Adicionou-se acetonitrilo e manteve-se a reação a 80 °C. Após 5 horas a reação estava completa (evidência de TLC). O 2-amino-9H-purina-6-carbonitrilo (**5g**) foi isolado na forma de um sólido branco com um rendimento global de 44%. O rendimento moderado também pode ser explicado pela purificação feita à mistura reacional através de uma coluna de sílica. As análises de TLC e espectroscópicas de ¹H e ¹³C RMN, dos sólidos obtidos, demonstraram que o produto se encontrava puro para ser utilizado na caracterização fotofísica.

2.2.7. Caracterização espectroscópica de 2-amino-9H-purina-6-carbonitrilo (**5g**)

Realizaram-se análises espectroscópicas de ¹H RMN e ¹³C RMN, recorrendo às técnicas de HMBC, HMQC e DEPT, (Tabela 34 e Tabela 35) que identificaram o produto obtido como sendo a estrutura das 2-amino-9H-purina-6-carbonitrilo (**5g**) esperadas.

No espectro de ¹H RMN, observa-se o sinal típico do próton 8-H como um singlete a δ 8,30 ppm, que integra para um próton, e um singlete largo a integrar para dois prótons a δ 6,91 ppm que confirma a presença do grupo 2-amino. A confirmação da estrutura é dada pelo sinal do próton na posição 9 conforme é demonstrado na Tabela 34.

Tabela 34: Dados espectroscópicos de ¹H RMN para o 2-amino-9H-purina-6-carbonitrilo (**5g**). (400 MHz, DMSO-*d*₆).



Composto	8-H	2-NH ₂	R	IV
5g	8,30 (s; 1H)	6,91 (s; 2H)	13,10 (s; 3H)	3475m, 3291m, 3179m, 3131f, 3094f, 2235f

No espectro de ^{13}C RMN (**Tabela 35**), para além dos sinais típicos da purina, observa-se o sinal do grupo nitrilo a δ 114,75 ppm, confirmando a estrutura do 2-aminopurina-6-carbonitrilo **5g**.

Tabela 35: Dados espectroscópicos de ^{13}C RMN para o 2-amino-9H-purina-6-carbonitrilo (**5g**). (100 MHz, DMSO- d_6).



Composto	R	C-2	C-4	C-5	C-6	C-8	CN	R
5g	H	160,15	156,19	128,16	129,14	144,79	114,75	-

2.2.8. Propriedades fotofísicas de 2-amino-9H-purina-6-carbonitrilo (**5g**)

As propriedades de absorção e fluorescência do composto **5g**, sintetizado anteriormente, foram medidas à semelhança dos compostos **5**. Foram comparados os valores de comprimento de onda de absorvância máxima, de emissão máxima, os rendimentos quânticos de fluorescência e o desvio de Stokes, para o composto **5g** - **Tabela 36**, **Tabela 37** e **Tabela 38**.

Tabela 36: Comprimentos de onda de absorção máxima (λ_{abs}) para os compostos **5g** em solventes diferentes.

Composto	R	Diclorometano	Dioxano	Acetonitrilo	Etanol	Sol. tampão pH=7,3	Sol. tampão pH=5,6
		λ_{abs} (nm)					
5g	H	347	352	350	356	352	350

Com base na **Tabela 36** e na **Figura 32**, pode verificar-se que os máximos de absorvância para o composto **5g** são semelhantes aos compostos **5** discutidos anteriormente, concluindo-se que o comprimento de onda de absorvância máxima para este composto é de 347 a 356nm, dependendo do solvente utilizado.

Ao comparar com a 2AP pode também concluir-se que, à semelhança dos outros compostos **5**, há um desvio para a direita, ou seja o comprimento de onda de absorvância máximo dos composto **5g** aproxima-se mais do visível.

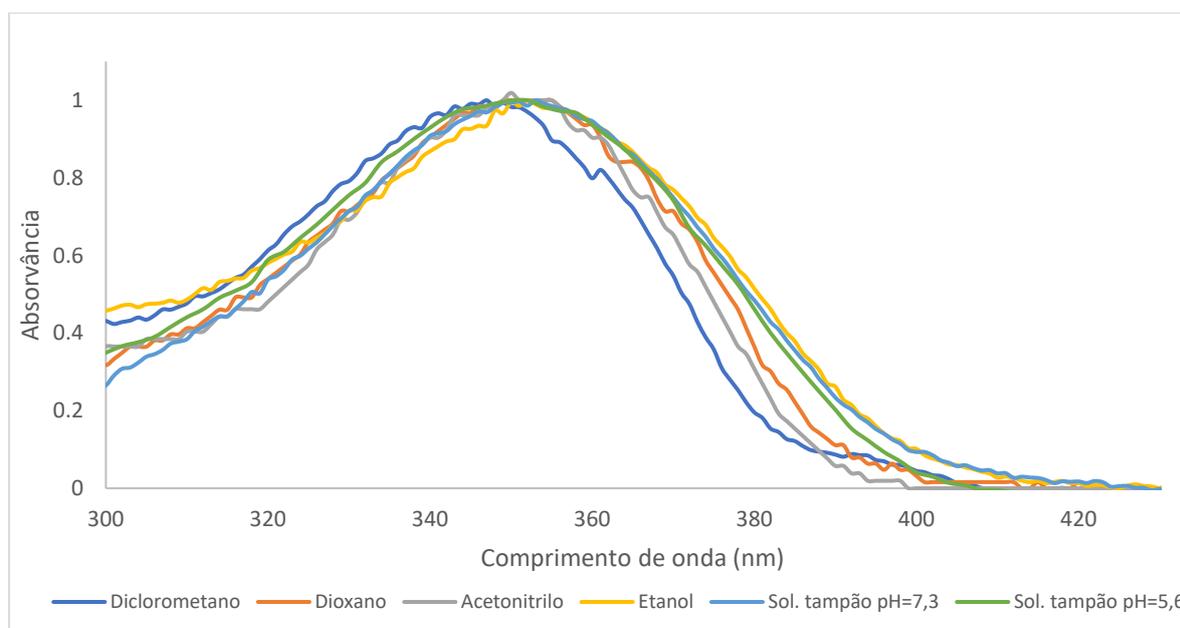


Figura 32: Espectros de absorção normalizados de soluções 1×10^{-5} M do composto **5g** em vários solventes (Percurso ótico: 1,0 cm).

Tabela 37: Comprimentos de onda de absorvância máxima (λ_{em}) para os compostos **5g** e 2AP em solventes diferentes.

		Diclorometano	Dioxano	Acetonitrilo	Etanol	Sol. tampão pH=7,3	Sol. tampão pH=5,6
Composto	R	λ_{em} (nm)					
5a	H	405	415	420	438	445	445

Ao analisar a **Tabela 37** pode concluir-se que os valores de comprimento de onda máximo de emissão são semelhantes entre o composto **5g** e os compostos **5**, discutidos anteriormente. Pode ainda concluir-se que à medida que se aumenta a polaridade dos solventes (diclorometano para água) os valores de comprimento de onda máximo de emissão também aumentam, contribuindo para um maior desvio de Stokes (**Tabela 38**).

No espectro de emissão do composto **5g** (**Figura 33**), um deslocamento batocrômico significativo pode ser observado do diclorometano para a água (40 nm), semelhante aos compostos **5**. Nos espectros de absorção, os desvios para o vermelho são desprezáveis (**Tabela 36**), indicando uma importante contribuição do relaxamento do solvente após a fotoexcitação.

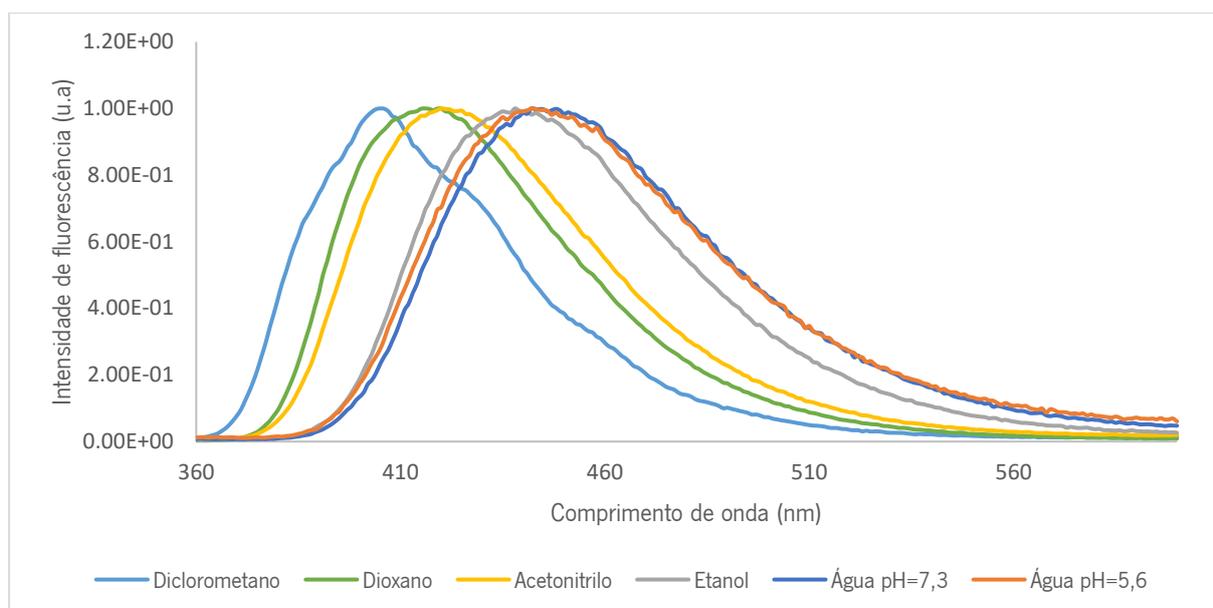


Figura 33: Espectros de fluorescência normalizados (no máximo de emissão) de soluções 1×10^{-5} M do composto **5g** em vários solventes ($\lambda_{exc} = 350$ nm).

Tabela 38: Rendimentos quânticos de fluorescência (Φ_F) para os compostos **5g** em solventes diferentes.

* R	Diclorometano		Dioxano		Acetonitrilo		Etanol		Sol. tampão pH=5,6		Sol. tampão pH=7,3		
	Φ_F	S	Φ_F	S	Φ_F	S	Φ_F	S	Φ_F	S	Φ_F	S	
5g	H	0,63	55	0,76	65	0,89	70	0,62	88	0,22	95	0,36	95

Erro para Φ_F cerca de 10%, *Identificação do composto; S = Desvio de Stokes (nm)

Ao analisar a **Tabela 38**, conclui-se que o composto **5g** apresenta um comportamento semelhante aos restantes compostos **5**, em que o rendimento quântico de fluorescência (Φ_F) diminui com o aumento da polaridade do solvente (em acetonitrilo e água). Os valores em diclorometano e dioxano (solventes de polaridade mais baixa) são exceção, uma vez que não são os valores mais altos de rendimento quântico de fluorescência (Φ_F), à semelhança do que acontecia nos restantes compostos **5**.

Os resultados em água com diferentes valores de pH (5,6 e 7,3) também diferem entre eles. Em pH ácido, os valores obtidos são menores que os valores em pH neutro. Isto pode dever-se ao facto de que, em pH ácido, os compostos podem estar parcialmente protonados, ou a diferente energia de formação de ligações de hidrogénio.

2.2.8.1. Propriedades fotofísicas de 5,6-diaminopirimidina-4-carbonitrilo (**8**)

As propriedades de absorção e fluorescência do composto **8** foram medidas à semelhança dos compostos analisados anteriormente. Os valores de comprimento de onda de absorção máxima (λ_{abs}), de emissão máxima (λ_{em}), o rendimento quântico de fluorescência (Φ_F) e o desvio de Stokes (**S**), para o composto **8** são apresentados na Tabela 39.

Tabela 39: Comprimentos de onda máximos de absorção (λ_{abs}) e emissão (λ_{em}), desvio de stokes (**S**) e rendimentos quânticos de fluorescência (Φ_F) para o composto **8** em vários solventes.

	Diclorometano	Dioxano	Acetonitrilo	Etanol	Sol. tampão pH=5,6	Sol. tampão pH=7,3
λ_{abs} (nm)	320	330	324	330	330	330
λ_{em} (nm)	402	400	401	400	415	415
S (nm)	92	70	91	70	85	85
Φ_F	0,25	0,30	0,66	0,71	0,24	0,33

Erro para Φ_F cerca de 10%; S= desvio de Stokes

A partir da Tabela 39 e pela Figura 34 podemos verificar que os máximos de absorção para o composto **8** são semelhantes nos vários solventes. Em diclorometano e acetonitrilo, o comprimento de onda máximo de absorção é cerca de 320 nm, contudo nos restantes solventes o máximo é de 330 nm. Ao comparar à 2AP, mencionada em cima, podemos também concluir que o composto **8**, dentro de todos os compostos analisados (**5**, **6** e **7**) é o composto que mais se aproxima dos valores do máximo de absorção da 2AP.

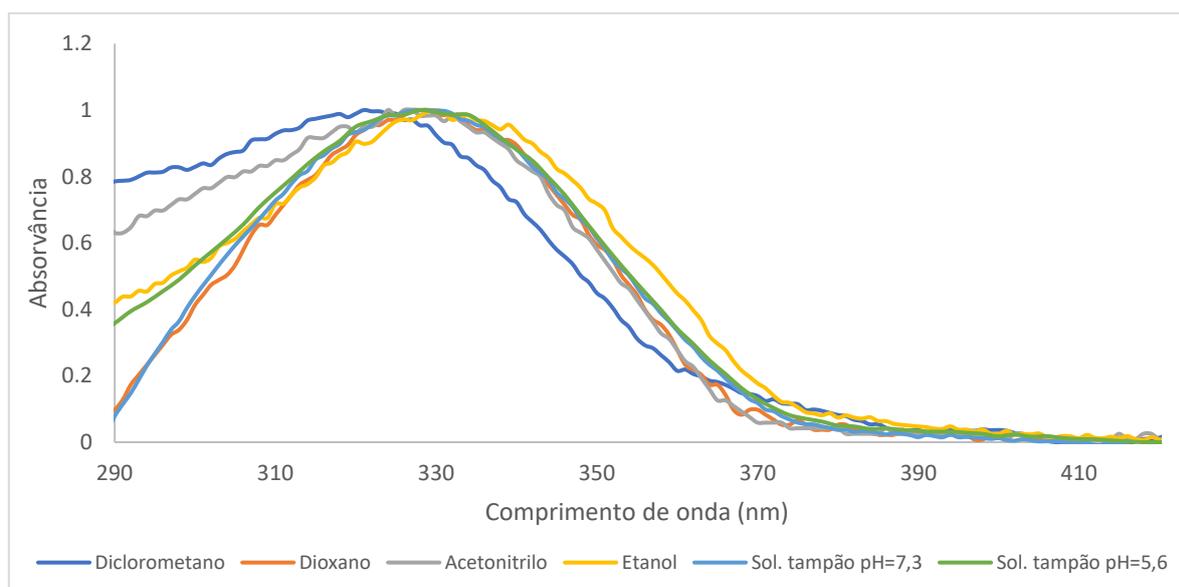


Figura 34: Espectros de absorção normalizados de soluções 1×10^{-5} M do composto **8** em vários solventes (Percurso ótico: 1,0 cm).

Pela **Tabela 39** pode-se ainda concluir que os valores de comprimento de onda máximo de emissão para o composto **8** são semelhantes, independentemente do solvente utilizado. Pode-se ainda concluir que, à medida que se aumenta a polaridade dos solventes (diclorometano para etanol), os valores de comprimento de onda máximo de emissão mantêm-se. É possível ver apenas um deslocamento batocrômico entre a água e os restantes solventes (15 nm) – **Figura 35**.

Ao contrário dos compostos **5**, onde se observa uma diminuição do rendimento quântico de fluorescência com o aumento da polaridade dos solventes, o composto **8** apresenta valores mais altos de rendimento quântico de fluorescência à medida que a polaridade do solvente aumenta. Contudo para o solvente mais polar (água), estes valores baixam para cerca de 25 – 30%. Isto poderá ser explicado pela interação solvente-composto (como, por exemplo, pontes de hidrogénio), que promovem uma alteração do momento dipolar da molécula que pode causar as diferenças no rendimento quântico de fluorescência (ϕ_f).

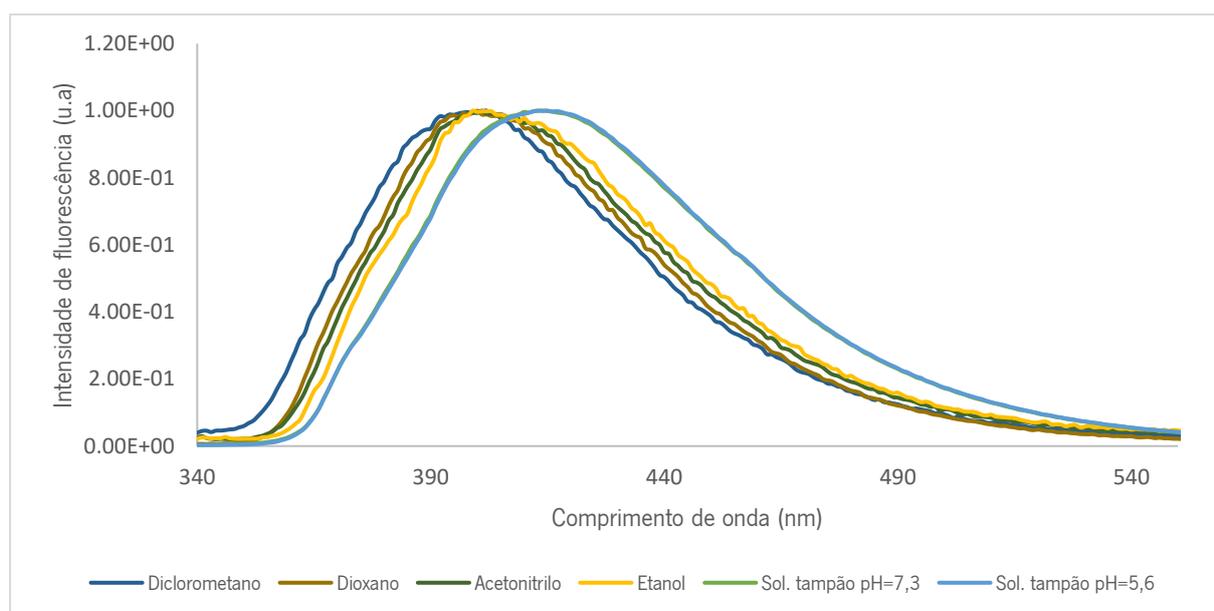


Figura 35: Espectros de fluorescência normalizados (no máximo de emissão) de soluções 1×10^{-5} M do composto **8** em vários solventes ($\lambda_{exc} = 310 - 330$ nm).

Dado ser uma molécula muito pequena e com um espectro de emissão com maior desvio batocrômico em meio aquoso, em relação ao conjunto dos restantes solventes (**Figura 35**), realizaram-se medidas de fluorescência em membranas modelo, para inferir a possibilidade de o composto ser usado como sonda de biomembranas. Assim, foram preparadas soluções do composto **8** isolado e incorporado em dois tipos de lipossomas (formados pelos fosfolípidos DPPC e Egg-PC). Na **Figura 36**, observa-se que, em

ambos os lipossomas, de Egg-PC (mistura natural de fosfolípidos, na fase fluida à temperatura ambiente) e DPPC (lípidio puro sintético, na fase gel à temperatura ambiente), o composto **8** fluoresce, apresentando um desvio hipsocrômico em lipossomas quando comparado com o espectro em meio aquoso. Com base neste resultado, é possível concluir que o composto **8** é capaz de penetrar a membrana lipídica, localizando-se num ambiente menos polar que a água, semelhante ao diclorometano (nos lípidos, o máximo de emissão é semelhante ao valor observado na **Tabela 39** para o diclorometano).

O composto **8** demonstrou potencialidade como sonda para biomembranas, uma vez que, além dos resultados obtidos na fluorescência que demonstravam uma afinidade do composto para solventes apolares (semelhante ao ambiente observado nos lípidos), este também apresenta uma estrutura semelhante às que podem ser encontradas entre as bases nitrogenadas (nomeadamente as pirimidinas) presentes nas biomembranas.

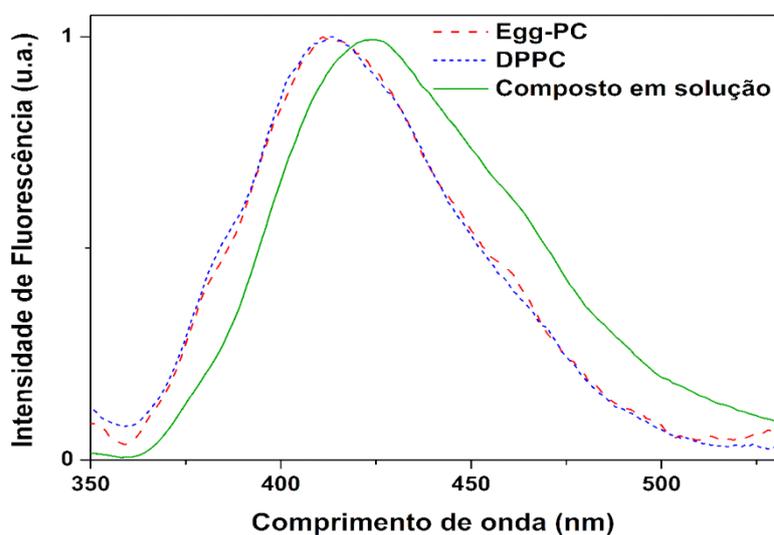


Figura 36: Espectros de fluorescência normalizados (no máximo de emissão) de soluções 1×10^{-6} M do composto **8** em água e em lipossomas ($\lambda_{exc} = 330$ nm).

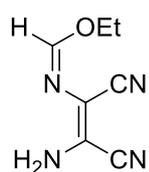
3. Parte experimental

3.1. Técnicas gerais – Primeira parte do trabalho experimental

As análises espectroscópicas por ^1H RMN e ^{13}C RMN foram realizadas nos espectrofotômetros Bruker Avance III 400 e Varian Unit Plus 300. Para as análises por ^1H RMN foram utilizadas cerca de 3 mg de sólido, enquanto para as análises por ^{13}C RMN utilizaram-se cerca de 20 mg. O solvente utilizado em ambos os casos foi o dimetilsulfóxido deuterado ($\text{DMSO-}d_6$). Utilizaram-se também as técnicas de DEPT, HMQC e HMBC para facilitar a identificação dos átomos de carbono através de correlação direta e indireta com os átomos de hidrogénio. Os espectros de infravermelho foram determinados usando um espectrofotómetro FTLA 2000-104 e as amostras preparadas com Nujol em células de cloreto de sódio. Os pontos de fusão foram determinados num aparelho Stuart cat. SMP3.

3.2. Síntese do reagente de partida

3.2.1. Síntese de *N*[(*Z*)-2-amino-1,2-dicianoetenil] formimidato de etilo (**1**)



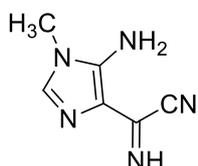
A uma solução de DAMN (10,14 g; 93,80 mmol) em dioxano (150 mL) adicionou-se TEOF (15,60 mL; 93,79 mmol). A mistura reacional foi aquecida à ebulição num sistema de destilação com coluna de fracionamento até recolher, aproximadamente, 80 mL de destilado (60 min de refluxo). Filtrou-se a mistura reacional através de uma coluna de sílica e terra de diatomáceas, seguindo-se uma lavagem da coluna com éter etílico (50 mL). A solução amarela foi colocada num banho de gelo (durante aproximadamente 15 min) e, por adição de *n*-hexano (80 mL), formou-se um sólido cristalino branco. O sólido foi filtrado sob vácuo, lavando com uma mistura fria de *n*-hexano/éter etílico (75:25). Recolheu-se um sólido branco que se mostrou puro por TLC e foi identificado como sendo o imidato (**1**; 15,03 g; 91,56 mmol; 97%). FE: $\text{C}_7\text{H}_8\text{N}_4\text{O}$. MM: 164,16 g/mol.

3.2.2. Síntese dos 5-amino-4-cianoformimidóil imidazoles (3)

Procedimento geral

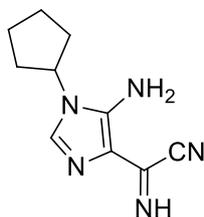
Utilizou-se o imidato **1** como reagente de partida, numa suspensão em etanol, à qual se adicionou a amina correspondente e uma quantidade catalítica de cloreto de anilíneo. Colocou-se a mistura reacional sob agitação à temperatura ambiente e, após a reação estar terminada (evidência por TLC), adicionou-se DBU e etanol. Deixou-se reagir, mais uma vez, sob agitação à temperatura ambiente. O sólido foi recolhido por filtração sob vácuo, seguida de lavagem com etanol e éter etílico frios.

3.2.2.1. Síntese de 5-amino-4-cianoformimidóil-1-(metil)imidazole (3a)



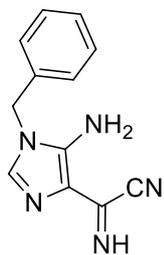
Partiu-se de **1** (3,37 g; 20,53 mmol) em etanol (4 mL). Adicionou-se metilamina (2,7 mL, 0,97g; 31,37 mmol) e cloreto de anilíneo. Colocou-se a mistura reacional em agitação magnética num banho de gelo. Após 27 min a mistura reacional foi filtrada sob vácuo, lavando com etanol e éter etílico frios. O sólido obtido foi identificado como sendo a amidina (**2a**; 2,73 g; 18,30 mmol; 89%). Transferiu-se o sólido **2a** para um balão de 25 mL e adicionou-se etanol (3 mL) e DBU (10 gotas). Formou-se uma suspensão amarela. Ao fim de 2 horas a mistura reacional foi filtrada sob vácuo, lavando com etanol e éter etílico frios. Recolheu-se um sólido amarelo (**3a**; 2,31g; 15,49mmol, 75%). FE: C₆H₇N₅. MM: 149,15 g/mol.

3.2.2.2. Síntese de 5-amino-4-cianoformimidóil-1-(ciclopentil)imidazole (3b)



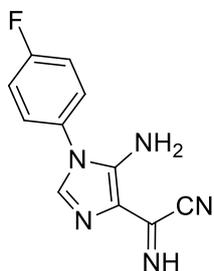
Partiu-se de **1** (3,05 g; 18,58 mmol) e ciclopentilamina (2,20 mL; 1,90 g; 22,30 mmol) e cloreto de anilíneo. Após 2 horas adicionou-se DBU (10 gotas), éter de petróleo (3 mL) e etanol (3 mL). Ao fim de 5 horas a mistura reacional foi filtrada sob vácuo, lavando com etanol e éter etílico frios. Recolheu-se um sólido amarelo (**3b**; 2,76 g; 13,58 mmol, 73%). FE: C₁₀H₁₃N₅. MM: 203,24 g/mol.

3.2.2.3. Síntese de 5-amino-4-cianoformimidoil-1-(benzil)imidazole (3c)



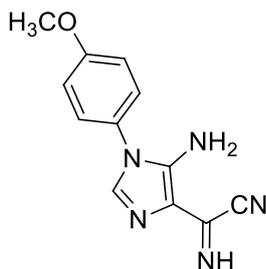
Partiu-se de **1** (3,05 g; 18,58 mmol) e benzilamina (3,50 mL; 3,43 g; 32,04 mmol) e cloreto de anilíneo. Após 6 horas adicionou-se DBU (5 gotas) e etanol (1 mL). Ao fim de 2 horas a mistura reacional foi filtrada sob vácuo, lavando com etanol e éter etílico frios. Recolheu-se um sólido branco (**3c**; 0,74 g; 3,29 mmol, 46%). FE: C₁₂H₁₁N₅. MM: 225,25 g/mol.

3.2.2.4. Síntese de 5-amino-4-cianoformimidoil-1-(4'-fluorofenil)imidazole (3d)



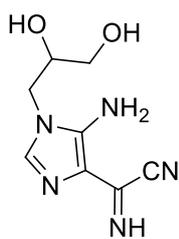
Partiu-se de **1** (3,13 g; 19,07mmol) em etanol (10 mL). Adicionou-se 4-fluoroanilina (1,8 mL; 2,11 g; 19,00 mmol) e cloreto de anilíneo. Após 6 horas, adicionou-se DBU (10 gotas) e etanol (6 mL). Ao fim de 17 horas a mistura reacional foi filtrada sob vácuo, lavando com etanol e éter etílico frios. Recolheu-se um sólido amarelo (**3d**; 2,63 g; 11,47 mmol, 60%). FE: C₁₁H₈FN₅. MM: 229,21 g/mol.

3.2.2.5. Síntese de 5-amino-4-cianoformimidoil-1-(4-metoxifenil)imidazole (3e)



Partiu-se de **1** (2,10 g; 12,79 mmol) em etanol (7 mL). Adicionou-se *p*-anisidina (1,88 g; 15,27 mmol) e cloreto de anilíneo. Após 6 horas adicionou-se DBU (10 gotas) e etanol (10 mL). Ao fim de 7 horas a mistura reacional foi filtrada sob vácuo, lavando com etanol e éter etílico frios. Recolheu-se um sólido amarelo (**3e**; 2,38 g; 9,87 mmol, 77%). FE: C₁₂H₁₁N₅O. MM: 241,25 g/mol.

3.2.2.6. Síntese de 5-amino-4-cianoformimidoil-1-(2',3'-di-hidroxipropil)imidazole (3f)



Partiu-se de 3-amino-1,2-propanediol (0,51 g; 5,60 mmol) em etanol (2 mL). Adicionou-se **1** (0,65 g; 3,96 mmol) e cloreto de anilíneo. Colocou-se a mistura reacional em agitação magnética num banho de gelo. Após 7 horas adicionou-se DBU (5 gotas). Ao fim de 1 hora a mistura reacional foi filtrada sob vácuo, lavando com etanol e éter etílico frios. Recolheu-se um sólido amarelo (**3f**; 0,55 g; 2,63 mmol, 66%).

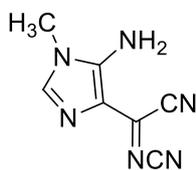
FE: C₈H₁₁N₅O₂. MM: 209,21 g/mol.

3.2.3. Síntese de 5-amino-*N*-cianoimidazole-4-carbimidoilnitrilos (4)

Procedimento geral

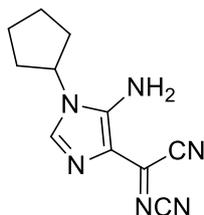
Utilizou-se os 5-amino-4-cianoformimidazolimidazoles **3** como reagentes de partida, em DMSO (0,5 – 1,0 mL) e ácido acético (1,5 - 2 equivalentes) aos quais se adicionou cianamida (1,5 equivalentes). Colocou-se a mistura reacional sob agitação à temperatura ambiente e, após a reação estar terminada (evidência de TLC), o sólido obtido foi recolhido por filtração sob vácuo, seguida de lavagem com etanol e éter etílico frios.

3.2.3.1. Síntese de 5-amino-*N*-ciano-1-(metil)imidazole-4-carbimidoilnitrilo (4a)



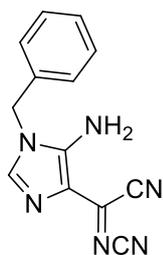
Partiu-se de **3a** (0,39 g; 2,61 mmol) em DMSO (0,5 mL). Adicionou-se ácido acético (0,30 mL; 5,24 mmol) e cianamida (0,17 g; 4,04 mmol). Formou-se uma suspensão esverdeada. Ao fim de 5 horas, isolou-se um sólido verde (**4a**; 0,40 g; mmol; 89%). FE: C₇H₆N₆. MM: 174,16 g/mol.

3.2.3.2. Síntese de 5-amino-*N*-ciano-1-(ciclopentil)imidazole-4-carbimidoilnitrilo (4b)



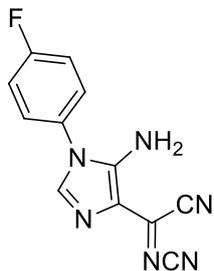
Partiu-se de **3b** (0,58 g; 2,85 mmol) em DMSO (1 mL). Adicionou-se ácido acético (0,33 mL; 5,77 mmol) e cianamida (0,27 g; 6,42 mmol). Formou-se uma suspensão esverdeada. Ao fim de 7 horas, recolheu-se um sólido amarelo (**4b**; 0,50 g; mmol; 77%). FE: C₁₁H₁₂N₆. MM: 228,25 g/mol.

3.2.3.3. Síntese de 5-amino-*N*-ciano-1-(benzil)imidazole-4-carbimidoilnitrilo (4c)



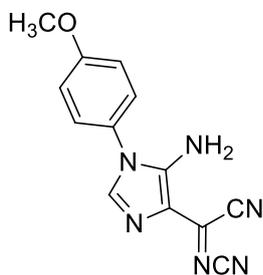
Partiu-se de **3c** (0,79 g; 3,51 mmol) em DMSO (1 mL). Adicionou-se ácido acético (0,40 mL; 6,99 mmol) e cianamida (0,24 g; 5,71 mmol). Formou-se uma suspensão esverdeada. Ao fim de 4 horas, recolheu-se um sólido amarelo (**4c**; 0,64 g; 2,56 mmol; 73%). FE: C₁₃H₁₀N₆. MM: 250,26 g/mol.

3.2.3.4. Síntese de 5-amino-*N*-ciano-1-(4'-fluorofenil)imidazole-4-carbimidoilnitrilo (**4d**)



Partiu-se de **3d** (0,85 g; 3,71 mmol) em DMSO (2 mL). Adicionou-se ácido acético (0,42 mL; 7,34 mmol) e cianamida (0,25 g; 5,95 mmol). Formou-se uma suspensão esverdeada. Ao fim de 4 horas, recolheu-se um sólido amarelo (**4d**; 0,60 g; 2,36 mmol; 64%). FE: C₁₂H₇FN₆. MM: 254,22 g/mol.

3.2.3.5. Síntese de 5-amino-*N*-ciano-1-(4'-metoxifenil)imidazole-4-carbimidoilnitrilo (**4e**)



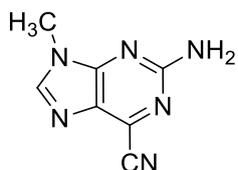
Partiu-se de **3e** (0,80 g; 3,32 mmol) em DMSO (2 mL). Adicionou-se ácido acético (0,38 mL; 6,64 mmol) e cianamida (0,21 g; 5,00 mmol). Formou-se uma suspensão esverdeada. Ao fim de 19 horas, recolheu-se um sólido amarelo (**4e**; 0,65 g; 2,44 mmol; 74%). FE: C₁₃H₁₀N₆O. MM: 266,26 g/mol.

3.2.4. Síntese de 2-aminopurina-6-carbonitrilo (**5**)

Procedimento geral

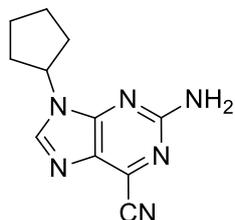
Utilizou-se 5-amino-*N*-ciano-1-*H*imidazole-4-carbimidoilnitrilo (**4**), como reagente de partida, em acetonitrilo (15 mL) e TFA (1 – 4 gotas). Colocou-se a mistura reacional sob agitação magnética à temperatura de 80 °C (IKA), após a reação estar terminada (evidência por TLC). O sólido obtido foi recolhido por filtração sob vácuo, seguida de lavagem com acetonitrilo e éter etílico frios.

3.2.4.1. Síntese de 2-amino-9-(metil)purina-6-carbonitrilo (**5a**)



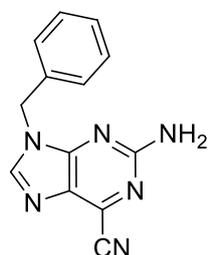
Partiu-se de **4a** (0,66 g; 2,82 mmol) em acetonitrilo (17 mL). Adicionou-se TFA (4 gotas) e aqueceu-se (80 °C). Ao fim de 27 horas, a mistura reacional foi colocada num banho de gelo (durante aproximadamente 15 min). Recolheu-se um sólido rosa-pálido (**5a**; 0,42 g; 1,79 mmol; 63%). FE: C₇H₆N₆. MM: 174,16 g/mol.

3.2.4.2. Síntese de 2-amino-9-(ciclopentil)purina-6-carbonitrilo (5b)



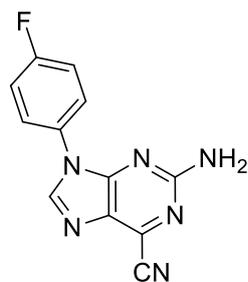
Partiu-se de **4b** (0,54 g; 2,37 mmol) em acetonitrilo (17 mL). Adicionou-se TFA (1 gota) e aqueceu-se (80 °C). Ao fim de 19 horas, verificou-se por TLC que a reação estava completa. A mistura reacional foi colocada num banho de gelo (durante aproximadamente 15 min). Recolheu-se um sólido amarelo-claro (**5b**; 0,48 g; 2,10 mmol; 90%). FE: C₁₁H₁₂N₆. MM: 228,25 g/mol.

3.2.4.3. Síntese de 2-amino-9-(benzil)purina-6-carbonitrilo (5c)



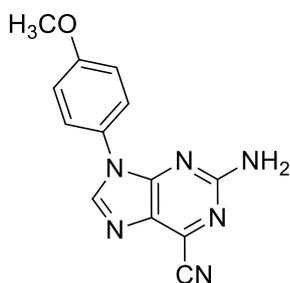
Partiu-se de **4c** (0,39 g; 1,56 mmol) em acetonitrilo (15mL). Adicionou-se TFA (1 gota) e aqueceu-se (80 °C). Ao fim de 22 horas, a mistura reacional foi colocada num banho de gelo (durante aproximadamente 15 min). Recolheu-se um sólido bege (**5c**; 0,27 g; 1,09 mmol; 70%). FE: C₁₃H₁₀N₆. MM: 250,26 g/mol.

3.2.4.4. Síntese de 2-amino-9-(4-fluorofenil)purina-6-carbonitrilo (5d)



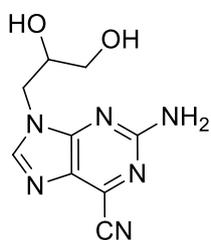
Partiu-se de **4d** (0,46 g; 1,81 mmol) em acetonitrilo (15 mL). Adicionou-se TFA (1 gota) e aqueceu-se (80 °C). Ao fim de 16 horas, a mistura reacional foi colocada num banho de gelo (durante aproximadamente 15 min). Recolheu-se um sólido castanho-claro (**5d**; 0,38 g; 1,49 mmol; 84%). FE: C₁₂H₇FN₆. MM: 254,22 g/mol.

3.2.4.5. Síntese de 2-amino-9-(4-metoxifenil)purina-6-carbonitrilo (5e)



Partiu-se de **4e** (0,23 g; 0,86 mmol) em acetonitrilo (15 mL). Adicionou-se ácido acético (0,074 mL; 1,29 mmol) e aqueceu-se (80 °C). Ao fim de 24 horas, a mistura reacional foi colocada num banho de gelo (durante aproximadamente 15 min). Recolheu-se um sólido cinzento (**5e**; 0,17 g; 0,64 mmol; 75%). FE: C₁₃H₁₀N₆O. MM: 266,26 g/mol.

3.2.4.6. Síntese de 2-amino-9-(2,3-di-hidroxiopropil)purina-6-carbonitrilo (5f)



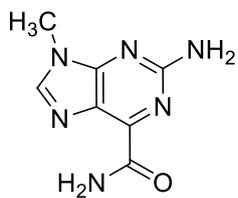
Partiu-se de **3f** (0,42 g; 2,01 mmol) em DMSO (0,5 mL). Adicionou-se ácido acético (0,18 mL; 3,14 mmol) e cianamida (0,13 g; 3,09 mmol). Colocou-se a mistura reacional sob agitação magnética à temperatura ambiente. Ao fim de 5 horas, verificou-se por TLC que a reação estava completa. Adicionou-se acetonitrilo (15 mL) e aqueceu-se a mistura reacional no IKA a uma temperatura de 80 °C. Ao fim de 6 horas, verificou-se por TLC que a reação estava completa. Deixou-se arrefecer ligeiramente e filtrou-se a mistura reacional através de uma coluna de sílica, seguindo-se uma lavagem da coluna com acetonitrilo. A mistura reacional foi colocada num banho de gelo (durante aproximadamente 15 min). Filtrou-se a mistura reacional sob vácuo, lavando com acetonitrilo e éter etílico frios. Recolheu-se um sólido castanho (**5f**; 0,22 g; 0,94 mmol; 47%). FE: C₉H₁₀N₆O₂. MM: 234,21 g/mol.

3.2.5. Síntese de 2-aminopurina-6-carboxamidas (6)

Procedimento experimental

Utilizou-se 2-aminopurina-6-carbonitrilo (**5**) como reagente de partida numa suspensão em etanol (2 mL) e água (1 mL), à qual se adicionou uma solução aquosa de hidróxido de sódio 4 M (1,5 equivalentes). Colocou-se a mistura reacional sob agitação à temperatura ambiente e, após a reação estar terminada (evidência de TLC), o sólido obtido foi recolhido por filtração sob vácuo, seguida de lavagem com etanol e éter etílico frios.

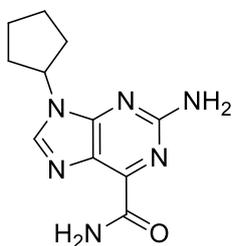
3.2.5.1. Síntese de 2-amino-9-(metil)purina-6-carboxamidas (6a)



Partiu-se de **5a** (0,22 g; 1,26 mmol) em etanol (2 mL) e água (1 mL). Adicionou-se hidróxido de sódio 4 M (0,48 mL; 1,92 mmol) Ao fim de 4 horas a suspensão foi colocada num banho de gelo (durante aproximadamente 15 min). Recolheu-se um sólido rosa-pálido (**6a**; 0,11 g; 0,57 mmol; 45%). FE: C₇H₈N₆O.

MM: 192,18 g/mol; p.f. (°C) >300 (decomposição).

3.2.5.2. Síntese de 2-amino-9-(ciclopentil)purina-6-carboxamidas (6b)



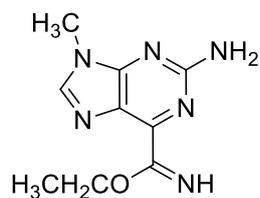
Partiu-se de **5b** (0,22 g; 0,96 mmol) em etanol (2 mL) e água (1 mL). Adicionou-se hidróxido de sódio 4 M (0,36 mL; 1,44 mmol). Ao fim de 13 horas, a suspensão foi colocada num banho de gelo (durante aproximadamente 15 min). Recolheu-se um sólido bege (**6b**; 0,07 g; 0,28 mmol; 31%). FE: C₁₁H₁₄N₆O. MM: 246,27 g/mol; p.f. (°C) >265 (decomposição).

3.2.6. Síntese de 2-aminopurina-6-carbimidato de etilo (7)

Procedimento experimental

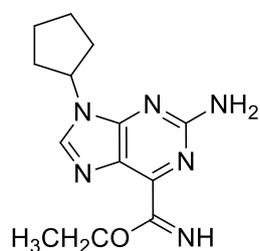
Utilizou-se 2-aminopurina-6-carbonitrilo (**5**) como reagente de partida em etanol (5 - 20 mL) e à mistura foi adicionada uma solução de hidróxido de sódio 4 M (0,2 – 0,4 equivalentes). Colocou-se a mistura reacional sob agitação à temperatura ambiente e, após a reação estar terminada (evidência de TLC), o sólido obtido foi recolhido por filtração sob vácuo, seguida de lavagem com etanol e éter etílico frios.

3.2.6.1. Síntese de 2-amino-9-(metil)purina-6-carbimidato de etilo (7a)



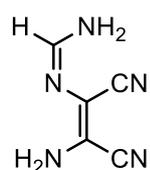
Partiu-se de **5a** (0,28 g; 1,61 mmol) em etanol (5 mL). Adicionou-se hidróxido de sódio 4 M (0,08 mL; 0,32 mmol). Ao fim de 18 horas, a suspensão foi colocada num banho de gelo (durante aproximadamente 15 min). Filtrou-se a mistura reacional sob vácuo, lavando com etanol e éter etílico frios. Recolheu-se um sólido rosa-pálido (**7a**; 0,25 g; 1,14 mmol; 70%). FE: C₉H₁₂N₆O. MM: 220,23 g/mol; p.f. (°C) 189 – 193.

3.2.6.2. Síntese de 2-amino-9-(ciclopentil)purina-6-carbimidato de etilo (7b)



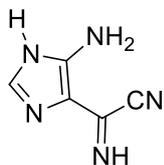
Partiu-se de **5b** (0,20 g; 0,88 mmol) em etanol (20 mL). Adicionou-se hidróxido de sódio 4 M (0,1 mL; 0,40 mmol). Ao fim de 36 horas, a suspensão foi colocada num banho de gelo (durante aproximadamente 15 min). Filtrou-se a mistura reacional sob vácuo, lavando com etanol e éter etílico frios. Recolheu-se um sólido bege (**7b**; 0,13 g; 0,47 mmol; 54%). FE: C₁₃H₁₈N₆O. MM: 274,32 g/mol; p.f. (°C) 166 – 169.

3.2.7. Síntese de (Z)-N'-(Z)-2-amino-1,2-dicianovinil)formimidamida (2g)



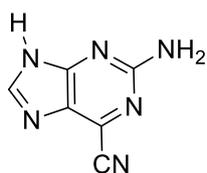
Partiu-se de **1** (2,90 g; 17,67 mmol) em acetonitrilo (3 mL). Adicionou-se amónia aquosa 25% (10 mL; 132,3 mmol). Colocou-se a mistura reacional sob agitação magnética a uma temperatura de 15 °C. Ao fim de 4 horas, verificou-se por TLC que a reação estava completa. Filtrou-se a mistura reacional sob vácuo, lavando com água e éter etílico frios. Recolheu-se um sólido cinzento (**2g**; 2,07 g; 15,32 mmol; 87%). FE: C₅H₅N₅. MM: 135,13 g/mol; p.f. (°C) >160 (decomposição).

3.2.8. Síntese de 5-amino-1H-imidazole-4-cianoformimidazole (**3g**)



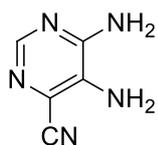
Partiu-se de **2g** (1,62 g; 11,99 mmol) em etanol 95% (145 mL). Adicionou-se hidróxido de bário octa-hidratado (3,78 g; 11,98 mmol). Colocou-se a mistura reacional sob agitação magnética, a uma temperatura de 15 °C. Ao fim de 1 hora adicionou-se dióxido de carbono à mistura reacional. Filtrou-se a mistura reacional sob vácuo lavando com éter etílico. Levou-se a solução-mãe ao evaporador rotativo, até evaporar o etanol. Filtrou-se a suspensão final, lavando com água e éter etílico frios. Recolheu-se um sólido verde (**3g**; 0,83 g; 6,14 mmol; 51%). FE: C₅H₅N₅. MM: 135,13 g/mol; p.f. (°C) >155 (decomposição).

3.2.9. Síntese de 2-amino-9H-purina-6-carbonitrilo (**5g**)



Partiu-se de **3g** (0,42 g; 3,11 mmol) em DMSO (1 mL). Adicionou-se ácido acético (0,27 mL; 4,72 mmol) e cianamida (0,21 g; 5,00 mmol). Colocou-se a mistura reacional sob agitação magnética, à temperatura ambiente. Ao fim de 3 horas, verificou-se por TLC que a reação estava completa. Adicionou-se acetonitrilo (15 mL) e colocou-se a mistura reacional no IKA a uma temperatura de 80 °C. Ao fim de 5 horas, verificou-se por TLC que a reação estava completa. Deixou-se arrefecer ligeiramente e filtrou-se a mistura reacional através de uma coluna de sílica, seguindo-se uma lavagem da coluna com acetonitrilo. A suspensão foi colocada num banho de gelo (durante aproximadamente 15 min). Filtrou-se a suspensão sob vácuo, lavando com acetonitrilo e éter etílico frios. Recolheu-se um sólido branco (**5g**; 0,23 g; 1,44 mmol; 44%). FE: C₆H₄N₆. MM: 160,14 g/mol. p.f. (°C) >320 (decomposição).

3.2.10. Síntese de 5,6-diaminopirimidina-4-carbonitrilo (**8**)



Partiu-se de **1** (0,56 g; 3,41 mmol) em acetonitrilo (25 mL). Adicionou-se acetato de amónio (0,27 g; 3,50 mmol) e ácido acético (0,39 mL; 6,81 mmol). Colocou-se a mistura reacional sob agitação magnética a uma temperatura de 80 °C. Ao fim de 7 horas, verificou-se por TLC que a reação estava completa. Filtrou-se a mistura reacional sob vácuo, lavando com acetonitrilo e éter etílico frios. Recolheu-se um sólido castanho (**8**; 0,15 g; 1,11 mmol; 33%). FE: C₅H₅N₅. MM: 135,13 g/mol. p.f. (°C) >285 (decomposição).

3.3. Técnicas gerais – Fluorescência

Os espectros de absorção foram registados num espectrofotómetro Shimadzu UV-3101PC UV-Vis-NIR. As medições dos espectros de fluorescência foram realizadas utilizando um espectrofluorímetro Fluorolog 3, equipado com monocromadores duplos na excitação e emissão. Os rendimentos quânticos de fluorescência, Φ_F , foram determinados pelo método do padrão (eq. 1) [23], [53],

$$\Phi_s = \Phi_r \times \frac{A_r \times F_s \times n_s^2}{A_s \times F_r \times n_r^2} \quad (1)$$

onde **A** é a absorvância ao comprimento de onda de excitação, **F** a área de emissão integrada e **n** é o índice de refração dos solventes. Os subscritos referem-se ao composto de referência (**r**) ou à amostra (**s**). O sulfato de quinino em solução aquosa de ácido sulfúrico 0,1 M foi utilizado como referência, $\Phi_r = 0,55$ a 25 °C [53] para determinação do rendimento quântico de fluorescência. As soluções foram previamente desarejadas por 20 minutos com uma corrente de nitrogénio ultrapuro. O valor de absorvância no comprimento de onda de excitação foi sempre menor que 0,1, a fim de evitar efeitos de filtro interno.

Para as amostras, foram preparadas soluções-mãe de $C = 1 \times 10^{-4}$ M, em diferentes solventes, e diluídas para uma $C = 1 \times 10^{-5}$ M.

Para a preparação de vesículas lipídicas, foi utilizado o método de injeção etanólica [54], [55]. No caso da preparação de membranas de egg-PC e DPPC, um volume definido de solução lipídica (20 mM) e composto **8** (1×10^{-6} M) em etanol foram injetados em conjunto, sob agitação vigorosa, em 5 mL de água ultrapura (grau Milli-Q) à temperatura ambiente para o egg-PC e a uma temperatura de 50 °C para o DPPC (acima da temperatura de transição de fase deste fosfolípido).

4. Conclusões

Uma análise do trabalho realizado permite concluir que todos os reagentes de partida e intermediários previstos no plano do trabalho experimental foram sintetizados com sucesso.

Foram sintetizados com ótimos rendimentos seis 4-cianoformimidazolimidazoles **3** como reagentes de partida da sequência de reações a realizar. Seguidamente, estes foram convertidos com rendimentos razoáveis nos *N*-cianoiminonitrilos **4** por reação com cianamida.

Foram sintetizadas seis 2-aminopurinas **5**, com ótimos rendimentos, a partir dos *N*-cianoiminonitrilos **5**, e o método mostrou ser reproduzível. A síntese da purina **5f** foi realizada numa reação em 2 passos a partir do imidazole **3f**, uma vez que não foi possível isolar o seu intermediário **4f**.

Foi ainda desenvolvido um método para a síntese das purinas **6** e **7**. Contudo, conseguiu-se apenas sintetizar os derivados com os substituintes metilo e ciclopentino na posição 9 (R= CH₃ e R= Cp), visto que o método demonstrou não ser reproduzível partindo das 6-cianopurinas **5** com os outros substituintes introduzidos.

A síntese da purina **5g** foi a mais complicada, uma vez que inicialmente não se conseguiu reproduzir o método reportado para a síntese do seu reagente de partida **3g**. Após investigar a razão das falhas deste método, foi possível sintetizar o 5-amino-1*H*-imidazole-4-cianoformimidazolimidazole (**3g**) com rendimentos razoáveis. Posteriormente, a síntese da 2-aminopurina **5g** foi realizada numa reação em 2 passos, a partir do imidazole **3g**, uma vez que também não foi possível isolar o seu intermediário **4g**. Os rendimentos obtidos para esta síntese foram bastante razoáveis.

Ainda na primeira tarefa proposta para este trabalho, foi descoberta a estrutura da pirimidina **8**. A sua síntese demonstrou ser possível a partir de dois métodos diferentes, contudo o método a partir do imidato mostrou ser mais viável, uma vez que no método a partir da amidina não foi possível isolar o composto. No entanto os rendimentos são muito baixos.

Através dos espetros de ¹H RMN e ¹³C RMN, foi possível identificar dois compostos que surgiam como contaminantes na síntese da pirimidina **8** e do imidazole **3g**, cuja formação parcialmente justificava o facto dos rendimentos obtidos serem baixos. No entanto, seria necessário a realização de mais testes para comprovar estes resultados e para identificar os outros compostos desconhecidos.

Na última tarefa, foram preparadas soluções dos compostos **5**, **6** e **7**, assim como da 2AP (obtida comercialmente), em seis solventes diferentes. Os resultados obtidos demonstraram melhores comprimentos de onda de absorção máxima do que a 2AP, uma vez que se deslocam significativamente para a região do visível. As purinas sintetizadas também demonstraram um elevado rendimento quântico

de fluorescência, um desvio de Stokes apreciável (uma diferença de quase 100 nm para solventes polares) e uma emissão sensível ao meio em que a molécula se encontra.

Na caracterização fotofísica do composto **8**, os resultados obtidos demonstraram comprimentos de onda de absorção máxima semelhantes à 2AP. Ao contrário das purinas, o composto **8** não demonstra diferença nos comprimentos de onda de emissão máxima nos diferentes solventes. No entanto, este composto demonstrou um desvio de Stokes apreciável em todos os solventes (70 a 92nm). Os resultados obtidos para inferir a possibilidade de o composto **8** ser usado como sonda de biomembranas demonstraram que este composto tem potencialidade como sonda para biomembranas, uma vez que apresentou uma afinidade para solventes apolares (semelhante ao ambiente observado nos lípidos).

Em termos de trabalhos futuros, resta realçar que esta atividade experimental revelou a necessidade de otimizar as condições reacionais para síntese das purinas **6** e **7**, de forma a tornar o método mais eficiente e reprodutível. O mesmo se verifica para a síntese do composto **8**. Além disso, devido ao facto da estrutura do composto **8** ser um possível precursor para a síntese de novas purinas, seria interessante estudar as condições para fechar o anel de cinco e formar purinas novas. No futuro, também será importante reproduzir as sínteses das purinas **5**, **6** e **7**, com substituintes diferentes em N-9 e proceder à caracterização fotofísica dos novos análogos de modo a estabelecer uma relação estrutura-propriedades, uma vez que ainda não reuniu informação suficiente para entender o efeito de substituintes alifáticos e aromáticos nas propriedades fotofísicas destes compostos.

5. Referências

- [1] A. A. Tanpure, M. G. Pawar, and S. G. Srivatsan, "Fluorescent Nucleoside Analogs: Probes for Investigating Nucleic Acid Structure and Function," *Isr. J. Chem.*, vol. 53, no. 6–7, pp. 366–378, Jun. 2013, doi: 10.1002/ijch.201300010.
- [2] Y. V. Suseela, N. Narayanaswamy, S. Pratihari, and T. Govindaraju, "Far-red fluorescent probes for canonical and non-canonical nucleic acid structures: Current progress and future implications," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 47, no. 3, pp. 1098–1131, Feb. 2018, doi: 10.1039/c7cs00774d.
- [3] R. W. Sinkeldam, N. J. Greco, and Y. Tor, "Fluorescent analogs of biomolecular building blocks: Design, properties, and applications," *Chem. Rev.*, vol. 110, no. 5, pp. 2579–2619, May 2010, doi: 10.1021/cr900301e.
- [4] B. Y. Michel, D. Dziuba, R. Benhida, A. P. Demchenko, and A. Burger, "Probing of Nucleic Acid Structures, Dynamics, and Interactions With Environment-Sensitive Fluorescent Labels," *Front. Chem.*, vol. 8, p. 23, Feb. 2020, doi: 10.3389/fchem.2020.00112.
- [5] B. Juskowiak, "Nucleic acid-based fluorescent probes and their analytical potential," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 399, no. 9, pp. 3157–3176, Mar. 2011, doi: 10.1007/s00216-010-4304-5.
- [6] Y. Saito and R. H. E. Hudson, "Base-modified fluorescent purine nucleosides and nucleotides for use in oligonucleotide probes," *J. Photochem. Photobiol.*, vol. 36, pp. 48–73, Sep. 2018, doi: 10.1016/j.jphotochemrev.2018.07.001.
- [7] L. A. Allison, *Fundamental Molecular Biology*. Williamsburg: Blackwell Publishing Ltd, 2007.
- [8] D. Samanta, S. B. Ebrahimi, and C. A. Mirkin, "Nucleic-Acid Structures as Intracellular Probes for Live Cells," *Adv. Mater.*, vol. 32, no. 13, pp. 1–38, Apr. 2020, doi: 10.1002/adma.201901743.
- [9] W. Xu, K. M. Chan, and E. T. Kool, "Fluorescent nucleobases as tools for studying DNA and RNA," *Nat. Chem.*, vol. 9, no. 11, pp. 1043–1055, Oct. 2017, doi: 10.1038/NCHEM.2859.
- [10] P. R. Callis, "Electronic States and Luminescence of Nucleic Acid Systems," *Ann. Rev. Phys. Chem.*, vol. 34, pp. 329–57, 1983, [Online]. Available: www.annualreviews.org.
- [11] L. Serrano-André, M. Merchá, and A. C. Borin, "Adenine and 2-aminopurine: Paradigms of modern theoretical photochemistry," *PNAS*, vol. 103, no. 23, pp. 8691–8696, 2006, [Online]. Available: www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0602991103.
- [12] A. Broo, "A Theoretical Investigation of the Physical Reason for the Very Different Luminescence Properties of the Two Isomers Adenine and 2-Aminopurine," *J. Phys. Chem. A*, vol. 102, pp. 526–531, 1998.

- [13] E. Nir, K. Kleiner, L. Grace, and M. S. De Vries, "On the photochemistry of purine nucleobases," *J. Phys. Chem. A*, vol. 105, no. 21, pp. 5106–5110, May 2001, doi: 10.1021/jp0030645.
- [14] J. R. Lakowicz, *Principles of fluorescence spectroscopy*. Baltimore: Springer Science+Business Media, LLC, 2006.
- [15] R. Y. Tsien, "Fluorescent probes of cell signaling," *Annu. Rev. Neurosci.*, vol. 12, pp. 227–253, 1989, [Online]. Available: www.annualreviews.org.
- [16] W. P. Ambrose, P. M. Goodwin, J. H. Jett, A. Van Orden, J. H. Werner, and R. A. Keller, "Single Molecule Fluorescence Spectroscopy at Ambient Temperature," *Chem. Rev.*, vol. 99, no. 10, pp. 2929–2956, 1999, doi: 10.1021/cr980132z.
- [17] R. K. Neely, S. W. Magennis, D. T. F. Dryden, and A. C. Jones, "Evidence of tautomerism in 2-aminopurine from fluorescence lifetime measurements," *J. Phys. Chem. B*, vol. 108, no. 45, pp. 17606–17610, 2004, doi: 10.1021/jp0490857.
- [18] J. Liang and S. Matsika, "Pathways for fluorescence quenching in 2-aminopurine π -stacked with pyrimidine nucleobases," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 133, no. 17, pp. 6799–6808, May 2011, doi: 10.1021/ja2007998.
- [19] A. C. Jones and R. K. Neely, "2-aminopurine as a fluorescent probe of DNA conformation and the DNA-enzyme interface," *Q. Rev. Biophys.*, vol. 48, no. 2, pp. 244–279, Apr. 2015, doi: 10.1017/S0033583514000158.
- [20] L. M. Wilhelmsson, "Fluorescent nucleic acid base analogues," *Q. Rev. Biophys.*, vol. 43, no. 2, pp. 159–183, 2010, doi: 10.1017/S0033583510000090.
- [21] G. T. Hwang, "Single-Labeled Oligonucleotides Showing Fluorescence Changes upon Hybridization with Target Nucleic Acids," *Molecules*, vol. 23, no. 1, p. 19, 2018, doi: 10.3390/molecules23010124.
- [22] K. Bacia and P. Schwille, "A dynamic view of cellular processes by in vivo fluorescence auto- and cross-correlation spectroscopy," *Methods*, vol. 29, pp. 74–85, 2003, [Online]. Available: www.elsevier.com/locate/ymeth.
- [23] S. Fery-Forgues and D. Lavabre, "Are Fluorescence Quantum Yields So Tricky to Measure? A Demonstration Using Familiar Stationery Products," *J. Chem. Educ.*, vol. 76, no. 9, pp. 1260–1264, 1999.
- [24] Y. Zhao, J. L. Knee, and A. M. Baranger, "Characterization of two adenosine analogs as fluorescence probes in RNA," *Bioorg. Chem.*, vol. 36, no. 6, pp. 271–277, 2008, doi:

- 10.1016/j.bioorg.2008.06.003.
- [25] X. Su, X. Xiao, C. Zhang, and M. Zhao, "Nucleic acid fluorescent probes for biological sensing," *Appl. Spectrosc.*, vol. 66, no. 11, pp. 1249–1261, Nov. 2012, doi: 10.1366/12-06803.
- [26] Y. Fu and N. S. Finney, "Small-molecule fluorescent probes and their design," *RSC Adv.*, vol. 8, no. 51, pp. 29051–29061, 2018, doi: 10.1039/c8ra02297f.
- [27] S. Nafisi, A. A. Saboury, N. Keramat, J. F. Neault, and H. A. Tajmir-Riahi, "Stability and structural features of DNA intercalation with ethidium bromide, acridine orange and methylene blue," *J. Mol. Struct.*, vol. 827, no. 1–3, pp. 35–43, 2007, doi: 10.1016/j.molstruc.2006.05.004.
- [28] H. Meier, "Conjugated oligomers with terminal donor-acceptor substitution," *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 44, no. 17, pp. 2482–2506, 2005, doi: 10.1002/anie.200461146.
- [29] A. M. Thooft, K. Cassaidy, and B. Vanveller, "A Small Push-Pull Fluorophore for Turn-on Fluorescence," *J. Org. Chem.*, vol. 82, no. 17, pp. 8842–8847, 2017, doi: 10.1021/acs.joc.7b00939.
- [30] N. J. Leonard, M. A. Sprecker, and A. G. Morrice, "Defined Dimensional Changes in Enzyme Substrates and Cofactors. Synthesis of lin-Benzoadenosine and Enzymic Evaluation of Derivatives of the Benzopurines," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 98, no. 13, pp. 3987–3994, 1976, doi: 10.1021/ja00429a040.
- [31] M. Legraverend, "Recent advances in the synthesis of purine derivatives and their precursors," *Tetrahedron*, vol. 64, no. 37, pp. 8585–8603, 2008, doi: 10.1016/j.tet.2008.05.115.
- [32] M. Legraverend and D. S. Grierson, "The purines: Potent and versatile small molecule inhibitors and modulators of key biological targets," *Bioorganic Med. Chem.*, vol. 14, no. 12, pp. 3987–4006, 2006, doi: 10.1016/j.bmc.2005.12.060.
- [33] S. Dinesh, G. Shikha, G. Bhavana, S. Nidhi, and S. Dileep, "Biological Activities of Purine Analogues: a Review," *J. Pharm. Sci. Innov.*, vol. 1, no. 2, pp. 29–34, 2012, [Online]. Available: www.jpsionline.com.
- [34] H. Vorbrüggen, "Advances in Amination of Nitrogen Heterocycles," *Adv. Heterocycl. Chem.*, vol. 49, no. C, pp. 117–192, 1990, doi: 10.1016/S0065-2725(08)60554-1.
- [35] L. C. Sowers, G. V. Fazakerley, R. Eritja, B. E. Kaplan, and M. F. Goodman, "Base pairing and mutagenesis: Observation of a protonated base pair between 2-aminopurine and cytosine in an oligonucleotide by proton NMR," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 83, no. 15, pp. 5434–5438, 1986, doi: 10.1073/pnas.83.15.5434.
- [36] O. J. G. Somsen, V. A. Hoek, and V. H. Amerongen, "Fluorescence quenching of 2-aminopurine

- in dinucleotides," *Chem. Phys. Lett.*, vol. 402, no. 1–3, pp. 61–65, 2005, doi: 10.1016/j.cplett.2004.11.122.
- [37] L. M. Wilhelmsson, P. Sandin, A. Holmén, B. Albinsson, P. Lincoln, and B. Nordén, "Photophysical characterization of fluorescent DNA base analogue, tC," *J. Phys. Chem. B*, vol. 107, no. 34, pp. 9094–9101, 2003, doi: 10.1021/jp034930r.
- [38] B. Holz, S. Klimasauskas, S. Serva, and E. Weinhold, "2-Aminopurine as a fluorescent probe for DNA base flipping by methyltransferases," *Nucleic Acids Res.*, vol. 26, no. 4, pp. 1076–1083, 1998, doi: 10.1093/nar/26.4.1076.
- [39] U. Subuddhi, M. Hogg, and L. J. Reha-Krantz, "Use of 2-aminopurine fluorescence to study the role of the β hairpin in the proofreading pathway catalyzed by the phage T4 and RB69 DNA polymerases," *Biochemistry*, vol. 47, no. 23, pp. 6130–6137, 2008, doi: 10.1021/bi800211f.
- [40] S. Lobsiger, S. Blaser, R. K. Sinha, H. M. Frey, and S. Leutwyler, "Switching on the fluorescence of 2-aminopurine by site-selective microhydration," *Nat. Chem.*, vol. 6, no. 11, pp. 989–993, 2014, doi: 10.1038/nchem.2086.
- [41] J. M. Jean and K. B. Hall, "2-Aminopurine fluorescence quenching and lifetimes: Role of base stacking," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 98, no. 1, pp. 37–41, 2001, doi: 10.1073/pnas.98.1.37.
- [42] J. M. Jean and K. B. Hall, "2-Aminopurine Electronic Structure and Fluorescence Properties in DNA," *Biochemistry*, vol. 41, no. 44, pp. 13152–13161, 2002, [Online]. Available: [papers://dc5b7a66-c191-4125-90d3-2536c98d4438/Paper/p978](https://doi.org/10.1021/bi02111a001).
- [43] M. F. G. Ramon Eritja; Bruce E. Kaplan, Dhananjaya Mhaskas, Lawrence C. Sowers, John Petruska, "Synthesis and properties of defined DNA oligomers containing base mismatches involving 2-aminopurine," vol. 14, no. 14, pp. 10561–10573, 1986.
- [44] S. Schmidt and D. Cech, "A New Approach to the Synthesis of 2-Aminopurine-2'-Deoxyriboside Via Tri-n-Butyltin Hydride Reduction," *Nucleosides and Nucleotides*, vol. 14, no. 6, pp. 1445–1452, 1995, doi: 10.1080/15257779508010704.
- [45] Y. Zhou and P. O. P. Ts'o, "Synthesis of oligodeoxyribonucleoside methylphosphonates containing 2-aminopurine," *Nucleosides and Nucleotides*, vol. 15, no. 10, pp. 1635–1648, 1996, doi: 10.1080/07328319608002463.
- [46] J. Fujimoto, Z. Nuesca, M. Mazurek, and L. C. Sowers, "Synthesis hydrolysis of oligodeoxyribonucleotides containing 2-aminopurine," *Nucleic Acids Res.*, vol. 24, no. 4, pp. 754–759, 1996, doi: 10.1093/nar/24.4.754.

- [47] L. W. Mclaughlin, T. Leong, F. Benseler, and N. Piel, "A new approach to the synthesis of a protected 2-aminopurine derivative and its incorporation into oligodeoxynucleotides containing the Eco RI and bam HI recognition sites," *Nucleic Acids Res.*, vol. 16, no. 12, pp. 5631–5644, 1988, doi: 10.1093/nar/16.12.5631.
- [48] D. C. Ward and E. Reich, "Fluorescence Studies of Nucleotides and Polynucleotides," *J. Biol. Chem.*, vol. 244, no. 5, pp. 1228–1237, 1969, [Online]. Available: <http://www.jbc.org/>.
- [49] D. W. Woodward, "4,5-Imidazoledicarbonitrile and method of preparation US 2,534,331," 1950.
- [50] M. J. Alves, B. L. Booth, and M. F. J. R. P. Proença, "Synthesis of 5-Amino-4-(cyanoformimidoyl)-1H-imidazole: a Reactive Intermediate for the Synthesis of 6-Carbamoyl-1,2-dihydropurines and 6-Carbamoyl-purines," *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, vol. 1, pp. 1705–1712, 1990.
- [51] N. R. Senhorães, "Síntese de derivados de adenina e guanina," Universidade do Minho, Braga, 2015.
- [52] A. M. Dias, A. S. Vila-Chã, A. L. Costa, D. P. Cunha, N. Senhorães, and M. F. Proença, "Versatile synthesis of 5-aminoimidazole-4-carboxylic acid derivatives," *Synlett*, no. 18, pp. 2675–2680, 2011, doi: 10.1055/s-0031-1289528.
- [53] S. R. Meech and D. Phillips, "Photophysics of some common Fluorescence Standards," *J. Photochem.*, vol. 23, pp. 193–217, 1983.
- [54] S. Batzri and E. D. Korn, "Single bilayer liposomes prepared without sonication," *BBA - Biomembr.*, vol. 298, no. 4, pp. 1015–1019, 1973, doi: 10.1016/0005-2736(73)90408-2.
- [55] J. R. Nordlund, C. F. Schmidt, S. N. Dicken, and T. E. Thompson, "Transbilayer Distribution of Phosphatidylethanolamine in Large and Small Unilamellar Vesicles," *Biochemistry*, vol. 20, no. 11, pp. 3237–3241, 1981, doi: 10.1021/bi00514a039.