

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
PPGQ – PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**SÍNTESE DE BIGINELLI APLICADA AO DESENVOLVIMENTO DE  
NOVAS CUMARINO-DIIDROPIRIMIDINONAS COM POTENCIAL  
USO NO DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DE CÂNCERES  
ASSOCIADOS À HSP 90**

Felipe Vitório Ribeiro

2015



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
PPGQ – PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**SÍNTESE DE BIGINELLI APLICADA AO DESENVOLVIMENTO DE  
NOVAS CUMARINO-DIIDROPIRIMIDINONAS COM POTENCIAL  
USO NO DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DE CÂNCERES  
ASSOCIADOS À HSP 90**

**FELIPE VITÓRIO RIBEIRO**

*Sob Orientação do Professor*

**Dr. Arthur Eugen Kümmerle**

*Co-orientação do professor*

**Dr. Cedric Stephan Graebin**

Dissertação submetida como  
requisito parcial para obtenção do  
grau de **Mestre em Ciências**, no  
Programa de Pós- Graduação em  
Química, Área de Concentração em  
Química Orgânica

Seropédica , RJ

Maio de 2015

547.2  
R347s  
T

Ribeiro, Felipe Vitório, 1990-  
Síntese de Biginelli aplicada ao desenvolvimento de novas cumarino-Diidropirimidinonas com potencial uso no diagnóstico e tratamento de cânceres associados à HSP90 / Felipe Vitório Ribeiro. - 2015.

210 f.: il.

Orientador: Arthur Eugen Kümmerle.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Química.

Bibliografia: f. 112-125.

1. Química orgânica - Síntese - Teses.  
2. Síntese orgânica - Teses. 3. Câncer - Diagnóstico - Teses. 4. Câncer - Tratamento - Teses. I. Kümmerle, Arthur Eugen, 1979-II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Química. III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

FELIPE VITÓRIO RIBEIRO

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Programa de Pós- Graduação em Química, Área de Concentração em Química Orgânica.

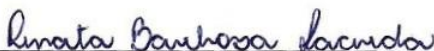
APROVADA EM 06/05/2015



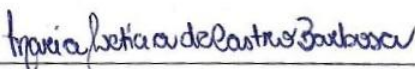
Dr. Arthur Eugen Kümmerle (Orientador) – DEQUIM-UFRRJ



Dr. Cedric Stephan Graebin (Co-Orientador) – DEQUIM-UFRRJ



Dra. Renata Barbosa Lacerda – DEQUIM-UFRRJ



Dr. Maria Leticia de Castro Barbosa (Farmácia-UFRJ)

Dr. Aurélio Baird Buarque Ferreira (Suplente) – DEQUIM-UFRRJ

Dr. Leandro Soter Miranda (Suplente) – IQ-UFRJ



Ao Deus de toda sabedoria, meu Senhor e Rei. Que eu possa chegar o mais próximo possível da sabedoria concedida a Salomão, o homem mais sábio que já existiu.

Aos meus pais, Moisés e Neuza, e à minha futura esposa com carinho.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus pela oportunidade de conhecer um pouco mais, através da ciência, Suas criações. Pois tudo vem dEle e nada existe sem Ele.

Aos meus pais Moisés e Neuza Ribeiro pelo carinho e apoio. Que viram de perto minhas aflições, meus temores e minhas vitórias nessa caminhada. E também minha irmã Tati, meu sobrinho Leo e meu cunhado Luizão.

À minha amada namorada e futura esposa Luana que orou por mim, me compreendeu e me acompanhou nesses anos com sua amizade, carinho e amor. Amo-te!

Ao meu pastor, amigo e líder Érico que sempre orou por mim, me orientou nas horas mais difíceis e acreditou em cada sonho que eu contei a ele.

Ao meu professor e orientador Dr. Arthur Eugen Kümmerle por acreditar em mim, na minha história, na minha capacidade e nos meus sonhos, me dando uma oportunidade de crescer como profissional, de trabalhar com aquilo que desde pequeno sonhava, com química, fazendo compostos que podem ser usados como fármacos e podem ajudar as pessoas com o produto do meu trabalho. Sinto-me útil à sociedade, como um verdadeiro pesquisador. No início do mestrado não eram muitos que acreditavam no nome Felipe Vitória, mas com sua paciência, experiência e vontade de transmitir o conhecimento me fez crescer como ser humano e como pesquisador. Obrigado por ser um homem digno de confiança, com um senso de justiça enorme e uma vontade imensa de trabalhar, existe poucos assim no mundo.

Ao meu co-orientador Cedric S. Graebin que me mostrou o fascinante mundo da síntese multicomponente.

Aos meus amigos de Laboratório Daiana Portella, Luciana Azevedo, Sabrina Neves e Thiago Padeiro que foram meus “braços direito” no meu trabalho e grandes exemplos de busca incessante pelo conhecimento, o que seria da minha vida acadêmica sem vocês. Obrigado pelas colaborações, pelo companheirismo, pelas altas risadas, por me aturar (rsrs), por fazerem do LadMol-QM o laboratório mais agradável que já trabalhei e acredito que é o melhor de todos.

Ao LASSBio pelas análises de ESI. E ao professor Guilherme Guedes do DEQUIM da Rural pela cristalografia de raio-X.

A todos os meus amigos da Igreja Nova Vida em Itaguaí que me apoiaram, me ajudaram e oraram por mim.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro pelo ensino público, gratuito e de qualidade.

A todos aqueles que participaram deste trabalho e contribuíram direta ou indiretamente para minha formação profissional.

“Quão profundas riquezas o saber e o conhecer de Deus. Quão insondáveis seus juízos e seus caminhos. A ele a Glória!” (Texto Bíblico de Romanos 11:33; canção de Ana Paula Valadão, 1999)

## RESUMO

Câncer é um termo usado para doenças em que células anormais se dividem sem controle e são capazes de invadir outros tecidos, podendo se espalhar para lugares distantes no corpo através dos sistemas sanguíneos e linfáticos por um processo conhecido como metástase, sendo considerado pela Organização Mundial da Saúde um dos maiores problemas de saúde enfrentados pela humanidade neste século. A Hsp90 (Heat Shock Proteins – 90kD) é considerada hoje como um possível alvo terapêutico no tratamento contra o câncer. Esta enzima possui um papel muito importante no desenvolvimento de processos tumorais das células porque a mesma está presente em todas as organelas e é estável, além de corresponder a 1-2% do conteúdo protéico celular, podendo chegar a 6% em nível de estresse. Dessa forma, a presente dissertação propõe o planejamento e a síntese de uma série de análogos ao novobiocin (**24**), pois é um inibidor desta enzima já descrito na literatura. A série aqui descrita é da classe das diidropirimidin-2(1*H*)-onas e foi planejada através de hibridação molecular deste núcleo com a subunidade cumarínica do novobiocin. Ambos os núcleos são comprovadamente ativos sobre linhagens de células tumorais. Portanto este trabalho tem como objetivo estudar o processo de síntese das diidropirimidin-2(1*H*)-onas planejadas como inibidoras da Hsp90, seu escopo reacional e avaliar suas propriedades de fluorescência como possíveis marcadores celulares. A série foi sintetizada através da reação multicomponente de Biginelli, utilizando ureias (**50a-b**), aldeídos aromáticos (**Ar a-n**), beta-cetoésteres cumarínicos sintetizados previamente (**105a-b**), HCl como catalisador. Toda a série foi caracterizada por métodos físicos e químicos de análise. Este é o primeiro relato de adutos de Biginelli contendo um núcleo cumarínico e o seu mecanismo reacional multicomponente parece curiosamente passar através de um intermediário de Knoevenagel, que foi considerado improvável pela literatura. A biblioteca de diidropirimidin-2(1*H*)-onas foi obtida com rendimentos de baixos a excelentes (25-99%), tendo sua estrutura final confirmada, também, por estudos de difração de raios-X. Análises fotofísicas de alguns compostos, em diferentes solventes, mostraram bons deslocamentos de Stokes em água, que estão associados a um processo conhecido como transferência interna de carga (ICT) que, junto com a determinação de seu pKa, fazem destes compostos um bom ponto de partida para novas sondas químicas e biológicas, bem como indicadores de pH.

**PALAVRAS-CHAVE:** Câncer, diidropirimidin-2(1*H*)-onas, Hsp-90, novobiocin, reação multicomponente de Biginelli.

## ABSTRACT

Cancer is a term used for diseases in which abnormal cells divide without control and are able to invade other tissues and can be spread to distant locations in the body through blood and lymph systems through a process known as metastasis, been considered by the World Health Organization as one of the biggest health problems facing humanity at this century. Hsp90 (Heat Shock Proteins – 90kD) is considered today as one possible therapeutic target in cancer treatment. This enzyme has an important role in the development of tumor cells processes because it is stable, and is present in all organelles, corresponding to 1-2% of the cellular protein content, reaching to 6% stress in stress level. Thus, this work proposes the design and synthesis of a series of novobiocin (**24**) analogs, and it is known as inhibitor of this enzyme. The molecules described herein belong to the class of dihydropyrimidin-2(1*H*)-one and was designed by molecular hybridization of this core with coumarin subunit of novobiocin, both compounds have proved activity on tumor cell lines. Therefore this work aims to study the process of synthesis of dihydropyrimidin-2(1*H*)-ones planned as inhibitors of Hsp90, its reaction scope and evaluate their fluorescence properties as possible cellular markers. The series was synthesized by multicomponent Biginelli reaction, using ureas (**50a-b**), aromatic aldehydes (**Ar a-n**), coumarin beta-ketoesters previously synthesized (**105a-b**) and HCl as catalyst. All compounds were characterized by physical and chemical methods of analysis. This is the first report of Biginelli adducts bearing a coumarin nucleus in the  $\beta$ -ketoester moiety and their MCR mechanism seems to pass through a Knoevenagel intermediate, which was considered as unlikely before. A chemical library of dihydropyrimidin-2(1*H*)-one was obtained with low to excellent yields (25-99%), with its final structure confirmed also by studies of X-ray diffraction. Photophysical analyses of representative compounds in different solvents show good Stokes shifts in water that are associated to a postulated ICT process which, along with the determination of their pKa, make these compounds a good start point for new chemical and biological probes as well as useful pH indicators.

**KEYWORDS:** Cancer, dihydropyrimidin-2(1*H*)-one, Hsp-90, novobiocin, Biginelli multicomponent reaction.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Desenvolvimento do câncer: células normais que após alterações genética perdem o controle proliferativo e invadem tecidos e órgãos. Adaptado de HARBER, 2000.....24
- Figura 2. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2014-2015 por sexo, exceto pele não melanoma (INCA, 2014).....25
- Figura 3. Mecanismo de ação da quimioterapia.....26
- Figura 4. Gás mostarda e mostardas nitrogenadas utilizadas no tratamento do câncer como agentes alquilantes das bases nitrogenadas do DNA.....27
- Figura 5. Agentes alquilantes mais comuns: sulfonatos alquílicos, complexos de platina, etilenaminas e nitrosuréias.....27
- Figura 6. Inibidores de PTKs selecionados: Imatinibe (**14**), Lapatinibe (**15**), Canertinibe (**16**) e Erlotinibe (**17**).....28
- Figura 7. A – Grupamento essencial para atividade sobre a PTK alvo para o Imatinibe (**14**) e ATP (**18**). B – Principais interações entre Imatinibe e aminoácidos presentes no sítio de ligação com ATP, destacando a interação do tipo ligação de hidrogênio entre o ligante e resíduo de treosina na posição 315 (Adaptado de PDB 3K5V).....29
- Figura 8. Envolvimento de cada Hsp em suas funções específicas. Adaptado de: Mosser e Morimoto, 2004; Borges e Ramos, 2005.....31
- Figura 9. A rede de interação de proteínas clientes da enzima Hsp90 citosólica humana. Adaptado de Da Silva e Ramos, 2012.....32
- Figura 10. Estrutura e função da Hsp90. Representação dos três domínios, N-terminal (DN), Central (DM) e C-terminal (DC); e ativação de proteína cliente dependente da hidrólise de ATP. (Modificada de Modificado de HARTL *et al.*,2011).....34
- Figura 11. Representação da interação do mesmo sítio como ATP e o inibidor Geldanamicina respectivamente.....35
- Figura 12. Exemplos de inibidores do domínio N-terminal: Geldanamicina (**19**); NVP-HSP990 (**20**); BIIB028 (**20**; Fase 1); AT13387 (**21**; Fase 2); Ganetespib (**23**; Fase 3).....35
- Figura 13. Exemplos de inibidores do domínio C-terminal: Taxol (**25**), Cisplatina (**8**), Epigallocatequina (**26**) e em destaque o Novobiocin (**24**).....37
- Figura 14. Modelagem molecular feita para o complexo novobiocin-Hsp90, através de um modelo homólogo de hHsp90 $\alpha$ . A – Homodímero da Hsp90 e ligação do novobiocin na

interface dos dois monômeros. B – Interações do novobiocin com os resíduos de aminoácido. C – Superfície de acesso ao solvente e encaixe do ligante novobiocin.....	38
Figura 15. Estruturas dos antibióticos, que atuam sobre proteínas clientes da Hsp90: Novobiocin ( <b>24</b> ); Clorobiocin ( <b>27</b> ) e Cumermicina ( <b>28</b> ).....	39
Figura 16. Estruturas dos análogos de Blagg 29-31.....	40
Figura 17. Análogos do novobiocin com atividade sobre a célula SKBr3 ( <b>32-34</b> ), e <b>35</b> com atividade pronunciada sobre célula MCF-7.....	41
Figura 18. Compostos ( <b>36-39</b> ) mais ativos da série de alquil aminas como substituintes na posição 7 da sub-unidade cumarínica.....	42
Figura 19. Descrição de relação estrutura atividade realizada para inibidores da Hsp90 contendo o núcleo cumarínico.....	43
Figura 20. Exemplo de uma reação multicomponente, fazendo-se analogia com um quebra-cabeça (SLOBBE <i>et al.</i> , 2012).....	44
Figura 21. Comparação entre a síntese linear clássica e a convergente (DÖMLING <i>et al.</i> , 2012).....	44
Figura 22. Crescimento das publicações utilizando reações multicomponentes (1946-2014).....	45
Figura 23. Exemplos de alguns compostos 1,3-dicarbonílicos e análogos utilizados na reação de Biginelli.....	48
Figura 24. Uréias/tiouréias e guanidina utilizadas em reações de Biginelli.....	48
Figura 25. DHPMs e suas diversas aplicabilidades biológicas no tratamento de diversas doenças, como câncer, hipertensão, HIV, dentre outras.....	52
Figura 26. DHPM inspiradas através na descoberta das propriedades antiproliferativas do Monastrol ( <b>102</b> ) em células tumorais.....	53
Figura 27. Atribuição dos principais sinais do espectro de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ (500 e 125 MHz) dos compostos <b>3a</b> em DMSO- $d_6$ .....	59
Figura 28. Atribuição das principais bandas do IV dos compostos <b>105a-b</b> .....	60
Figura 29. Atribuição dos principais picos do espectro de Massas do composto <b>105a</b> .....	61
Figura 30. Esquema reacional de dimerização da cumarina em questão. Adaptado de SPECHT <i>et al.</i> , 1982.....	62

Figura 31. Cromatogramas das reações de formação do produto <b>106a</b> utilizando o beta-cetoéster <b>105a</b> , benzaldeído e uréia na presença dos catalisadores indicados, por 24 horas ( $\lambda=370$ nm, coluna C-18, eluída com H <sub>2</sub> O/MeOH 1%); A – Uso de 25 $\mu$ L de HCl concentrado em 2 mL de etanol; B – Uso de 25 $\mu$ L de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> concentrado em 2 mL de etanol.....	65
Figura 32. Cromatogramas das reações de formação do produto <b>106a</b> utilizando o beta-cetoéster <b>105a</b> , benzaldeído e uréia na presença dos catalisadores indicados, por 24 horas ( $\lambda=370$ nm, coluna C-18, eluída com H <sub>2</sub> O/MeOH 1%); A – Uso de 12,5 $\mu$ L de HCl em 2 mL de etanol; B – Uso de 12,5 $\mu$ L de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> em 2 mL de etanol.....	66
Figura 33. Atribuição dos principais sinais do espectro de RMN de <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C (500 e 125 MHz) do intermediário <b>121</b> em DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> .....	67
Figura 34. Atribuição dos principais sinais do espectro de RMN de <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C (400 e 100 MHz) de <b>106a</b> em DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> .....	75
Figura 35. Espectro de RMN bidimensional COSY para o produto <b>106a</b> . Acoplamento entre hidrogênios próximos. Ampliação na região de 4,90 – 9,60 ppm no espectro 1D de <sup>1</sup> H.....	76
Figura 36. Espectro de RMN bidimensional HSQC para o produto <b>106a</b> . Acoplamento entre carbonos e hidrogênios através de uma ligação covalente, J <sup>1</sup> .....	77
Figura 37. Espectro de RMN bidimensional HSQC para o produto <b>106a</b> com ampliação na região de 6,6-8,3 ppm do espectro de hidrogênio, e 110-165 ppm do espectro de carbono. Acoplamento entre carbonos e hidrogênios através de três ligações covalentes, J <sup>3</sup> .....	79
Figura 38. Atribuição das principais bandas do IV do composto <b>106a</b> .....	80
Figura 39. Atribuição dos principais picos do espectro de massas do composto <b>106a</b> .....	81
Figura 40. Estrutura molecular do composto <b>106c</b> . Elipsóides térmicos são desenhados a 40% de probabilidade. A cristalização da molécula de solvente foi omitida por razões de clareza.....	87
Figura 41. Análises espectrais para os derivados cumarínicos. A – Espectro de UV-Vis em metanol normalizado. B – Espectro de emissão de fluorescência em metanol normalizado, com excitação em $\lambda_{\max}$ para cada derivado.....	88
Figura 42. Titulação espectrofotométrica do composto <b>106a</b> (6 $\mu$ M) em água.....	91
Figura 43. Determinação de pKa em função de $\log((A-A_f)/(A_0-A))$ para o composto ( <b>106a</b> ), obtido através de valores de absorvância em 390nm (FRIN, 2008).....	92



Figura 44. Espectro de fluorescência do composto **106a** (6  $\mu\text{M}$ ) em água, com aumento de pH e  $\lambda_{\text{exc}}$  em 337 nm.....92

Figura 45. Espectro UV-Vis do composto **106a** (6  $\mu\text{M}$ ) em água e **106a** (6  $\mu\text{M}$ ) com adição de 5 equivalentes de  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^{1+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  e  $\text{Ca}^{2+}$  .....93

## LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Exemplos de RMCs em ordem cronológica de descobertas.....	46
Esquema 2. Primeiro relato da reação de Biginelli.....	47
Esquema 3. Mecanismo imínio para síntese de DHPMs proposto por Folkers.....	49
Esquema 4. Mecanismo Knoevenagel para síntese de DHPMs proposto por Sweet.....	50
Esquema 5. Mecanismo Enamina para síntese de DHPMs proposto por Kappe.....	50
Esquema 6. Planejamento estrutural da série proposta.....	55
Esquema 7. Análise retrossintética para obtenção da quimioteca de Diidropirimidinonas de Biginelli ( <b>106a-r</b> ).....	57
Esquema 8. A – Esquema reacional. B – Mecanismo proposto para a formação dos betacetoésteres ( <b>105a-b</b> ).....	58
Esquema 9. A – Esquema reacional. B – Mecanismo proposto para a formação do intermediário <b>121</b> .....	68
Esquema 10. A – Esquema reacional. B – Mecanismo proposto para a formação da série de Diidropirimidinonas.....	69

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características das células tumorais e proteínas clientes da Hsp90 envolvidas.....	33
Tabela 2. Otimização das condições reacionais.....	62
Tabela 3. Otimização das condições reacionais para a obtenção de <b>106a</b> .....	63
Tabela 4. Escopo reacional, rendimentos da síntese cumarina diidropirimidinona e propriedades físicas.....	70
Tabela 5. Principais acoplamentos (C-H) apresentados no espectro HSQC ( $J^1$ ) de <b>106a</b> .....	77
Tabela 6. Principais acoplamentos (C-H) apresentados no espectro HMQC de <b>106a</b> .....	78
Tabela 7. Dados espectroscópicos de RMN de $^1\text{H}$ dos compostos <b>106a-r</b> . Valores de $\delta$ expressos em ppm.....	82
Tabela 8. Dados espectroscópicos de RMN de $^{13}\text{C}$ dos compostos <b>106a-r</b> . Valores de $\delta$ expressos em ppm.....	84
Tabela 9. Dados espectroscópicos dos derivados cumarínicos.....	88

## LISTA DE ABREVIATURAS

- Abl – proteína tirosina kinase retificada pelo oncogene Abl
- ADP – adenosina difosfato
- Akt – proteína tirosina kinase retificada pelo oncogene Akt
- Asp – *Aspartate* (Aspartato)
- ATP – adenosina trifosfato
- Btk – proteína tirosina kinase Breton's
- CCD – cromatografia em camada delgada
- CI<sub>50</sub> – concentração para 50% de inibição
- CLAE – cromatografia de alta eficiência
- c-Met – proteína tirosina kinase retificada pelo oncogene MET
- CML – *chronic myeloid leukemia* (leucemia mieloide crônica)
- COSY – *correlation spectroscopy* (espectroscopia de correlação)
- Csk – proteína tirosina kinase retificada pelo gene Csk
- Cys – aminoácido cisteína
- DC – domínio C-terminal
- DHPM – 3,4-diidropirimidin-2(1*H*)-ona
- DN – domínio N-terminal
- DNA – ácido desoxirribonucleico
- DSMO – dimetilsulfóxido
- EGFR – epidermal growth factor receptor (receptor do fator de crescimento epidérmico)
- EM – espectrometria de massas
- ESI – *Electrospray ionization* (ionização por eletrosspray)
- Fak – proteína quinase de adesão focal

FDA – Food and Drug Administration

Fps – proteína tirosina kinase não receptora

GFR – receptores do fator de crescimento

HeLa – células de carcinoma cervical humano

Hif-1alfa – *Hypoxia-inducible factor 1-alpha* (fator de indução de hipóxia)

HIV – *Human Immunodeficiency Virus* (vírus da imunodeficiência humana)

HMBC – *Heteronuclear Multiple Bond Correlation*

HSP – *Heat shock protein* (proteínas de choque térmico)

HSQC – *Heteronuclear Single-Quantum Correlation*

ICT – *internal charge transfer* (transferência interna de carga)

IM – imatinibe

INCA – Instituto Nacional do Câncer

IV – infravermelho

J – constante de acoplamento

JAK – proteína tirosina kinase Janus

kDa – kilodalton

LASSBio – Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas

LS-180 – linhagem celular de carcinoma de cólon humano

M – domínio central

m/z – razão massa carga

MCF-7 – linhagem celular proveniente de carcinoma de mama humano

MeOH – metanol

Met – aminoácido metionina

MMP2 – metalo proteinase de matriz-2

Myt1 – fator de transcrição de mielina 1

NCI EUA – Instituto Nacional do Câncer Americano (*National Cancer Institute*)

NOESY – *Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*

NRTKs – proteínas tirosina kinases não receptoras

P.F. – ponto de fusão

PDB – *Protein Data Bank*

PDGFR – receptor do fator de crescimento derivado das plaquetas

Phe – aminoácido fenilalanina

ppm – partes por milhão

PTKs – proteínas tirosina kinase

Raf-1 – proteína tirosina kinase retificada pelo oncogene Raf-1

Raji – linfoma de Burkitt

RIP – proteína inativadora de ribosomas

RMCs – reações multicomponentes (*MCR - multicomponent reactions*)

RMN – ressonância magnética nuclear

RNA – ácido ribonucleico (*ribonucleic acid*)

RTKs – proteína tirosina kinase receptoras

SAR – Relação estrutura-atividade (*structure-activity relationship*)

SkBr3 – *Sloan-Kettering Cancer Center*

SKOV-3 – adenocarcinoma

Src – proteína tirosina kinase retificada pelo oncogene Src

Syk – tirosina quinase esplênica

Thr – aminoácido treonina

TKis – inibidores de tirosina quinase

UV – Ultravioleta

VEGFR – receptor do fator de crescimento do endotélio vascular

Wee1 – *Mitosis inhibitor protein kinase*

## SUMÁRIO

1 – Introdução .....	23
1.1 – O Câncer .....	23
1.2 – O tratamento do câncer .....	25
1.3 – Proteínas como alvo terapêutico do câncer .....	30
1.4 – HSP 90 e o câncer .....	30
1.5 – HSP 90 – Estrutura e função .....	33
1.6 – Inibidores de HSP 90 .....	35
1.7 – Novobiocin e cumarinas inibidoras da HSP 90 .....	38
1.8 – Reações multicomponente .....	43
1.9 – Breve histórico das RMCs .....	45
1.10 – Reação Tricomponente de Biginelli .....	47
1.11 – Mecanismo de reação .....	48
1.12 – Aplicação biológica das cumarinas de Biginelli .....	51
2 – Objetivos .....	54
3 – Resultados e Discussão .....	56
3.1 – Planejamento Sintético e Obtenção da Quimioteca de Diidropirimidinonas de Biginelli ( <b>106a-r</b> ) .....	56
3.1.1 – Síntese dos Betacetoésteres ( <b>105a-b</b> ) .....	57
3.1.2 – Padronização e otimização da síntese do betacetoéster <b>105a</b> .....	60
3.1.3 – Síntese das Diidropirimidinonas – Padronização .....	63



3.1.4	– Síntese da série de Diidropirimidinonas – Escopo reacional .....	70
3.1.5	– Estudos de caracterização fotofísica .....	87
4	– Conclusões .....	94
5	– Parte Experimental .....	96
5.1	– Metodologia Sintética .....	96
5.2	– Síntese dos betacetoésteres ( <b>105a-b</b> ) .....	97
5.3	– Síntese dos produtos de Biginelli ( <b>106a-o</b> ) .....	98
5.3.1	– 6-(7-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)-2-oxo-4-fenil-1,2,3,4-tetraidropirimidinona-5-carboxilato de etila ( <b>106a</b> ) .....	99
5.3.2	– 6-(7-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)-4-(4-nitrofenil)-2-oxo-1,2,3,4-tetrahidropirimidinona-5-carboxilato de etila ( <b>106b</b> ) .....	99
5.3.3	– 6-(7-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)-4-(4-hidroxifenil)-2-oxo-1,2,3,4-tetrahidropirimidinona-5-carboxilato de etila ( <b>106c</b> ) .....	100
5.3.4	– 6-(7-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)-4-(4-metoxifenil)-2-oxo-1,2,3,4-tetrahidropirimidinona-5-carboxilato de etila ( <b>106d</b> ) .....	101
5.3.5	– 6-(7-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)-4-(3-metoxifenil)-2-oxo-1,2,3,4-tetrahidropirimidinona-5-carboxilato de etila ( <b>106e</b> ) .....	101
5.3.6	– 4-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-6-(7-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)-2-oxo-1,2,3,4-tetrahidropirimidinona-5-carboxilato de etila ( <b>106f</b> ) .....	101
5.3.7	– 6-(7-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)-2-oxo-4-(3,4,5-trimetoxifenil)-1,2,3,4-tetrahidropirimidinona-5-carboxilato de etila ( <b>106g</b> ) .....	103
5.3.8	– 4-(4-fluorfenil)-6-(7-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-yl)-2-oxo-1,2,3,4-tetrahidropirimidinona-5-carboxilato de etila ( <b>106h</b> ) .....	103

5.3.9	– 4-(4-clorofenil)-6-(7-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)-2-oxo-1,2,3,4-tetrahidropirimidinona-5-carboxilato de etila ( <b>106i</b> ) .....	104
5.3.10	– 4-(4-bromofenil)-6-(7-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-yl)-2-oxo-1,2,3,4-tetrahidropirimidinona-5-carboxilato de etila ( <b>106j</b> ) .....	105
5.3.11	– 6-(7-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)-2-oxo-4-(tiofen-2-il)-1,2,3,4-tetrahidropirimidinona-5-carboxilato de etila ( <b>106k</b> ) .....	105
5.3.12	– 6-(7-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)-2-oxo-4-(tiazol-2-il)-1,2,3,4-tetrahidropirimidinona-5-carboxilato de etila ( <b>106l</b> ) .....	106
5.3.13	– 6-(7-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)-2-oxo-4-(piridin-2-il)-1,2,3,4-tetrahidropirimidinona-5-carboxilato de etila ( <b>106m</b> ) .....	107
5.3.14	– 4-(3-bromopiridin-2-il)-6-(7-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)-2-oxo-1,2,3,4-tetrahidropirimidinona-5-carboxilato de etila ( <b>106n</b> ) .....	107
5.3.15	– 6-(7-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)-4-fenil-2-tioxo-1,2,3,4-tetrahidropirimidinona-5-carboxilato de etila ( <b>106o</b> ) .....	108
5.3.16	– 6-(7-(dietilamino)-2-oxo-2H-cromen-3-il)-2-oxo-4-fenil-1,2,3,4-tetrahidropirimidinona-5-carboxilato de etila ( <b>106p</b> ) .....	109
5.3.17	– 6-(7-(dietilamino)-2-oxo-2H-cromen-3-il)-4-(4-metoxifenil)-2-oxo-1,2,3,4-tetrahidropirimidinona-5-carboxilato de etila ( <b>106q</b> ) .....	109
5.3.18	– 6-(7-(dietilamino)-2-oxo-2H-cromen-3-il)-4-(4-clorofenil)-2-oxo-1,2,3,4-tetrahidropirimidinona-5-carboxilato de etila ( <b>106r</b> ) .....	110
5.4	– Caracterização do intermediário de Knoevenagel isolado ( <b>121</b> ) .....	111
6	– Referencias Bibliográficas .....	112
7	– Anexos .....	125-210

## 1. Introdução

### 1.1. O câncer

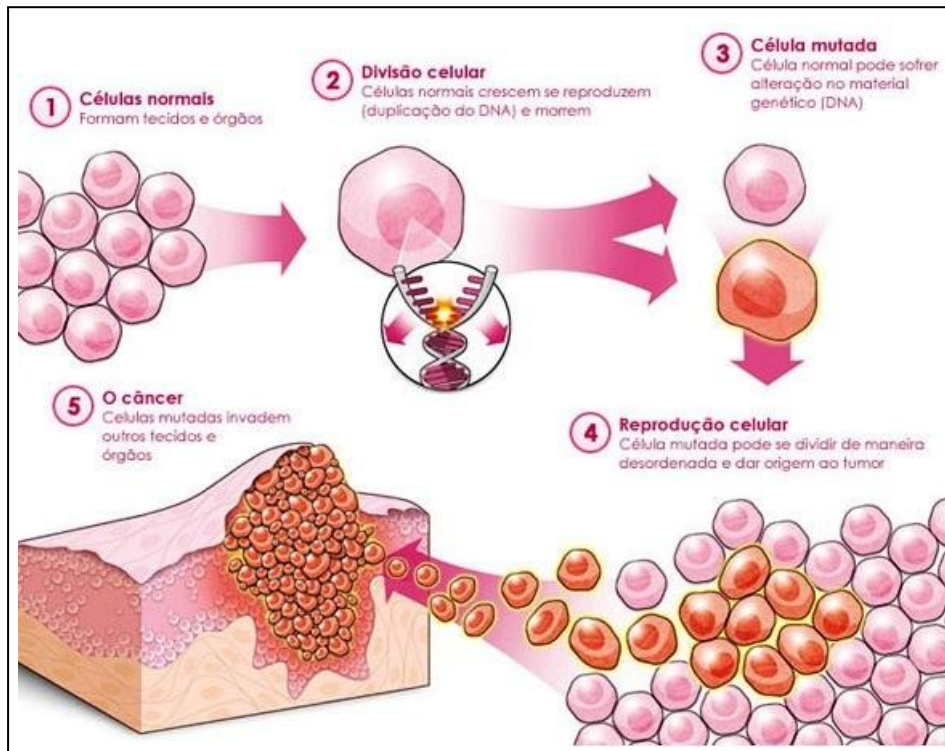
Câncer é um termo usado para doenças em que células anormais se dividem sem controle e são capazes de invadir outros tecidos, podendo se espalhar para lugares distantes no corpo através dos sistemas sanguíneos e linfáticos por um processo conhecido como metástase (KATZUNG, 1994; JAIN, 1994).

O câncer não pode ser classificado como apenas uma doença. Existem na verdade mais de 100 tipos diferentes de cânceres e a maioria são nomeados de acordo com o órgão ou tipo de célula em que eles começam, como por exemplo, o câncer de cólon que afeta primariamente o cólon. Diferentes tipos de câncer podem ser agrupados em categorias mais amplas, sendo que as principais incluem:

- Carcinoma – Tumor maligno desenvolvido a partir de células epiteliais, glandulares ou do trofoblasto;
- Sarcoma – Neoplasia que atinge células da mesoderme, que podem atingir ossos, cartilagens, gorduras, músculos, vasos sanguíneos ou tecidos moles;
- Leucemia – Corresponde a um conjunto de neoplasias malignas que atingem o sangue e possuem origem na medula óssea;
- Linfoma – Grupo de doenças neoplásicas do sistema linfático que se originam da proliferação clonal de linfócitos em qualquer estágio de maturação;
- Mieloma – Neoplasia dos plasmócitos que se caracteriza pela proliferação excessiva de plasmócitos malignos; e
- Cânceres do sistema nervoso central.

Todos os cânceres começam nas células, a unidade básica de vida do corpo (NCI EUA, 2014).

Para se tentar compreender o câncer é útil saber como e quando as células normais se tornam células cancerosas. O corpo humano, assim como de outros animais, é composto de inúmeros tipos de células diferentes. Estas células crescem e se dividem de forma controlada para produzir outras novas células para manutenção de um corpo saudável e executar as atividades de todo o organismo. Quando estas células se tornam velhas ou “danificadas”, elas morrem e são substituídas por novas células, processo chamado de apoptose (Figura 1).




**Figura 1.** Desenvolvimento do câncer: células normais que após alterações genética perdem o controle proliferativo e invadem tecidos e órgãos. Adaptado de HARBER, 2000.

No entanto, este processo tão bem organizado pode falhar. O material genético (DNA) de uma célula pode tornar-se danificado ou alterado, produzindo mutações que afetam o crescimento de células normais. Quando isso acontece, as células não morrem quando deveriam e novas células se formam quando o organismo não precisa delas. As células extras podem formar uma massa de tecido chamado tumor. A maioria das células normais no corpo humano tem 46 cromossomos. No entanto, algumas células cancerosas podem ter mais de 100 cromossomos. Além disso, tal padrão é inconsistente e células cancerosas podem ter números diferentes de cromossomos entre si (INCA, 2014).

No Brasil, a estimativa para o biênio 2014-2015, aponta para a ocorrência de aproximadamente 576 mil casos novos de câncer, incluindo os casos de pele não melanoma, reforçando a magnitude do problema do câncer no país. O câncer de pele do tipo não melanoma (182 mil casos novos) será o mais incidente na população brasileira, seguido pelos tumores de próstata (69 mil), mama feminina (57 mil), cólon e reto (33 mil), pulmão (27 mil), estômago (20 mil) e colo do útero (15 mil). Em homens, os tipos mais incidentes serão os cânceres de próstata, pulmão, cólon e reto, estômago e cavidade oral; e, nas mulheres, os de mama, cólon e reto, colo do útero, pulmão e glândula tireoide (Figura 2). É incontestável que

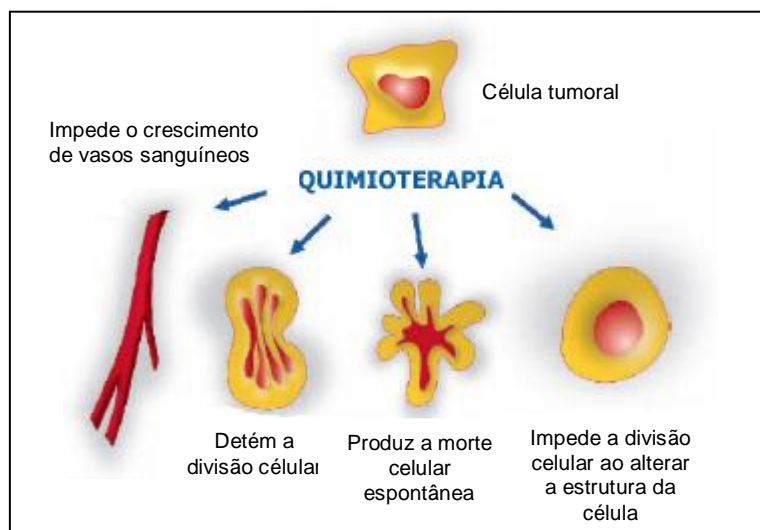
o câncer é hoje, no Brasil, um problema de saúde pública, cujo controle e prevenção deverão ser priorizados em todas as regiões, desde as mais desenvolvidas até às mais desiguais (INCA, 2014).

Localização primária	casos	%			Localização primária	casos	%
			<b>Homens</b>	<b>Mulheres</b>	Mama Feminina	57.120	20,8%
Próstata	68.800	22,8%			Cólon e Reto	17.530	6,4%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	16.400	5,4%			Colo do Útero	15.590	5,7%
Cólon e Reto	15.070	5,0%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.930	4,0%
Estômago	12.870	4,3%			Glândula Tireoide	8.050	2,9%
Cavidade Oral	11.280	3,7%			Estômago	7.520	2,7%
Esôfago	8.010	2,6%			Corpo do Útero	5.900	2,2%
Laringe	6.870	2,3%			Ovário	5.680	2,1%
Bexiga	6.750	2,2%			Linfoma não Hodgkin	4.850	1,8%
Leucemias	5.050	1,7%			Leucemias	4.320	1,6%
Sistema Nervoso Central	4.960	1,6%					

**Figura 2.** Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2014-2015 por sexo, exceto pele não melanoma (INCA, 2014).

## 1.2. O tratamento do câncer

A quimioterapia continua sendo o principal tratamento para doenças malignas sistêmicas, como o câncer, tendo como principais eventos desse tratamento a redução do crescimento de vasos sanguíneos, o bloqueio da divisão celular e a indução de apoptose (AHLES & SAYKIN, 2007; Figura 3). No entanto, alguns tumores são insensíveis a agentes quimioterápicos e outros adquirem resistência aos mesmos. Diversos fármacos podem induzir a apoptose através de vias de apoptose específicas e mutações únicas que impedem a apoptose, podem promover resistência aos mesmos (JOHNSTONE *et al.*, 2002).

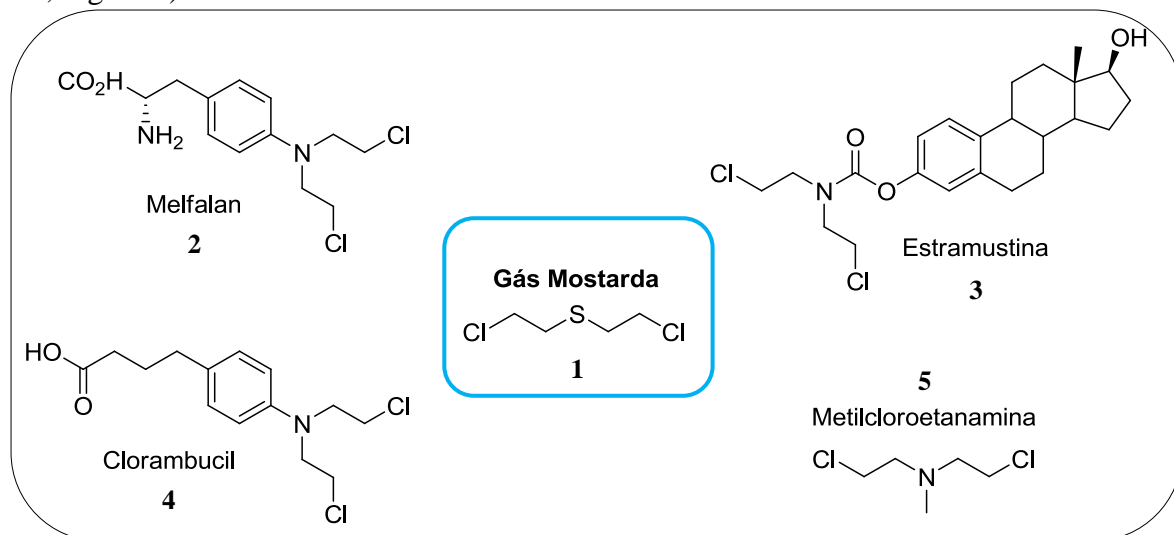


**Figura 3.** Mecanismo de ação da quimioterapia.

Um dos maiores problemas do tratamento do câncer com medicamentos se dá pelo fato das células cancerígenas serem muito parecidas com as células normais do organismo. Diversos são os alvos da quimioterapia que, em geral, atua matando as células que estão em rápida multiplicação. Nesse sentido, essa abordagem terapêutica atua preferencialmente sobre células cancerígenas, mas também acaba afetando qualquer tecido normal cujas células apresentem característica de rápida proliferação, como por exemplo a medula óssea, a mucosa do tubo digestivo ou as células do bulbo capilar. Isso explica por que os agentes quimioterápicos podem levar à queda dos componentes do sangue e à queda dos cabelos, por exemplo (FERREIRA & ROCHA, 2010).

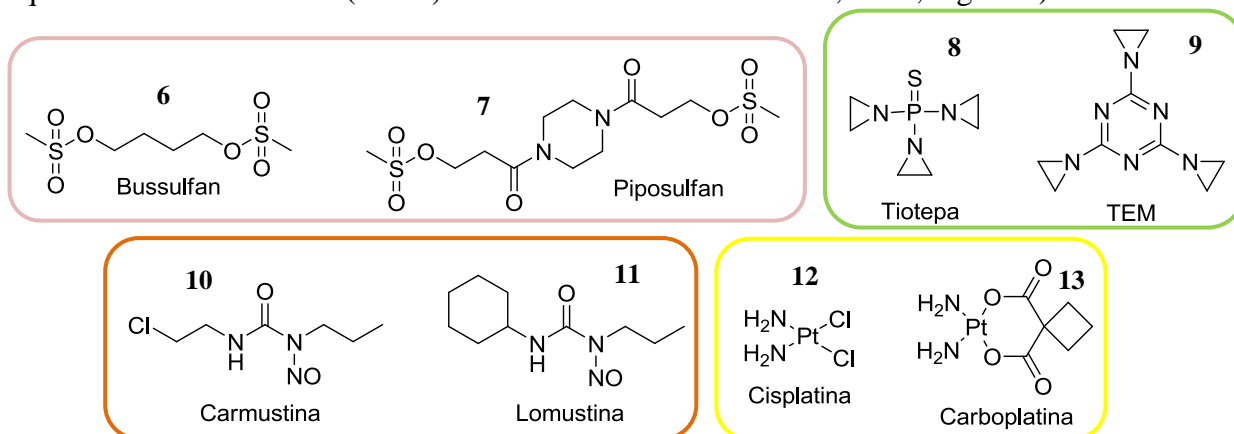
Duas classes terapêuticas de extrema importância para o tratamento do câncer são os agentes alquilantes e os inibidores de proteínas tirosinas quinases. O uso de agente alquilantes, como o nome já sugere, leva à alquilação das bases nitrogenadas do DNA, originando então a fragmentação das fitas do DNA por enzimas reparadoras, promovendo o pareamento incorreto de nucleotídeos e também impossibilitando a separação das fitas de DNA para replicação (AVENDANO e MENENDEZ, 2008). Esta foi uma das primeiras alternativas para o tratamento de alguns linfomas, tendo sua descoberta ocorrida ao acaso. Durante um treinamento militar um grupo de pessoas foi exposto acidentalmente ao gás mostarda (1) e através da contagem de leucócitos do sangue descobriu-se mais tarde que os mesmos diminuíram. Na década de 40, muitos pacientes com linfoma avançado foram tratados não mais com a inalação do gás, mas por administração intravenosa. Os resultados

obtidos com o tratamento foram bons, porém temporários devido à resistência desenvolvida pelas células tumorais. Com isso, o gás mostarda (1) serviu de inspiração para pesquisas e elaboração de outros agentes alquilantes, como as mostardas nitrogenadas (2-5; GILMAN, 1963; Figura 4).



**Figura 4.** Gás mostarda e mostardas nitrogenadas utilizadas no tratamento do câncer como agentes alquilantes das bases nitrogenadas do DNA.

Entre outros agentes alquilantes também são bastante utilizados os sulfatos alquílicos (6-7), etil aminas (8-9) e as nitrosuréias (10-11). Também são utilizados complexos de platina que tem efeito metalante (12-13; AVENDANO e MENENDES, 2008; Figura 5).

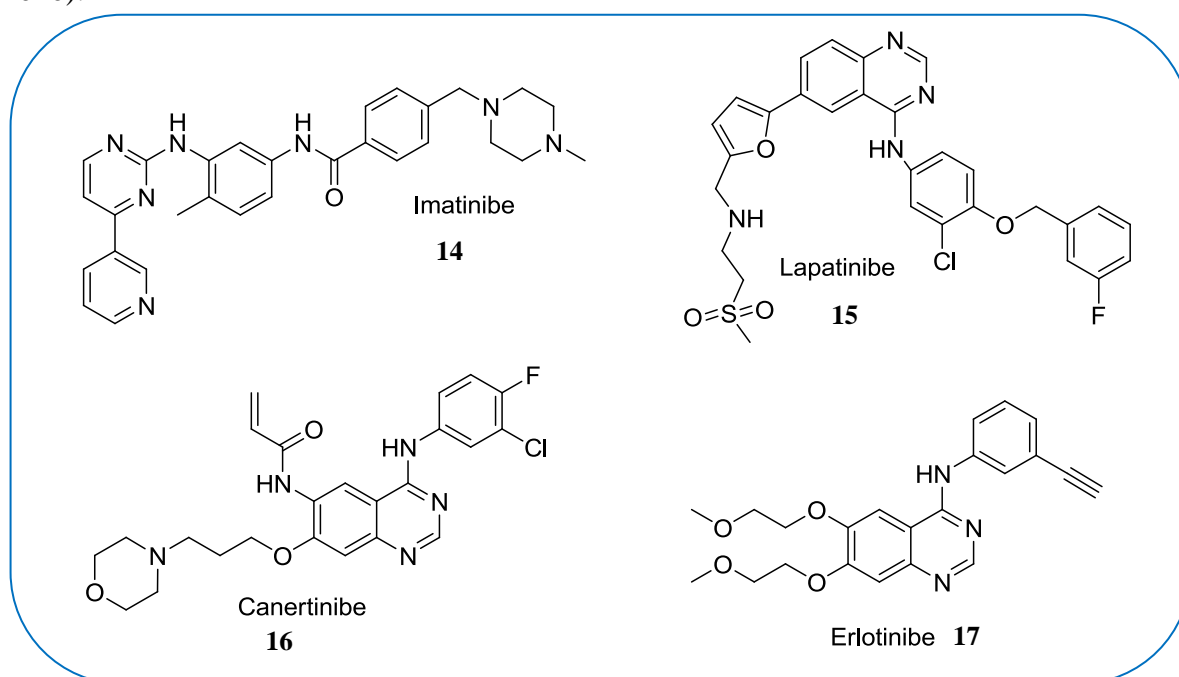


**Figura 5.** Agentes alquilantes mais comuns: sulfatos alquílicos, etilenaminas e nitrosuréias E os complexos de platina com efeito metalante.

As proteínas tirosinas quinases (PTKs, *Protein Tyrosine Kinases*) são responsáveis pela fosforilação e modulação da atividade enzimática. As PTKs estão relacionadas com

processos oncogênicos devido algumas PTKs-chave se encontrarem desreguladas em tumores, mantendo a fosforilação, que leva os sinais de transdução a um estado permanentemente ativado (AVILA e ROMEIRO, 2010). As PTKs são geralmente divididas em proteínas quinases receptores (RTKs, Receptor Tyrosine Kinases) e proteínas quinases não-receptores (NRTKs, Non-Receptor Tyrosine Kinases). Exemplos de RTKs são o receptor de insulina e receptores de fatores de crescimento (GFRs), como o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), receptor do fator de crescimento de fibroblastos (FGFR), receptor do fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGFR) e receptor do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGFR). Exemplos das PTKs não-receptores, que são componentes intracelulares, são as proteínas clientes Src, Jak, Abl, Fak, Fps, Csk, Syk e Btk (Tabela 1; BENNASROUNE *et al.*, 2004).

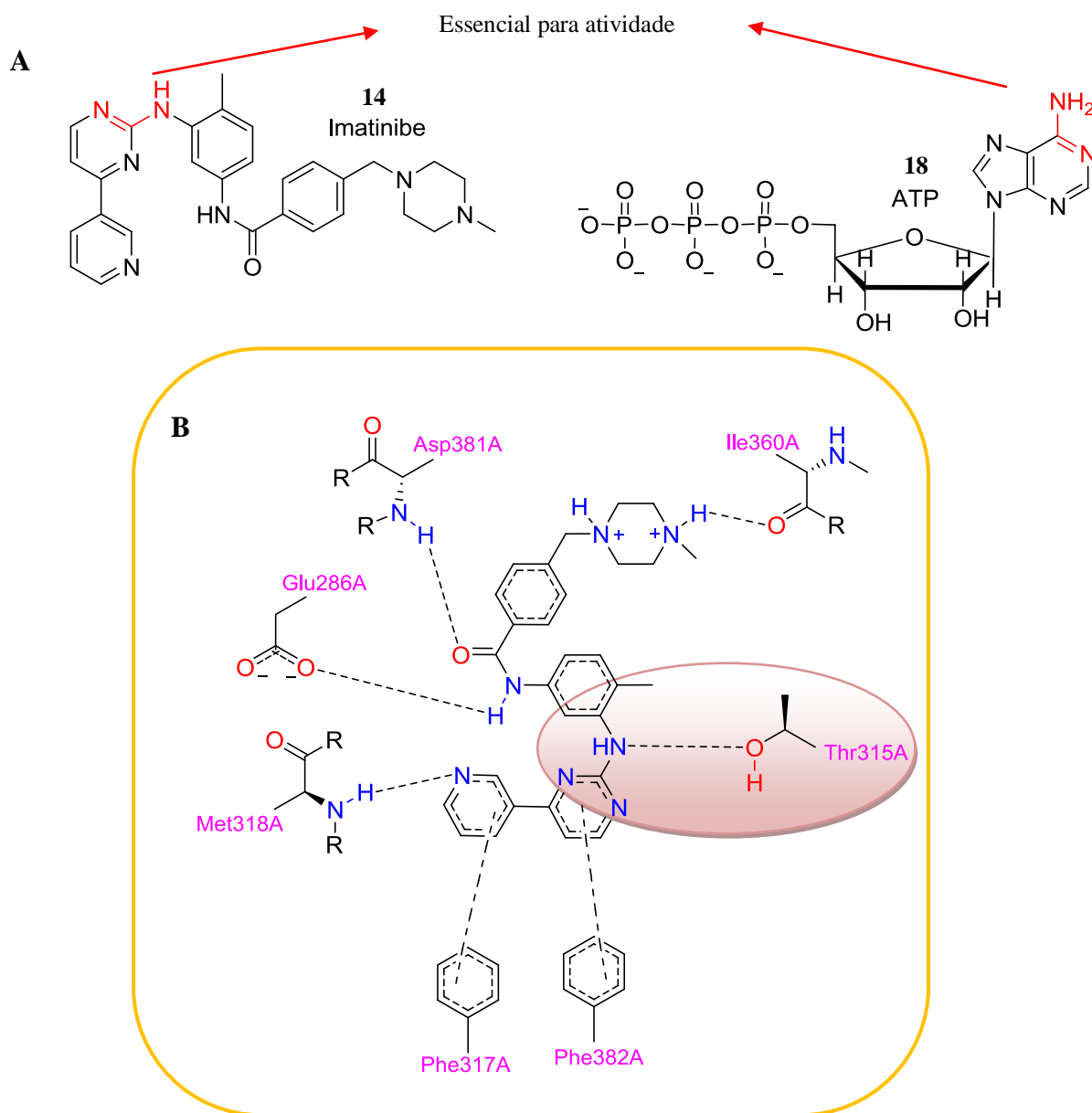
Na Figura 6 são apresentados alguns inibidores de tirosinas quinases (TKIs, *Tyrosine Kinase Inhibitors*) com atividade antitumoral. Dentre os principais, o imatinibe (**14**) teve grande destaque no tratamento da leucemia mieloide crônica (CML, *Chronic Myeloid Leukemia*), marcando o início da era dos “-tinibes”, TKIs. Porém, a resistência associada ao tratamento do câncer com este fármaco, que é um desafio na busca de novos TKIs, levou ao aparecimento de inibidores de segunda, terceira e quarta geração, em geral tendo como alvo mais de uma quinase, os chamados inibidores multi-quinases (**14-17**; AVILA e ROMEIRO, 2010).



**Figura 6.** Inibidores de PTKs selecionados: Imatinibe (**14**), Lapatinibe (**15**), Canertinibe (**16**) e Erlotinibe (**17**).



A interação do inibidor imatinibe (**14**) com o sítio do ATP das enzimas ocorre pois tanto o fármaco em questão quanto a própria molécula de ATP (**18**) possuem um grupamento essencial para esta interação, a sub-unidade amino-pirimidina (Figura 7A). A formação de ligação de hidrogênio desta com um resíduo de treonina (Thr 315) é essencial para a interação entre estes ligantes e a enzima alvo (AVENDANO e MENENDES, 2008; Figura 7B).



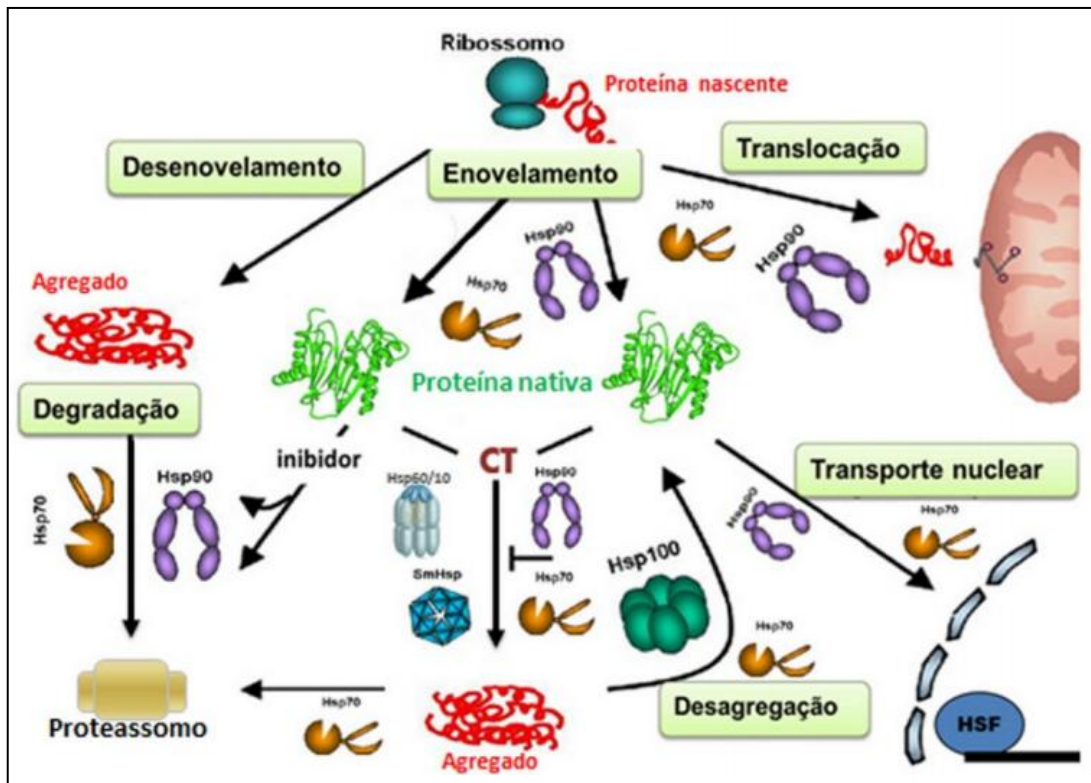
**Figura 7.** **A** – Grupamento essencial para atividade sobre a PTK alvo para o Imatinibe (**14**) e ATP (**18**). **B** – Principais interações entre Imatinibe e aminoácidos presentes no sítio de ligação com ATP, destacando a interação do tipo ligação de hidrogênio entre o ligante e resíduo de treonina na posição 315 (Adaptado de PDB 3K5V).

### **1.3. Proteínas como alvo terapêutico do câncer**

Os estudos sobre o proteoma revelaram que as “chaperonas moleculares” são uma antiga e conservada classe de proteínas que orientam o enovelamento normal, disposição intracelular e o controle proteolítico de muitos dos principais reguladores do crescimento celular, diferenciação e sobrevivência. Esta função de guardiãs essenciais é subvertida durante a oncogênese para permitir a transformação maligna e para facilitar uma evolução somática rápida. Farmacologicamente, 'subornar' o dever de uma proteína guardiã e essencial como as chaperonas parece oferecer uma estratégia única e promissora no tratamento do câncer (WHITESELL *et al.*, 2005).

### **1.4. HSP 90 e o Câncer**

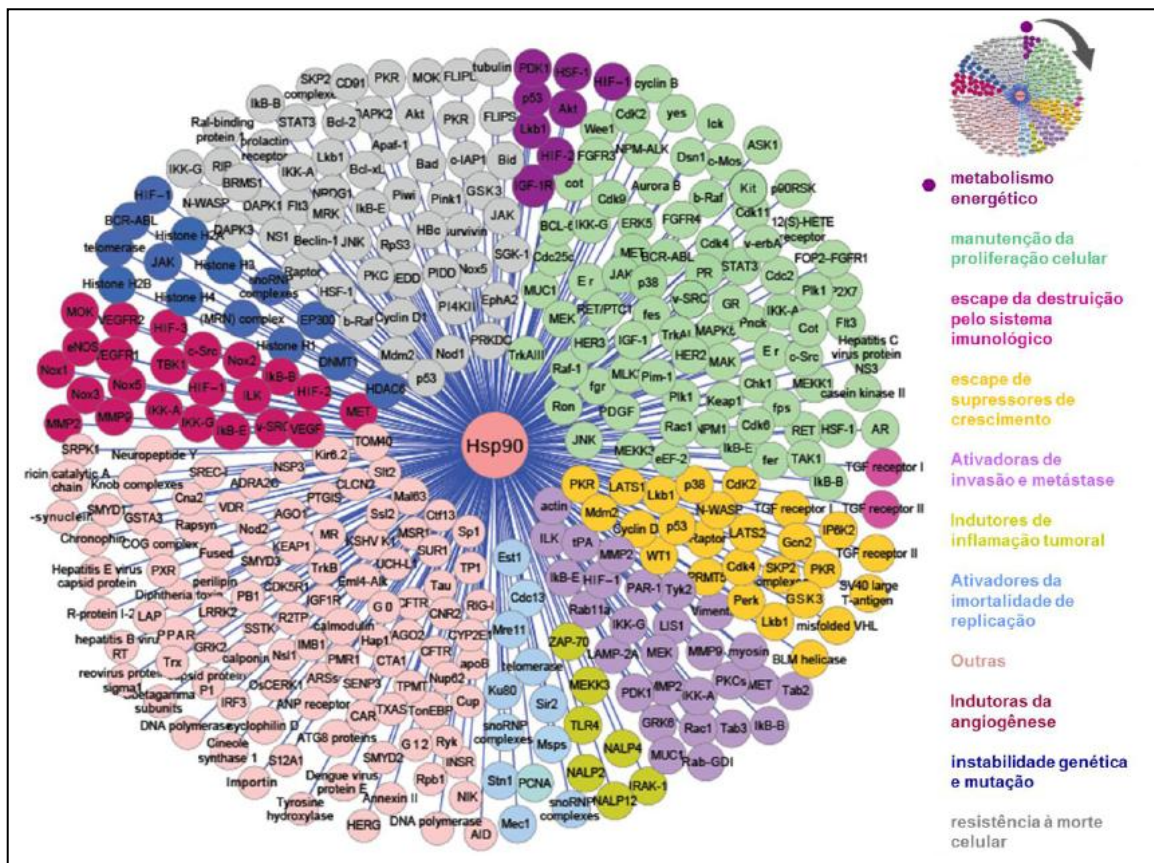
Devido à exposição a fatores interferentes, as células em muitos tecidos aumentam drasticamente a produção de um pequeno grupo de proteínas que são conhecidas como proteínas de choque térmico ou “proteínas de estresse térmico” (do inglês, *Heat Shock Proteins* - HSP). Há cerca de 40 anos, muitos grupos de pesquisa vêm estudando estas proteínas e outras similares a elas, mostrando que se trata de uma classe de proteínas expressas como “chaperonas moleculares” (BORGES & RAMOS, 2005; TIROLI-CEPEDA & RAMOS, 2011) e que, como sugere o termo do francês *Chaperon* (“dama de companhia”), assistem o enovelamento protéico e previnem interações indesejáveis (WHITESELL *et al.*, 2005). As chaperonas, de maneira geral, ligam e estabilizam polipeptídeos, facilitando seu correto enovelamento, sem causar modificações na estrutura primária das proteínas. As chaperonas também participam da translocação de proteínas através de membranas e organelas (HARTL & HAYER-HARTL, 2002), na entrega de substratos para proteólise e na recuperação de proteínas agregadas (SANCHEZ & LINDQUIST, 2000). As principais chaperonas moleculares são as Hsp's 60/10, 70, 90 e 100 (o número representa o tamanho da proteína em kDa). Por exemplo, a Hsp90 é uma chaperona de 90kDa (PDB, 2008). A figura 8 representa estas principais chaperonas e suas funções bioquímicas.



**Figura 8.** Envolvimento de cada Hsp em suas funções específicas. Adaptado de: Mosser e Morimoto, 2004; Borges e Ramos, 2005.

A Hsp90 possui um papel muito importante no desenvolvimento de processos tumorais das células porque a mesma está presente em todos os compartimentos celulares e é estável, além de corresponder a 1-2% de todas as proteínas que não são submetidas a estresse celular, podendo chegar a 6% das proteínas em nível de estresse. (SANGSTER & QUEITSCH, 2005; LEOPOLDINO *et al.*, 2012).

A Hsp90 atua na manutenção da conformação, regulação e no tráfego de uma variedade de proteínas, denominadas proteínas clientes (ou substratos). Mais de 200 proteínas clientes de Hsp90 já foram identificadas em mamíferos como dependentes direta ou indiretamente desta chaperona para o desempenho de suas funções celulares (Figura 9; ECHEVERRÍA *et al.*, 2011) incluindo fatores de transcrição, proteínas quinases, receptores hormonais, e outras classes envolvidas em transdução de sinais e em epigenética sendo, portanto, extremamente importante para o ciclo celular, apoptose, e respostas adaptativas a situações de estresse (CHIOSIS *et al.*, 2012).



**Figura 9.** A rede de interação de proteínas clientes da enzima Hsp90 citosólica humana. Adaptado de Da Silva e Ramos, 2012.

Segundo Hanahan e Weinberg (2000), uma instabilidade genética ou um estresse celular permite que a célula adquira seis características associadas à maioria dos tumores em que as proteínas clientes da Hsp90 estão relacionadas (Tabela 1): auto-suficiência em sinais de crescimento (BASSO *et al.*, 2002); invasão de outros tecidos e metástase (BELIAKOFF *et al.*, 2003); potencial replicativo ilimitado (EUSTACE *et al.*, 2004); angiogênese (ISAACS *et al.*, 2002); insensibilidade a sinais de supressão de crescimento (MUNSTER *et al.*, 2002) e resistência a apoptose (MALONEY & WORKMAN, 2002). Sendo assim a Hsp90 é responsável por ligar-se às suas proteínas clientes, estabilizando-as e fazendo com que suas funções sejam executadas corretamente, contribuindo então para o processo de carcinogênese e tornando-a um alvo terapêutico e de estudo contra o câncer (SPECENIER & VERMORKEN, 2012).

De fato, essas proteínas clientes citadas possuem participação em diversos tipos de tumores, sendo que o aumento da expressão de Hsp90 é mais proeminente em cânceres de mama, melanoma, de pulmão e gastrointestinais (HONG *et al.*, 2013).

**Tabela 1.** Características das células tumorais e proteínas clientes da Hsp90 envolvidas.

<b>Característica</b>	<b>Principais proteínas clientes</b>
Autossuficiência em sinais de crescimento	RTKs, serina/treosina quinases, receptores de hormônio esteroide, Akt, ErbB2, Raf-1, EGFR
Invasão de outros tecidos e metástase	MMP2, c-Met
Potencial replicativo ilimitado	hTERT
Angiogênese	Hif-1alfa, FAK, Akt
Insensibilidade a sinais de supressão de crescimento	PIK, Wee1, Myt1
Resistência à apoptose	Akt, RIP

### **1.5. HSP 90 – Estrutura e função**

As Hsp90 são proteínas de massa molecular entre 82-96 kDa que formam homodímeros principalmente através das associações de seus 191 aminoácidos na região C-terminal (NEMOTO *et al.*, 1995). Esta proteína possui três subunidades, sendo elas: domínios N-terminal, Central (M) e C-terminal.

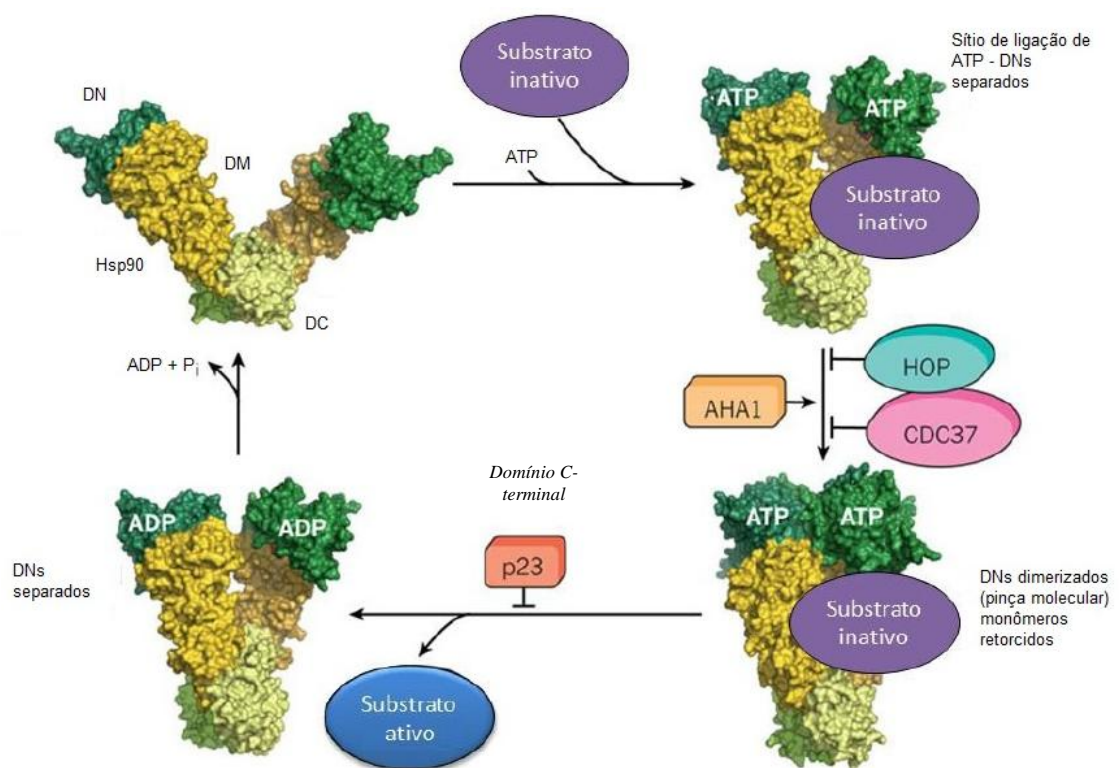
O domínio N-terminal (DN), que possui aproximadamente 25 kDa, é o que possui um sítio de ligação ao ATP, sendo o responsável pela atividade ATPásica (hidrólise de ATP), que gera a energia necessária para o enovelamento das proteínas clientes. Uma sequência de aminoácidos carregados de tamanho variável separa o domínio N-terminal do domínio Central (M), o que pode conferir certa flexibilidade entre esses domínios (WHITESILL *et al.*, 1994; YOUNG *et al.*, 2001).

O domínio Central ou domínio M (DM) possui aproximadamente 35 kDa e possui a função de direcionar a hidrólise do ATP no domínio N-terminal através de uma interação de



um resíduo de arginina com um fosfato do ATP já ligado a subunidade N. Este também pode interagir com proteínas clientes e co-chaperonas (MEYER *et al.*, 2003).

O domínio C-terminal (DC) é o menor dos três domínios da Hsp90 com aproximadamente 12 kDa, cuja função é a dimerização da Hsp90, além de possuir sítios de ligação para co-chaperonas. Recentemente foi demonstrado que o domínio C-terminal é capaz de assumir uma dinâmica alternando entre estados abertos e fechados, sendo que durante a hidrólise de ATP, o equilíbrio está deslocado para o estado aberto, mostrando uma completa harmonia e cooperatividade entre os três domínios da Hsp90 (RATZKE *et al.*, 2010). A figura 10 mostra todas as subunidades responsáveis pela função da Hsp90.



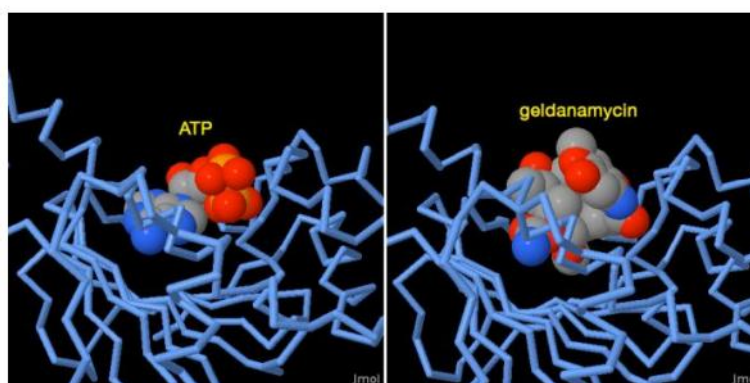
**Figura 10.** Estrutura e função da Hsp90. Representação dos três domínios, N-terminal (DN), Central (DM) e C-terminal (DC); e ativação de proteína cliente dependente da hidrólise de ATP. (Modificada de HARTL *et al.*, 2011)

## 1.6. Inibidores de HSP 90

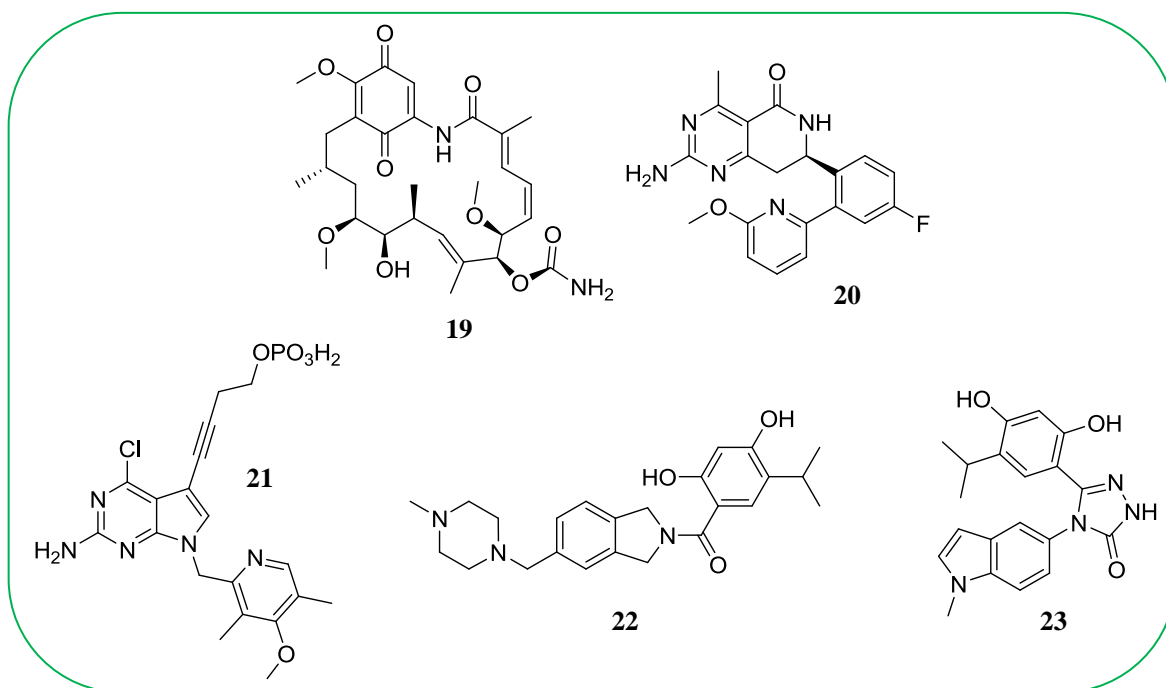
Os inibidores da Hsp90 podem ser divididos em duas classes principais: inibidores do domínio *N*-terminal e inibidores do domínio *C*-terminal.

O domínio *N*-terminal da Hsp90 é tido como alvo de inibição, pois este é o sítio de hidrólise do ATP que gera energia para o enovelamento das proteínas clientes. Diversos inibidores foram planejados como miméticos de ATP, visando a formação de um complexo de inibição mais estável com a enzima (BUCHNER, 1999).

Entretanto, foram os produtos naturais que forneceram os inibidores da unidade *N*-terminal mais conhecidos, sendo o antibiótico geldanamicina (**19**) da classe das ansamicinas, o mais descrito. Quando ligado ao domínio *N*-terminal (Figura 11) este leva à degradação das proteínas clientes através do proteassomo, uma vez que estas não sofrem mais o enovelamento correto devido à inibição da Hsp90 (CHIOSIS *et al.*, 2004; CALDERWOOD *et al.*, 2006). O alvo *N*-terminal tem sido extensamente estudado, sendo que em 2010 aproximadamente 17 protótipos de inibidores se apresentavam em diversos estágios de triagem clínica (JANIN, 2010) e atualmente várias classes químicas foram descritas como inibidores desta subunidade (BHAT *et al.*, 2014; Figura 12). Entretanto, é necessário ter em mente que inibidores do domínio *N*-terminal têm sido associados com toxicidade, limitando seu uso no combate de tumores (DUERFELDT & BLAGG, 2010).



**Figura 11.** Representação da interação do DN-terminal com ATP e com o inibidor Geldanamicina, respectivamente.

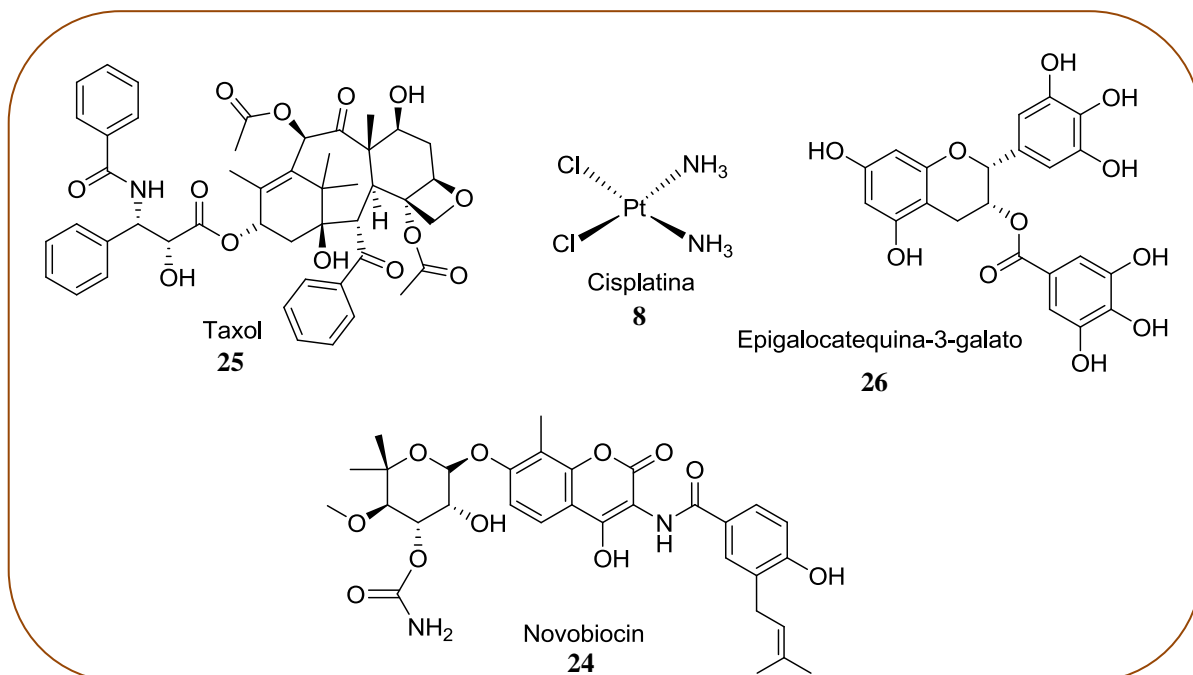


**Figura 12.** Exemplos de inibidores do domínio *N*-terminal: Geldanamicina (**19**); NVP-HSP990 (**20**); BIIB028 (**20**; Fase 1); AT13387 (**21**; Fase 2); Ganetespib (**23**; Fase 3).

Diferentemente dos inibidores do domínio *N*-terminal, os inibidores do domínio *C*-terminal tem sido considerados promissores no tratamento de células tumorais por apresentarem reduzidos efeitos colaterais, uma vez que este domínio não é conservado frente a outras enzimas (CONDE *et al.*, 2009) e sua inibição não leva à indução de resposta pró-sobrevivência (BAGATELL *et al.*, 2000). Sendo assim, do ponto de vista farmacológico é mais interessante a busca de inibidores desta subunidade da enzima (BAGATELL *et al.*, 2000). O primeiro ligante do domínio *C*-terminal identificado foi o Novobiocin, **24** ( $CI_{50} = 700 \mu\text{M}$  frente a Hsp90), um antibiótico natural da classe das cumarinas, que inibe a topoisomerase do tipo II (Marcu *et al.*, 2000) e diminui os níveis de algumas proteínas cliente relacionadas a alguns tipos de câncer (MARCUS *et al.*, 2000), mostrando também a capacidade de afetar a apoptose e a inibição da proliferação celular (SOTI *et al.*, 2002).

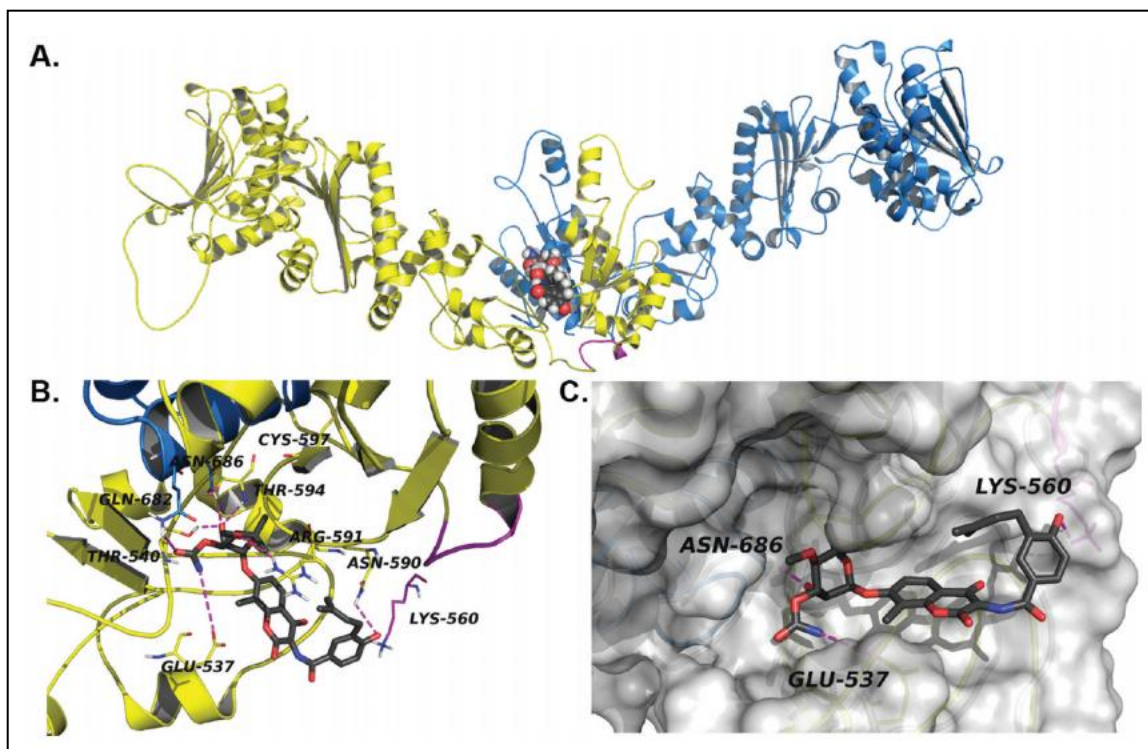
Desde a descoberta do novobiocin (**24**), apenas alguns outros inibidores *C*-terminais foram descritos, incluindo o taxol (**25**), cisplatina (**8**), epigalocatequina-3-galato (**26**; Figura 13) e análogos sintéticos estruturalmente relacionados ao novobiocin (serão abordados mais a frente).





**Figura 13.** Exemplos de inibidores do domínio C-terminal: Taxol (**25**), Cisplatina (**8**), Epigallocatequina (**26**) e em destaque o Novobiocin (**24**).

Embora o modo de ligação dos inibidores do domínio N-terminal da Hsp90 tenha sido bem definido (ROE *et al.*, 1999), os elementos estruturais necessários para a interação com o domínio C-terminal ainda não estão totalmente caracterizados, principalmente devido à falta de uma estrutura cristalográfica deste domínio. Um trabalho recente com o novobiocin utilizando modelo de *docking* através de homologia molecular forneceu informações adicionais sobre as variações estruturais do sítio de ligação deste a Hsp90. No entanto, a grande liberdade conformacional desta chaperona flexível ainda é uma grande limitação para o desenho racional de inibidores seletivos (MORONI *et al.*, 2014; Figura 14).



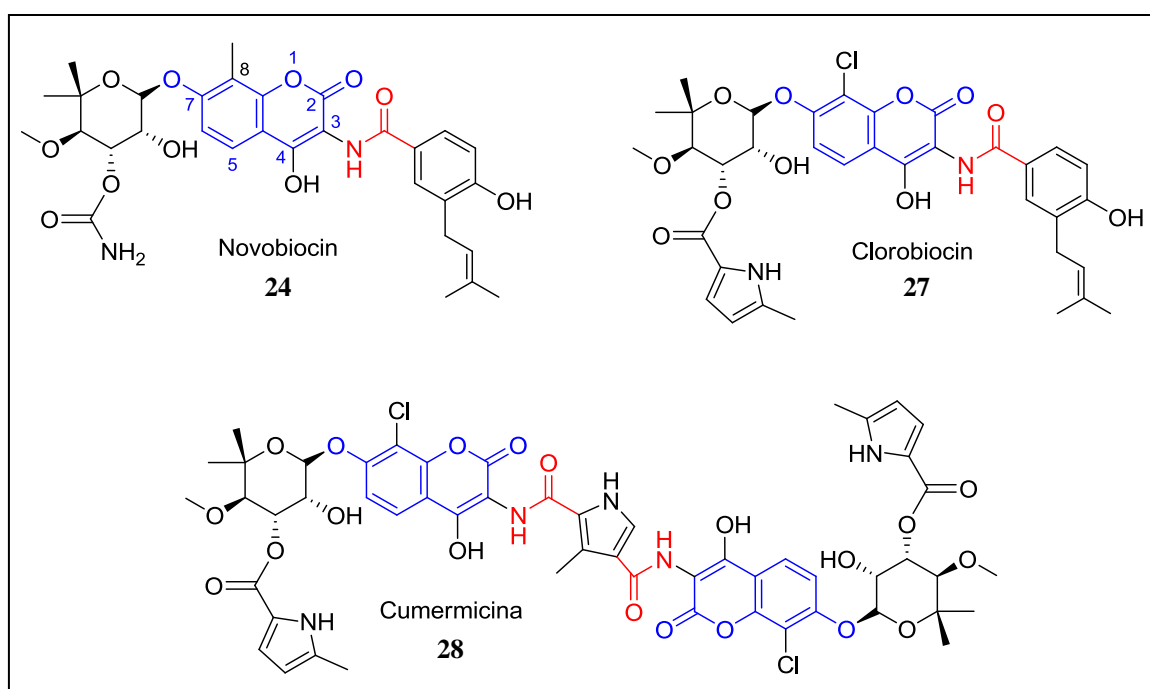
**Figura 14.** Modelagem molecular feita para o complexo novobiocin-Hsp90, através de um modelo homólogo de hHsp90 $\alpha$ . **A** – Homodímero da Hsp90 e ligação do novobiocin na interface dos dois monômeros. **B** – Interações do novobiocin com os resíduos de aminoácido. **C** – Superfície de acesso ao solvente e encaixe do ligante novobiocin.

### 1.7. Novobiocin e cumarinas inibidoras da HSP 90

O Novobiocin é uma cumarina membro da mesma família de antibióticos a qual pertencem a cumermicina e o clorbicocin (Figura 15) e que manifesta uma forte atividade antimicrobiana através da inibição da DNA girase B, mediada pela hidrólise de ATP (LEWIS *et al.*, 1996). Estes antibióticos são isolados a partir de várias espécies de *Streptomyces* e todos possuem uma estrutura comum, a 3-amido-4-hidroxicumarina (BERGER & BATCHO, 1978; LANOOT *et al.*, 2002). Devido ao fato do novobiocin atuar sobre o domínio de ligação do ATP da DNA girase B da mesma forma que a geldanamicina e o radicicol, dois antibióticos inibidores da Hsp90, Marcu e colaboradores (2000) levantaram a hipótese de que o novobiocin poderia também atuar sobre esta chaperona. De fato, a avaliação antitumoral frente a células de câncer de mama SkBr3, que possuem alta expressão da Hsp90, demonstraram que esta cumarina era capaz de exercer atividade citotóxica. Através de análises posteriores de Western blot, Marcu e colaboradores confirmaram que o novobiocin

induz a degradação de enzimas dependentes da Hsp90 de uma forma dependente da concentração.

Em contraste com outros inibidores da Hsp90, foi demonstrado que o novobiocin se liga ao domínio C-terminal, revelando um local de ligação não reconhecido anteriormente, e, talvez, uma nova oportunidade de se estudar o maquinário da Hsp90 (MARCUS *et al.*, 2000). Porém, devido sua baixa potência contra células cancerígenas ( $CI_{50} \approx 700 \mu M$ ; frente células de câncer de mama SkBr3), é considerado um composto protótipo, mas não adequado para fins terapêuticos (JOSEPH *et al.*, 2006).

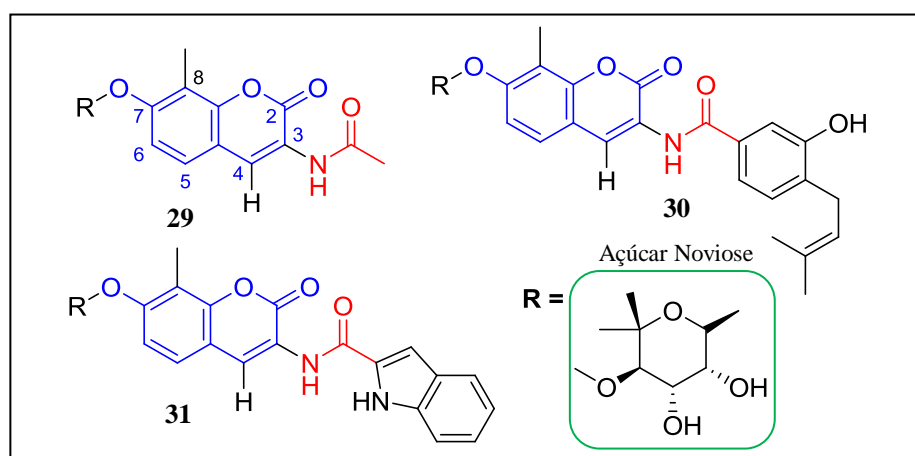


**Figura 15.** Estruturas dos antibióticos, que atuam sobre proteínas clientes da Hsp90: Novobiocin (**24**); Clorobiocin (**27**) e Cumermicina (**28**).

A partir desta descoberta iniciou-se, então, uma busca por análogos cumarínicos do novobiocin mais potentes e seletivos.

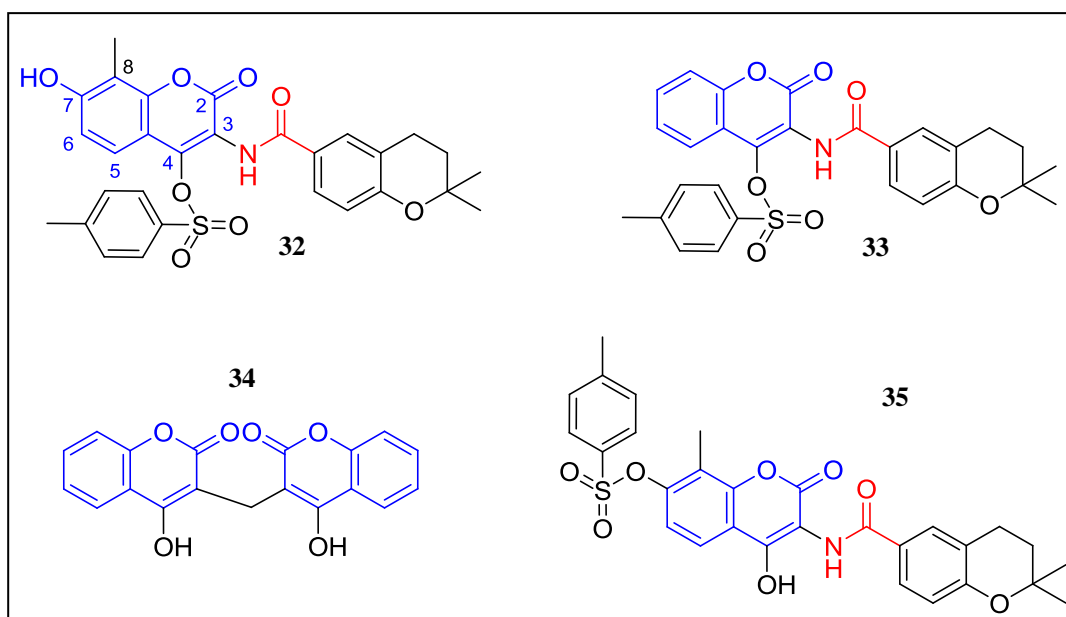
Em 2005, a primeira tentativa de melhorar a atividade inibitória do novobiocin contra a Hsp90 foi relatada por Blagg e colaboradores. Estes autores exploraram o papel da subunidade noviose ligada na posição 7 do anel cumarínico para a atividade biológica (Figura 16). O Composto **29**, presente na figura 16, não possui uma hidroxila na posição 4 da cumarina mas contem uma cadeia lateral N-acetil no lugar de uma benzamida, se mostrando então mais ativo que o novobiocin, sendo identificado como um inibidor de Hsp90 que

induziu a degradação de proteínas clientes com uma concentração 70 vezes menor do que a do novobiocin (BLAGG *et al.*, 2007; ANSAR *et al.*, 2007). Em continuação, os estudos de Blagg relataram que o composto **30** (Figura 16) provou ser um inibidor mais eficaz e seletivo para Hsp90, levando a degradação das proteínas clientes ErbB2 e p53 (BURLISON *et al.*, 2006). Já o análogo **31**, também mais potente em relação ao novobiocin, pode degradar as proteínas Her2, Raf e Akt, com aumento de 2000 vezes na atividade biológica ( $CI_{50} = 0,37 \mu M$ ) em SKBr3, uma linhagem de células tumorais (BURLISON *et al.*, 2008; HUANG & BLAGG, 2007; HASTINGS *et al.*, 2008).



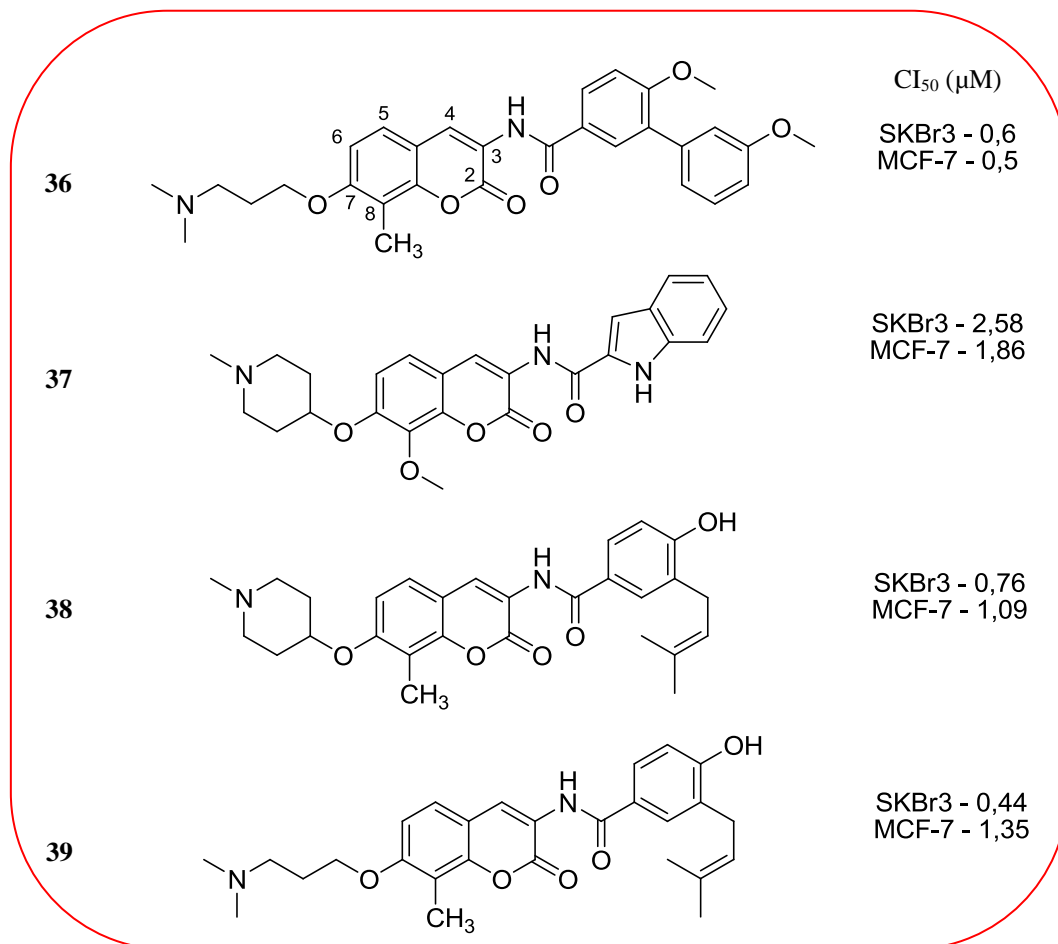
**Figura 16.** Estruturas dos análogos descritos por Blagg e colaboradores como inibidores da Hsp90 **29-31**.

Apesar dos relatos iniciais de modificações estruturais mantendo a noviose terem levado a compostos bastante ativos como antitumorais, indicado a importância desta subunidade glicosídica, compostos relatados em trabalhos posteriores, sem essa subunidade na posição 7 da cumarina (**32-35**; Figura 17), também se mostraram mais ativos que o novobiocin com  $CI_{50}$  próximos à  $50 \mu M$  para a mesma linhagem de células tumorais, a SKBr3 (LE BRAS *et al.*, 2006 e 2007; RADANYI *et al.*, 2008; HERNANDEZ *et al.*, 2008).



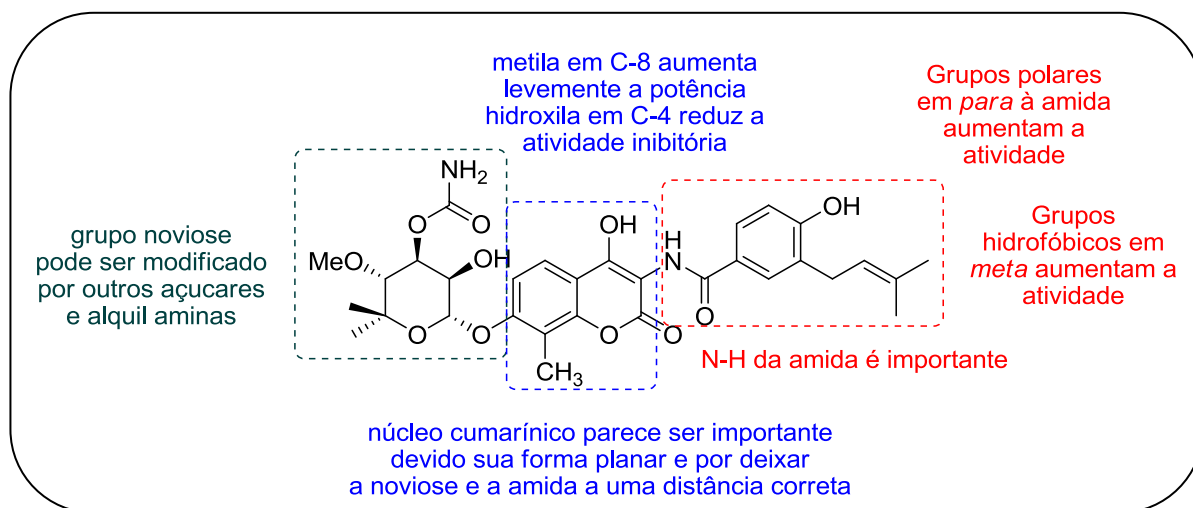
**Figura 17.** Análogos do novobiocin com atividade sobre a linhagem de células tumorais SKBr3 (**32-34**), e **35** com atividade pronunciada sobre a linhagem celular tumoral MCF-7.

Posteriormente, Zhao e colaboradores sintetizaram compostos (**36-39**) com uma substituição do açúcar na posição 7 por alquil amins e observaram que a atividade biológica frente as linhagens celulares SKBr3 e MCF-7 foram muito melhores do que os análogos com a noviose (Figura 18). As  $CI_{50}$  variaram na faixa de 3-100  $\mu\text{M}$  para derivados com a subunidade glicosídica conservada enquanto que os derivados com alquil amins apresentaram  $CI_{50}$  que variaram na faixa de 0,44-1,86  $\mu\text{M}$ , demonstrando então que o açúcar não seria essencial para a atividade (ZHAO *et al.*, 2011).



**Figura 18.** Compostos (36-39) mais potentes frente à Hsp90 da série de alquil aminas como substituintes na posição 7 da sub-unidade cumarínica.

Com todas essas informações em mãos, é possível então traçar uma correlação entre relação estrutura atividade com os compostos já descritos. Nesses estudos foi observado que na subunidade cumarínica (Figura 19) a presença de uma amida secundária na posição 3 é importante para a atividade biológica. Substituintes hidroxila na posição 4 do anel cumarínico levam a perda de potencia, enquanto substituintes oxigenados na posição 6 e 8 aumentam levemente a potencia de inibição da Hsp90. A noviose pode ser substituída por alquilaminas para aumento de potencia. Curiosamente, o núcleo cumarínico parece ser importante por ser um grupo planar e por deixar seus substituintes na posição 3 e 7 em distancias favoráveis à interação com o DC da Hsp90 (ZHAO *et al.*, 2011).

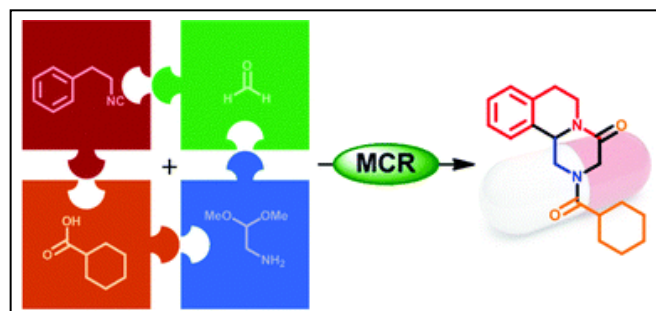


**Figura 19.** Descrição de relação estrutura atividade realizada para inibidores da Hsp90 contendo o núcleo cumarínico.

Em termos sintéticos os trabalhos de Zhao mostram uma quantidade razoável de reações químicas para a síntese de análogos do novobiocin contendo o núcleo cumarínico. Entretanto, não há uma descrição do uso de reações multicomponentes para a obtenção de análogos do novobiocin. Em específico, a reação tricomponente de Biginelli poderia ser de grande valia, uma vez que permitiria unir à subunidade cumarínica, uma amida secundária e uma cadeia lateral aromática, requisitos dos inibidores da Hsp90. Esse planejamento sintético será melhor detalhado nos objetivos desta dissertação de mestrado.

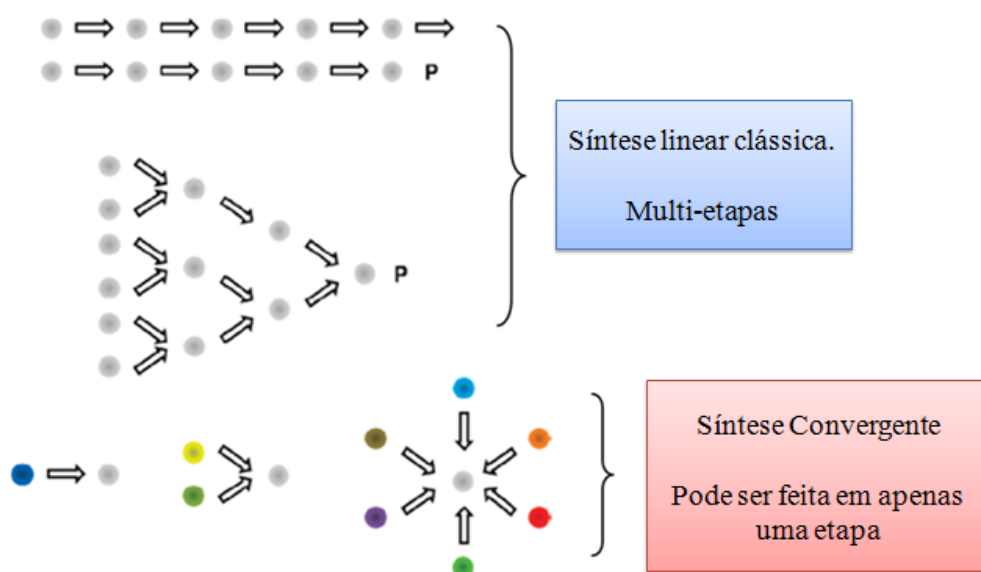
## 1.8. Reações Multicomponentes

Reações multicomponentes (RMCs) são, por definição, reações convergentes onde três ou mais reagentes de partida se organizam quimicamente para formar apenas um único produto que contem basicamente a maioria dos átomos das espécies reagentes (BATALHA, 2012). Essas reações podem ser comparadas a um quebra-cabeça, onde todos os reagentes ou peças se unem para formar um só produto ou uma só peça (Figura 20).



**Figura 20.** Exemplo de uma reação multicomponente, fazendo-se analogia com um quebra-cabeça (SLOBBE *et al.*, 2012).

Estas reações apresentam as seguintes vantagens sobre as reações tradicionais ou lineares: alto poder de convergência (Figura 21), ambientalmente amigável (química verde), menor número de etapas, materiais de partida disponíveis facilmente, possibilidade de automação, possibilidade de formação de bibliotecas de compostos com características estruturais de todos os reagentes e ótima eficiência na formação de ligações químicas (ROCHA *et al.*, 2008).



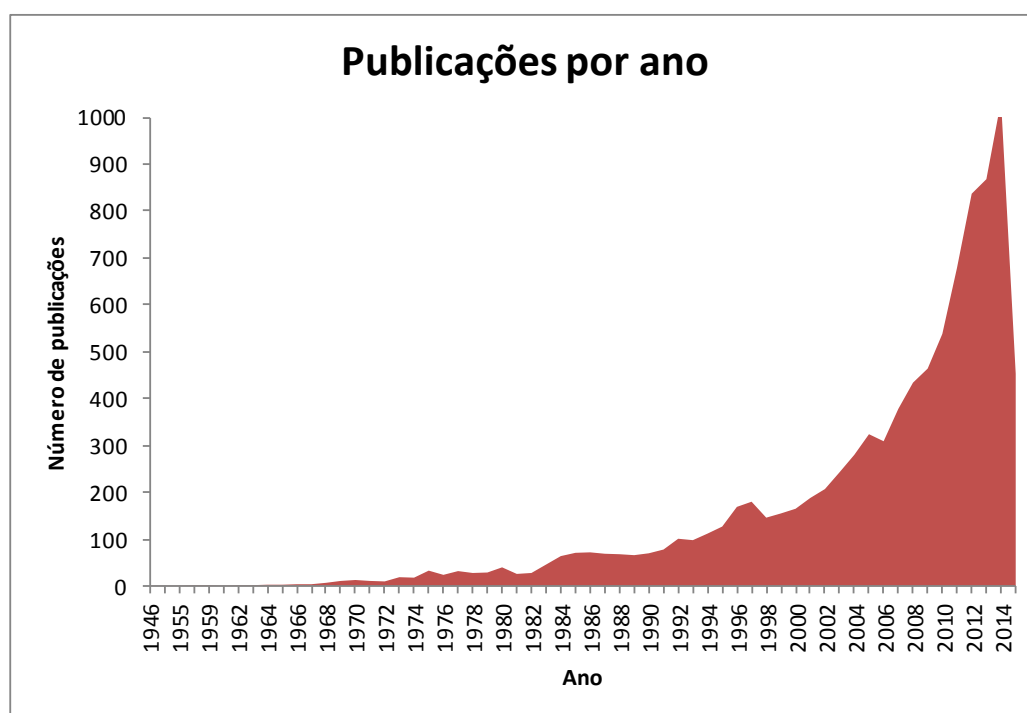
**Figura 21.** Comparação entre a síntese linear clássica e a convergente (DÖMLING *et al.*, 2012).

As reações multicomponentes têm sua marca na química medicinal, pois são uma ferramenta extremamente útil e moderna na pesquisa e obtenção de novos candidatos a fármacos. Devido a sua aplicabilidade sintética são capazes de produzir compostos



extremamente complexos estruturalmente, como alguns produtos naturais (TOURÉ & HALL, 2009), e altamente sofisticados (BATALHA *et al.*, 2012). Estes tipos de reações podem gerar moléculas contendo uma variedade de grupos funcionais, além de permitir a criação de novas estruturas através de uma variação sistemática de reagentes, possibilitando produzir bibliotecas de moléculas diversificadas e estruturalmente distintas, as quais podem apresentar atividade biológica ou serem modificadas para tal fim (DÖMLING *et al.*, 2012).

Antes de se descobrir o amplo espectro de ação biológica dos compostos obtidos e suas vantagens sintéticas já mencionadas, as RMCs não eram muito exploradas. Porém, nos últimos anos, as mesmas se desenvolveram principalmente pela busca por moléculas bioativas, tanto na indústria farmacêutica quanto agroquímica (BIENAYME *et al.*, 2000; GANEM, 2009). A importância e valorização crescente deste tipo de reação é claramente notada consultando-se a base de dados SCOPUS utilizando-se a como palavra chave “multicomponent reaction” no título e abstract<sup>1</sup> (Figura 22).



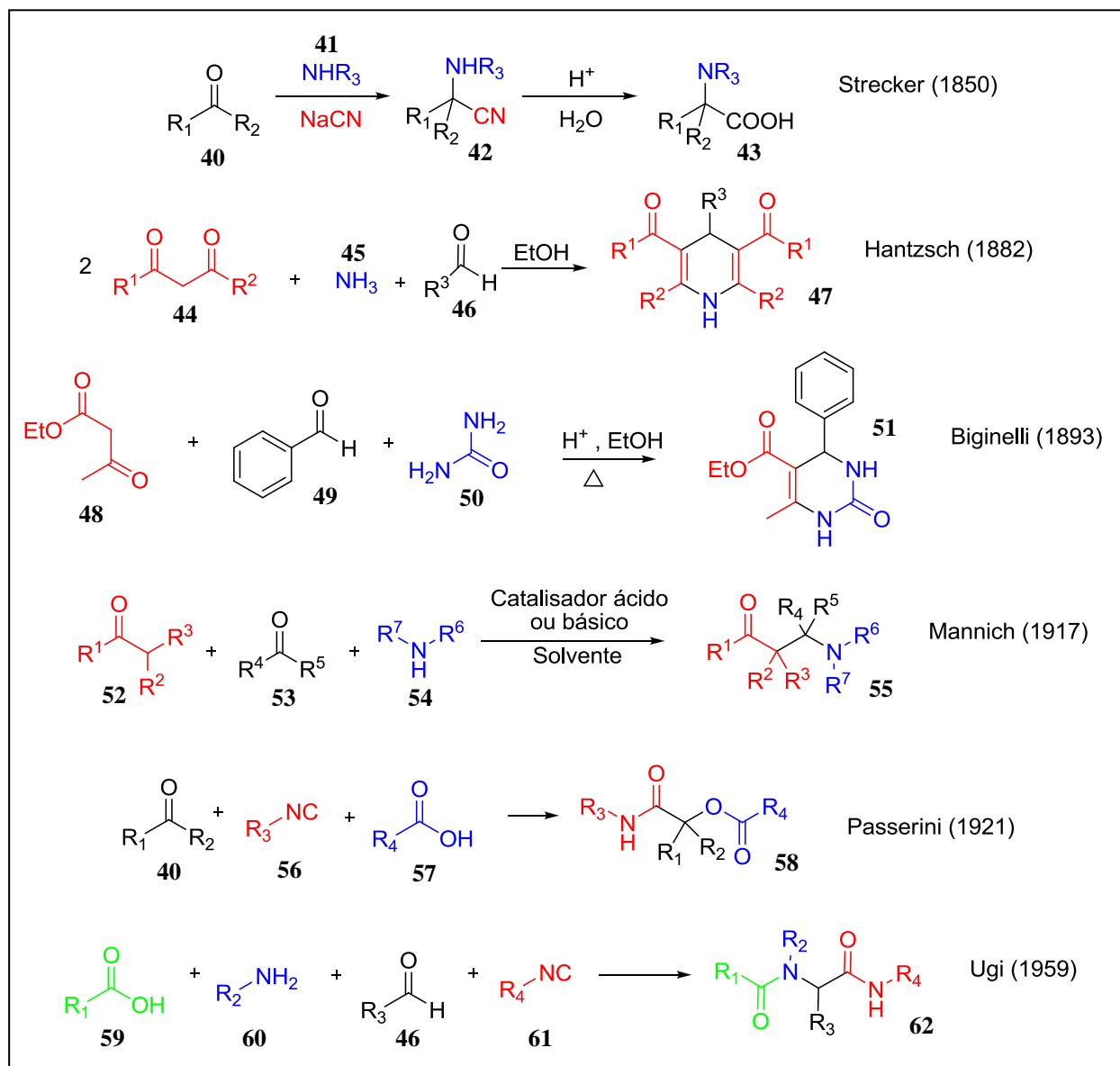
**Figura 22.** Crescimento das publicações utilizando reações multicomponentes (1946-2014).<sup>1</sup>

### 1.9. Breve histórico das RMCs

Vários procedimentos sintéticos foram propostos e têm sido aplicados com grande eficiência em termos de RMC, principalmente as de compostos heterocíclicos. No Esquema 1

<sup>1</sup>Pesquisa realizada em 08/01/2015 em [www.scopus.com](http://www.scopus.com)

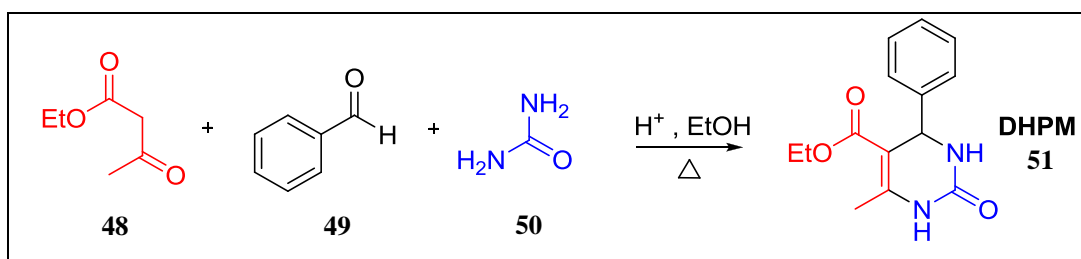
estão representados exemplos destas RMCs em ordem cronológica. Esta evolução pôde ser vista na literatura científica a partir de 1850 com a publicação da reação de Strecker (STRECKER, 1850). A partir de 1882 outras importantes reações foram reportadas como a síntese de diidropiridinas de Hantzsch (HANTZSCH, 1882), as diidropirimidinonas de Biginelli (BIGINELLI, 1893), a reação de Mannich (MANNICH, 1917), a reação de Passerini (PASSERINI, 1921) e a reação tetracomponente de Ugi (UGI, 1959).



Esquema 1. Exemplos de RMCs em ordem cronológica de descobertas.

### 1.10. Reação Tricomponente de Biginelli

No ano de 1983, o químico italiano Pietro Biginelli foi o responsável pelo descobrimento de uma reação tricomponente entre benzaldeído (**49**), ureia (**50**) e acetoacetato de etila (**48**; BIGINELLI, 1893). A reação se procedeu sob refluxo em etanol e catálise ácida com HCl, gerando como produto uma 3,4-diidropirimidin-2(1*H*)-ona (DHPM, **43**, Esquema 2 24). Tal procedimento sintético é conhecido atualmente como reação de Biginelli, condensação de Biginelli ou síntese de diidropirimidinonas de Biginelli (KAPPE, 2000).

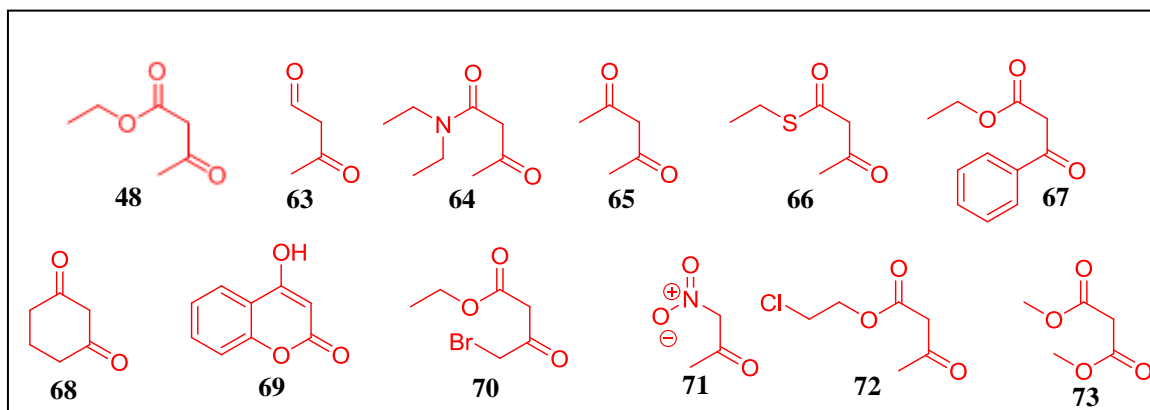


Esquema 2. Primeiro relato da reação de Biginelli.

A reação de Biginelli não se limita apenas aos reagentes relatados na primeira reação descrita, podendo-se obter uma infinidade de DHPMs diferentes de acordo com a vasta quantidade de substratos que podem ser empregados nesta reação.

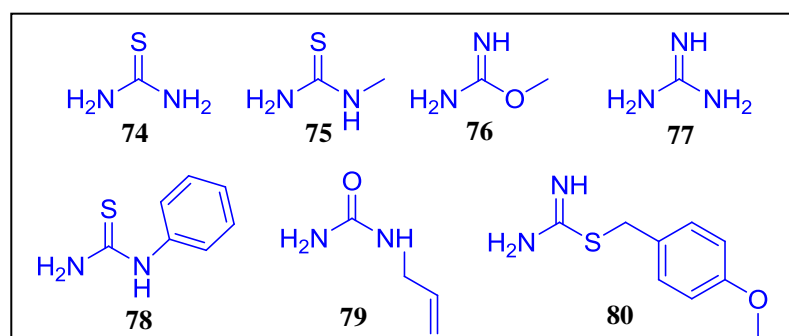
Os três componentes podem ser variados na reação, porém o aldeído é que apresenta maior variedade. De acordo com Kappe, a condensação de Biginelli funciona melhor com aldeídos aromáticos, com substituintes em todas as posições do anel. Aldeídos com grupos retiradores e doadores de elétrons nas posições *meta* e *para* normalmente fornecem produtos com melhores rendimentos. Para aldeídos contendo substituintes volumosos na posição *orto*, os rendimentos podem diminuir. Aldeídos heterocíclicos, como furano, tiofeno, tiazolil e anéis piridínicos também podem ser empregados, enquanto que o emprego de aldeídos alifáticos fornece produtos em rendimentos de baixo a moderados (KAPPE, 2003).

O componente dicarbonílico pode ser variado e não se limita somente ao uso de acetoacetatos de alquila (Figura 23). Beta-cetotioésteres, acetatos substituídos, beta-dicetonas cíclicas e acíclicas são viáveis para a reação de Biginelli. Acetoamidas podem até substituir o uso dos cetoésteres para produzir piridino-5-carboxamidas, porém com rendimentos inferiores (KAPPE, 2003).



**Figura 23.** Exemplos de alguns compostos 1,3-dicarbonílicos e análogos utilizados na reação de Biginelli.

A ureia é o componente da RMC de Biginelli que tem a maior restrição em termos de variação estrutural. A ureia pode ser trocada por ureias substituídas, tioureias, tioureias substituídas e até mesmo guanidinas, tendo como desvantagem um acréscimo no tempo reacional (Figura 24; KAPPE, 2003).

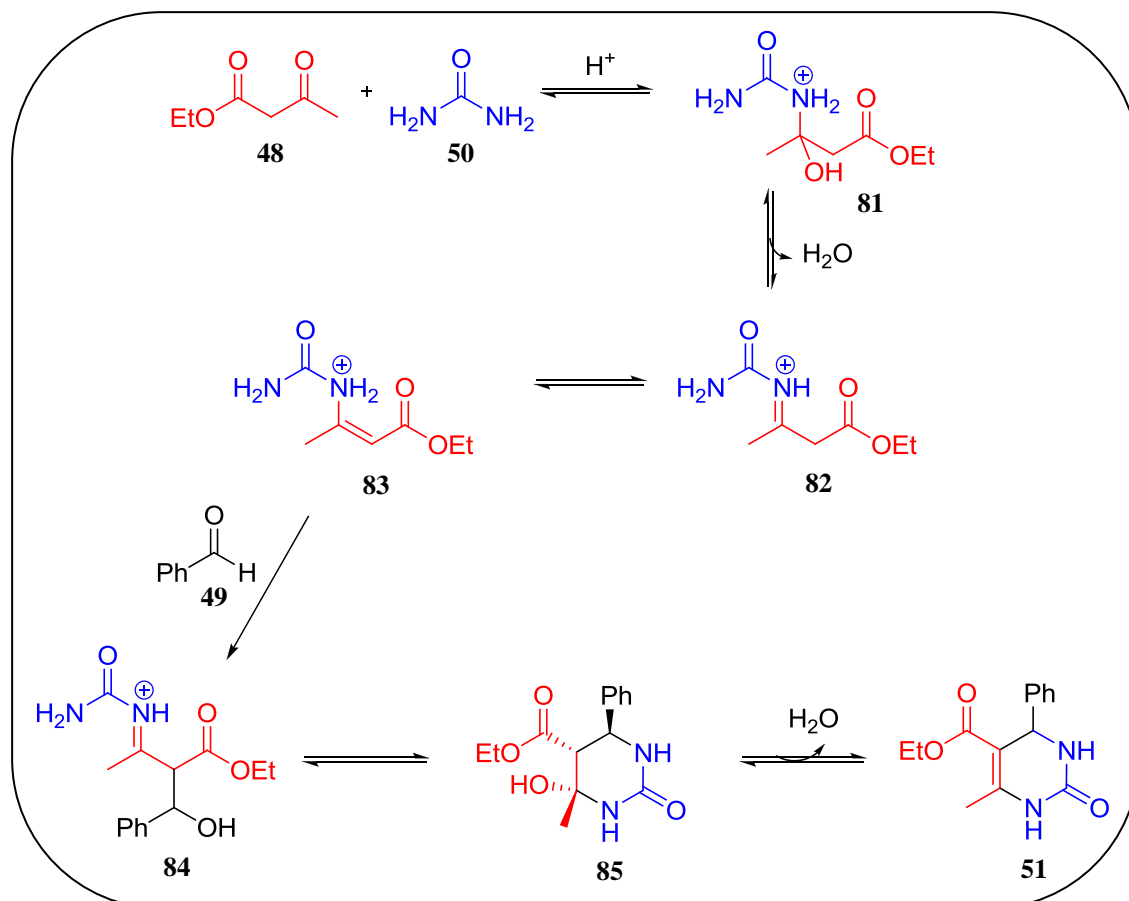


**Figura 24.** Uréias/tiouréias e guanidina utilizadas em reações de Biginelli.

### 1.11. Mecanismo de reação

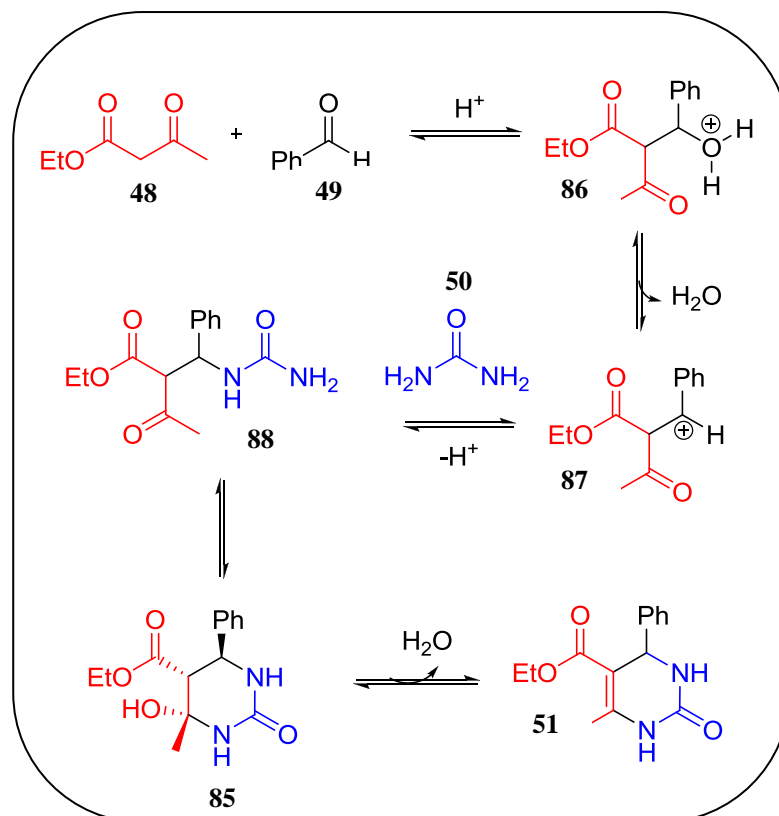
A reação de Biginelli foi alvo de intensa investigação por parte de pesquisadores na tentativa de explicar a interação tri-componente e várias propostas de mecanismo são discutidas até hoje.

A primeira proposta mecanística da reação de Biginelli, foi a via enamina, estudada na década de 1930 por Folkers e Johnson (Folkers & Johnson, 1933) os quais basearam suas conclusões em rendimento de reação e observações visuais (Esquema 3).



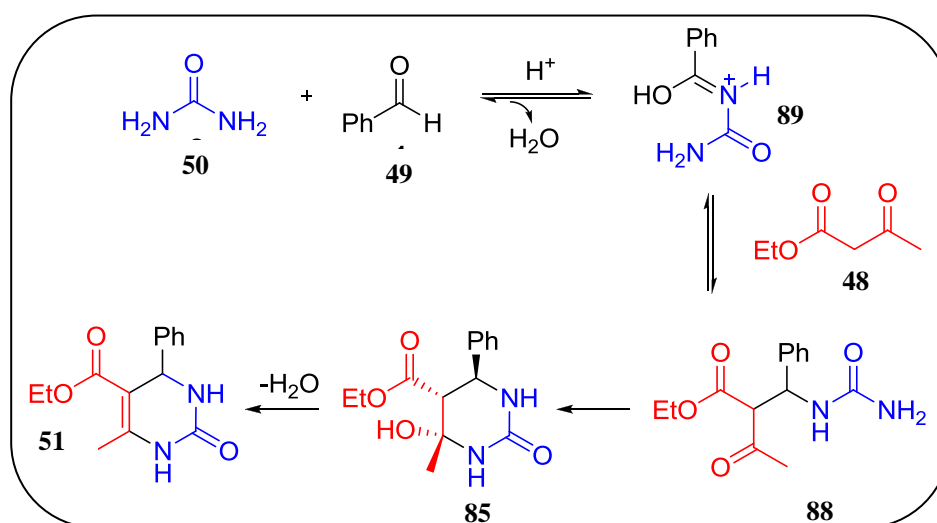
**Esquema 3.** Mecanismo enamina para síntese de DHPMs proposto por Folkers.

Em 1973, a segunda proposta mecanística foi sugerida por Sweet e Fissekis (1973). Conhecido como mecanismo de Knoevenagel (Esquema 4), esta via envolvia a reação entre benzaldeído **49** e acetoacetato de etila **48** via condensação aldólica formando um carbocátion **87** estável que sofria posterior reação com uréia **50**.



**Esquema 4.** Mecanismo Knoevenagel para síntese de DHPMs proposto por Sweet.

A formação do íon imínio foi proposta então em 1997 por Kappe (KAPPE, 1997; Esquema 5) e constitui a explicação mais concisa na formação da DHPMs. A primeira interação ocorre entre o benzaldeído **49** e a uréia **50** formando intermediário reativo do tipo íon imínio **89**. O intermediário formado reage com acetoacetato de etila **48** para formação de **51**. Os dados obtidos por experimentos de RMN foram fundamentais para a aceitação da proposta.

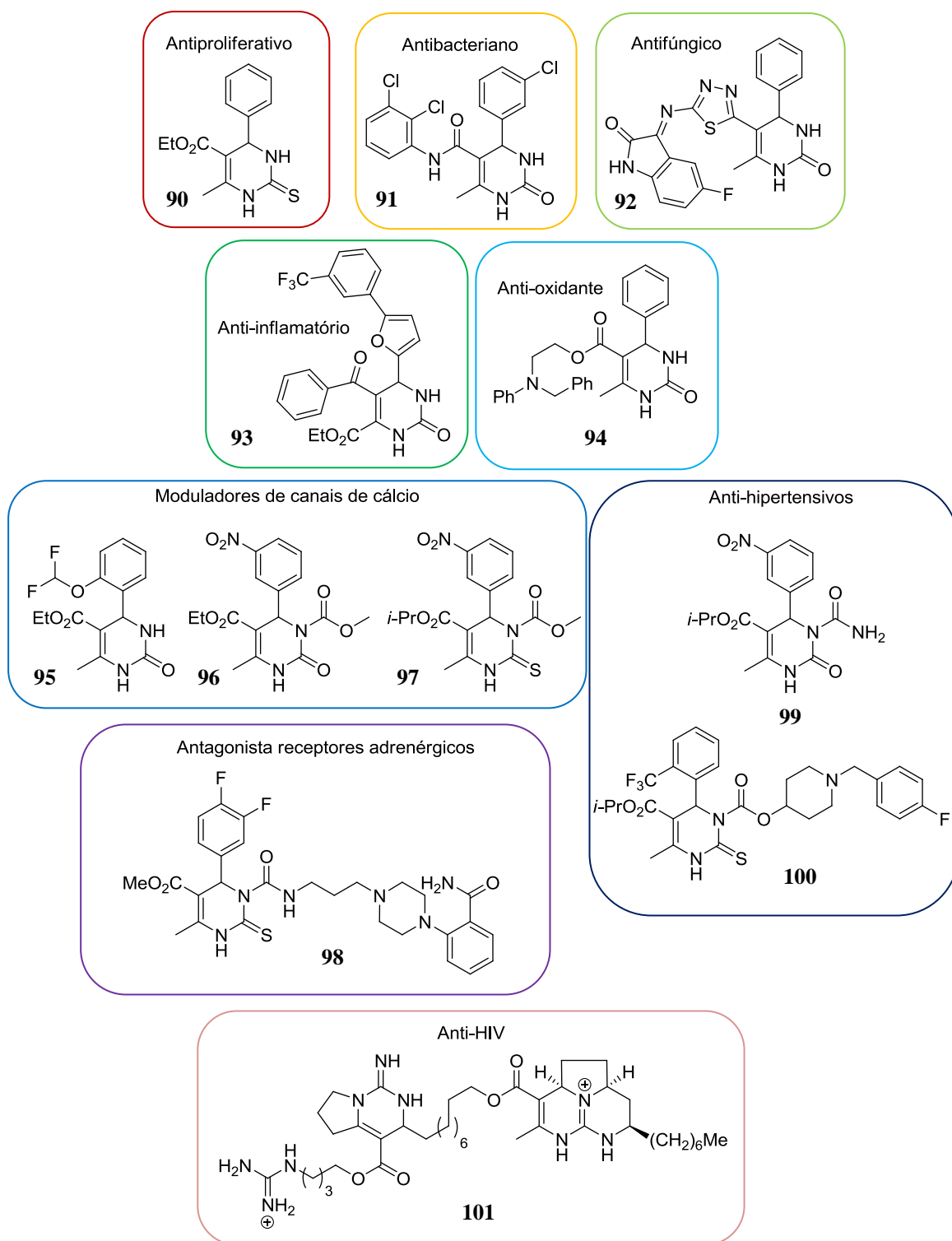


**Esquema 5.** Mecanismo imínio para síntese de DHPMs proposto por Kappe.

Recentemente De Souza e colaboradores (2009) caracterizaram, empregando técnica de ESI-MS/MS, a formação de íon imínios referentes a reação de uréia com benzaldeído numa reação de Biginelli, sem entretanto observar, num período menor do que 24h, a formação de massa correspondente ao intermediário de Knoevenagel proposto por Sweet. Este resultado veio a corroborar com o mecanismo proposto por Kappe, indicando que realmente esta reação passa pela formação inicial do íon imínio, deixando de lado as outras vias mecânicas, enamina e Knoevenagel.

### **1.12. Aplicação Biológica das Diidropirimidinonas de Biginelli**

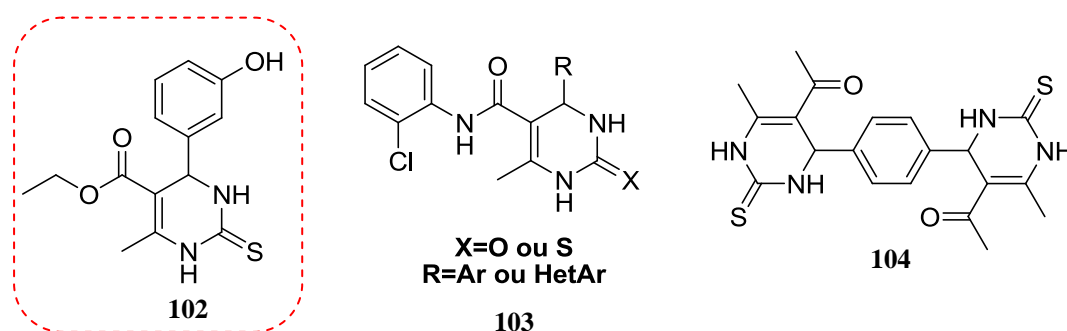
A reação multicomponente de Biginelli tem ganhado espaço e chamado atenção devido ao amplo espectro de aplicação biológica dos produtos obtidos através desta reação. Os adutos de Biginelli apresentam atividades promissoras, tais como antiproliferativas (**90**), antibacterianas (**91**) e antifúngica (**92**; ASHOK *et al.*, 2007), anti-inflamatória (**93**; KAPPE, 2000), antioxidante (**94**; STEFANI *et al.*, 2006; ISMAILLI *et al.*, 2008) além da capacidade de modular canais de cálcio (**95-97**) e antagonistas de receptores adrenérgicos  $\alpha_{1A}$  (**98**; KAPPE, 2000). Podem também ser eficazes no tratamento de hipertensão arterial (**99-100**; ATWAL *et al.*, 1990; ROVNYAK *et al.*, 1992). Apesar de não serem sintéticos, alcalóides marinhos contendo um núcleo DHPM, tais como a batzeladina B (**101**), isolados de várias espécies de esponjas marinhas, foram relatados como os primeiros produtos naturais de baixa massa molecular capazes de inibir a ligação do HIV ao receptor gp-120 de células CD<sub>4</sub>, atuando como um agente antiviral no tratamento na AIDS (PATIL *et al.*, 1995). A Figura 25 mostra exemplos de compostos que possuem cada uma das atividades biológicas mencionadas acima.



**Figura 25.** DHPMs e suas diversas aplicações biológicas no tratamento de diversas doenças, como câncer, hipertensão, HIV, dentre outras.



Em 1999 foi relatado por Mayer e colaboradores uma DHPM, o monastrol (**102**; Figura 31), como o primeiro inibidor específico da enzima Kinesin Eg5 que é responsável pela mitose celular (MAYER *et al.*, 1999; KAAAN *et al.*, 2010). A inibição da proteína quinase Eg5 é uma estratégia promissora no tratamento do câncer, pois se tornar vantajosa frente a outros inibidores de mitose pois não apresenta efeitos neurotóxicos consideráveis (MULLER *et al.*, 2009). Com inspiração no monastrol (**102**), Kumar e colaboradores descreveram a síntese e atividade antiproliferativa de adutos de Biginelli em estudos realizados com células de tumor de mama (MCF-7). Os compostos avaliados neste trabalho (**103**; KUMAR *et al.*, 2009; Figura 31) mostraram percentual de citotoxicidade na ordem de 7 a 79 % quando empregados a 50 µg/mL. Pouco mais tarde Azizian e colaboradores relataram a atividade antiproliferativa de bisdiidropirimidinonas (**104**). Os compostos foram testados contra células de carcinoma cervical humano (HeLa), adenocarcinoma (SKOV-3), carcinoma de cólon humano (LS-180), câncer de mama (MCF-7) e linfoma de Burkitt (Raji). A bisdiidropirimidinona (**104**; Figura 26) foi a mais promissora dentre os compostos testados por Azizian mostrando  $CI_{50}$  de 26,4; 23,9; >100,0; 45,3 e 32,9 µM para as linhagens HeLa, SKOV-3, LS-180, MCF-7 e Raji, respectivamente (AZIZIAN *et al.*, 2010).



**Figura 26.** DHPM inspiradas através na descoberta das propriedades antiproliferativas do Monastrol (**102**) em células tumorais.

A promissora atividade antiproliferativa descrita para alguns adutos de Biginelli levou o nosso grupo de pesquisa (LaDMol-QM – Laboratório de Diversidade Molecular e Química Medicinal) a investigar o potencial dos adutos de Biginelli com o núcleo cumarínico em células tumorais e avaliação dos mesmos como sondas químicas e biológicas.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo Geral

Baseado em uma das linhas de pesquisa de nosso laboratório (LaDMol-QM – Laboratório de Diversidade Molecular e Química Medicinal) que visa a identificação de novos candidatos a fármacos anti-tumorais e a marcadores celulares por fluorescência, objetivamos neste trabalho a construção de uma quimioteca de *Diidropirimidinonas*, explorando o uso do núcleo cumarínico. Desta forma, o objetivo geral deste trabalho foi sintetizar e caracterizar, através de técnicas espectroscópicas, uma quimioteca de diidropirimidinonas, análogas ao novobiocin (**24**), planejadas como inibidores da enzima Hsp90, e avaliar suas propriedades de fluorescência para possíveis marcações celulares.

### 2.2. Objetivos Específicos

- Sintetizar e purificar uma quimioteca de diidropirimidinonas inéditas análogas ao novobiocin;
- Caracterizar por métodos espectroscópicos de infravermelho (IV), ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono (RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ ) e espectrometria de massas os produtos sintetizados;
- Determinar a via mecanística que a reação de multicomponente de Biginelli passa no caso de termos um composto dicarbonílico particular como o betacetoéster cumarínico;
- Avaliar o perfil dos compostos sintetizados como sondas de fluorescência e como marcadores de fluorescência para Hsp90; Uso destes como teranósticos.

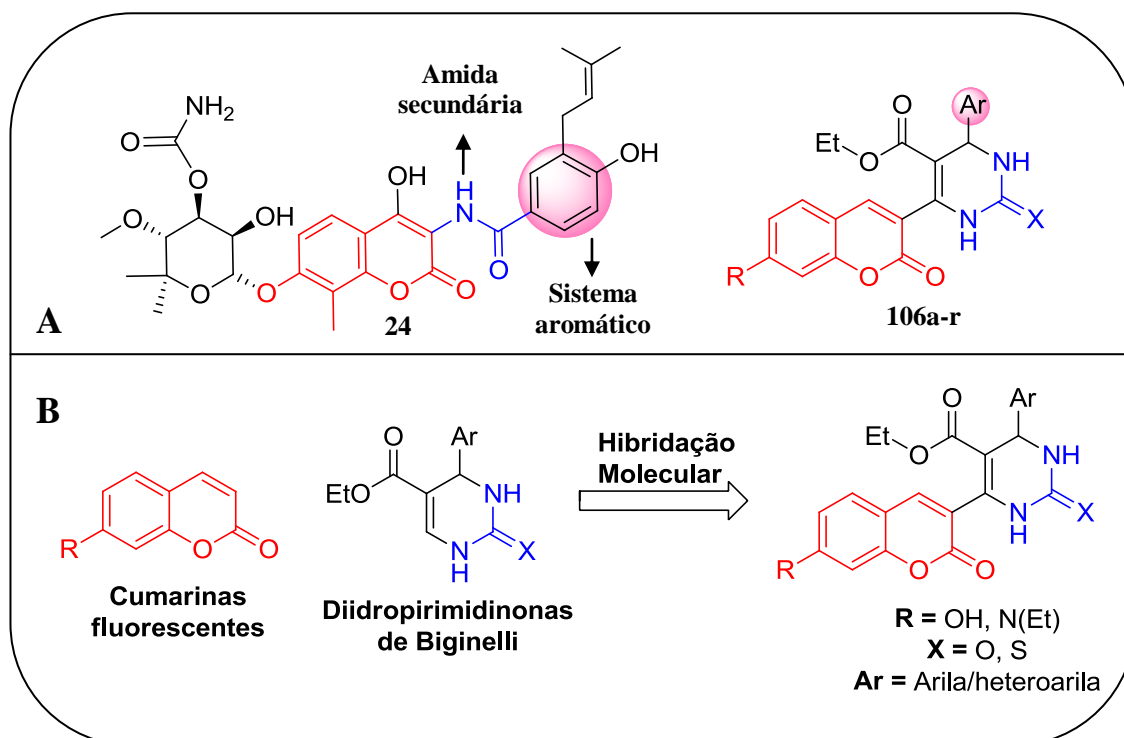
### 2.3. Planejamento Estrutural

O planejamento estrutural da série de *Diidropirimidinonas* foi baseado na técnica de hibridação molecular. Esta hibridação dos grupos *Diidropirimidinona* e *cumarina* baseou-se em dados da literatura que demonstram perfil farmacológico como antitumoral para estes núcleos em estudos farmacológicos *in vivo* e *in vitro* (Esquema 6). O núcleo cumarínico foi escolhido, pois este, como visto na introdução, está presente em diversos inibidores da Hsp-

90. Já a escolha da subunidade diidropirimidinona se deu, pois a mesma poderia ser construída a partir de beta-cetoésteres de cumarinas, fornecendo outros requisitos estruturais para a inibição da Hsp-90, uma amida secundária e um anel aromático. (ZHAO *et al.*, 2011; Esquema 6).

Neste contexto, pretendeu-se realizar o estudo de identificação de novos candidatos a fármacos anti-tumorais a partir da construção de uma quimioteca de 18 diidropirimidinonas cumarínicas (**106a-r**), sendo quinze 7-*OH*-cumarinas (**106a-o**) e três 7-*N*-dietil-cumarinas (**106p-r**), variando-se a natureza dos anéis aromáticos ligados às subunidades diidropirimidinona. A reação adotada para a síntese dos compostos foi a reação multicomponente de Biginelli, que é capaz de unir as duas subunidades propostas neste trabalho: diidropirimidinona e cumarínica.

A eleição dos anéis aromáticos para a construção da quimioteca foi planejada de maneira racional tendo como objetivo investigar a relevância da diversidade de interações moleculares e propriedades físico-químicas (estereoeletrônicas,ceptor/doador de ligação hidrogênio e lipofilicidade) introduzidas pelas modificações propostas (Esquema 7).



Esquema 6. Planejamento estrutural da série proposta.

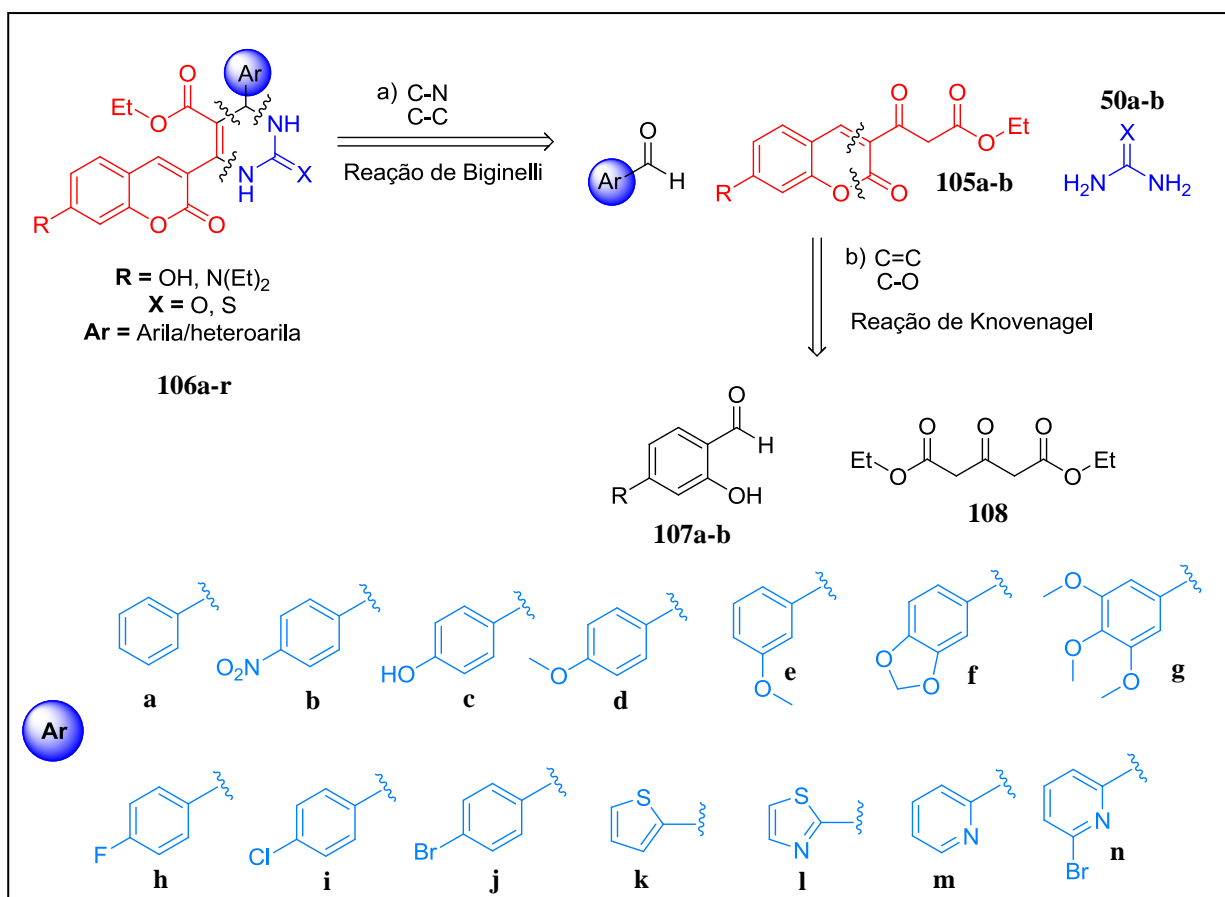
### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Planejamento Sintético e Obtenção da Quimioteca de Diidropirimidinonas de Biginelli (106a-r)

A síntese dos compostos da quimioteca de diidropirimidinonas de Biginelli (106a-r) foi baseada na análise retrossintética ilustrada no Esquema 7.

A análise retrossintética, através de duas desconexões C-N (etapa **a**) e uma desconexão (C-C), permitiu identificar os precursores aldeídos (**Ar a-n**), beta-cetoésteres (105a-b) e (tio)uréias (50a-b) como compostos-chave para a síntese da quimioteca de diidropirimidinonas (4a-r), explorando a condensação ácido-catalisada de aldeídos aromáticos funcionalizados em Ar, (tio)ureias e betacetoésteres cumarínico numa reação tricomponente de Biginelli.

Os benzaldeídos (**Ar a-n**) e as (tio)uréias (50a-b) selecionados para esta síntese puderam ser adquiridos comercialmente. Por sua vez, os betacetoésteres cumarínicos (105a-b), que não são comerciais, foram ser sintetizados. Através da análise retrossintética do composto 105a-b podemos observar na etapa **b** uma desconexão C=C e uma C-O, que permitiu identificar como precursores seus salicilaldeídos correspondentes (107a-b), que após uma reação de Knoevenagel com 3-oxopentanodioato de dietila (108), explorando a substituição nucleofílica à carbonila com catálise básica, originaram os betacetoésteres pretendidos.



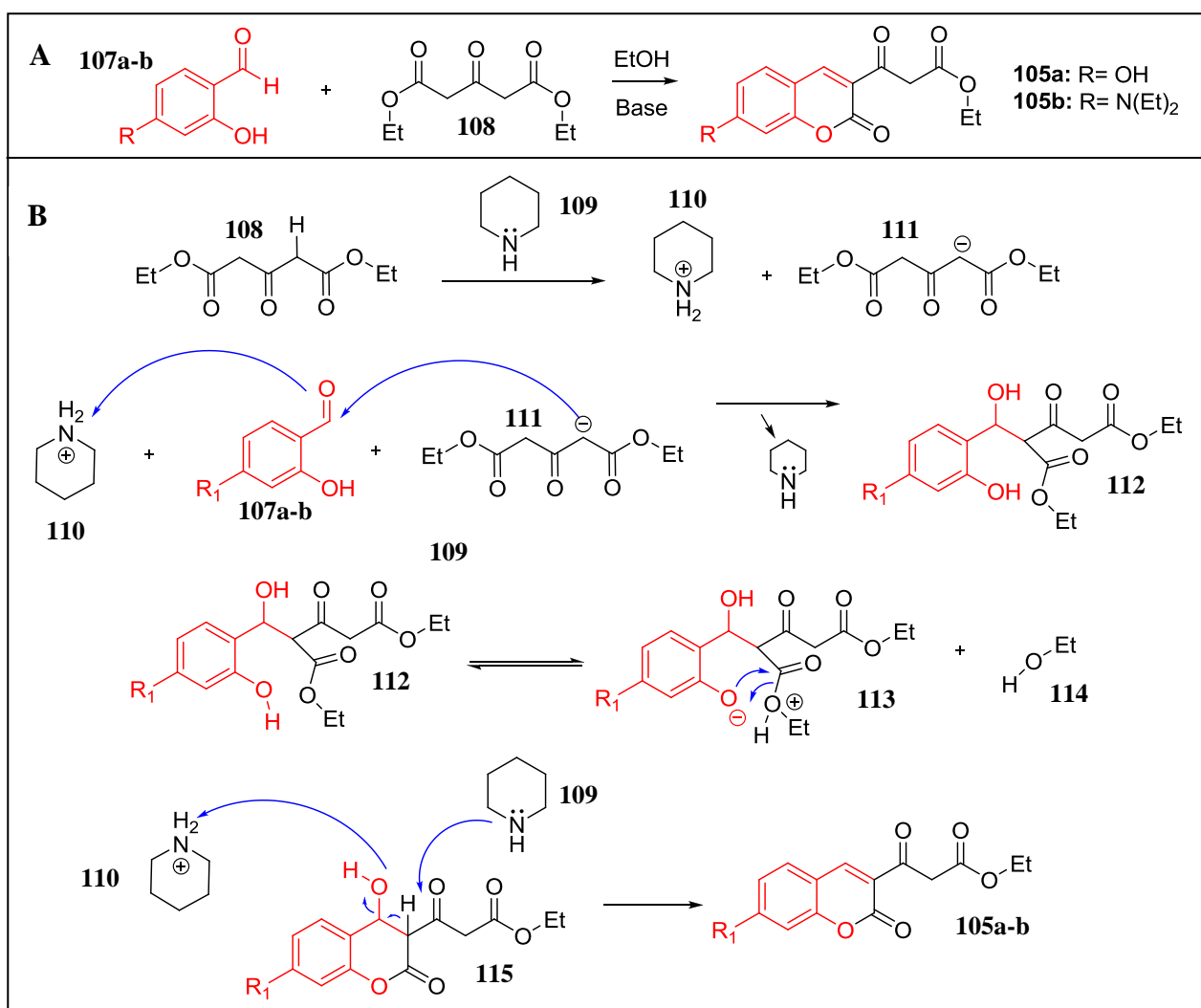
Esquema 7. Análise retrosintética para obtenção da quimioteca de Diidropirimidinonas de Biginelli (**106a-r**)

### 3.1.1 Síntese dos Betacetoésteres (**105a-b**)

O emprego de metodologia descrita por Barrio e colaboradores nos permitiu obter os betacetoésteres (**105a-b**), em 66-86% de rendimento isolado, diretamente a partir dos precursores aldeídicos correspondentes (**107a-b**) (BARRIO *et al.*, 2005). Normalmente esta reação se procede com o uso de salicilaldeídos, 3-oxopentanodioato de dietila (**108**) e uma base orgânica, utilizando-se etanol como solvente, passando por um mecanismo do tipo Knoevenagel (BARRIO *et al.*, 2005). A otimização das condições reacionais, bem como seus rendimentos serão abordadas adiante.

A necessidade do uso da base orgânica nesta reação se deve a formação de um carbânion como intermediário (**111**), o que acontece na primeira etapa do mecanismo. Em seguida, este carbânion (**111**) atua como nucleófilo na segunda etapa reacional, atacando a carbonila do salicilaldeído (**107a-b**) numa reação de condensação aldólica. O uso da

piperidina se dá, pois a mesma é básica o suficiente para desprotonar o hidrogênio do carbono alfa-carbonílico do 3-oxopentanodioato de dietila (**108**) na primeira etapa, assim como o fenol do salicilaldeído (em **112**), levando ao seu fenóxido correspondente (**113**). Este fenóxido, na etapa seguinte do mecanismo, faz uma substituição nucleofílica acílica intramolecular ao éster, seguida de uma desidratação (**115**) que origina o núcleo cumarínico (**105a-b**). A base normalmente é utilizada em quantidades catalíticas, pois a mesma deve participar de todas as etapas do mecanismo sendo sempre regenerada como demonstrado no Esquema 8.

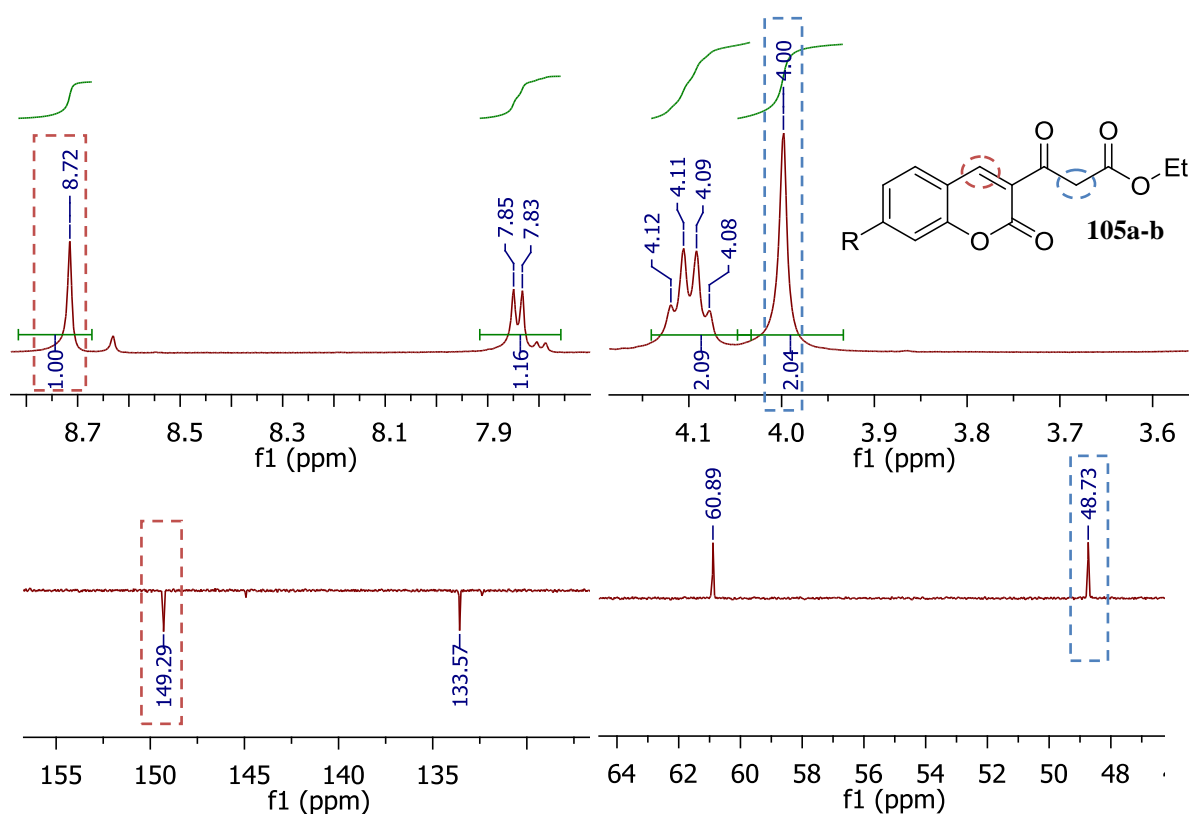


**Esquema 8.** A – Esquema reacional. B – Mecanismo proposto para a formação dos betacetoésteres (**105a-b**).

A formação dos beta-cetoésteres cumarínicos (**105a-b**) foi confirmada através de análises de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ . A Figura 27 ilustra alguns dos principais sinais de RMN  $^1\text{H}$  para o

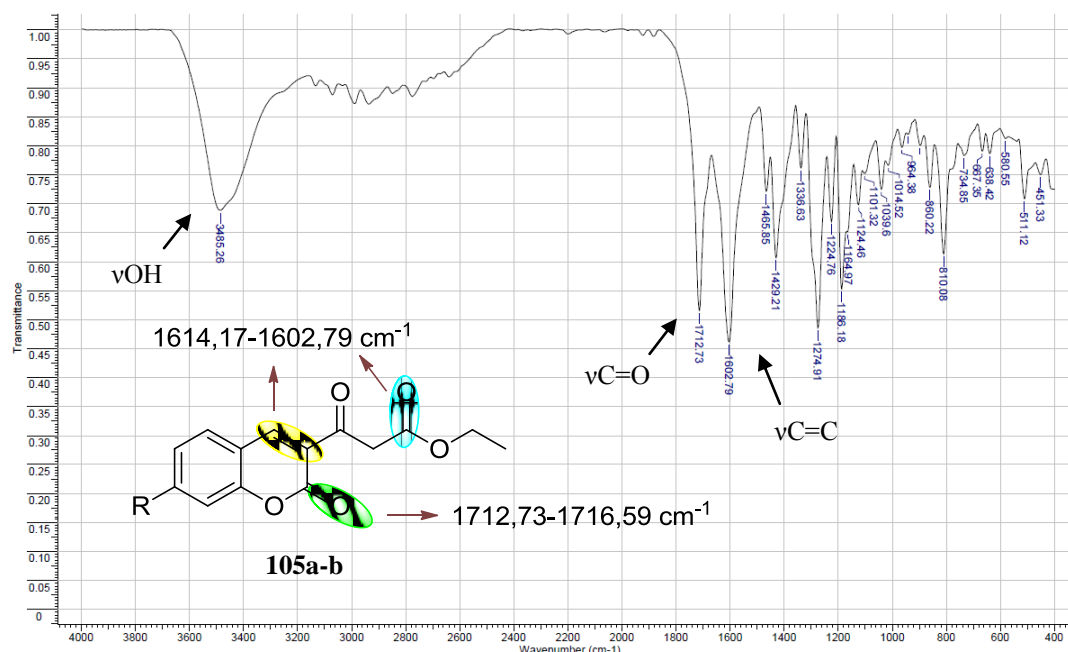
betacetoéster (**105a**) formado. Podemos observar a presença de um sinal simpleto, em 8,72 ppm para **105a** e 8,56 para **105b** (anexo S5), com integração referente a um hidrogênio, correspondendo ao hidrogênio da subunidade cromenona, que é o principal indicativo da formação de uma ligação C=C que não existia nesta posição em nenhum dos reagentes de partida. Ademais, seu deslocamento para campo mais baixo se destaca em relação aos outros sinais da cromemenona e é característico devido à proximidade de duas carbonilas. O deslocamento químico no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  mostra um sinal referente a este CH numa faixa entre 148,70 (para **105b**, anexo S5) e 149,29 (para **105a**, Figura 27) ppm.

Também podemos destacar os sinais simpletos com integração para dois hidrogênios variando entre 3,94 (**105b**, anexo S5) e 4,00 (**105a**, Figura 27) ppm, e 48,76 (**105b**) e 48,73 (**105a**) nos espectros de  $^{13}\text{C}$ , referentes ao metileno alfa-dicarbonílico presente na subunidade ceto-éster, confirmando a obtenção da molécula **105a-b** (Figura 27).



**Figura 27.** Atribuição dos principais sinais do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (500 e 125 MHz) dos compostos **105a** em  $\text{DMSO-}d_6$ .

No espectro no IV do composto **105a** (Figura 28) foi observada uma banda alargada em  $3485\text{ cm}^{-1}$  sendo esta banda característica do estiramento do grupo  $\text{-OH}$ . A banda presente em  $3160\text{ cm}^{-1}$  foi atribuída ao estiramento da ligação C-H de carbono  $sp^2$ . Em  $1712\text{ cm}^{-1}$  observou-se o estiramento do grupamento carbonila do grupo éster, enquanto que a banda intensa em  $1602\text{ cm}^{-1}$  corresponde ao estiramento do grupamento carbonílico vizinho ao éster. Observou-se ainda em  $1274\text{ cm}^{-1}$  uma banda intensa característica do estiramento da ligação C-O do grupamento éster da estrutura.



**Figura 28.** Atribuição das principais bandas do espectro de IV em pastilha de KBr dos compostos **105a-b**.

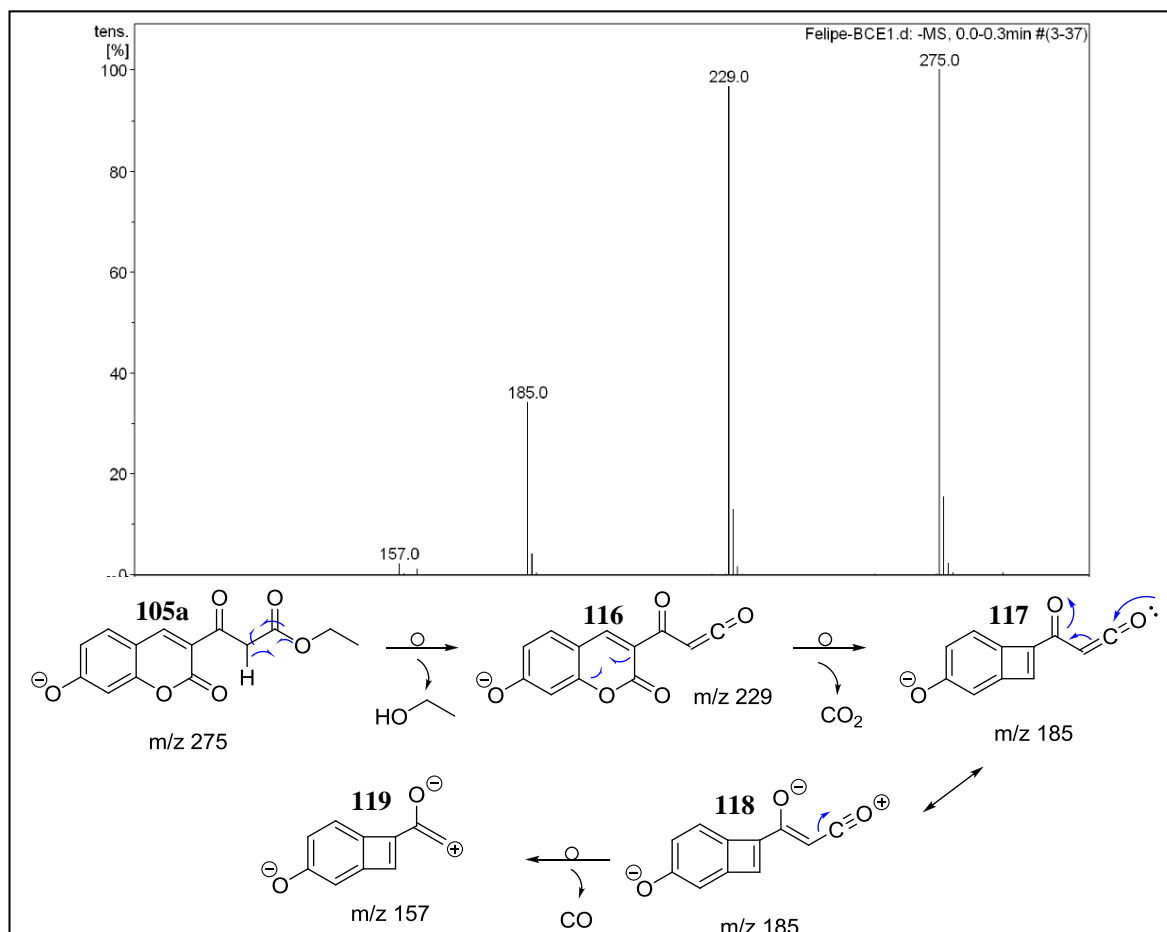
A Figura 29 mostra o espectro de massas do composto **105a**, com fonte de ionização negativa por eletronspray, o pico base foi detectado como  $m/z$  275, e todos os outros picos são elucidados pela proposta de fragmentografia mostrada na figura.

### 3.1.2 Padronização e otimização da síntese do betacetoéster **105a**.

Para elaboração de uma síntese de melhor execução e obtenção de melhores rendimentos reacionais, foi necessário a padronização e otimização da síntese do composto **105a**. Para tal, foram utilizadas diferentes bases e temperaturas reacionais. Diversos relatos da

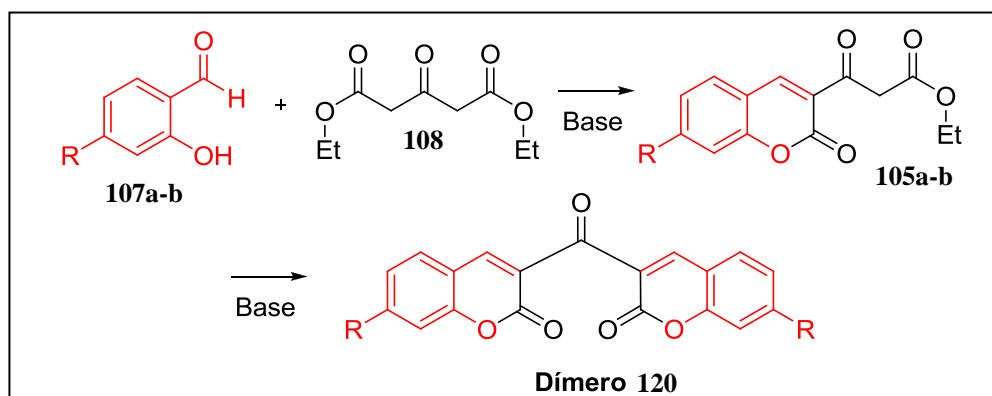


literatura indicam que esta síntese ocorre normalmente em refluxo, utilizando piperidina como catalisador (BARRIO et al., 2005). Desta forma, foram realizados os testes de síntese de **105a** com estas condições reacionais e a mesma foi obtida em 79% de rendimento após 4h. No entanto, a reação apresentava alguns subprodutos de difícil separação que se mantinham no produto isolado, os quais possivelmente eram oriundos da dimerização da cumarina com o salicilaldeído nestas condições reacionais (SPECHT et al., 1982; Figura 30).



**Figura 29.** Atribuição dos principais picos do espectro de Massas ionizado por eletronspray do composto **105a**.

Assim, optou-se por testar a mesma reação, mas a temperatura ambiente, o que acabou levando a maiores rendimentos e menos impurezas, após 24h de reação. Surpreendentemente a síntese ainda pôde ser feita a baixas temperaturas (5°C, 48h), mas em menores rendimentos.



**Figura 30.** Esquema reacional de dimerização da cumarina em questão. Adaptado de SPECHT et al., 1982.

No Brasil, a venda de piperidina comercial tem sido cada vez mais rígida e por isso pensou-se no uso de morfolina como base catalítica. Com esta base e utilizando as condições otimizadas de 25°C e 24h, a reação funcionou bem levando a rendimentos satisfatórios de 76%, sendo uma alternativa à falta de piperidina no mercado nacional, mesmo possuindo valor financeiro maior. Tentou-se também o uso de bases alifáticas como trietilamina e dietilamina, mas as mesmas não levaram a bons rendimentos, o uso da trietilamina forneceu apenas 20% de produto e a dietilamina não levou a qualquer formação do mesmo, indicando que uma base cíclica seria mais adequada para esta síntese (Tabela 2).

**Tabela 2.** Otimização das condições reacionais.

<i>Teste</i>	<i>Condições Reacionais</i>	<i>% Rendimento 105a</i>	<i>% Rendimento 105b</i>
1	Piperidina (cat), refluxo, 4h	79 <sup>a</sup>	65
2	Piperidina (cat), 25°C, 24h	86	66
3	Piperidina (cat), 5°C, 24h	61	Nd
4	Morfolina (cat), 25°C, 24h	76	Nd
5	Et <sub>3</sub> N (cat), 25°C, 24h	20	Nd
6	Et <sub>2</sub> NH (cat), 25°C, 24h	0	Nd

<sup>a</sup> Presença de impurezas; Nd – Não determinado.

### 3.1.3 Síntese das Diidropirimidinonas - Padronização

Com os beta-cetoésteres em mãos, o primeiro teste realizado para síntese das diidropirimidinonas de Biginelli com benzaldeído e uréia foi feito da forma clássica como descrito na literatura, fazendo o uso de uma gota de HCl como catalisador e etanol como solvente a 75°C (SHARGHI & JOKAR, 2009). Entretanto, foi observado o aparecimento de uma coloração avermelhada intensa na reação, indicando uma possível degradação do anel cumarínico que é sensível à presença de ácidos e bases (MURRAY, 1978).

Devido a isso, decidiu-se investigar as melhores condições reacionais para a formação dos produtos pretendidos, analisando a natureza (orgânicos e inorgânicos; ácidos ou bases) e a concentração dos catalisadores.

De fato, embora a observação por cromatografia em camada delgada (CCD) tenha indicado a consumo total dos reagentes e a formação de um produto levemente fluorescente, uma mistura complexa e difícil de isolar apareceu na reação. Com base nesse resultado, decidimos investigar as melhores condições reacionais para a obtenção dos produtos de Biginelli, usando a reação de obtenção de **106a** como modelo e analisando a formação dos produtos após 24h de reação à 75°C. Foram então utilizados diferentes catalisadores de distintas naturezas, tais como ácidos e bases, orgânicos e inorgânicos, e também mudando as suas concentrações (Tabela 3).

**Tabela 3.** Otimização das condições reacionais para a obtenção de **106a**.

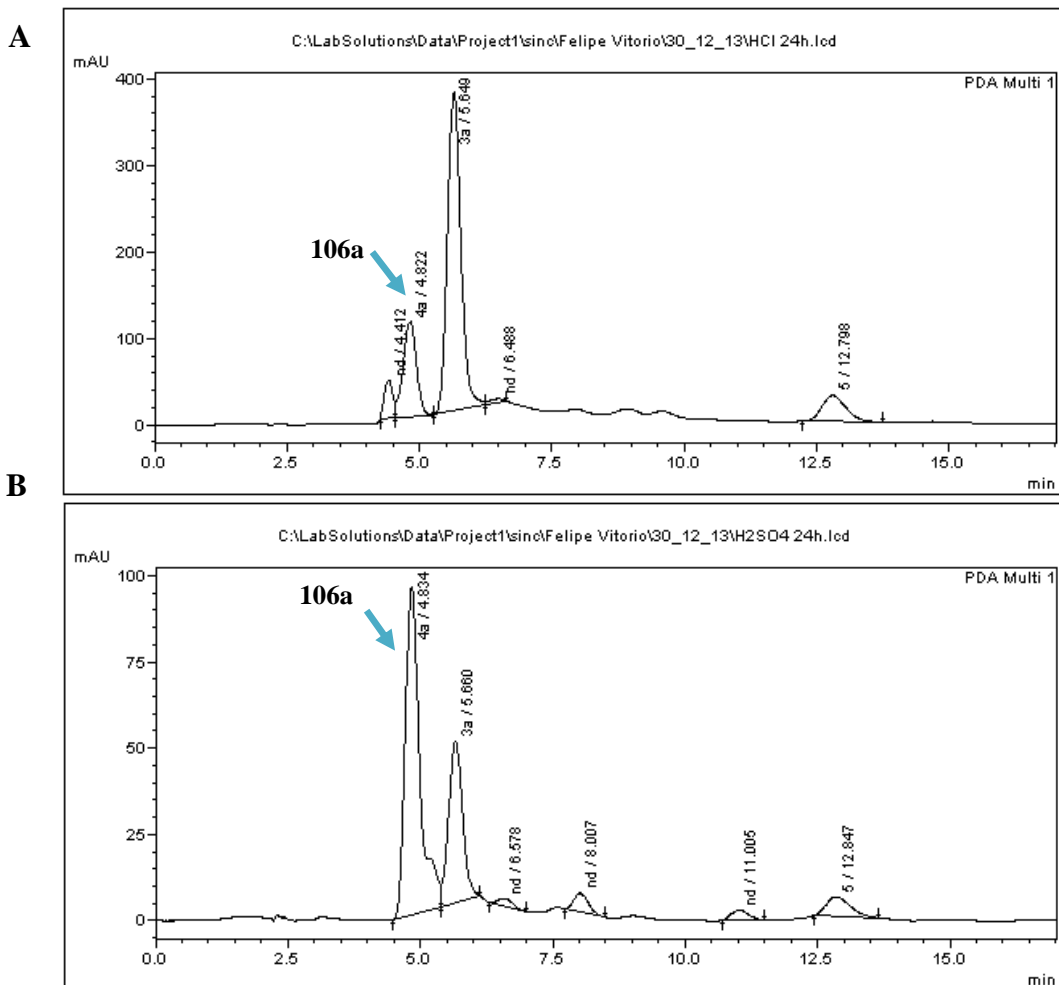
<i>Teste</i>	<i>Catalisador</i>	<i>% Rendimento<sup>a</sup></i>
1	-	Traço <sup>b</sup>
2	HCl (25 µL)	15
3	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (25 µL)	36
4	HCl (12,5 µL)	68
5	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (12,5 µL)	38

6	AcOH (25 $\mu$ L)	Traço <sup>b</sup>
7	TFA (25 $\mu$ L)	Traço <sup>b</sup>
8	p-TsOH (0,1mol%)	59
9	CaF <sub>2</sub> (0,1mol%)	Traço <sup>b</sup>
10	Cu(OAc) <sub>2</sub> (0,1mol%)	Traço <sup>b</sup>
11	CdCl <sub>2</sub> (0,1mol%)	Traço <sup>b</sup>
12	PPh <sub>3</sub> (0,1mol%)	Traço <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Rendimentos isolados após 24 horas de reação. <sup>b</sup> Pequena quantidade de produto **106a** formado, observado por cromatogramas de CLAE a 370 nm após 24 horas de reação, porém apresentou muitas impurezas.

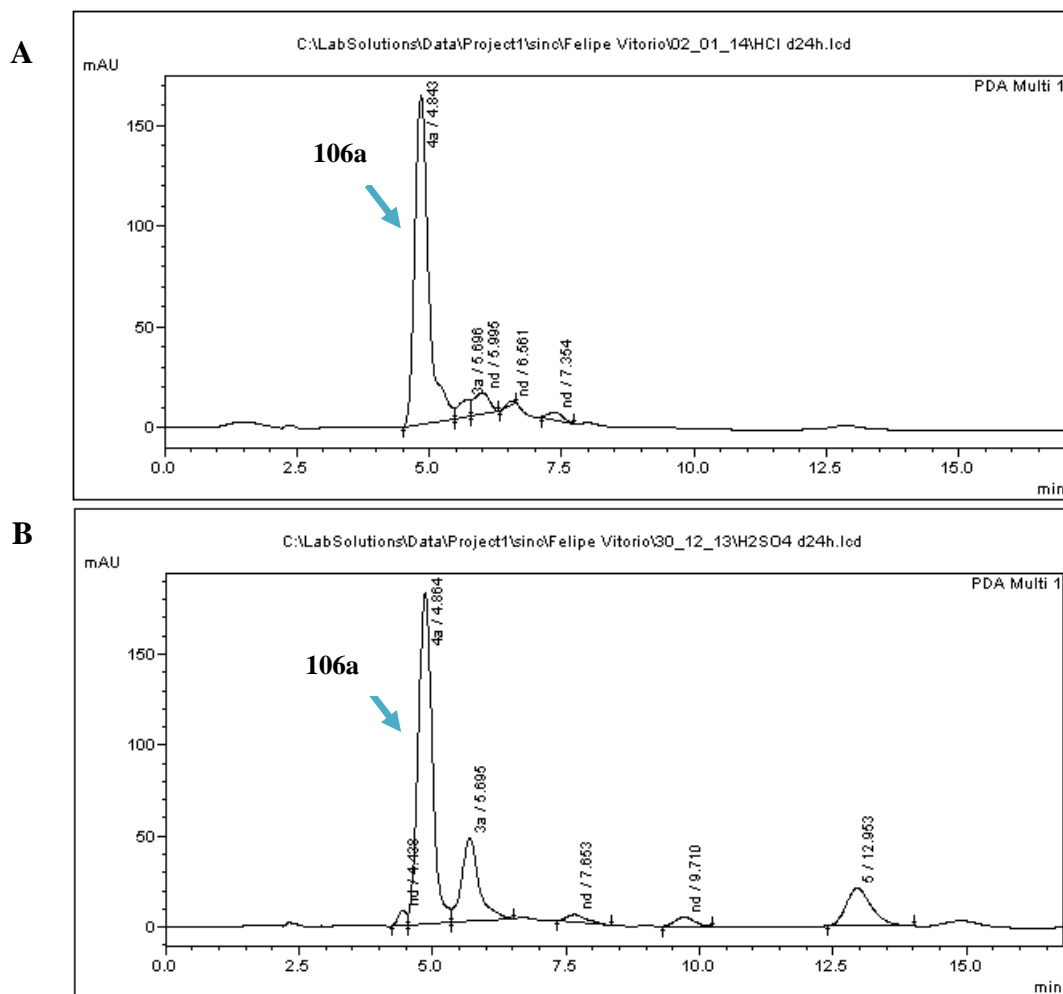
Como esperado, a síntese de **106a** é totalmente dependente da presença de um catalisador (Teste 1, Tabela 3; Folkers, 1933). No entanto, se na literatura uma grande variedade de catalisadores pode ser utilizada para este fim, no nosso caso, a natureza e concentração dos referidos catalisadores mudou drasticamente os rendimentos de formação do produto de Biginelli **106a**, onde em muitos casos só foram observados traços da diidropirimidinona desejada.

As avaliações começaram utilizando os catalisadores tradicionais, ou seja, os ácidos de Bronsted inorgânicos HCl e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Testes 2 e 3, Tabela 3). No entanto, diferentemente do primeiro ensaio descrito, a concentração de ácido (25 $\mu$ L / 2 mL) foi fixada. A análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) após 24h indicou a formação de **106a** e o total consumo de **105a**. Entretanto foram obtidos rendimentos isolados de baixos a razoáveis, 15 e 36%, provavelmente devido à presença de outros produtos (Figura 31).



**Figura 31.** Cromatogramas das reações de formação do produto **106a** utilizando o beta-cetoéster **105a**, benzaldeído e uréia na presença dos catalisadores indicados, por 24 horas. ( $\lambda=370$  nm, coluna C-18, eluída com H<sub>2</sub>O/MeOH 1%); **A** – Uso de 25  $\mu$ L de HCl concentrado em 2 mL de etanol; **B** – Uso de 25  $\mu$ L de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado em 2 mL de etanol.

Tendo em mente a sensibilidade estrutural das cumarinas, a quantidade dos ácidos empregados foi reduzida e surpreendentemente os rendimentos foram maiores, especialmente para HCl, resultando em uma reação bastante limpa. A reação também foi avaliada em tempos menores, mas vimos que 24 horas era a melhor condição reacional, pois sempre observou-se uma quantidade substancial do beta-cetoéster **105a** em tempos menores (Figura 32). O uso de irradiação microondas por 1h a 90°C também foi testado, mas os resultados foram bastante semelhantes a aqueles obtidos sob aquecimento convencional na mesma temperatura e tempo reacional.



**Figura 32.** Cromatogramas das reações de formação do produto **106a** utilizando o beta-cetoéster **105a**, benzaldeído e uréia na presença dos catalisadores indicados, por 24 horas. ( $\lambda=370$  nm, coluna C-18, eluída com H<sub>2</sub>O/MeOH 1%); **A** – Uso de 12,5  $\mu$ L de HCl em 2 mL de etanol; **B** – Uso de 12,5  $\mu$ L de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> em 2 mL de etanol.

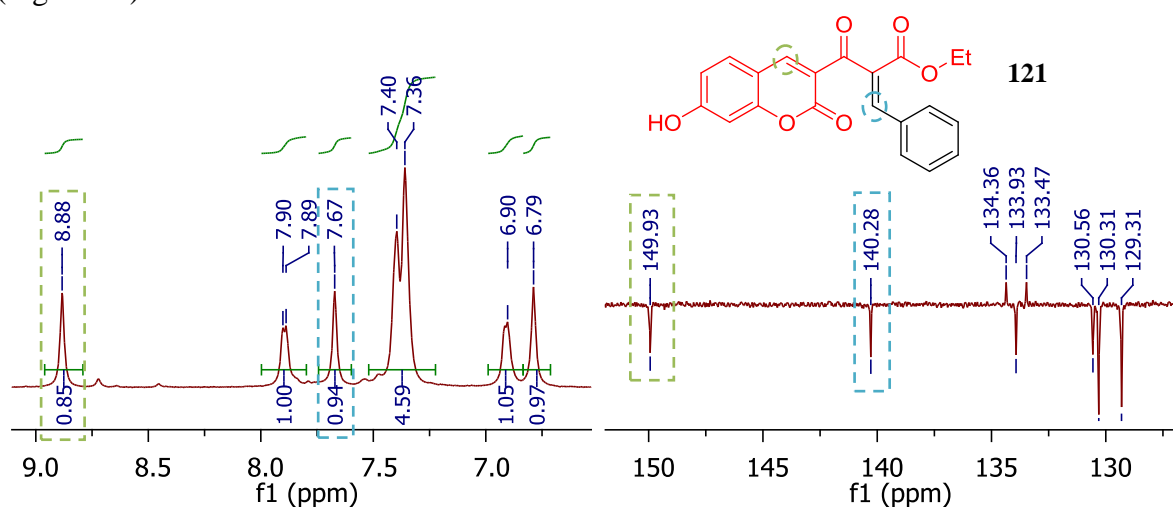
Aparentemente a força do ácido é importante para esta reação, uma vez que o uso de ácidos de Bronsted mais fracos, tais como ácido acético e ácido trifluoroacético, não conduziram a uma quantidade considerável de **106a** (Testes 6 e 7; Tabela 3).

O uso de ácidos e bases de Lewis com diferentes naturezas, macios e duros, é comum nesse tipo de reação multicomponente (KAPPE, 2000). Entretanto, o uso destes catalisadores em nosso caso levou a uma formação insignificante do produto **106a** (Testes 9-12; Tabela 3), o que indica que não só a força, mas também a natureza do catalisador é importante.

Curiosamente no curso de todas as reações catalisadas por ácido de Lewis, por ácidos de Bronsted e não catalisadas, observou-se por CCD o consumo parcial do beta-cetoéster de partida e o aparecimento de um produto não detectado durante a reação com ácidos de Bronsted fortes. A formação deste novo produto era dependente do tempo e das condições reacionais. Nas reações catalisadas por ácidos e base de Lewis foi observada a presença desta nova espécie já nas primeiras horas de reação, enquanto para as reações não catalisadas somente após 24h havia formação da mesma.

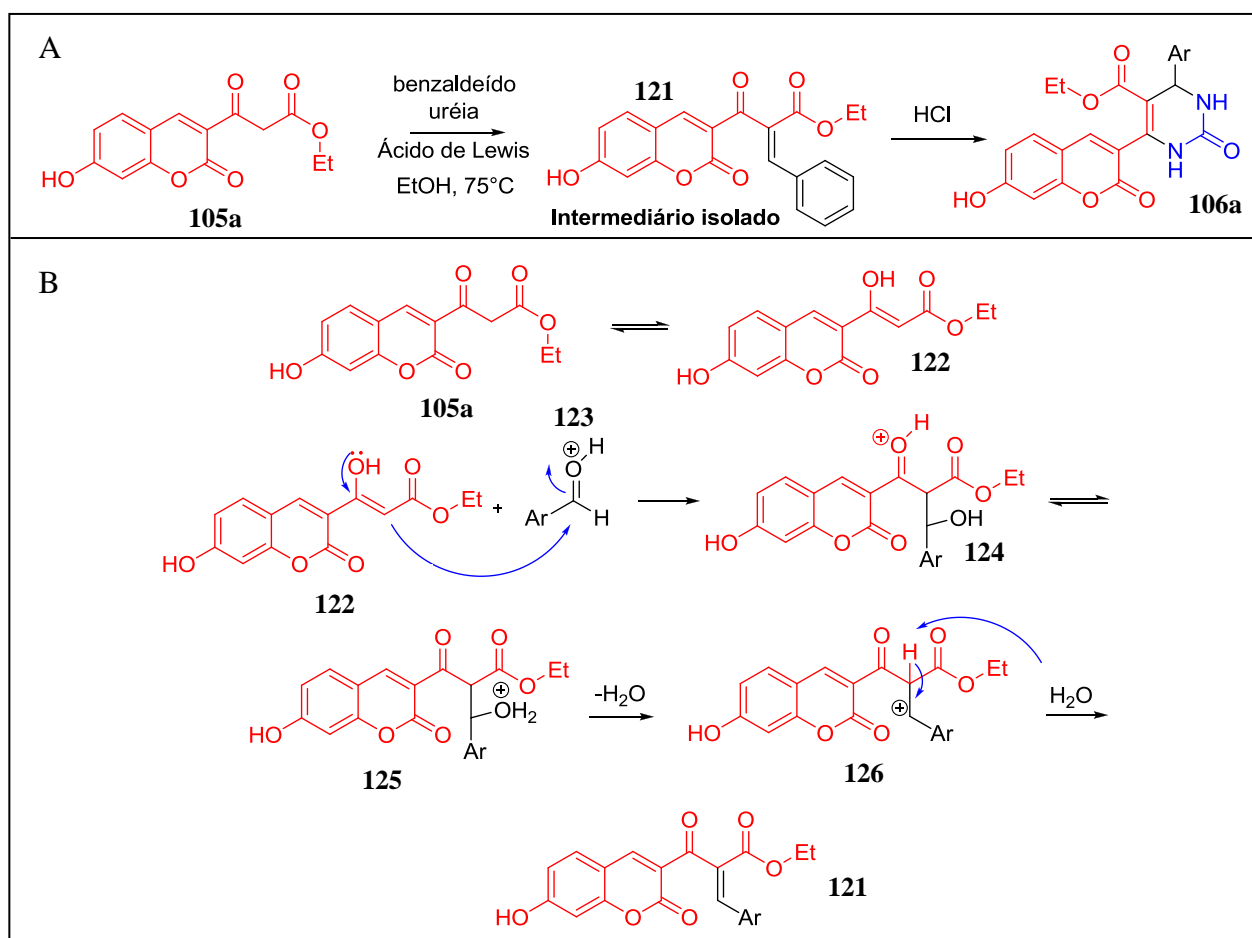
Como este produto não fora observado antes, postulamos que o mesmo poderia se tratar de uma espécie intermediária. De fato, a adição de 12,5  $\mu\text{L}$  de HCl nas reações catalisadas por ácido de Lewis conduziu ao desaparecimento deste novo composto e a formação do produto de Biginelli **106a**, corroborando a proposta de um intermediário reacional. Embora este produto não tenha sido observado por CCD em reações com ácidos Bronsted fortes, análises por CLAE indicaram sua presença em pequenas quantidades, sendo totalmente consumido até ao final do tempo de reação, isto é, 24h.

O isolamento por CCD preparativa do intermediário e subsequente análise por RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  mostrou a presença de um novo sinal característico de benzilideno (simpleto) em 7,67 ppm e um sinal no espectro de carbono em 140,28 ppm referente a um metino. Ademais, todos os sinais dos hidrogênios do sistema aromático da cumarina e do benzaldeído de partida estavam presentes, sem, no entanto a presença de qualquer sinal da unidade proveniente da ureia. Este então foi atribuído como um produto de uma condensação de Knoevenagel, **121** (Figura 33).



**Figura 33.** Atribuição dos principais sinais do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (500 e 125 MHz) do intermediário **121** em  $\text{DMSO-}d_6$ .

O Esquema 9 mostra o mecanismo de formação deste intermediário reacional e o seu consumo levando a formação do aduto de Biginelli final de nossa série de compostos. Na primeira etapa, existe um equilíbrio ceto-enólico da carbonila cetônica vizinha ao éster. Após a formação do enol, o par de elétrons da hidroxila regenera a dupla ligação da carbonila e a dupla ligação do enol faz um ataque nucleofílico à carbonila do aldeído aromático. Na segunda etapa, pelo equilíbrio no meio reacional, a hidroxila formada advinda do aldeído é protonada, seguindo então por eliminação de água e formação de um carbocátion benzílico. Na terceira e última etapa uma molécula de água abstrai o hidrogênio ácido entre as duas carbonílas, levando assim a formação do aduto de Knoevenagel.

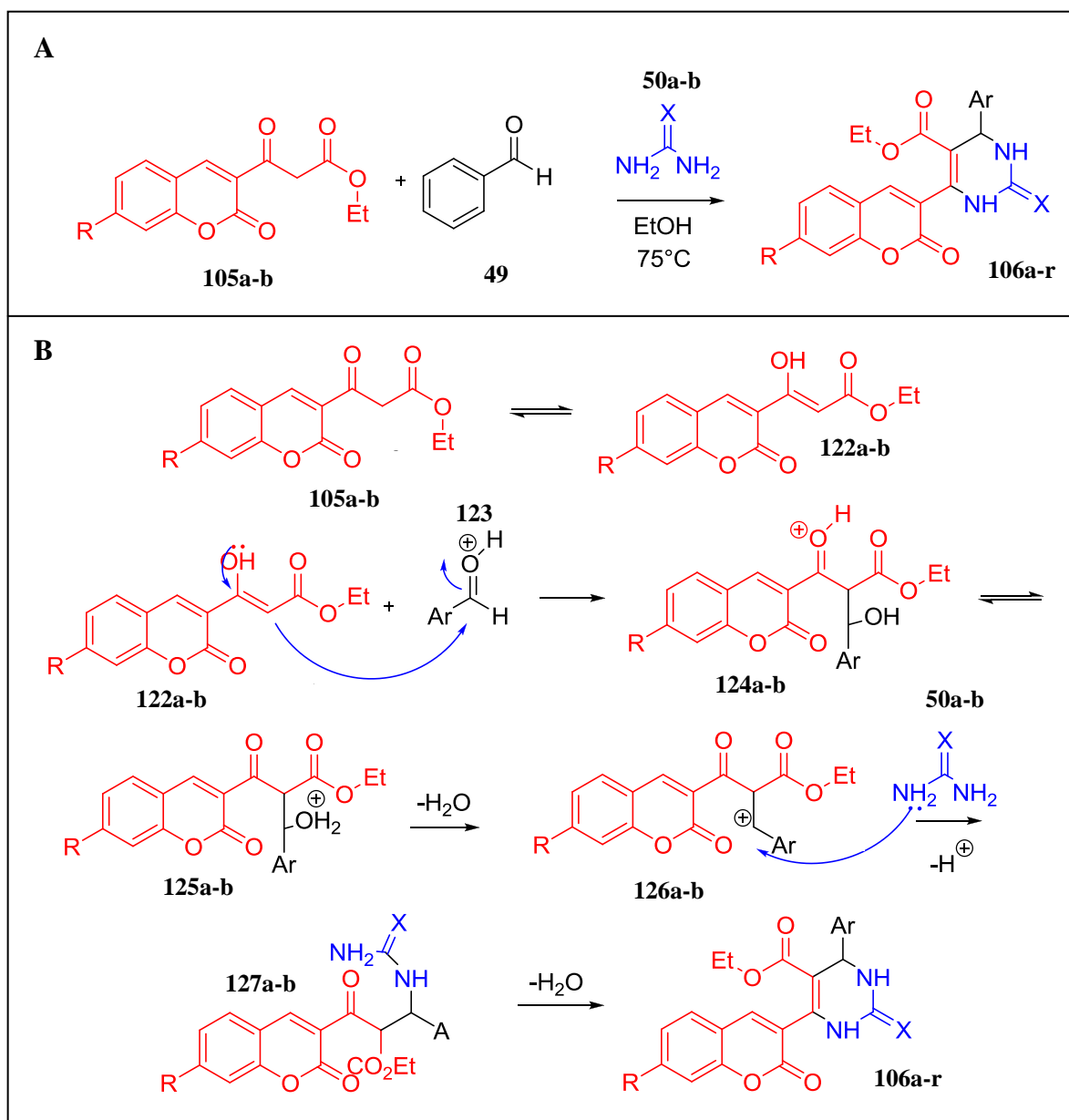


**Esquema 9.** A – Esquema reacional. B – Mecanismo proposto para a formação do intermediário **121**.

Adutos de Knoevenagel eram postulados como intermediários da reação de Biginelli antes de Kappe descrevê-los como improváveis (KAPPE, 1997). No entanto, até hoje a literatura só explorou o uso de beta-cetoésteres alifáticos e aromáticos comuns. Entretanto, em



nossas reações utilizamos um novo tipo de cumarina-beta-cetoéster que nunca havia sido descrito antes para esta reação multicomponente e que, pelo menos parcialmente, passa por um mecanismo de Knoevenagel. O mecanismo então proposto para reação de Biginelli fazendo o uso do núcleo cumarínico, pode passar por uma reação de Knoevenagel como já descrito acima. Após a formação do intermediário carbocatiônico (**126a-b**), há então o ataque nucleofílico do par de elétrons do nitrogênio da uréia formando **3.5a** para que após uma desidratação e eliminação de água geram finalmente o produto de Biginelli (Esquema 10).

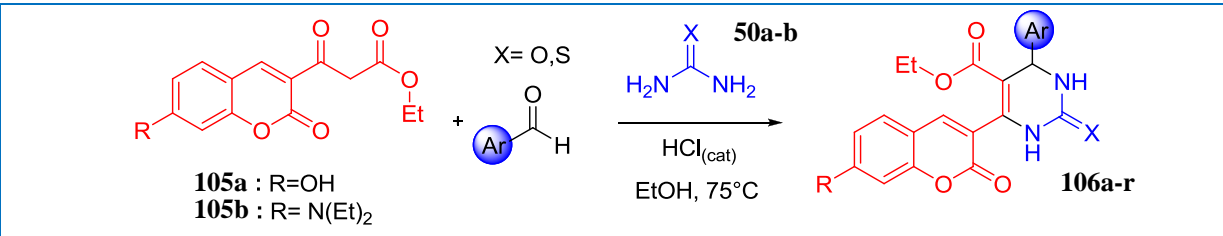
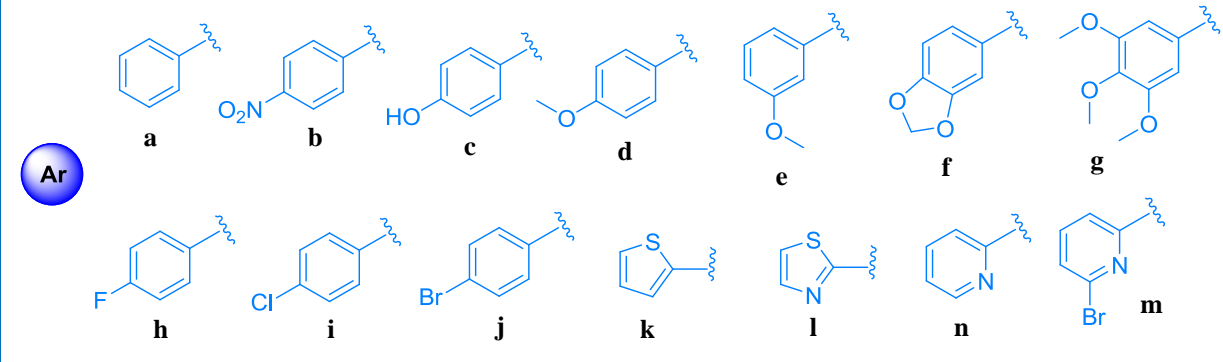
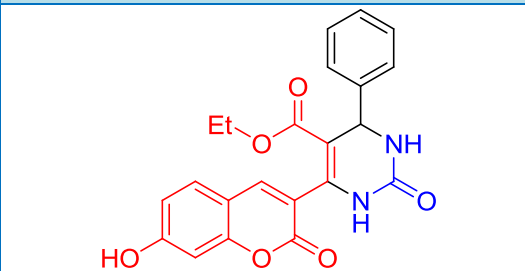


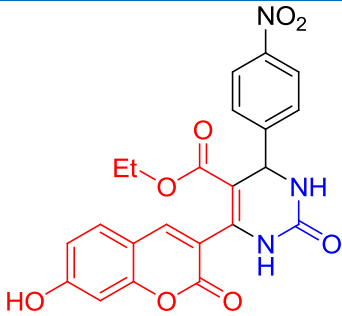
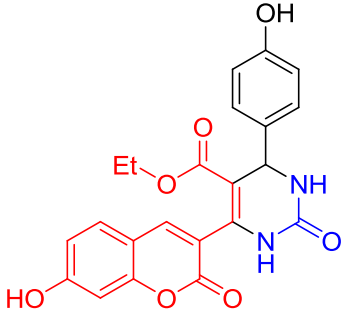
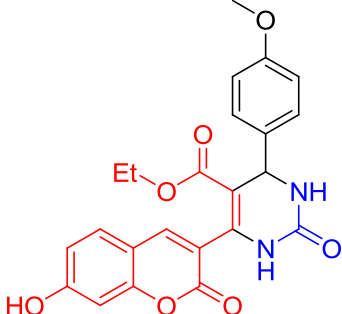
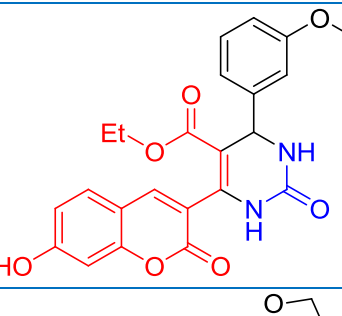
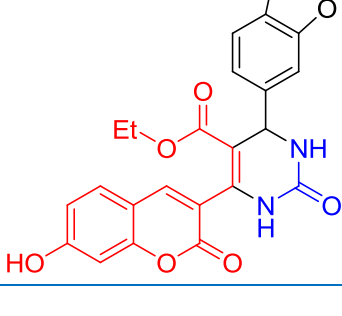
**Esquema 10.** A – Esquema reacional. B – Mecanismo proposto para a formação da série de Diidropirimidinonas.

### 3.1.4 Síntese da série de Diidropirimidinonas – Escopo reacional

Depois de todos os ajustes e usando as melhores condições reacionais, ou seja, 12,5  $\mu$ L de HCl como catalisador, visamos estudar o escopo da reação usando os beta-cetoésteres-cumarínicos (**105a** e **105b**); aldeídos de diferentes naturezas, como aromáticos ou heteroaromáticos; e uréia ou tiouréia, levando então a construção de uma quimioteca de novas cumarinas de Biginelli. Na tabela 4 estão descritos os produtos obtidos com seus respectivos rendimentos, purezas e pontos de fusão.

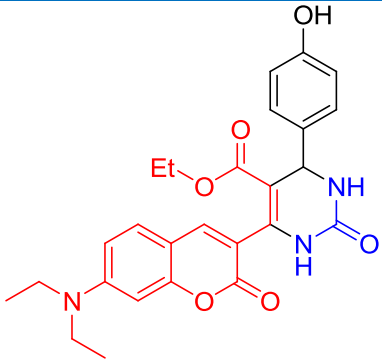
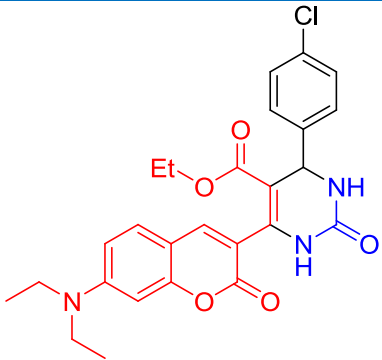
**Tabela 4.** Escopo reacional, rendimentos da síntese cumarina diidropirimidinona e propriedades físicas.

Estrutura	Pruduto	Pureza HPLC (%)	Rend. (%)	p.f (°C)
 <p> <b>105a</b> : R=OH  <b>105b</b> : R= N(Et)<sub>2</sub> </p> <p> <b>50a-b</b>  <math>\text{H}_2\text{N}-\text{C}(=\text{X})-\text{NH}_2</math>  <math>\text{X} = \text{O}, \text{S}</math> </p> <p> <math>\text{HCl}_{(\text{cat})}</math>  <math>\text{EtOH}, 75^\circ\text{C}</math> </p> <p><b>106a-r</b></p>				
 <p>Ar</p> <p>a b c d e f g h i j k l n m</p>				
 <p><b>106a</b></p>		99	68	219

	<b>106b</b>	96	73	124
	<b>106c</b>	100	77	266
	<b>106d</b>	98	80	141
	<b>106e</b>	98	79	246
	<b>106f</b>	100	81	249

	<b>106g</b>	100	75	291
	<b>106h</b>	95	99	131
	<b>106i</b>	97	74	181
	<b>106j</b>	99	90	129
	<b>106k</b>	96	99	144

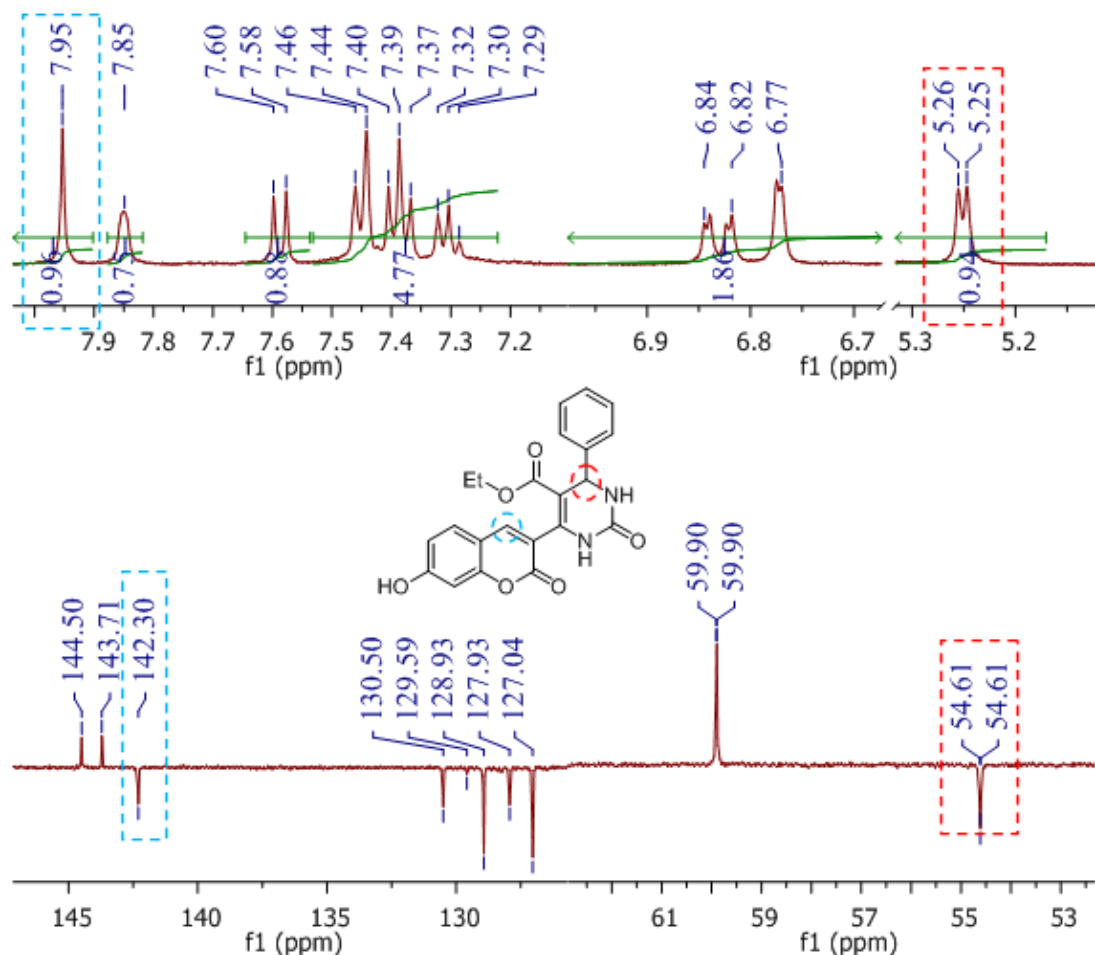
	<b>106l</b>	100	25	161
	<b>106m</b>	100	25	151
	<b>106n</b>	100	21	257
	<b>106o</b>	96	61	164
	<b>106p</b>	98	65	157

	<b>106q</b>	100	63	177
	<b>106r</b>	97	58	96

Os compostos **106a-r** foram obtidos com rendimentos de baixo a excelentes após purificação cromatográfica. Normalmente produtos de Biginelli são isolados por precipitação simples, porém no nosso caso não foi possível devido a pequenas impurezas residuais provenientes da degradação da subunidade cumarínica. Analisando o escopo reacional de **105a**, é possível assegurar que os aldeídos aromáticos são muito bem empregáveis neste tipo de reação devido aos rendimentos variando de 68 até 99%, bem como o uso de tioureia levando a uma diidropirimidin-2-(1*H*)-tiona (**106o**) em 61%. No entanto, a reação parece ser muito sensível ao uso de aldeídos heteroaromáticos. O derivado tiofenil mostra um excelente rendimento de 99%, enquanto o tiazolil, o piridil e o 3-Br-2-piridil foram obtidos com rendimentos próximos à 25%, pois estes são os únicos a conter, na posição 2, um nitrogênio  $sp^2$  que poderia interferir na reação. As mesmas condições foram aplicadas a **105b**, beta-cetoéster com uma dietilamina na posição 7 da cumarina, com três aldeídos aromáticos diferentes que mostraram resultados semelhantes (**106p-r**), embora tenham sido obtidos com rendimentos um pouco mais baixos.

A formação das diidropirimidinonas **106a-r** foi evidenciada através de análises por espectroscopia de RMN de  $^1H$  e de  $^{13}C$ . Estes compostos apresentaram um sinal duplete típico

na faixa de 5,2-5,4 ppm (d, 1H) com constante de acoplamento (J) variando na faixa de 2,8-3,5 Hz, e um sinal no espectro de carbono na faixa de 53-55 ppm, para o CH originado a partir da reação com a carbonila do aldeído. O hidrogênio de cromenona também pode ser identificado como um simpleto variando na faixa de 7,8- 8,0 ppm e um sinal no espectro de carbono na faixa entre 141-143 ppm (Figura 34).

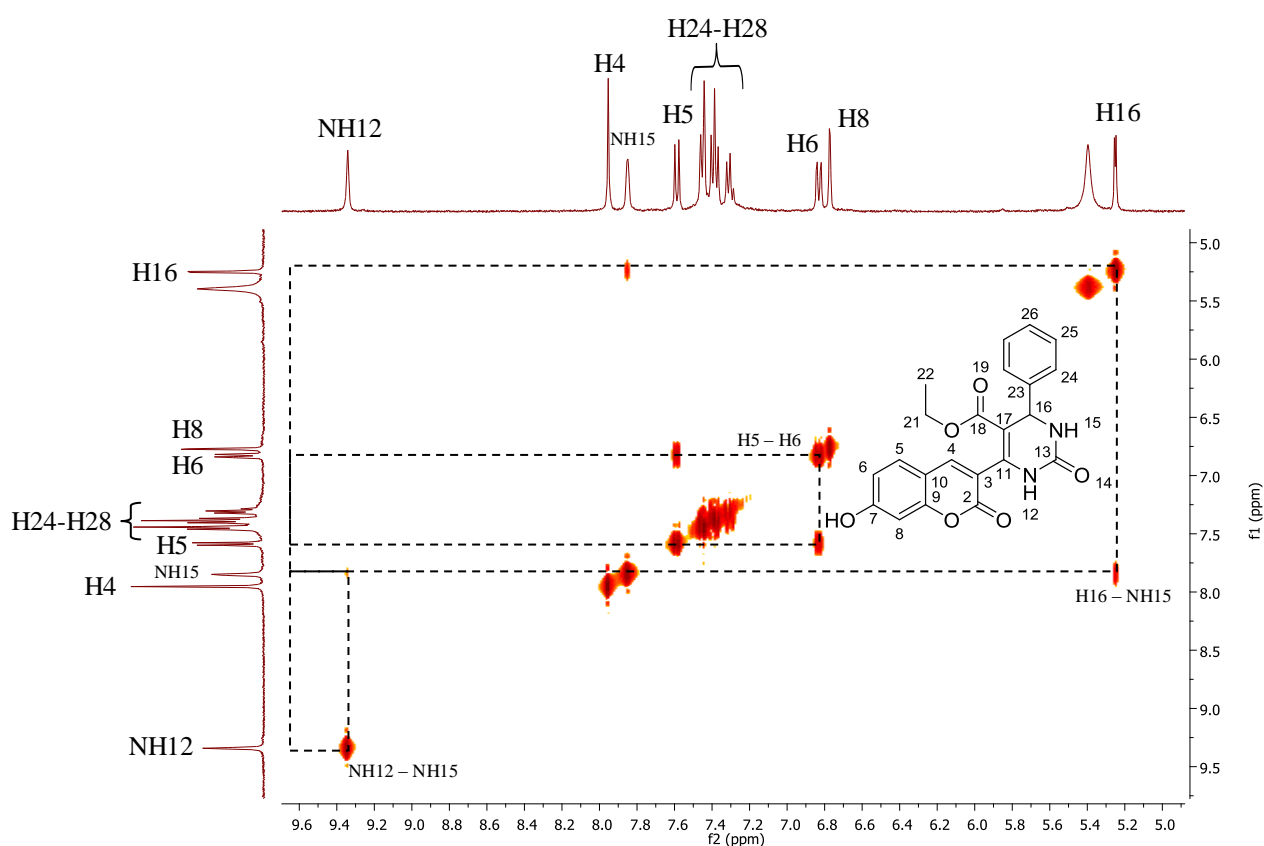


**Figura 34.** Atribuição dos principais sinais do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (400 e 100 MHz) de **106a** em  $\text{DMSO-}d_6$ .

Visto que os produtos diidropirimidinônicos possuem mais do que um sistema aromático em sua estrutura, a determinação estrutural da série apresentou complexidade na elucidação e atribuição inequívoca de todos os sinais de hidrogênio e carbono. Frente a isso, foram realizados espectros de RMN de correlação bidimensionais para correta atribuição dos sinais observados nos espectros unidimensionais. Os espectros foram obtidos a partir da

estrutura **106a**, devido à sua maior disponibilidade quantitativa e igualdade dos núcleos da série.

Com o propósito de se determinar acoplamentos de hidrogênios próximos foi realizado em espectro de RMN COSY (SILVERSTEIN *et al.*, 2007) do produto **106a** (Figura 35). Através deste, pôde-se verificar a interação entre o H16 e o NH15 (5,25 ppm – 7,87 ppm) mostrando então específico deste NH, fazendo distinção do NH12 que não interage com o H16, e que pôde apenas fazer um acoplamento em “W” com o próprio NH15 (7,87 ppm – 9,37 ppm). O H6 pôde acoplar com seu vizinho H5 por meio de três ligações (6,84 ppm – 7,60 ppm).



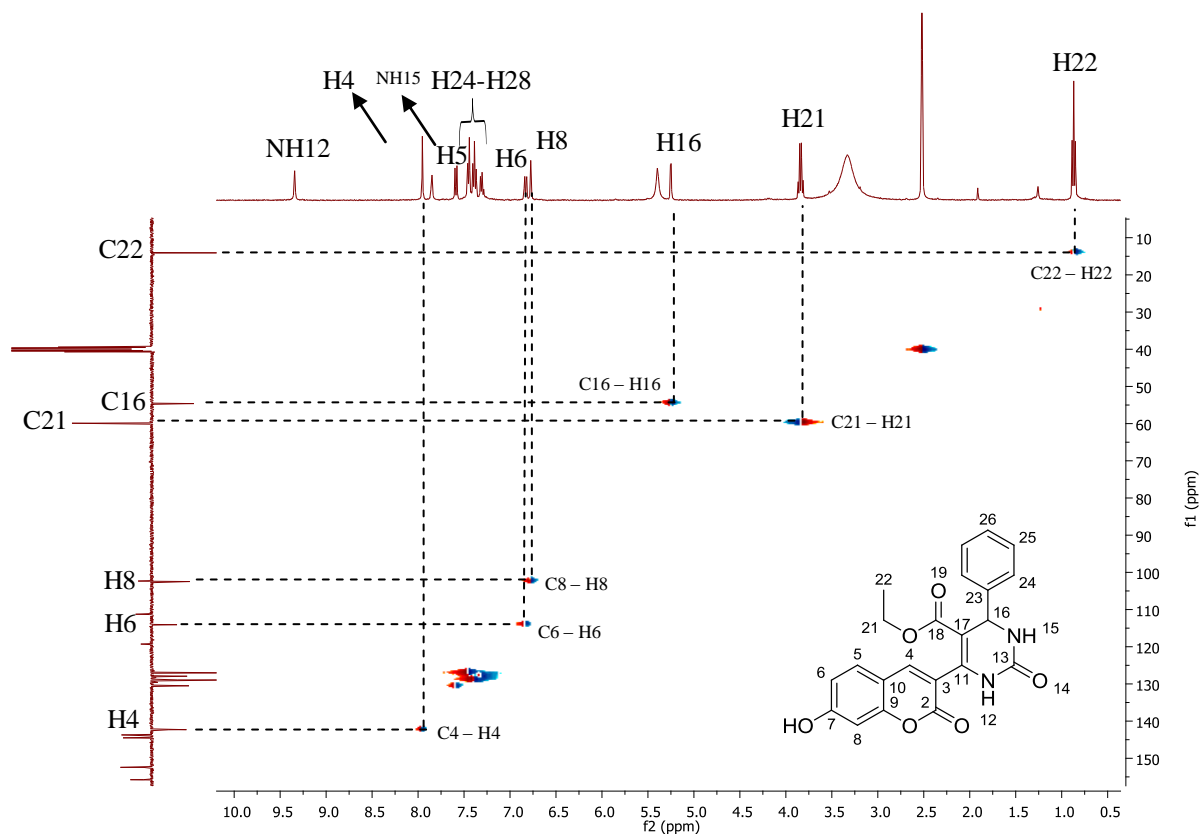
**Figura 35.** Espectro de RMN bidimensional COSY para o produto **106a**. Acoplamento entre hidrogênios próximos. Ampliação na região de 4,90 – 9,60 ppm no espectro 1D de  $^1\text{H}$ .

Através da atribuição dos sinais no espectro de hidrogênio descritos anteriormente foi possível determinar, no espectro de carbono, os sinais correspondentes aos carbonos ligados a esses hidrogênios através de um experimento de HSQC. Este visualiza o acoplamento entre os



núcleos de carbono e de hidrogênio presentes na estrutura do produto através de uma ligação covalente,  $J^1$  (SILVERSTEIN et al., 2007).

A Figura 36 demonstra o espectro de HSQC para o espectro de hidrogênio no eixo horizontal, e para o espectro de carbono no eixo vertical. Os acoplamentos do tipo  $J^1$  observados entre os hidrogênios e carbonos são descritos na Tabela 5.



**Figura 36.** Espectro de RMN bidimensional HSQC para o produto **106a**. Acoplamento entre carbonos e hidrogênios através de uma ligação covalente,  $J^1$ .

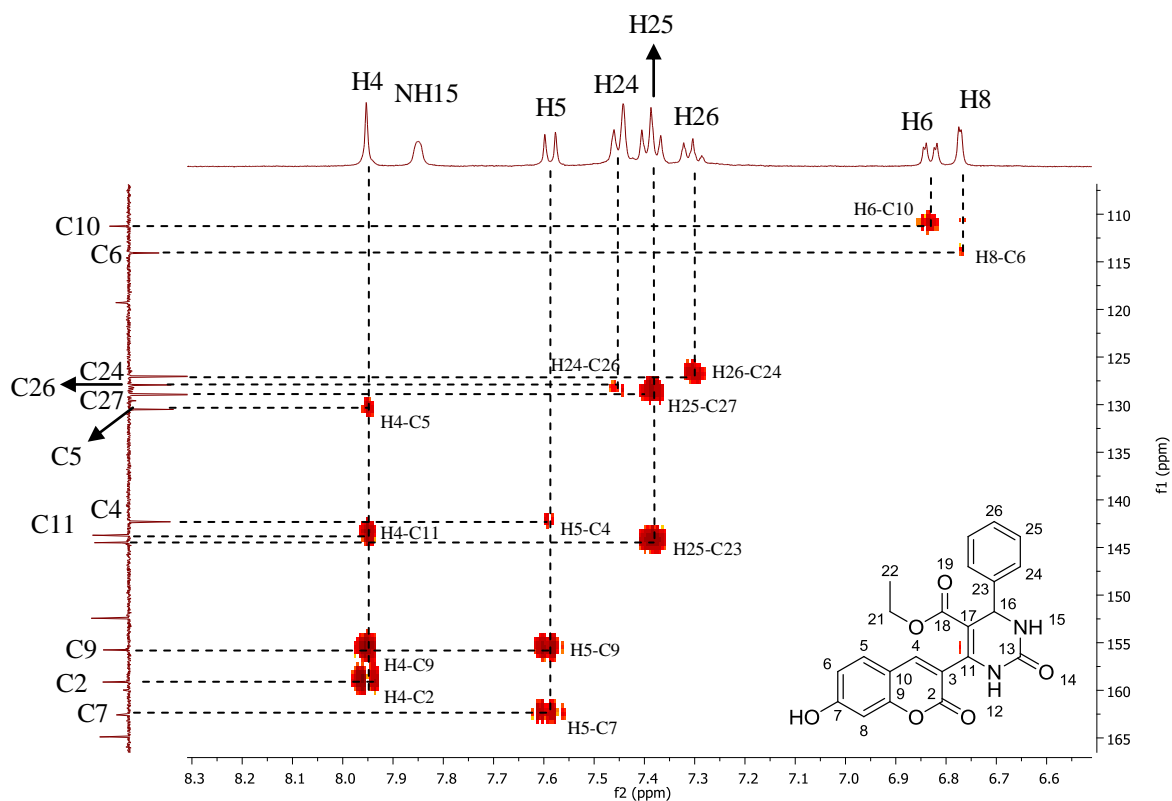
**Tabela 5.** Principais acoplamentos (C-H) apresentados no espectro HSQC ( $J^1$ ) de **106a**.

Acoplamento C-H	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)
C22-H22	0,86	14,08
C21-H21	3,84	59,92
C16-H16	5,25	54,60
C8-H8	6,79	102,44
C6-H6	6,84	113,93
C4-H4	7,97	142,29

Os acoplamentos entre carbonos e hidrogênios do sistema aromático podem ser analisados melhor através de um ampliação do espectro de HMQC na região de 6,6-8,3 ppm do espectro de hidrogênio, e 110-165 ppm do espectro de carbono. Com essa ampliação então se pode atribuir os sinais dos hidrogênios acoplados a carbonos por meio de três ligações, como mostra a Figura 37 e Tabela 6.

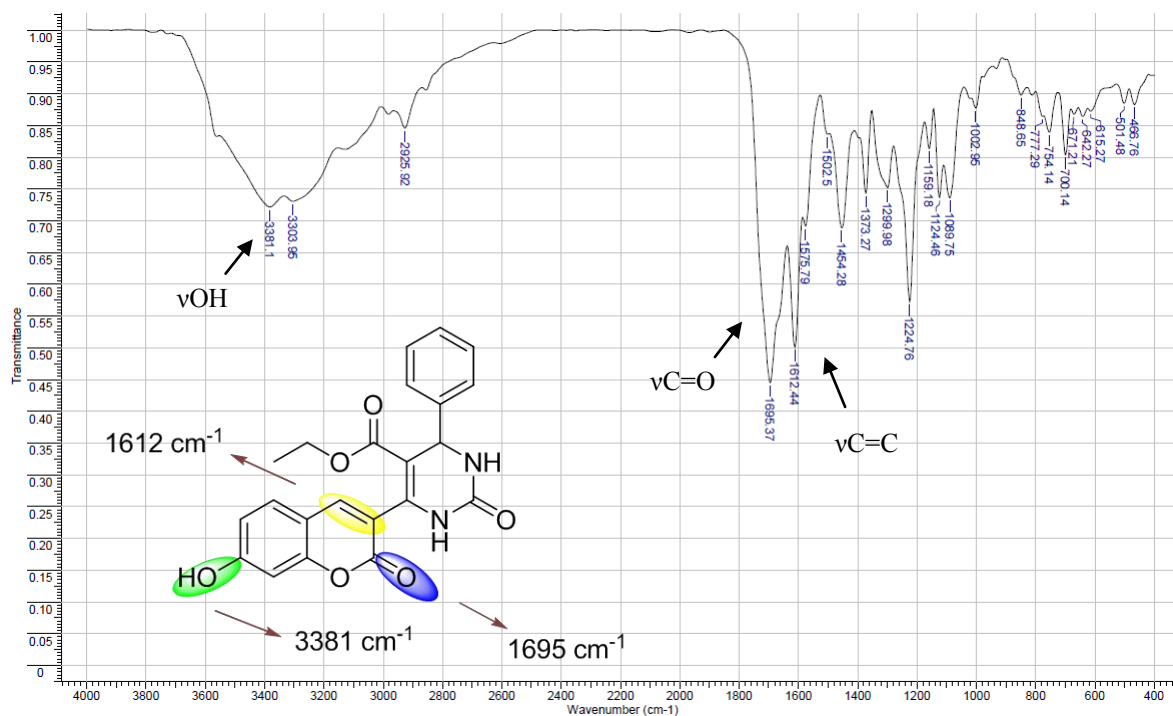
**Tabela 6.** Principais acoplamentos (C-H) apresentados no espectro HMQC de **106a**.

<b>Acoplamento C-H</b>	<b>J<sup>n</sup></b>	<b>δ<sup>1</sup>H (ppm)</b>	<b>δ<sup>13</sup>C (ppm)</b>
H4-C5	J <sup>3</sup>	7,97	130,56
H4-C11	J <sup>3</sup>	7,97	143,69
H4-C9	J <sup>3</sup>	7,97	155,68
H4-C2	J <sup>3</sup>	7,97	152,44
H5-C4	J <sup>3</sup>	7,60	142,29
H5-C9	J <sup>3</sup>	7,60	155,68
H5-C7	J <sup>3</sup>	7,60	162,16
H6-C10	J <sup>3</sup>	6,84	111,46
H8-C6	J <sup>3</sup>	6,79	113,93
H24-C26	J <sup>3</sup>	7,45	127,93
H25-C23	J <sup>3</sup>	7,39	144,49
H25-C27	J <sup>3</sup>	7,39	128,96
H26-C24	J <sup>3</sup>	7,30	127,93



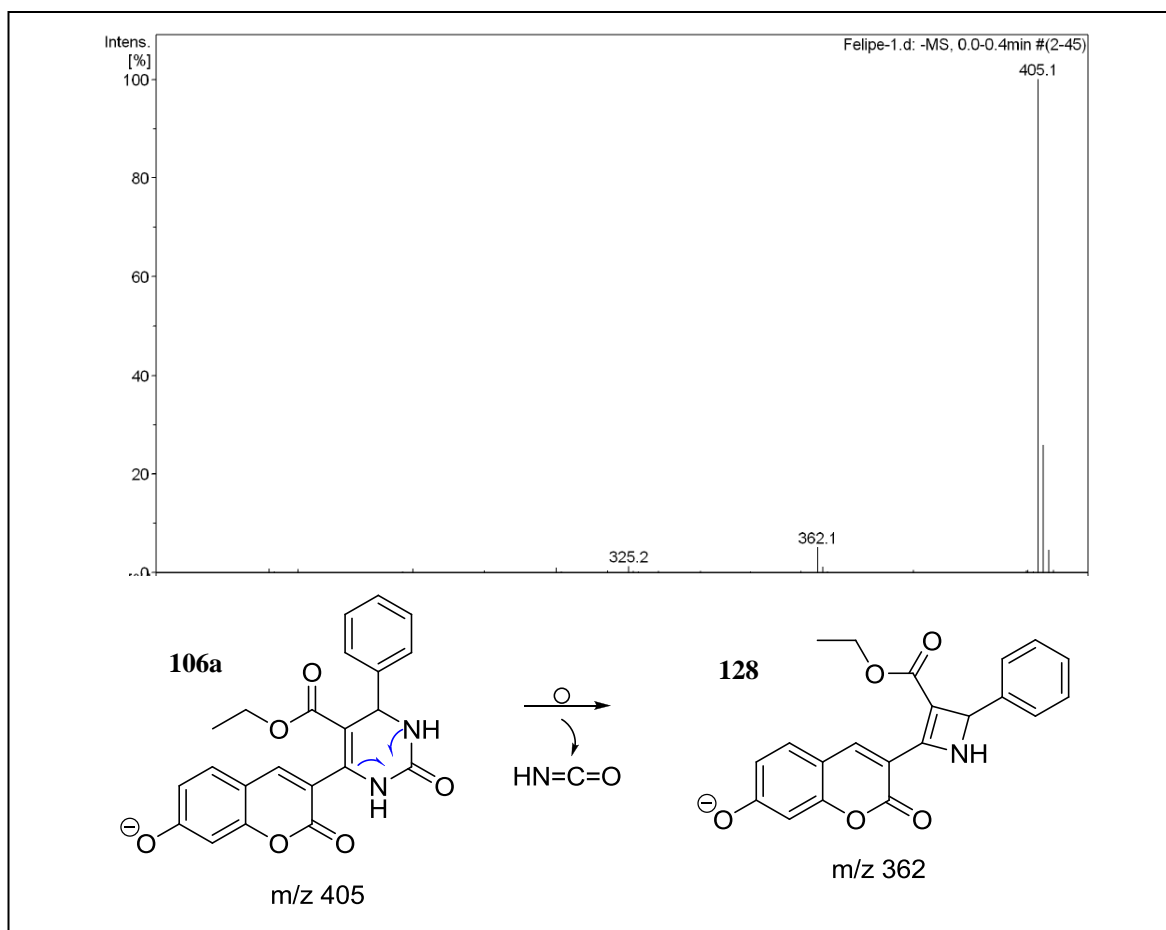
**Figura 37.** Espectro de RMN bidimensional HSQC para o produto **106a** com ampliação na região de 6,6-8,3 ppm do espectro de hidrogênio, e 110-165 ppm do espectro de carbono Acoplamento entre carbonos e hidrogênios através de três ligações covalentes,  $J^3$ .

No espectro de IV do composto **106a** (Figura 38) foi observada uma banda alargada em  $3381\text{ cm}^{-1}$  sendo esta banda característica do estiramento do grupo  $\text{-OH}$ . A banda presente em  $2925\text{ cm}^{-1}$  foi atribuída ao estiramento da ligação C-H de carbono  $sp^2$ . Em  $1695\text{ cm}^{-1}$  observou-se o estiramento do grupamento carbonila do grupo éster e amida. Observou-se ainda em  $1224\text{ cm}^{-1}$  uma banda intensa característica do estiramento da ligação C-O do grupamento éster da estrutura.



**Figura 38.** Atribuição das principais bandas do espectro de IV em pastilha de KBr do composto **106a**.

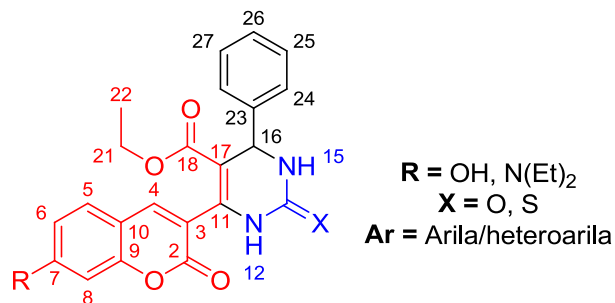
Por fim, a Figura 39 mostra o espectro de massas do composto **106a**, com fonte de ionização negativa, o pico base foi detectado como  $m/z$  405, e todos os outros picos foram elucidados pela proposta de fragmentografia mostrada na figura.



**Figura 39.** Atribuição dos principais picos do espectro de massas ionizado por eletrospray do composto **106a**.

Com a elucidação estrutural feita pelos espectros bidimensionais para o composto 4a, pôde-se atribuir correlacionar os sinais obtidos pelos espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para toda a serie de cumarinas-diidropirimidinonas conforme demonstrado nas Tabelas 7-8.

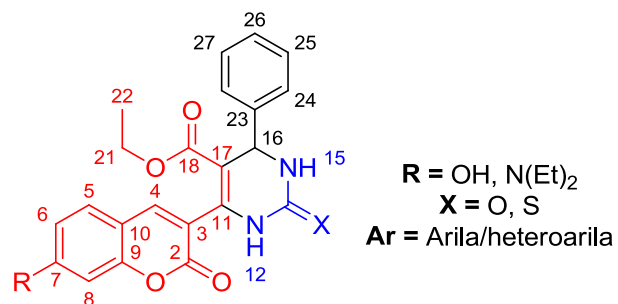
**Tabela 7.** Dados espectroscópicos de RMN de  $^1\text{H}$  dos compostos **106a-r**. Valores de  $\delta$  expressos em ppm.



<b>106</b>	H4	H5	H6	OH 7	N(Et) <sub>2</sub> 7	H8	NH 12	NH 15	H16	H21	H22	H24	H25	H26	H27	H28	26	25	27
<b>a</b>	7,97	7,6	6,84	10,71	-	6,79	9,37	7,87	5,25	3,82	0,86	7,45	7,39	7,3	7,39	7,45	-	-	-
<b>b</b>	8,02	7,6	6,85	10,76	-	6,8	9,58	8,08	5,39	3,84	0,87	8,28	7,73	-	7,73	8,28	-	-	-
<b>c</b>	7,96	7,6	6,85	10,71	-	6,79	9,33	7,79	5,15	3,83	0,87	7,23	6,75	-	6,75	7,23	9,41 (OH)	-	-
<b>d</b>	7,97	7,6	6,85	10,72	-	6,8	9,37	7,85	5,2	3,83	0,87	7,36	6,94	-	6,94	7,36	3,76 (OCH <sub>3</sub> )	-	-
<b>e</b>	7,97	7,61	6,84	10,72	-	6,79	9,4	7,89	5,21	3,84	0,86	6,88	-	7,04	7,61	7,04	-	3,77 (OCH <sub>3</sub> )	-
<b>f</b>	7,99	7,6	6,85	10,72	-	6,79	9,4	7,85	5,17	3,84	0,86	6,98	-	-	6,9	6,9	6,02 (OCH <sub>2</sub> O)		-
<b>g</b>	8	7,61	6,84	10,74	-	6,79	9,43	7,88	5,19	3,86	0,88	6,86	-	-	-	6,86	3,66 (OCH <sub>3</sub> )	3,37 (OCH <sub>3</sub> )	-
<b>h</b>	7,99	7,59	6,86	10,72	-	6,79	9,44	7,93	5,24	3,83	0,86	7,46	7,21	-	7,21	7,46	-	-	-
<b>i</b>	7,99	7,6	6,86	10,74	-	6,79	9,47	7,95	5,25	3,84	0,87	7,48	7,48	-	7,48	7,48	-	-	-
<b>j</b>	7,96	7,59	6,84	-	-	6,77	9,46	7,96	5,22	3,83	0,86	7,39	7,58	-	7,58	7,39	-	-	-
<b>k</b>	7,89	7,58	6,81	-	-	6,74	9,5	8,05	5,48	3,88	0,91	-	7,45	7,08	7	-	-	-	-
<b>l</b>	7,9	7,64	6,84	10,71	-	6,78	9,58	8,15	5,6	3,9	0,92	-	7,71	7,79	-	-	-	-	-

<b>m</b>	7,91	7,61	6,84	10,7	-	6,78	9,34	8,58	5,31	3,84	0,86	-	7,8	7,32	7,8	7,46	-	-	-
<b>n</b>	7,95	7,61	6,84	10,77	-	6,78	9,48	7,95	5,27	3,84	0,86	-	-	7,53	7,8	7,61	-	-	-
<b>o</b>	7,99	7,61	6,84	10,77	-	6,79	9,79	10,56	5,28	3,85	0,85	7,42	7,42	7,42	7,42	7,42	-	-	-
<b>p</b>	7,83	7,49	6,73	-	3,46 (CH <sub>2</sub> ); 1,14 (CH <sub>3</sub> )	6,58	9,36	7,87	5,22	3,83	0,88	7,38	7,38	7,38	7,38	7,38	-	-	-
<b>q</b>	7,82	7,49	6,74	-	3,46 (CH <sub>2</sub> ); 1,14 (CH <sub>3</sub> )	6,58	9,31	7,8	5,17	3,84	0,89	7,36	6,93	-	6,93	7,36	3,75 (OCH <sub>3</sub> )	-	-
<b>r</b>	7,58	7,29	6,58	-	3,42 (CH <sub>2</sub> ); 1,22 (CH <sub>3</sub> )	6,48	8,15	6,35	5,44	3,97	0,99	7,32	7,42	-	7,42	7,32	-	-	-

**Tabela 8.** Dados espectroscópicos de RMN de  $^{13}\text{C}$  dos compostos **106a-r**. Valores de  $\delta$  expressos em ppm.



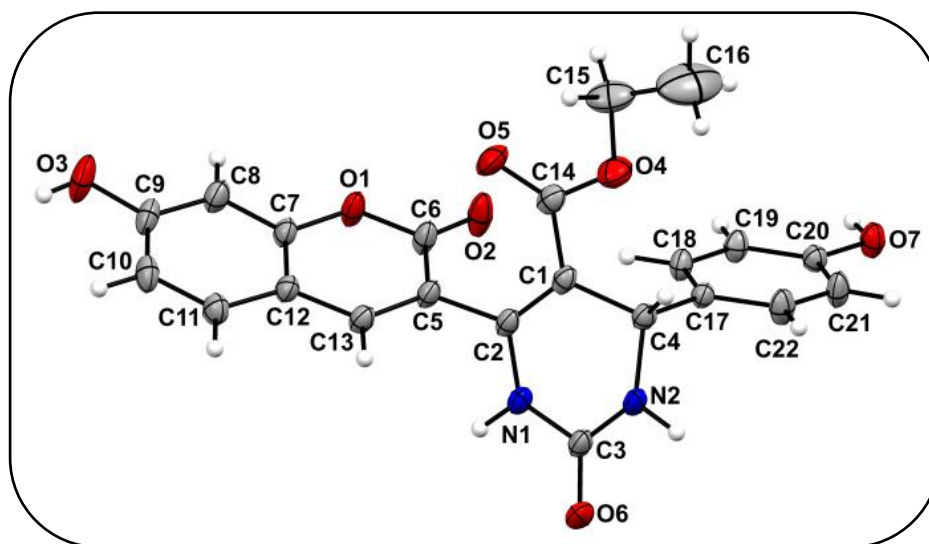
<b>106</b>	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C13	C16	C18	C21	C22	C23	C24	C25	C26	C27	C28
<b>a</b>	152,44	199,55	142,29	130,56	113,93	162,16	102,44	155,68	111,46	143,69	159,12	54,60	164,88	59,92	14,05	144,49	124,05	128,96	127,93	128,96	124,05
<b>b</b>	155,71	119,12	142,57	130,64	114,04	162,29	102,48	155,71	111,36	144,46	159,13	54,14	164,71	60,16	14,07	151,61	124,38	128,40	147,39	128,40	124,38
<b>c</b>	152,50	119,88	142,21	130,54	113,91	162,09	102,43	157,24	111,49	143,20	159,15	54,05	164,93	59,87	14,11	135,08	128,24	115,55	155,65	115,55	128,24
<b>d</b>	152,48	119,62	142,26	130,57	113,92	162,12	102,44	159,11	111,47	143,40	159,15	53,94	164,91	59,91	14,11	136,66	128,24	114,27	155,66 (C) 55,56 (OCH <sub>3</sub> )	114,27	128,24
<b>e</b>	152,47	119,51	142,26	130,59	113,95	162,23	102,44	159,18	111,42	145,89	159,85	54,40	164,89	59,94	14,11	143,76	112,76	155,68 (C) 55,47 (OCH <sub>3</sub> )	113,30	119,19	130,05



<b>f</b>	152,36	119,53	142,30	130,59	113,94	162,15	102,44	159,22	111,45	143,62	156,64	54,22	164,85	59,95	14,11	138,41	107,42	147,83	147,03 (C) 101,44 (OCH <sub>2</sub> O)	106,56	120,35
<b>g</b>	152,37	119,85	142,20	130,65	113,96	162,19	102,45	155,81	111,43	143,92	159,46	54,31	164,87	59,44	14,18	137,10	104,20	153,33 (C) 56,23 (OCH <sub>3</sub> )	122,44 (C) 60,41 (OCH <sub>3</sub> )	153,33 (C) 56,23 (OCH <sub>3</sub> )	104,20
<b>h</b>	152,33	119,35	142,39	130,57	114,00	162,94	102,45	155,67	111,36	143,82	159,18	53,65	164,82	59,96	14,08	140,71	129,03	115,04	162,31	115,04	129,03
<b>i</b>	152,31	119,35	142,42	130,61	113,98	162,20	102,45	155,68	111,42	143,94	159,14	53,95	164,60	60,03	14,09	143,44	128,98	128,98	132,57	128,98	128,98
<b>j</b>	152,34	118,92	142,49	130,51	114,22	162,93	102,49	155,77	111,09	143,66	159,20	54,01	164,93	60,02	14,09	144,32	129,32	131,88	121,09	131,88	129,32
<b>k</b>	152,60	118,57	142,55	130,67	114,27	163,17	102,48	155,86	110,97	143,85	159,05	49,89	164,67	60,08	14,16	148,27	-	124,62	127,21	125,68	-
<b>l</b>	152,46	118,68	142,58	130,73	113,95	162,29	102,42	155,77	111,33	144,76	158,77	52,27	164,51	60,19	14,15	172,64	-	142,89	121,10	-	-
<b>m</b>	152,70	119,51	142,30	130,60	113,91	162,16	102,41	155,68	111,14	144,22	159,05	56,30	164,94	59,38	14,11	-	-	149,84	121,91	137,33	123,27
<b>n</b>	152,32	119,27	142,42	130,64	113,98	162,24	102,45	155,71	111,39	144,62	159,07	56,88	164,79	60,01	14,10	163,79	-	141,48	127,59	140,91	120,59
<b>o</b>	159,25	118,58	142,94	130,65	113,95	174,64	102,43	162,22	111,45	143,17	164,67	54,69	184,23	60,32	14,03	140,61	127,24	129,15	128,93	129,15	127,27
<b>p</b>	151,26	116,11	142,56	130,22	109,50	159,61 (C) 44,55 (CH <sub>2</sub> ) 12,79 (CH <sub>3</sub> )	96,75	152,66	107,75	144,23	156,60	54,51	165,07	59,83	14,18	144,55	127,05	128,83	127,94	128,83	127,05

<b>q</b>	151,24	116,20	142,49	130,19	109,50	159,63 (C) 44,55 2(CH <sub>2</sub> ) 12,79 2(CH <sub>3</sub> )	96,76	156,59	107,76	143,93	159,94	53,67	165,09	59,79	14,21	136,72	128,22	114,23	152,67 (C) 55,55 (OCH <sub>3</sub> )	114,23	128,22
<b>r</b>	153,21	-	142,57	129,88	113,92	159,85 (C) 44,97 2(CH <sub>2</sub> ) 12,45 2(CH <sub>3</sub> )	109,23	156,75	103,43	141,72	159,85	55,11	164,56	60,44	13,88	133,72	128,99	128,33	127,79	128,33	128,99

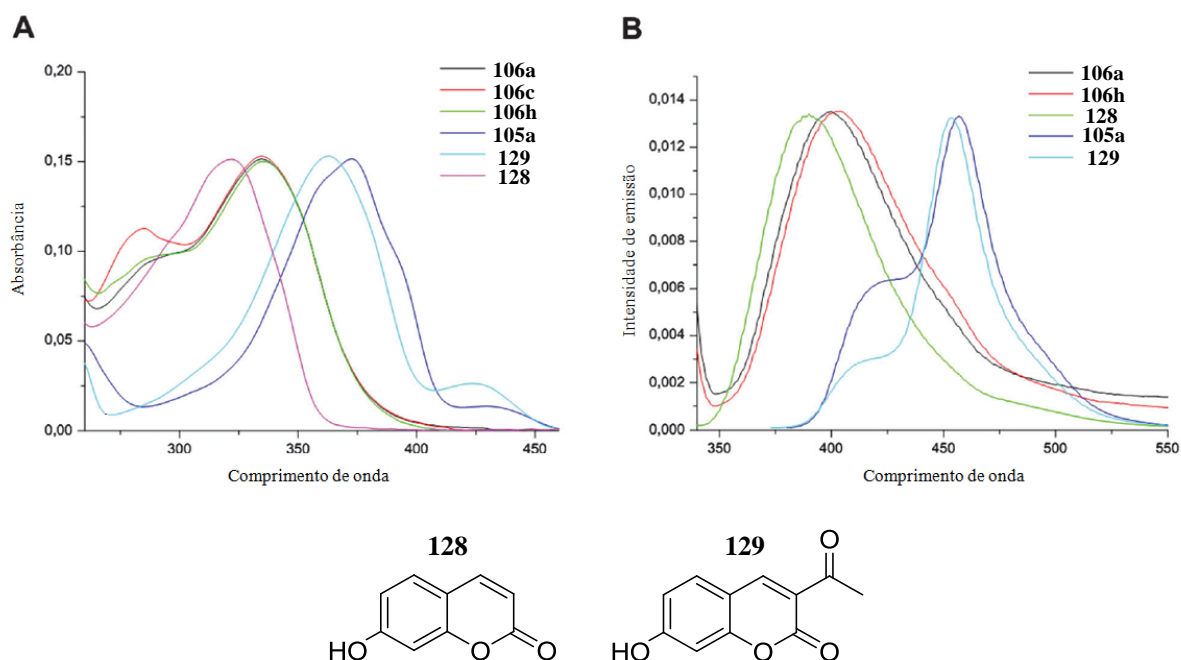
Além disso, cristais prismáticos incolores do derivado **106c** adequados para difração de raios-X foram obtidos por meio de evaporação lenta de uma solução em mistura de hexano:acetato de etila à temperatura ambiente e confirmou a formação do núcleo diidropirimidinônico. O composto **106c** cristaliza num grupo espacial P-1 triclínico e a estrutura molecular é mostrada na Figura 40.



**Figura 40.** Estrutura molecular do composto **106c**. Elipsóides térmicos são desenhados a 40% de probabilidade. A cristalização da molécula de solvente foi omitida por razões de clareza.

### 3.1.5 Estudos de caracterização fotofísica

Como dito nos objetivos, o uso de compostos orgânicos como teranósticos passa pela necessidade do mesmo poder ser detectado no tecido alvo devido a suas características de fluorescência. Assim, algumas características fotofísicas da série de cumarinas-diidropimidinonas foram analisadas em três compostos representativos da série: **106a** (Ph), **106c** (4-OH-Ph) e **106h** (4-F-Ph). Inicialmente os compostos tiveram suas absorções no UV-Vis, emissão de fluorescência e rendimentos quânticos analisados (Figura 41; Tabela 9). A análise espectroscópica foi feita, num primeiro momento, em metanol usando 7-hidroxi-2H-cromen-2-ona (umbeliferona – **128**) e 3-acetil-7-hidroxi-2H-cromen-2-ona (**129**) como padrões. As mesma análises foram feitas para o composto precursor da serie estudada (**105a**).



**Figura 41.** Análises espectrais para os derivados cumarínicos. **A** – Espectro de UV-Vis em metanol normalizado. **B** – Espectro de emissão de fluorescência em metanol normalizado, com excitação em  $\lambda_{\max}$  para cada derivado.

Os espectros de UV-Vis mostraram propriedades estruturais interessantes da série. Estes poderiam fazer uma extensão de conjugação devido a presença da subunidade cinâmica, porém os compostos **106a**, **106c** e **106h** possuem um espectro muito similar ao espectro da umbeliferona (**128**). No composto **105a** e 3-acetil-7-hidroxi-2H-cromen-2-ona (**129**), a subunidade cumarínica pode fazer conjugação com o grupo cetona lateral. Como se pôde observar, **105a** e **129** exibiram bandas duplas de absorções com máximo de absorção em 370 nm e mínimo em 430 nm, diferentemente das diidropirimidinonas (**106a**) e da umbeliferona (**128**).

**Tabela 9.** Dados espectroscópicos dos derivados cumarínicos.

Composto	Solvente	Abs $\lambda_{\max}$ (nm)	Emissão $\lambda_{\max}^a$ (nm)	Rendimento Quântico $\phi$	Deslocamento de Stokes
<b>105a</b>	Metanol	372	456	0,73 <sup>a</sup>	84
	Água	424	458	0,62 <sup>a</sup>	34
	EtOAc	363	424	0,0055 <sup>a</sup>	61
<b>106a</b>	Metanol	335	398	0,011 <sup>b</sup>	63
	Água	337	452	0,055 <sup>b</sup>	115
	EtOAc	327	399	0,013 <sup>b</sup>	72

<b>106c</b>	Metanol	335	412	0,0044 <sup>b</sup>	77
	Água	337	452	0,032 <sup>b</sup>	115
	EtOAc	327	406	0,012 <sup>b</sup>	79
<b>106h</b>	Metanol	335	404	0,015 <sup>b</sup>	69
	Água	337	451	0,11 <sup>b</sup>	114
	EtOAc	327	404	0,022 <sup>b</sup>	77
<b>128</b>	Metanol	324	392	0,23 <sup>c</sup>	68
	Água	337	451	0,79 <sup>c</sup>	114
	EtOAc	327	382	0,018 <sup>c</sup>	55
<b>129</b>	Metanol	361	457	0,43 <sup>c</sup>	96
	Água	424	452	0,79 <sup>c</sup>	28
	EtOAc	363	408	<0,001 <sup>c</sup>	51

<sup>a</sup> Determinado usando 3-acetil-7-hidroxi-2H-cromen-2-ona (**129**) como padrão. <sup>b</sup> Determinado usando umbeliferona (**128**) como padrão. <sup>c</sup> Valores obtidos de AZUMA *et al.*, 2003.

De fato, a difração de raios-X já havia demonstrado uma conformação dobrada entre as subunidades da cumarina e do éster cinâmico, o que impede a conjugação dos elétrons  $\pi$  entre esses dois sistemas e que provavelmente se mantém em solução. O leve deslocamento batocrômico (14 nm) observado para os compostos de Biginelli comparado com a umbeliferona (**128**) indica que provavelmente uma transferência interna de carga (Internal Charge Transfer – ICT) pode estar acontecendo entre o anel da cromenona e a subunidade cinâmica do éster (VITÓRIO *et al.*, 2015).

Os espectros de emissão de fluorescência das cumarinas-diidropirimidinonas demonstram uma correlação com o da umbeliferona (**128**), enquanto os espectros de **105a** e **129** mostram dois comprimentos de onda de emissão. Novamente um deslocamento batocrômico quando comparado a **128** e uma redução no rendimento quântico (Tabela acima) reforçam a ideia de que haja uma transferência interna de carga ocorrendo nos compostos obtidos. Curiosamente, embora o sistema aromático do núcleo diidropirimidinona não apresente conjugação direta com a subunidade cinâmica, este influencia a fluorescência de alguma forma, a Tabela 9 mostra inclusive que o composto mais emissivo é o que possui um substituinte retirador de elétrons no anel aromático (**106h**), enquanto o menos emissivo é o que possui um grupo doador de elétrons (**106c**).

O aumento da polaridade do solvente levando a um deslocamento batocrômico no espectro de absorção máxima (abs  $\lambda_{\text{max}}$ ) indicou que as principais bandas observadas são correspondentes a uma transição eletrônica do tipo  $\pi\text{-}\pi^*$  dos compostos. O fenômeno de ICT é conhecido por ser estabilizado em solventes com grandes constantes dielétricas levando a um deslocamento para o vermelho nas absorções e emissões máximas (CIGÁN *et al.*, 2013). De fato, em água os compostos **106a**, **106c** e **106h** exibiram os maiores deslocamentos batocrômicos, oriundos de uma ICT. O metanol é um solvente mais polar que o acetato de etila, por exemplo,  $\epsilon=32,7$  e  $\epsilon=6,02$  respectivamente, os resultados mostraram que somente a água ( $\epsilon=80,1$ ) foi capaz de melhor estabilizar a ICT (Tabela 9). A ICT em cumarinas foi correlacionada com a habilidade de solventes muito polares em estabilizar seus estados singletes excitados (DAHIYA *et al.*, 2005; SATPATI, *et al.*, 2009).

A medida dos rendimentos quânticos ( $\phi_F$ ) das diidropirimidinonas indicou uma redução em comparação com a umbeliferona (**128**) devido à ICT. Novamente, os  $\phi_F$  para **106a**, **106c** e **106h** não apresentaram diferenças significativas entre os solventes metanol e acetato de etila. Porém, inesperadamente, em água os compostos analisados mostraram um aumento no  $\phi_F$  de até 5 vezes. Nesta caso era esperado uma redução no  $\phi_F$ , uma vez que em solventes mais polares a ICT é melhor estabilizada. O fenômeno inverso apresentado pode ser explicado pela redução no giro feito pelas ligações simples envolvidas na transferência de carga no estado excitado para alguns solventes específicos, como descrito para outras cumarinas (CIGÁN *et al.*, 2013).

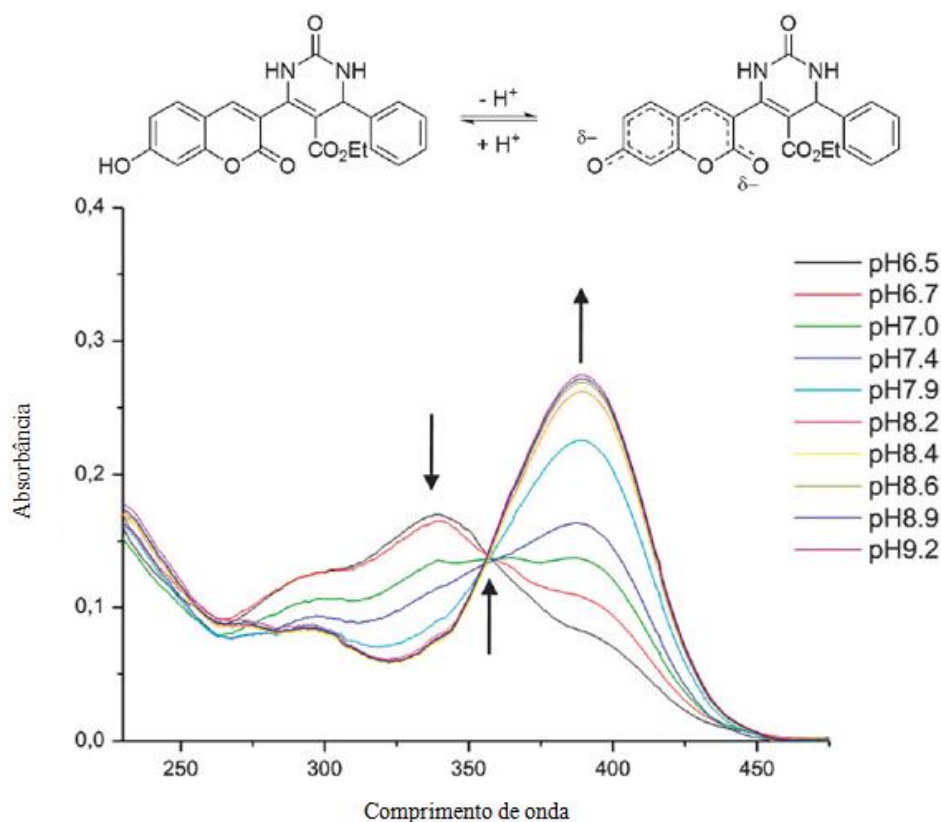
O aumento no rendimento quântico em água somado também a bons deslocamentos de Stokes<sup>1</sup>, por volta de 115 nm, para as cumarinas-diidropirimidinonas, e a transferência interna de carga (ICT), validam esses compostos para o uso e a elaboração de novas sondas químicas e biológicas por fluorescência.

Como já conhecido e descrito na introdução deste trabalho, as hidroxí-cumarinas podem atuar como indicadores de pH e, devido a isto, suas fluorescências são sensíveis a variações de pH em meio aquoso. Desta forma, o pKa do composto **106a** foi determinado através de uma titulação espectrofotométrica (Figura 42). Foi observado que com o aumento

---

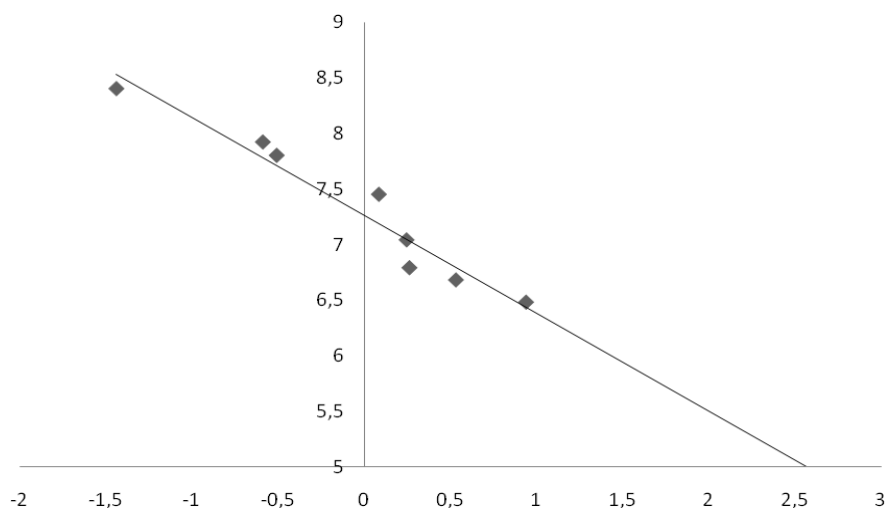
<sup>1</sup> O deslocamento de Stokes pode ser calculado a partir da diferença entre os  $\lambda_{\text{max}}$  de emissão e de absorção.

do pH há um efeito hipocrômico na banda centrada em 335 nm, enquanto um efeito hiperacrômico foi observado na banda centrada em 390 nm, formando um ponto isobéstico em aproximadamente 355 nm.



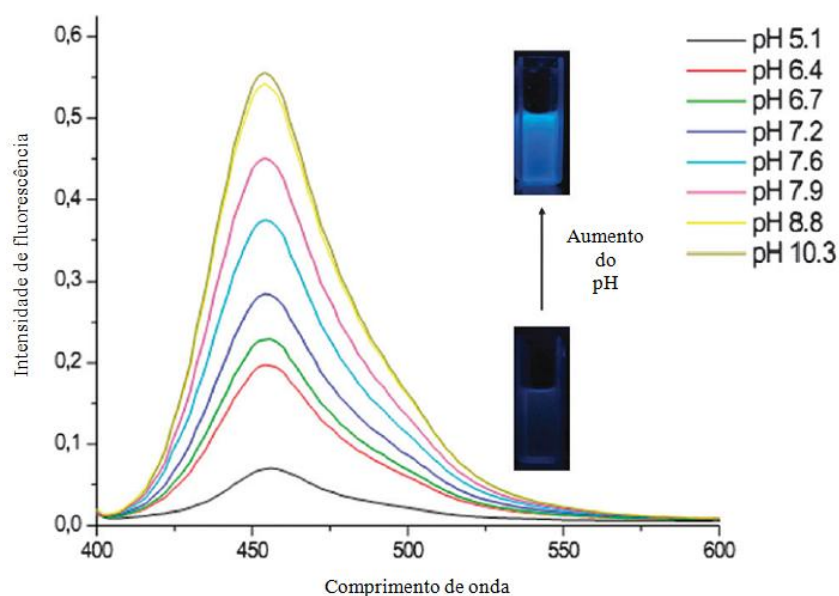
**Figura 42.** Titulação espectrofotométrica do composto **106a** (6  $\mu$ M) em água.

Um gráfico de pH versus  $\log \left( \frac{A - A_f}{A_0 - A} \right)$  foi plotado e o valor de pKa para o composto **106a** foi determinado em 7,49 (Figura 43). Adicionalmente, uma maior diminuição do pH não levou a nenhuma mudança no espectro de absorção no UV-Vis (não demonstrado). Uma preocupação com sondas sensíveis ao pH é a determinação dos pKa's, uma vez que em pHs abaixo destes valores há uma redução da fluorescência devido a redução da ionização da hidroxila fenólica. Fortuitamente, o pKa determinado para os compostos sintetizados permite que os mesmos sejam utilizados como sondas em meio fisiológico (pH=7,4), sem que haja grande comprometimento da fluorescência.



**Figura 43.** Determinação de pKa em função de  $\log\left(\frac{A-A_p}{A_0-A}\right)$  para o composto (**106a**), obtido através de valores de absorvância em 390nm (FRIN, 2008).

Vale destacar que os indicadores de pH fluorescentes como as cumarinas são empregados numa faixa de pH em torno do pKa de seu estado fundamental. Na verdade, em pH fisiológico o composto **106a** apresentou um aumento de cerca de 6 vezes na fluorescência quando comparada com a sua forma menos ionizada (aprox pH 5), atingindo o seu máximo de fluorescência a um pH de cerca de 9, onde este apresentou uma intensidade de fluorescência 11 vezes maior (Figura 44).

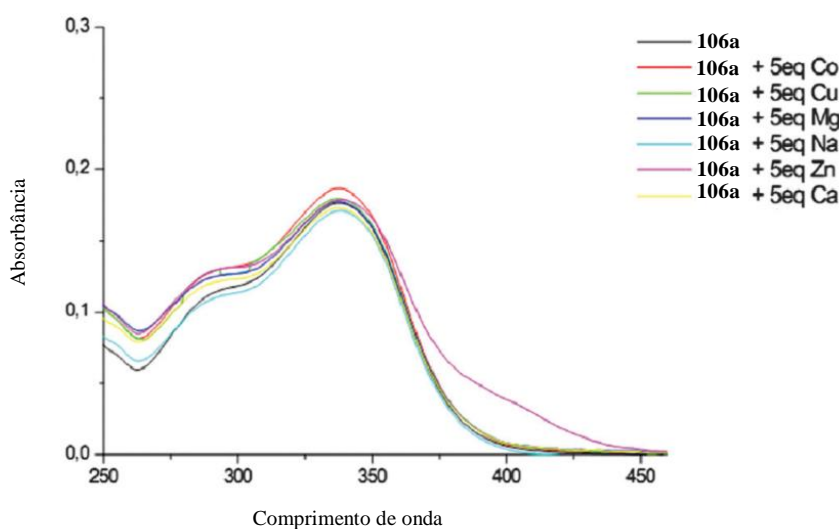


**Figura 44.** Espectro de fluorescência do composto **106a** (6  $\mu$ M) em água, com aumento de pH e  $\lambda_{exc}$  em 337 nm.



Embora o aumento do pH tenha conduzido a uma alteração no espectro de absorção de UV-vis, não foram observadas modificações na fluorescência. Este é um comportamento típico de fluoróforos que se submetem a transferência de prótons fotoinduzida (através de excitação eletrônica) sem que haja transferência de elétrons. Isso poderia ser explicado porque as cumarinas-diidropirimidinonas, como outras cumarinas, são muito mais ácidas no estado excitado quando comparadas aos seus estados fundamentais. Desta forma, quando o composto **106a** foi ensaiado em um pH próximo do pKa no estado fundamental, *i.e* um pH de aproximadamente 7,5, a estrutura emissiva estava quase que exclusivamente na sua forma ionizada, devido à desprotonação da forma ácida no estado excitado (VALEUR et al., 2001).

Finalmente, como as cumarinas também são descritas como sondas que complexam metais (LI *et al.*, 2012) e alguns destes estão presentes nos meios biológicos, como em compartimentos celulares onde as cumarinas-diidropirimidinonas deverão ser usadas, alguns dos mais importantes metais ( $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^{1+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  e  $\text{Ca}^{2+}$ ) foram testados como possíveis interferentes. A Figura 45 mostra que não houve qualquer mudança significativa nos espectros de absorção no UV-Vis quando 5 equivalentes de cada metal foi adicionado sobre uma solução do composto **106a**, indicando que as cumarinas-diidropirimidinonas não se complexam com os metais testados, o que associado a grande fluorescência em pH fisiológico e deslocamento de Stokes validam a série como candidatos a sondas biológicas de fluorescência.

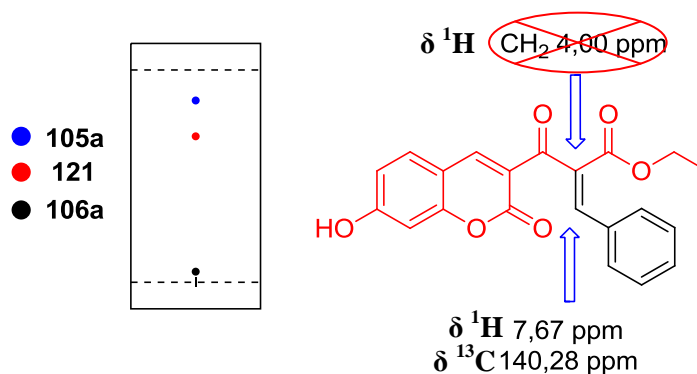


**Figura 45.** Espectro UV-Vis do composto **106a** (6  $\mu\text{M}$ ) em água e **106a** (6  $\mu\text{M}$ ) com adição de 5 equivalentes de  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^{1+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  e  $\text{Ca}^{2+}$ .

## 4 – CONCLUSÕES

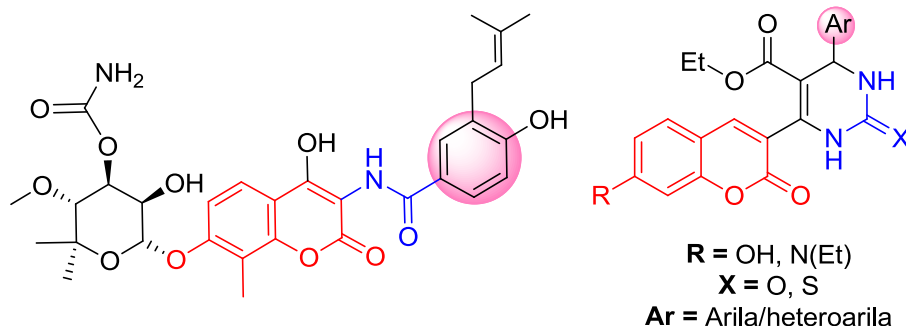
A metodologia de construção da quimioteca mostrou-se reprodutível, levando a obtenção de 18 novos compostos (**106a-r**) através da otimização da reação multicomponente de Biginelli.

Obtivemos com sucesso, a partir do protocolo da Reação de Biginelli (RMC), novas 3,4-diidropirimidin-2 (1*H*)-onas/ tionas (**106a-r**). Esta é a primeira descrição da cumarina beta-cetoéster utilizada para esta finalidade (**105a-b**). O melhor protocolo encontrado faz a utilização de um catalisador clássico ácido Bronsted (HCl). Foi determinada a melhor concentração catalítica devido à instabilidade das cumarinas nestas condições. Ácidos de Bronsted fracos, assim como ácidos/base de Lewis foram testados e não conduziram aos produtos desejados, diferentemente do que se diz na literatura para este tipo de catalise. Desde o início de todo o processo de síntese, pode-se observar uma quantidade considerável de um produto proveniente de uma condensação de Knoevenagel, que era consumido quando um ácido de Bronsted era adicionado ao meio reacional levando então a conversão deste nas diidropirimidinonas. Propusemos este produto (**121**) de Knoevenagel como um intermediário importante nas nossas reações, ao contrário das descrições anteriores para a síntese Biginelli.



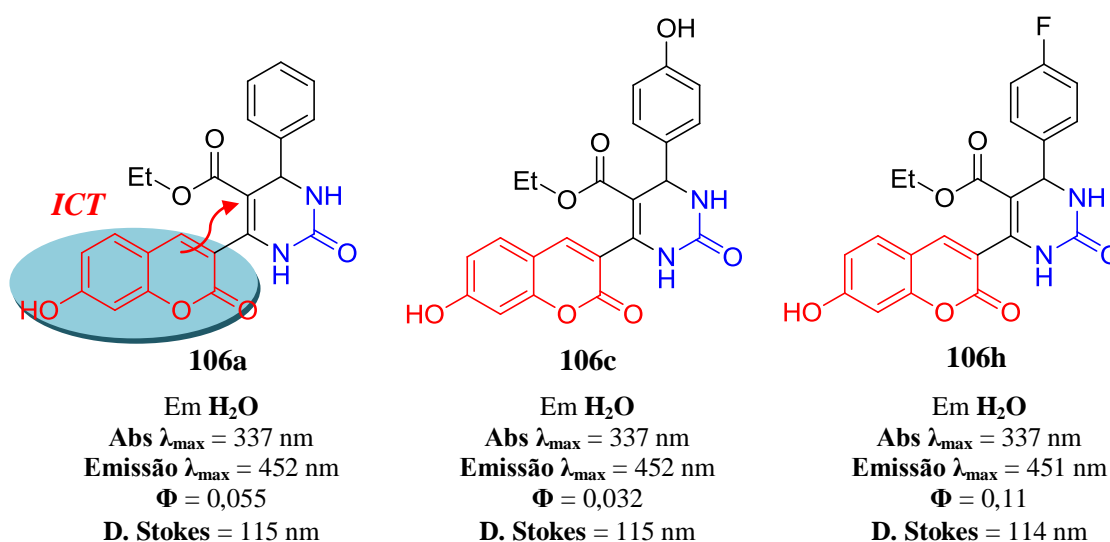
Com a observação do aparecimento de um produto não esperado pela CCD, devido sua coloração diferenciada, o mesmo foi isolado e caracterizado por RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , IV e massas, como um intermediário de Knoevenagel, cuja via mecanística havia sido considerada improvável. Com isso o trabalho trás um desafio para a busca da determinação do mecanismo da reação de Biginelli com diversos substratos.

Os métodos sintéticos aplicados à construção da quimioteca de *Diidropirimidinonas* (**106a-r**) mostraram-se viáveis e com rendimentos variando de 25 a 99%. Os produtos sintetizados mostram também grande similaridade ao protótipo natural, novobiocin (**24**).



Finalmente a avaliação das propriedades fluorescentes das cumarinas-diidropirimidinonas (**106a; c; h**), revelou através de uma síntese simples e adaptável, a obtenção de novas sondas de pH baseadas no fenômeno de transferência interna de carga (ICT) que pode se útil em processos químicos e biológicos.

Temos como perspectivas os ensaios biológicos dos compostos sintetizados frente às linhagens de células tumorais MCF-7 e SKBr3, que possuem alta expressão da enzima Hsp90, como já descrito nesse trabalho. Pretendemos realizar os testes, em parceria com o Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio). Dentre outros experimentos que serão determinadas pelo nosso grupo de pesquisa.



## 5 – PARTE EXPERIMENTAL

### 5.1 Metodologia Sintética

A fase orgânica das reações foi tratada com sulfato de sódio anidro, filtrada e o solvente foi evaporado à pressão reduzida em evaporador rotatório IKA RV10 e HB10.

Para a cromatografia em camada delgada (c.c.d.) foram utilizadas placas de alumínio Kieselgel 60 (HF-254, Merck) com 0,2 mm de espessura. A visualização das substâncias em c.c.d. foi realizada em lâmpada ultra violeta (254 e 365 nm).

A determinação dos pontos de fusão foi realizada em aparelho AAKER modelo PFM II e os valores não foram corrigidos.

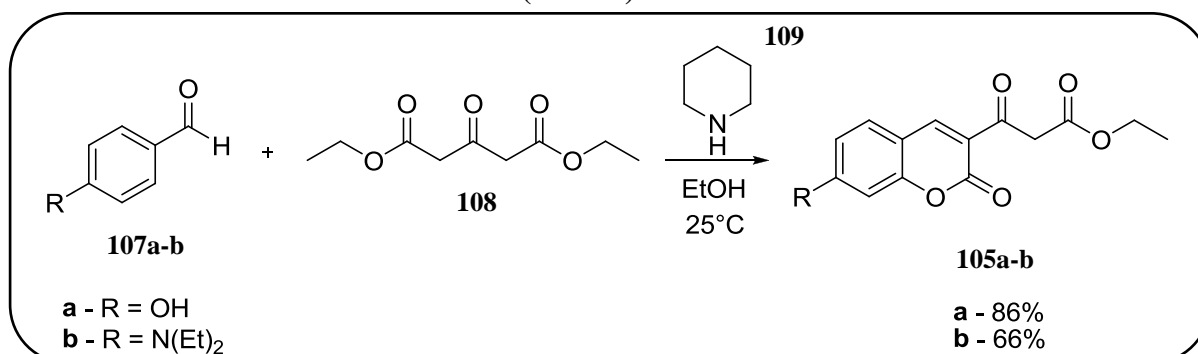
Os espectros de RMN-<sup>1</sup>H 1D e 2D foram obtidos em aparelhos RMN Brucker AVANCE-400 MHz (DEQUIM-UFRRJ) ou RMN Brucker AVANCE-500 MHz (DEQUIM-UFRRJ), operando a 400 MHz e 500 MHz respectivamente. As amostras foram dissolvidas em DMSO-*d*<sub>6</sub> ou CDCl<sub>3</sub> contendo tetrametilsilano (TMS) como referência interna e colocadas em tubos de 5 mm de diâmetro. Os espectros de RMN-<sup>13</sup>C 1D e 2D foram obtidos à 100 MHz ou 125 MHz, em aparelho RMN Brucker AVANCE-400 MHz (DEQUIM-UFRRJ) ou RMN Brucker AVANCE-500 MHz (DEQUIM-UFRRJ) respectivamente, e as amostras foram dissolvidas em DMSO-*d*<sub>6</sub> ou CDCl<sub>3</sub> contendo TMS como referência interna.

As áreas dos picos foram obtidas por integração eletrônica e sua multiplicidade descrita com: s-simpleto / d-duplo / t-triplo / q-quadruplo / m-multiplo / dd-duplo duplo.

Os espectros de infravermelho (IV) foram obtidos em um espectrômetro Perkin-Elmer - Modelo 1600 (DEQUIM-UFRRJ). As amostras foram examinadas sob a forma de pastilhas de brometo de potássio (KBr). Os valores de absorção foram pulsados em número de onda, utilizando como unidade o centímetro recíproco (cm<sup>-1</sup>). Os espectros de massas foram obtidos em modo de ionização negativa no aparelho Esquire 6000-ESI Ion Trap MSn System Bruker Daltonics e os dados foram analisados no software Compass 1.3.SR2.

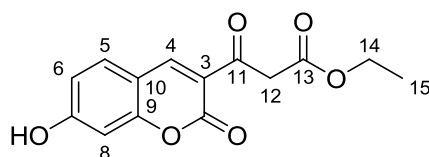
Nas cromatografias de adsorção em coluna, utilizou-se gel de sílica 100-200 *mesh* (Merck) como fase estacionária e *n*-hexano:acetato de etila como fase móvel.

## 5.2 Síntese dos betacetoésteres (105a-b)



A uma solução de 3,1 mmol do respectivo aldeído (**107a-b**) em 10 mL de EtOH, mantida à 25°C, adicionou-se seguidamente, 1 mmol de oxopentandiato de dietila (**108**) e 0,7 mmol de piperidina. A reação foi acompanhada por cromatografia em camada fina e após *ca.* 24h foi evidenciado o total consumo do produto de partida (**107a-b**). A purificação do produto precipitado no meio reacional foi de filtração em funil de Büchner com lavagem de 90 ml de EtOH gelado, levando, após secura do produto, aos ésteres desejados em rendimentos de 66 a 86%.

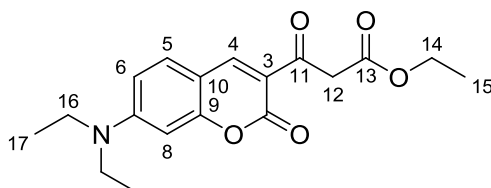
**5.2.1 – 3-(7-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)-3-oxopropanoato de etila (105a) – sólido amorfo amarelo, p.f. 143°C.**



**RMN <sup>1</sup>H (500 MHz) DMSO-*d*<sub>6</sub> / TMS (δ-ppm):** OH7=11,31 (1H, s), H4=8,71 (1H, s), H5=7,84 (1H, d, J 8,5 Hz), H6=6,88 (1H, d, J 8,2 Hz), H8=6,78 (1H, s), H14=4,12 (2H, q), H12=4,00 (2H, s), H15=1,18 (3H, t). **RMN <sup>13</sup>C (125 MHz) DMSO-*d*<sub>6</sub> / TMS (δ -ppm):** C11=190,34; C13=168,14; C2=165,17; C7=159,72; C9=157,89; C4=149,29; C5=133,57; C3=118,44, C6=114,99; C10=111,31; C8=102,32; C14=60,89; C12=48,74; C15=14,47. **I.V.**

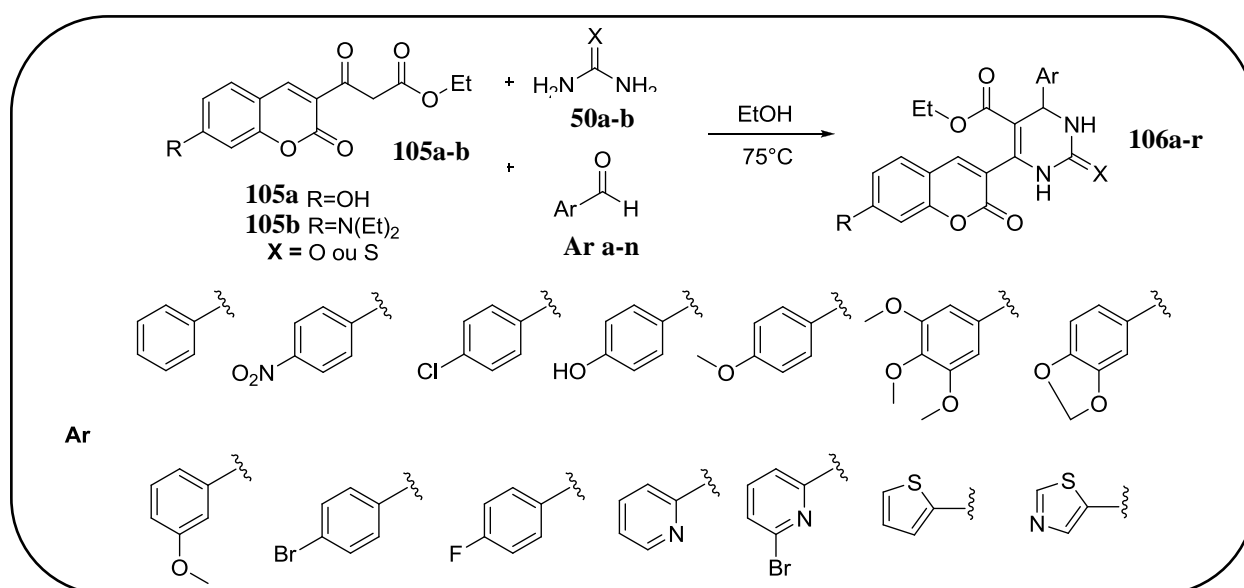
**Max. (filme)  $\gamma - \text{cm}^{-1}$ :** 3485,26, 1712,73, 1602,79. **MS (ESI-)  $m/z$ :** 275,0, 229,0, 185,0, 157,0; **MS/MS ( $m/z$  275,0):** 275,0, 228,9, 185,0.

**5.2.2 – 3-(7-(dietilamino)-2-oxo-2H-cromen-3-il)-3-oxopropanoato de etila (105b) – sólido amorfo laranja, p.f. 109°C.**



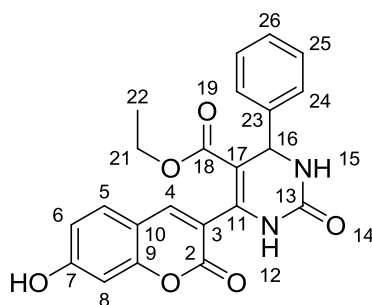
**RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz)  $\text{DMSO-}d_6$  / TMS ( $\delta$  -ppm):** H4=8,56 (1H, s), H5=7,69 (1H, d, J 8,8 Hz), H6=6,82 (1H, d, J 9,1 Hz), H8=6,59 (1H, d), H14=4,10 (2H, q), H12=3,94 (2H, s), H16=3,51 (4H, q) H 15 e H17=1,16 (9H, m). **RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz)  $\text{DMSO-}d_6$  / TMS ( $\delta$ -ppm):** C11=189,82; C13=168,40; C2=160,54; C9=158,87; C7=153,80; C4=148,70; C5=133,23; C3=114,03; C6=110,90; C10=108,12; C8=96,31; C14=60,75; C12=48,76; C16=44,97; C15=14,49; C17=12,80. **I.V. Max. (KBr)  $\gamma - \text{cm}^{-1}$ :** 3442,82, 1741,66, 1716,59. **MS (ESI-)  $m/z$ :** 330,1, 275,0, 229,0, 185,0; **MS/MS ( $m/z$  330,0)** 330,1, 284,1, 262,1, 216,1, 188,1, 145,0.

### 5.3 Síntese dos produtos de Biginelli (106a-o)



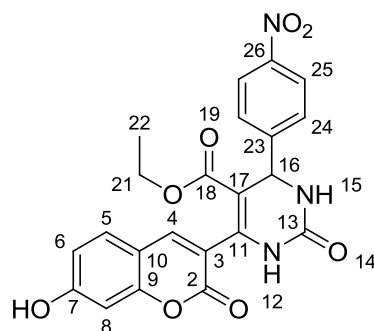
A uma solução de 0,3 mmol do betacetoéster (**105a-b**) em 2 mL de EtOH, 0,35 mmol de uréia ou tiouréia, 0,5 mmol de aldeídos correspondentes e 12,5 uL de HCl à 37% como catalisador. Após agitação a 75°C por 24h, a mistura pastilhada e cromatografada em coluna de sílica gel e hexano:acetato de etila como eluente. A evaporação do solvente sob pressão reduzida levou aos produtos de Biginelli com rendimentos de até 99%.

**5.3.1 – 6-(7-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)-2-oxo-4-fenil-1,2,3,4-tetrahidropirimidinona-5-carboxilato de etila (106a)** – sólido bege, 68% de rendimento após purificação, p.f. 219°C.



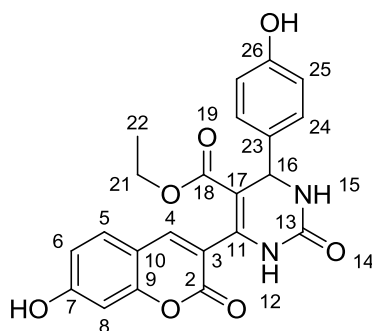
**RMN <sup>1</sup>H (500 MHz) DMSO-*d*<sub>6</sub> / TMS (δ -ppm):** OH7=10,71 (1H, s), NH12=9,37 (1H, s), H4=7,97 (1H, s), NH15=7,87 (1H, s), H5=7,60 (1H, d, J 8.5 Hz), H24-H28=7,42 (5H, m), H6=6,84 (1H, d, J 8,3 Hz), H8=6,79 (1H, d), H16=5,25 (1H, d, J 3,2 Hz), H21=3,84 (2H, q), H22=0,86 (3H, t). **RMN <sup>13</sup>C (125 MHz) DMSO-*d*<sub>6</sub> / TMS (δ -ppm):** C18=164,88; C7=162,13; C13=159,14; C9=155,65; C2=152,42; C23=144,49; C11=143,69; C4=142,29; C5=130,58; C27=128,98; C24=127,05, C3=119,55; C6=113,93; C10=111,45; C8=102,43; C21=59,94; C16=54,56; C22=14,08. **I.V. Max. (KBr) γ – cm<sup>-1</sup>:** 3381,1, 1695,37, 1612,44, 1224,76. **MS (ESI-) m/z:** 405,1, 362,1, 325,2; **MS/MS (m/z 405,0)** 406,1, 362,1;

**5.3.2 – 6-(7-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)-4-(4-nitrofenil)-2-oxo-1,2,3,4-tetrahidropirimidinona-5-carboxilato de etila (106b)** – sólido bege, 73% de rendimento após purificação, p.f. 124°C.



**RMN <sup>1</sup>H (400 MHz) DMSO-*d*<sub>6</sub> / TMS (δ -ppm):** OH7=10,76 (1H, s), NH12=9,58 (1H, s), H24 e H28=8,28 (2H, d, J 8,8 Hz), NH15=8,08 (1H, s), H4=8,02 (1H, s), H25 e H27=7,72 (2H, d, J 8,8 Hz), H5=7,60 (1H, d, J 8,5 Hz), H6=6,85 (1H, d, J 8,5 Hz), H8=6,80 (1H, d), H16=5,39 (1H, d, J 3,2 Hz), H21=3,85 (2H, q), H22=0,87 (3H, t). **RMN <sup>13</sup>C (100 MHz) DMSO-*d*<sub>6</sub> / TMS (δ -ppm):** C18=164,71; C7=162,30; C13=159,14; C9=155,71; C2=152,18; C23=151,62; C26=147,40; C11=144,47; C4=142,58; C5=130,64; C25 e C22=128,40; C24 e C28=124,39; C3=119,13; C6=114,04; C10=111,37; C8=102,49; C21=60,16; C16=54,15; C22=14,07. **I.V. Max. (KBr) γ - cm<sup>-1</sup>:** 3263,45, 1699,23, 1610,51, 1220,9. **MS (ESI-) m/z:** 451,1, 411,1, 405,1, 339,2, 325,2, 311,2; **MS/MS (m/z 405,0)** 450,1, 407,1, 360,1.

**5.3.3 – 6-(7-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)-4-(4-hidroxifenil)-2-oxo-1,2,3,4-tetrahidropirimidinona-5-carboxilato de etila (106c) – sólido laranja, 77% de rendimento após purificação, p.f. 266°C.**

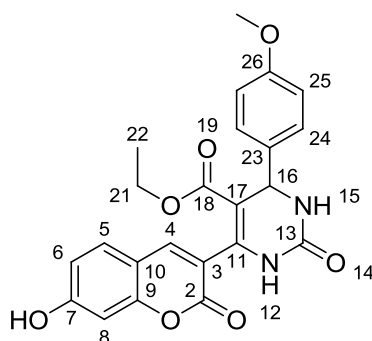


**RMN <sup>1</sup>H (400 MHz) DMSO-*d*<sub>6</sub> / TMS (δ -ppm):** OH7=10,71 (1H, s), OH26=9,41 (1H, s), NH12=9,33 (1H, d), H4=7,96 (1H, s), NH15=7,79 (1H, s), H5=7,60 (1H, d, J 8,5 Hz), H24 e H28=7,23 (2H, d, J 8,5 Hz), H6=6,85 (1H, d, J 8,5 Hz), H8=6,79 (1H, d), H25 e H27=6,75 (2H, d, J 8,5 Hz), H16=5,15 (1H, d, J 3,2 Hz), H21=3,84 (2H, q), H22=0,87 (3H, t). **RMN <sup>13</sup>C (100 MHz) DMSO-*d*<sub>6</sub> / TMS (δ -ppm):** C18=164,93; C7=162,09; C13=159,15;



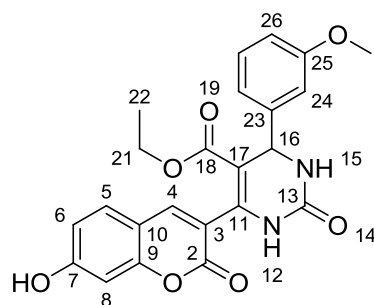
C9=157,24; C26=155,65; C2=152,50; C11=143,20; C4=142,21; C23=135,06; C5=130,54; C24 e C28=128,24; C3=119,68; C25 e C27=115,50; C6=113,91; C10=111,49; C8=102,43; C21=59,87; C16=54,05; C22=14,11. **I.V. Max. (KBr)  $\gamma - \text{cm}^{-1}$ :** 3222,95, 1683,8, 1593,15, 1226,69. **MS (ESI-) m/z:** 421,1, 379,1, 349,0 275,0; **MS/MS (m/z 421,0)** 422,1, 378,1.

**5.3.4** – **6-(7-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)-4-(4-metoxifenil)-2-oxo-1,2,3,4-tetrahidropirimidinona-5-carboxilato de etila (106d)** – sólido laranja, 80% de rendimento após purificação, p.f. 141°C.



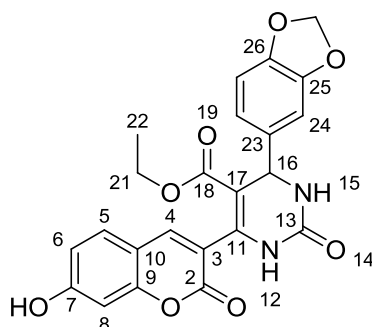
**RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz) DMSO- $d_6$  / TMS ( $\delta$ -ppm):** OH7=10,72 (1H, s), NH12=9,37 (1H, d), H4=7,97 (1H, s), NH15= 7,84 (1H, s), H5=7,60 (1H, d, J 8,5 Hz), H24 e H28=7,36 (2H, d, J 8,5 Hz), H25 e H27=6,94 (2H, d, J 8,8 Hz), H6=6,84 (1H, d, J 8,5 Hz), H8=6,79 (1H, s, J 8,5 Hz), H16=5,20 (1H, d, J 3,2 Hz), H21=3,84 (2H, q), OCH<sub>3</sub>26=3,76 (3H, s), H22=0,87 (3H, t). **RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz) DMSO- $d_6$  / TMS ( $\delta$ -ppm):** C18=164,91; C7=162,12; C13=159,15; C9=159,11; C26=155,66; C2=152,48; C11=143,40; C4=142,26; C23=136,66; C5=130,57; C24 e C28=128,24; C3=119,62; C25 e C27=114,27; C6=113,92; C10=111,47; C8=102,44; C21=59,91; OCH<sub>3</sub>26=55,56; C16=53,94; C22=14,11. **I.V. Max. (KBr)  $\gamma - \text{cm}^{-1}$ :** 3417,75, 1693,45, 1610,51, 1222,83. **MS (ESI-) m/z:** 435,1, 421,1, 393,1, 275,0; **MS/MS (m/z 435,0)** 436,1, 392,1.

**5.3.5** – **6-(7-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)-4-(3-metoxifenil)-2-oxo-1,2,3,4-tetrahidropirimidinona-5-carboxilato de etila (106e)** – sólido bege, 79% de rendimento após purificação, p.f. 244°C.



**RMN <sup>1</sup>H (500 MHz) DMSO-*d*<sub>6</sub> / TMS (δ-ppm):** OH7=10,72 (1H, s), NH12=9,40 (1H, s), H4=7,97 (1H, s), NH15=7,89 (1H, s), H5=7,60 (1H, d, J 8,5 Hz), H27=7,30 (1H, t), H26 e H28=7,03 (2H, d, J 6,6 Hz), H24=6,86 (1H, d, J 6,9 Hz), H6=6,84 (1H, d, J 8,5), H8=6,78 (1H, d), H16=5,21 (1H, d, J 3,2 Hz), H21=3,84 (2H, q), OCH<sub>3</sub>25=3,77 (3H, s), H22=0,86 (3H, t). **RMN <sup>13</sup>C (125 MHz) DMSO-*d*<sub>6</sub> / TMS (δ-ppm):** C18=164,89; C7=162,33; C13=159,85; C9=159,18; C26=155,68; C2=152,47; C11=145,89; C23=143,76; C4=142,26; C5=130,59; C28=130,05; C3=119,51; C27=119,19; C6=113,95; C26=113,30; C24=112,76; C10=111,42; C8=102,44; C21=59,94; OCH<sub>3</sub>25=55,47; C16=54,40; C22=14,11. **I.V. Max. (KBr) γ – cm<sup>-1</sup>:** 3338,67, 1685,73, 1606,65 **MS (ESI-) m/z:** 435,1, 392,1, 363,1, 275,0, 229,0, 184,9; MS/MS (m/z 435,0) 436,1, 392,1.

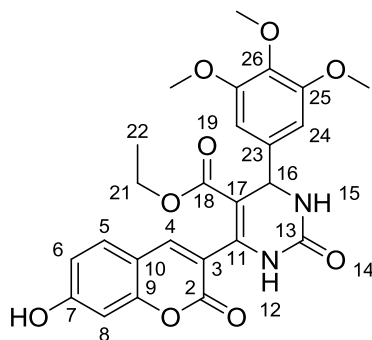
**5.3.6 – 4-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-6-(7-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)-2-oxo-1,2,3,4-tetrahidropirimidinona-5-carboxilato de etila (106f) – sólido bege, 81% de rendimento após purificação, p.f. 249°C**



**RMN <sup>1</sup>H (500 MHz) DMSO-*d*<sub>6</sub> / TMS (δ-ppm):** OH7=10,72 (1H, s), NH12=9,40 (1H, s), H4=7,99 (1H, s), NH15=7,85 (1H, s), H5=7,60 (1H, d, J 8,5 Hz), H24=6,98 (1H, s), H27-H28=6,90 (2H, s), H6=6,84 (1H, d, J 8,5 Hz), H8=6,79 (1H, d), OCH<sub>2</sub>O=6,02 (2H, s),

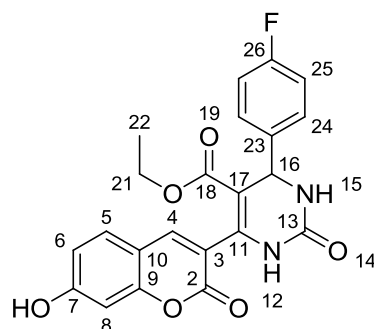
H16=5,17 (1H, d, J 2,8 Hz), H21=3,84 (2H, q), H22=0,86 (3H, t). **RMN <sup>13</sup>C (125 MHz) DMSO-*d*<sub>6</sub> / TMS (δ-ppm):** C18=164,85; C7=162,15; C9=159,22; C13=155,64; C2=152,36; C25=147,83; C26=147,03; C11=143,62; C4=142,30; C23=138,41; C5=130,59; C28=120,35; C3=119,53; C6=113,94; C10=111,45; C27=108,58; C24=107,42; C8=102,44; OCH<sub>2</sub>O=101,44; C21=59,55; C16=54,22; C22=14,11. **I.V. Max. (KBr) γ – cm<sup>-1</sup>:** 3398,46, 1689,59, 1660,66, 1232,47. **MS (ESI-) m/z:** 449,1, 407,1, 349,0; **MS/MS (m/z 449,0)** 450,1, 406,1;

**5.3.7 – 6-(7-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)-2-oxo-4-(3,4,5-trimetoxifenil)-1,2,3,4-tetrahidropirimidinona-5-carboxilato de etila (106g) – sólido bege, 75% de rendimento após purificação, p.f. 291°C.**



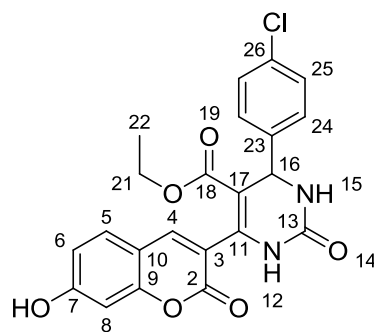
**RMN <sup>1</sup>H (500 MHz) DMSO-*d*<sub>6</sub> / TMS (δ-ppm):** OH7=10,74 (1H, s), NH12=9,43 (1H, s), H4=8,00 (1H, s), NH15=7,88 (1H, s), H5=7,61 (1H, d, J 8,5 Hz), H24 e H28=6,86 (2H, d), H6=6,84 (1H, d, J 8,2), H8=6,79 (1H, d), H16=5,19 (1H, d, J 3,1 Hz), H21=3,86 (2H, q), OCH<sub>3</sub>26=3,66 (3H, s), OCH<sub>3</sub>25 e OCH<sub>3</sub>27=3,37 (6H, s), H22=0,88 (3H, t). **RMN <sup>13</sup>C (125 MHz) DMSO-*d*<sub>6</sub> / TMS (δ-ppm):** C18=164,87; C7=162,19; C13=159,46; C9=155,61; C25 e C27=153,33; C2=152,37; C11=143,92; C4=142,20; C23=137,10; C5=130,65; C26=122,44; C3=119,65; C6=113,98; C10=111,43; C24 e C28=104,20; C8=102,45; OCH<sub>3</sub>26=60,41; OCH<sub>3</sub>25 e OCH<sub>3</sub>27=56,23; C16=54,31; C22=14,18. **I.V. Max. (KBr) γ – cm<sup>-1</sup>:** 3313,6, 1720,45, 1130,25. **MS (ESI-) m/z:** 495,1, 451,1; **MS/MS (m/z 495,0)** 496,1, 452,1.

**5.3.8** – **4-(4-fluorfenil)-6-(7-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-yl)-2-oxo-1,2,3,4-tetrahidropirimidinona-5-carboxilato de etila (106h)** – sólido amarelo, 99% de rendimento após purificação, p.f. 131 °C.



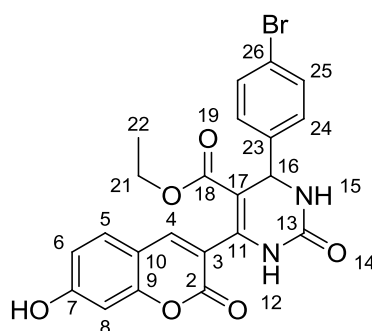
**RMN <sup>1</sup>H (500 MHz) DMSO-*d*<sub>6</sub> / TMS (δ-ppm):** OH7=10,72 (1H, s), NH12=9,44 (1H, s), H4=7,99 (1H, s), NH15=7,93 (1H, s), H5=7,59 (1H, d, J 8,5 Hz), H24 e H28=7,46 (2H, m), H25 e H27=7,21 (2H, m, J 8,5), H6=6,85 (1H, d, J 8,2 Hz), H8=6,79 (1H, s), H16=5,24 (1H, d, J 2,8 Hz), H21=3,83 (2H, q), H22=0,85 (3H, t). **RMN <sup>13</sup>C (125 MHz) DMSO-*d*<sub>6</sub> / TMS (δ-ppm):** C18=164,82; C7=162,94; C26=162,31; C13=159,18; C9=155,67; C2=152,33; C11=143,82; C4=142,39; C23=140,71; C5=130,57; C28=129,03; C3=119,35; C27 e C25=115,04; C6=114,00; C10=111,36; C8=102,45; C21=59,96; C16=53,65; C22=14,08. **I.V. Max. (KBr) γ – cm<sup>-1</sup>:** 3386,89, 1693,45, 1230,54. **MS (ESI-) m/z:** 423,1, 380,1; MS/MS (m/z 423,0) 424,1, 380,0.

**5.3.9** – **4-(4-clorofenil)-6-(7-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-yl)-2-oxo-1,2,3,4-tetrahidropirimidinona-5-carboxilato de etila (106i)** – sólido bege, 74% de rendimento após purificação, p.f. 181 °C



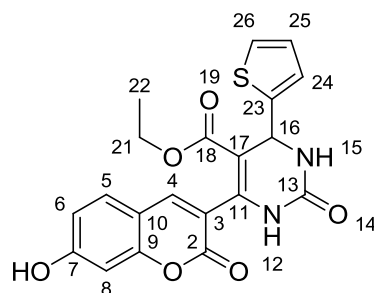
**RMN <sup>1</sup>H (400 MHz) DMSO-*d*<sub>6</sub> / TMS (δ-ppm):** OH7=10,74 (1H, s), NH12=9,47 (1H, s), H4=7,99 (1H, s), NH15=7,95 (1H, s), H5=7,60 (1H, d, J 8,3 Hz), H24, 25, 27 e 28=7,48 (4H, s), H6=6,86 (1H, d, J 8,5 Hz), H8=6,79 (1H, d), H16=5,25 (1H, d, J 3,2 Hz), H21=3,84 (2H, q), H22=0,87 (3H, t). **RMN <sup>13</sup>C (100 MHz) DMSO-*d*<sub>6</sub> / TMS (δ-ppm):** C18=164,60; C7=162,20; C13=159,14; C9=155,68; C2=152,31; C11=143,94; C23=143,44; C4=142,42; C26=132,57; C5=130,61; C24, 25, 27, e 28=128,98; C3=119,35; C6=113,98; C10=111,42; C8=102,45; C21=60,03; C16=53,95; C22=14,09. **I.V. Max. (KBr) γ – cm<sup>-1</sup>:** 3392,68, 1697,3, 1660,66, 1228,62. **MS (ESI-) m/z:** 439,1, 397,1; **MS/MS (m/z 439,0)** 441,1, 396,1, 275,1.

**5.3.10 – 4-(4-bromofenil)-6-(7-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-yl)-2-oxo-1,2,3,4-tetrahidropirimidinona-5-carboxilato de etila (106j) – sólido bege, 90% de rendimento após purificação, p.f. 129°C.**



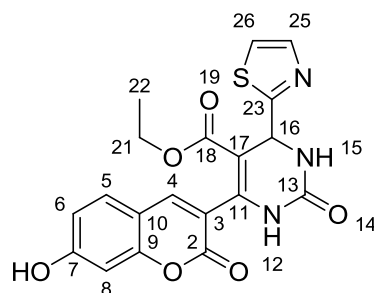
**RMN <sup>1</sup>H (400 MHz) DMSO-*d*<sub>6</sub> / TMS (δ-ppm):** NH12=9,46 (1H, s), NH15=7,96 (1H, s), H4=7,96 (1H, s), H5, 25 e 27=7,59 (3H, m), H24 e 28=7,39 (2H, d, J 8,5 Hz), H6=6,84 (1H, d, J 8,5 Hz), H8=6,77 (1H, s), H16=5,22 (1H, d, J 3,1Hz), H21=3,83 (2H, q), H22=0,86 (3H, t). **RMN <sup>13</sup>C (100 MHz) DMSO-*d*<sub>6</sub> / TMS (δ-ppm):** C18=164,93; C7=162,93; C13=159,20; C9=155,77; C2=152,34; C11=143,66; C4=142,49; C25 e 27=131,88; C5=130,51; C24 e 28=129,32; C26=121,09; C3=118,94; C6=114,22; C10=111,09; C8=102,49; C21=60,02; C16=54,01; C22=14,09. **I.V. Max. (KBr) γ – cm<sup>-1</sup>:** 3433,18, 1660,66, 1616,3, 1228,62. **MS (ESI-) m/z:** 485,0, 406,2, 275,1, 229,0, 185,0; **MS/MS (m/z 485,0)** 483,1, 442,0.

**5.3.11 – 6-(7-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)-2-oxo-4-(tiofen-2-il)-1,2,3,4-tetrahidropirimidinona-5-carboxilato de etila (106k) – sólido laranja, 99% de rendimento após purificação, p.f. 144°C.**



**RMN <sup>1</sup>H (500 MHz) DMSO-*d*<sub>6</sub> / TMS (δ-ppm):** NH12=9,50 (1H, s), NH15=8,05 (1H, d), H4=7,89 (1H, s), H5=7,58 (1H, d, J 8,5 Hz), H25=7,45 (1H, d, J 6,0 Hz), H26=7,08 (1H, d), H27=7,00 (1H, m), H6=6,81 (1H, d, J 8,8 Hz), H8=6,74 (1H, s), H16=5,48 (1H, d, J 3,5 Hz), H21=3,88 (2H, q), H22=0,91 (3H, t). **RMN <sup>13</sup>C (125 MHz) DMSO-*d*<sub>6</sub> / TMS (δ-ppm):** C18=164,67; C7=163,17; 160,12; C13=159,05; C9=155,86; C2=152,60; C23=148,27; C11=143,85; C4=142,55; C5=130,67; C26=127,21; C27=125,68; C25=124,62; C3=118,57; C6=114,27; C10=110,97; C8=102,48; C21=60,08; C16=49,89; C22=14,16. **I.V. Max. (KBr) γ – cm<sup>-1</sup>:** 3384,96, 1689,59, 1606,65, 1211,26. **MS (ESI-) m/z:** 411.1, 369.1, 275.0, 229.0; **MS/MS (m/z 411.0)** 412.0, 368.0.

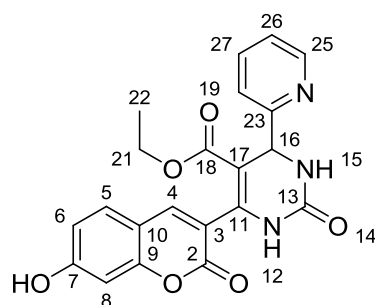
**5.3.12 – 6-(7-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)-2-oxo-4-(tiazol-2-il)-1,2,3,4-tetrahidropirimidinona-5-carboxilato de etila (106I) – sólido bege, 25% de rendimento após purificação, p.f. 161°C.**



**RMN <sup>1</sup>H (400 MHz) DMSO-*d*<sub>6</sub> / TMS (δ-ppm):** OH7=10,71 (1H, s), NH12=9,58 (1H, s), NH15=8,15 (1H, s), H4=7,90 (1H, s), H26=7,79 (1H, d), H25=7,71 (1H, d), H5=7,64 (1H, d, J 8,0 Hz), H6=6,84 (1H, d, J 6,5 Hz), H8=6,78 (1H, d), H16=5,60 (1H, d, J 3,2 Hz), H21=3,90 (2H, q), H22=0,92 (3H, t). **RMN <sup>13</sup>C (100 MHz) DMSO-*d*<sub>6</sub> / TMS (δ-ppm):** C23=172,64; C18=164,51; C7=162,29; C13=158,77; C9=155,77; C2=152,46; C11=144,76; C25=142,89; C4=142,58; C5=130,73; C26=121,10; C3=118,68; C6=113,95; C10=111,33;

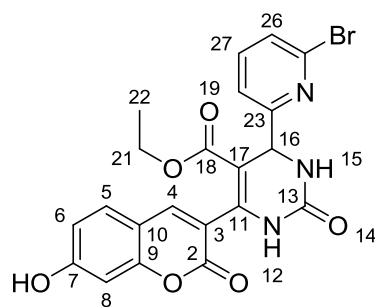
C8=102,42; C21=60,19; C16=52,27; C22=14,15. **I.V. Max. (KBr)  $\gamma - \text{cm}^{-1}$ :** 3390,75, 1701,16, 1610,51, 1220,9. **MS (ESI-) m/z:** 412,1, 369,1, 275,0, 229,0; **MS/MS (m/z 412,0)** 413,0, 369,0, 336,1, 323,0, 160,9.

**5.3.13** – **6-(7-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)-2-oxo-4-(piridin-2-il)-1,2,3,4-tetrahidropirimidinona-5-carboxilato de etila (106m)** – sólido bege, 25% de rendimento após purificação, p.f. 151 °C.



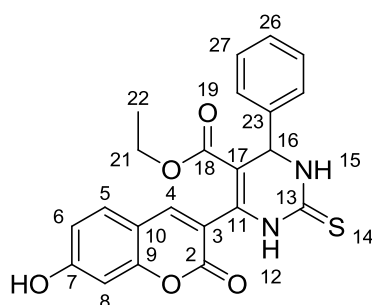
**RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz) DMSO- $d_6$  / TMS ( $\delta$ -ppm):** OH7=10,70 (1H, s), NH12=9,34 (1H, s), NH15=8,58 (1H, s), H4=7,91 (1H, s), H25 e 27=7,80 (2H, m), H5=7,61 (1H, d, J 8,5 Hz), H28=7,46 (1H, d, J 7,7 Hz), H26=7,32 (1H, m), H6=6,84 (1H, d, J 8,5 Hz), H8=6,78 (1H, d), H16=5,31 (1H, s, J 3,0 Hz), H21=3,84 (2H, q), H22=0,86 (3H, t). **RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz) DMSO- $d_6$  / TMS ( $\delta$ -ppm):** C18=164,94; C7=162,16; C13=159,05; C9=155,68; C2=152,70; C25=149,84; C11=144,22; C4=142,30; C27=137,33; C5=130,60; C28=123,27; C26=121,91; C3=119,51; C6=113,91; C10=111,14; C8=102,41; H21=59,38; C16=56,30; H22=14,11. **I.V. Max. (KBr)  $\gamma - \text{cm}^{-1}$ :** 3248,02, 1697,3, 1608,58, 1220,9. **MS (ESI-) m/z:** 406,1, 363,1, 275,0, 229,0; **MS/MS (m/z 406,0)** 407,1, 363,1, 317,0.

**5.3.14** – **4-(3-bromopiridin-2-il)-6-(7-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)-2-oxo-1,2,3,4-tetrahidropirimidinona-5-carboxilato de etila (106n)** – sólido bege, 21% de rendimento após purificação, p.f. 257°C.



**RMN <sup>1</sup>H (500 MHz) DMSO-*d*<sub>6</sub> / TMS (δ-ppm):** OH7=10,77 (1H, s), NH12=9,48 (1H, s), NH15 e H4=7,95 (2H, s), H27=7,80 (1H, m), H28 e H5=7,61 (2H, m), H26=7,53 (1H, m), H6=6,84 (1H, d, J 8,5 Hz), H8=6,78 (1H, d), H16=5,27 (1H, s), H21=3,84 (2H, q), H22=0,86 (3H, t). **RMN <sup>13</sup>C (125 MHz) DMSO-*d*<sub>6</sub> / TMS (δ-ppm):** C18=164,79; C23=163,79; C7=162,24; C13=159,07; C9=155,71; C2=152,32; C11=144,62; C4=142,42; C25=141,48; C27=140,91; C5=130,64; C26=127,59; C28=120,69; C3=119,27; C6=113,98; C10=111,39; C8=102,45; C17=100,65; C21=60,01; C16=56,88; C22=14,10. **I.V. Max. (KBr) γ – cm<sup>-1</sup>:** 3440,9, 1674,16, 1608,58, 1211,26. **MS (ESI-) m/z:** 486,0, 441,0, 255,2; **MS/MS (m/z)** 486,0 484,0, 441,0, 396,9, 361,1.

**5.3.15** – **6-(7-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-3-il)-4-fenil-2-tioxo-1,2,3,4-tetrahidropirimidinona-5-carboxilato de etila (106o)** – sólido bege, 61% de rendimento após purificação, p.f. 164 °C.

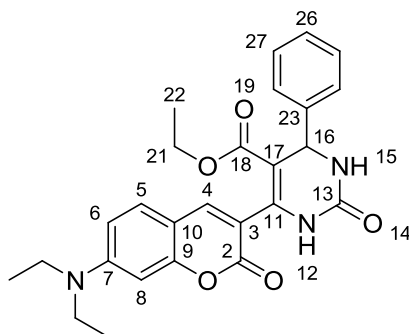


**RMN <sup>1</sup>H (500 MHz) DMSO-*d*<sub>6</sub> / TMS (δ-ppm):** OH7=10,77 (1H, s), NH15=10,56 (1H, s), NH12=9,79 (1H, s), H4=7,99 (1H, s), H5=7,61 (1H, d, J 8,5 Hz), H24-28=7,42 (5H, m), H6=6,84 (1H, d, J 8,5 Hz), H8=6,79 (1H, d), H16=5,28 (1H, d, J 3,5 Hz), H21=3,85 (2H, q), H22=0,85 (3H, t). **RMN <sup>13</sup>C (125 MHz) DMSO-*d*<sub>6</sub> / TMS (δ-ppm):** C18=184,23; C7=174,64; C13=164,67; C9=162,22; C2=159,25; 155,73; C11=143,17; C4=142,94;



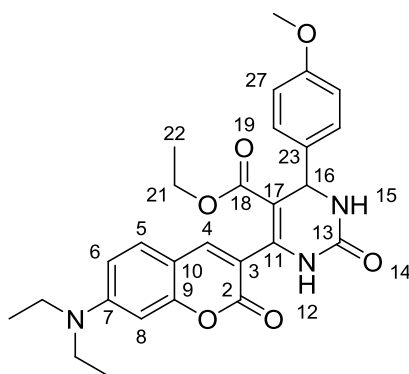
C23=140,61; C5=130,65; C25 e 27=129,15; C26=128,93; C24 e 28=127,24; C3=118,58; C6=113,95; C10=111,45; C8=102,43; C21=60,32; C16=54,69; C22=14,03. **I.V. Max. (KBr) – cm<sup>-1</sup>:** 3220,68, 2981,77, 1704,97, 1610,47, 1223,76. **MS (ESI-) m/z:** 421,1, 419,1, 409,1, 405,1, 403,1, 387,1, 379,1; **MS/MS (m/z 421,0)** 422,0, 419,0.

**5.3.16** – **6-(7-(dietilamino)-2-oxo-2H-cromen-3-il)-2-oxo-4-fenil-1,2,3,4-tetrahidropirimidinona-5-carboxilato de etila (106p)** – sólido laranja, 65% de rendimento após purificação, p.f. 156 °C.



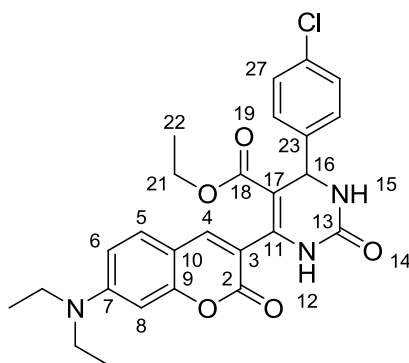
**RMN <sup>1</sup>H (500 MHz) DMSO-d<sub>6</sub> / TMS (δ-ppm):** NH12=9,35 (1H, s), NH15=7,87 (1H, m), H4=7,83 (1H, s), H5=7,49 (1H, d, J 8,8 Hz), H24-28=7,38 (5H, m), H6=6,73 (1H, d, J 8,8 Hz), H8=6,58 (1H, d), H16=5,22 (1H, d, J 3,5 Hz), H21=3,83 (2H, q), 2(CH<sub>2</sub>)7=3,46 (4H, q), 2(CH<sub>3</sub>)7=1,14 (6H, t), H22=0,88 (3H, t). **RMN <sup>13</sup>C (125 MHz) DMSO-d<sub>6</sub> / TMS (δ-ppm):** C18=165,07; C7=159,61; C13=156,60; C9=152,66; C2=151,26; C23=144,55; C11=144,23; C4=142,56; C5=130,22; C25 e C27=128,83; C26=127,94; C24 e C28=127,05; C3=116,11; C6=109,50; C10=107,75; C8=96,75; C21=59,83; C16=54,51; 2(CH<sub>2</sub>)7=44,52; C22=14,18; 2(CH<sub>3</sub>)7=12,79. **I.V. Max. (KBr) γ – cm<sup>-1</sup>:** 2974,14, 1699,23, 1612,44, 1224,76. **MS (ESI-) m/z:** 460,3, 432,2, 325,2; **MS/MS (m/z 460,0)** 461,2, 414,2, 373,2.

**5.3.17** – **6-(7-(dietilamino)-2-oxo-2H-cromen-3-il)-4-(4-metoxifenil)-2-oxo-1,2,3,4-tetrahidropirimidinona-5-carboxilato de etila (106q)** – sólido laranja, 63% de rendimento após purificação, p.f. 177 °C.



**RMN <sup>1</sup>H (500 MHz) DMSO-*d*<sub>6</sub> / TMS (δ-ppm):** NH12=9,31 (1H, s), H4=7,82 (1H, s), NH15=7,80 (1H, s), H5=7,49 (1H, d, J 8,8 Hz), H24 e H28=7,36 (2H, m, J 8,8 Hz), H25=6,93 (2H, d, J 8,5 Hz), H6=6,74 (1H, d, J 8,8 Hz), H8=6,58 (1H, d), H16=5,17 (1H, d, J 3,1 Hz), H21=3,84 (2H, q), (OCH<sub>3</sub>)27=3,75 (3H, s), 2(CH<sub>2</sub>)7=3,46 (4H, q), 2(CH<sub>3</sub>)7=1,14 (6H, t), H22=0,89 (3H, t). **RMN <sup>13</sup>C (125 MHz) DMSO-*d*<sub>6</sub> / TMS (δ-ppm):** C18=165,09; C13=159,94; C7=159,63; C9=156,59; C26=152,67; C2=151,24; C11=143,93; C4=142,49; C23=136,72; C5=130,19; C24 e C28=128,22; C3=116,20; C25 e C27=114,23; C6=109,50; C10=107,76; C8=96,76; C21=59,79; (OCH<sub>3</sub>)26=55,55; C16=53,67; 2(CH<sub>2</sub>)7=44,55; C22=14,21; 2(CH<sub>2</sub>)7=12,79. **I.V. Max. (KBr) γ – cm<sup>-1</sup>:** 2925,92, 1695,37, 1610,51, 1226,69. **MS (ESI-) m/z** 490,2, 396,8; **MS/MS (m/z 490,0)** 491,2, 444,2, 403,2.

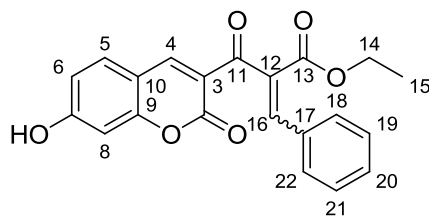
**5.3.18 – 6-(7-(dietilamino)-2-oxo-2H-cromen-3-il)-4-(4-clorofenil)-2-oxo-1,2,3,4-tetrahidropirimidinona-5-carboxilato de etila (106r) – sólido laranja, 58% de rendimento após purificação, p.f. 96°C.**



**RMN <sup>1</sup>H (500 MHz) CDCl<sub>3</sub> / TMS (δ-ppm):** NH12=8,15 (1H, s), H4=7,58 (1H, s), H25 e H27=7,42 (2H, d, J 8,5 Hz), H24 e H28=7,32 (2H, d, J 8,2 Hz), H5=7,29 (1H, d, J 8,8 Hz),

H6=6,58 (1H, d, J 8,2 Hz), H8=6,48 (1H, s), NH15=6,35 (1H, s), H16=5,44 (1H, s, J 2,5 Hz), H21=3,97 (2H, q), 2(CH<sub>2</sub>)7=3,42 (4H, q), 2(CH<sub>3</sub>)7=1,22 (6H, t), H22=0,99 (3H, t). **RMN <sup>13</sup>C (125 MHz) CDCl<sub>3</sub> / TMS (δ-ppm):** C18=164,56; C7 e C13=159,85; C9=156,75; C2=153,21; C3=142,57; C11=141,72; C23=133,72; H5=129,88; C24 e C28=128,99; C25 e C27=128,33; C26=127,79; C3=113,92; C8=109,23; C10=103,43; C17=97,21; C21=60,44; C16=55,11; 2(CH<sub>2</sub>)7=44,97; C22=13,88; 2(CH<sub>3</sub>)7=12,45. **I.V. Max. (KBr) γ – cm<sup>-1</sup>:** 2976,07, 1712,73, 1614,37, 1510,21. **MS (ESI-) m/z** 494,2, 472,2, 387,1, 382,2, 371,1, 357,2; **MS/MS (m/z** 494,0) 495,1, 448,1, 407,1.

**5.4 Caracterização do intermediário de Knoevenagel isolado (121) – sólido amarelo, p. f. 165°C.**



**RMN <sup>1</sup>H (500 MHz) DMSO-*d*<sub>6</sub> / TMS (δ-ppm):** OH7=10,37 (1H, s), H4=8,68 (1H, s), H5=7,90 (1H, d, J 6,9 Hz), H16=7,67 (1H, s), H18-H22=7,38 (5H, m), H6=6,91 (1H, d, J 6,3 Hz), H8=6,79 (1H, s), H14=4,19 (2H, d), H15=1,14 (3H, s). **RMN <sup>13</sup>C (125 MHz) DMSO-*d*<sub>6</sub> / TMS (δ-ppm):** C11=190,36; C13=165,60; C2=164,49; C7=159,25; C9=158,19; C4=149,93, C16=140,28; C12=134,36; C5=133,92; C17=133,47; C18-C19 e C21-C22=130,30; C20=129,31; C3=118,71; C6=115,11; C10=111,47; C8=102,45; C14=61,34; C15=14,46. **I.V. Max. (KBr) γ – cm<sup>-1</sup>:** 3431,25, 1730,09, 1616,3, 1190,04. **MS (ESI-) m/z** 363,1, 275,0, 229,0, 185,0; **MS/MS (m/z 363,0)** 363,1, 291,0.

## 6 – REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHLES, T. A.; SAYKIN, A. J. Candidate mechanisms for chemotherapy-induced cognitive changes. **Nature Reviews Cancer**, v. 7, p. 192-201, 2007.

ANSAR, S.; BURLISON, J.A.; HADDEN, M.K.; YU, X.M.; DESINO, K.E.; BEAN, J.; NECKERS, L.; AUDUS, K.L.; MICHAELIS, M.L.; BLAGG, B.S. A non-toxic Hsp90 inhibitor protects neurons from A $\beta$ -induced toxicity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 17, p. 1984, 2007.

ASHOK, M.; HOLLA, B. S.; KUMARI, N. S. Convenient one pot synthesis of novel derivatives of thiazolo[2,3-b]dihydropyrimidinone possessing 4-methylthiophenyl moiety and evaluation of their antibacterial and antifungal activities. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 42, p. 380-385, 2007.

ATWAL, K. S.; ROVNYAK, G. C.; KINBALL, S. D.; FLOYD, D. M.; MORELAND, S.; SWANSON, B. N.; GOUGOUTAS, J. Z.; SCHWARTZ, J.; SMILLIE, K. M.; MALLAY, M. F. Dihydropyrimidine calcium channel blockers. II. 3-Substituted-4-aryl-1,4-dihydro-6-methyl-5-pyrimidinecarboxylic acid esters as potent mimics of dihydropyridines. **Journal Medicinal Chemistry**, v. 33, p. 2629-2635, 1990.

AVENDANO, C.; MENENDEZ, J. C. **Medicinal chemistry of anticancer drugs**. 1<sup>a</sup> Ed., Amsterdam: The Netherlands Linacre House, 2008.

Avila, C. M.; Romeiro, N. C. Proteínas Tirosinas Quinases: Desafios do Desenvolvimento de Fármacos para a Terapia do Câncer. **Revista Virtual de Química**, v. 2, p. 59-82, 2010.

AZIZIAN, J.; MOHAMMADI, K. M.; FIRUZI, O.; MIRZA, B.; MIRI, R. Microwave-assisted solvent-free synthesis of bis(dihydropyrimidinone)benzenes and evaluation of their cytotoxic activity. **Chemical Biology and Drug Discovery**, v. 75, p. 375-380, 2010.

AZUMA, K.; SUZUKI, S.; UCHIYAMA, S.; KAJIRO, T.; SANTA T.; IMAI, K. A study of the relationship between the chemical structures and the fluorescence quantum yields of coumarins, quinoxalinones and benzoxazinones for the development of sensitive fluorescent derivatization reagents. **Photochemistry and Photobiology Science**, v. 2, p. 443–449, 2003.

BAGATELL, R. PAINE-MURRIETA, G. D.; TAYLOR, C. W.; PULCINI, E. J.; AKINAGA, S.; BENJAMIN, I. J. WHITESELL, L. Induction of a heat shock factor 1-dependent stress response alters the cytotoxic activity of hsp90-binding agents. **Clinical Cancer Research**, v. 6, p. 3312, 2000.

BARRIO, J. R.; PETRIC, A. J.; SATYAMURTHY, N. A method for labeling structures, such as b-amyloid plaques and neurofibrillary tangles, in vivo or in vitro, is provided and comprises contacting brain tissue with one or more compds., preferably radiolabeled for detection by positron emission tomog. (PET). *PCT Int. Appl.*, WO 2005040337 A2 20050506, 2005.

BASSO A. D.; SOLIT, D. B.; CHIOSIS, G.; GIRI, B.; TSICHLIS, P.; ROSEN, N. Protein synthesis post-translation modification and degradation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 39858-39866, 2002.

BATALHA, P. N. Recentes avanços em reações multicomponentes: uma perspectiva entre os anos de 2008 e 2011. **Revista Virtual de Química**, v. 4, p. 13, 2012.

BELIAKOFF J.; BAGATELL, R.; PAINE-MURRIETA, G.; TAYLOR, C. W.; LYKKESFELDT, A. E.; WHITESELL, L. Hormone-Refractory Breast Cancer Remains Sensitive to the Antitumor Activity of Heat Shock Protein 90 Inhibitors. **Clinical Cancer Research**, v. 9, p. 4961-4971, 2003.

BENNASROUNE, A.; GARDIN, A.; AUNIS, D.; CREMEL, G.; HUBERT, P. Tyrosine kinase receptors as attractive targets of cancer therapy. **Critical Review in Oncology Hematology**, v. 50, p. 23, 2004.

BERGER, J.; BATCHO, A.D. Coumarin - Glycoside Antibiotics. **Journal of Chromatography Library**, v. 15, p. 101, 1978.

BHAT, R.; TUMMALAPALLI, S. R.; ROTELLA, D. P. Progress in the Discovery and Development of Heat Shock Protein 90 (Hsp90) Inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 57, p. 8718-8728, 2014.

BIENAYME, H.; HULME, C.; ODDON, G.; SCHMITT, P. Maximizing Synthetic Efficiency: Multi-Component Transformations Lead the Way. **Chemistry - A European Journal**, v. 6, p. 3321-3329, 2000.

BIGINELLI, P. The urea-aldehyde derivatives of acetoacetic esters. **Gazzetta Chimica Italiana**, v. 23, p. 360-413, 1893.

BLAGG, B.; MICHAELIS, M.L.; MCINTOSH, M. **US 20070270452**, 2007

BORGES, J. C.; RAMOS, C. H. I. Protein folding assisted by chaperones. **Protein and Peptide Letters**, v. 12, p. 257-261, 2005.

BUCHNER, J. Hsp90 & Co – a holding for folding. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 24, p. 136-141, 1999.

BURLISON, J.A.; AVILA, C.; VIELHAUER, G.; LUBBERS, D.J; HOLZBEIERLEIN, J; BLAGG, B.S. Development of Novobiocin Analogues That Manifest Anti-proliferative Activity against Several Cancer Cell Lines. **Journal of Organic Chemistry**, v. 73, p. 2130, 2008.

BURLISON, J.A.; NECKERS, L.; SMITH, A.B.; MAXWELL, A.; BLAGG, B.S. Novobiocin: Redesigning a DNA Gyrase Inhibitor for Selective Inhibition of Hsp90. **Journal of American Chemical Society**, v. 128, p. 15529, 2006.

CALDERWOOD, S. K.; KHALEQUE, M. A.; SAWYER, D. B.; CIOCCA, D. R. Heat shock proteins in cancer: chaperones of tumorigenesis. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 31, p. 164-172, 2006.

CHIOSIS, G.; VILENCHIK, M.; KIM, J.; SOLIT, D. Hsp90: the vulnerable chaperone. **Drug Discovery Today**, v. 9, p. 881-888, 2004.

CIGÁN, M.; DONOVALOVÁ, J.; SZOCS, V.; GASPAR, J.; JAKUSOVÁ, K.; GÁPLOVSKY, A. 7-(Dimethylamino)coumarin-3-carbaldehyde and Its Phenylsemicarbazone: TICT Excited State Modulation, Fluorescent H-Aggregates, and Preferential Solvation. **The Journal of Physical Chemistry A**, v. 117, p. 4870–4883, 2013.

CONDE, R.; BELAK, Z. R.; NAIR, M.; O'CARROLL, R. F.; OVSENEK, N. Modulation of Hsf1 activity by novobiocin and geldanamycin. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 87, p. 845-851, 2009.

DAHIYA, P.; KUMBHAKAR, M.; MUKHERJEE, T.; PAL, H. Effect of protic solvents on twisted intramolecular charge transfer state formation in coumarin-152 and coumarin-481 dyes. **Chemical Physics Letters**, v. 414, p. 148–154, 2005.

DE SOUZA, R. O. M. A.; DA PENHA, E. T.; MILAGRE, H. M. S.; GARDEN, S. J.; ESTEVES, P. M.; EBERLIN, M. N.; ANTUNES, O. A. C. The three-component Biginelli reaction: a combined experimental and theoretical mechanistic investigation. **Chemistry a European Journal**, v. 15, p. 9799-9804, 2009.

DÖMLING, A.; WANG, W.; WANG, K. Chemistry and Biology Of Multicomponent Reactions. **Chemical Reviews**, v. 112, p. 3083-3135, 2012.

DUERFELDT, A. S.; BLAGG, B. S. J. Hsp90 inhibition: Elimination of shock and stress. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, p. 4983-4987, 2010.

ECHEVERRÍA, P. C.; BERNTHALER, A.; DUPUIS, P.; MAYER, B.; PICARD, D. An interaction network predicted from public data as a discovery tool: application to the Hsp90 molecular chaperone machine. **PLoS ONE**, v. 6, p. 26044, 2011.

EUSTACE, B. K.; SAKURAI, T.; STEWART, J. K.; YIMLAMAI, D.; UNGER, C.; ZEHERMEIER, C. Functional proteomic screens reveal an essential extracellular role for hsp90 $\alpha$  in cancer cell invasiveness. **Nature Cell Biology**, v. 6, p.507-514, 2004.

Ferreira, C. G.; Rocha, J. C. C. **Oncologia Molecular**, 2<sup>a</sup> Ed., Atheneu, 2010.

FOLKERS, K.; JOHNSON, T. B. Researches on pyrimidines. CXXXVI. The mechanism of formation of tetrahydropyrimidines by the Biginelli reaction. **Journal of the American Chemical Society**, v. 55, p. 3784-3791, 1933.

FRIN, K. **Propriedades fotoquímicas de alguns complexos de ferro(II) e rênio(I)**. 2008. 143 f. Tese (Doutorado) - Curso de Doutorado em Química Inorgânica, Usp, Sao Paulo, 2008.

GANEM, B. *Acc. Chem. Res.*, v. 42, p. 463, 2009.

GILMAN, A. The initial clinical trial of nitrogen mustard. **The American Journal of Surgery**, v. 105, p. 574-578, 1963.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The Hallmarks of Cancer. **Cell**, v. 100, p. 57-70, 2000.

HANTZSCH, A. Synthesis of pyridine derivatives from acetoacetic ester and aldehydeammoniak. **Justus Liebigs Annalen der Chemie**, v. 215, p. 1, 1882.

HARBER, D. Roads leading to breast câncer. **The New England Journal of Medicine**, v. 343, p. 1566-1568, 2000.



HARTL, F. U.; HAYER-HARTL, M. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. **Science**, v. 295, p. 1852-1858, 2002.

HARTL, F.U; BRACHER, A.; HAYER-HARTL, M. Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. **Nature**, v. 475, p. 324-32, 2011.

HASTINGS, J.M.; HADDEN, M.K.; BLAGG, B.S. Synthesis and Evaluation of Derrubone and Select Analogues. **Journal of Organic Chemistry**, v. 73, p. 369, 2008.

HERNANDEZ, A.; LOPEZ-LLUCH, G.; BERNAL, G.A.; NAVAS, P. PINTORTORO, J.A. Dicoumarol down-regulates human *PTTG1/Securin* mRNA expression through inhibition of Hsp90. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 7, p.474-482, 2008.

HONG, D. S.; BANERJI, U.; TAVANA, B.; GEORGE, G. C.; AARON, J.; KURZROCK, R. Targeting the molecular chaperone heat shock protein 90 (Hsp90): Lessons learned and future directions. **Cancer Treatment Reviews**, v. 39, n. 4, p. 375–387, 2013.

<http://www.cancer.gov/cancertopics/cancerlibrary/what-is-cancer>. Acessado em 01/02/2015.

HUANG, Y.T.; BLAGG, B.S. A Library of Noviosylated Coumarin Analogues. **Journal of Organic Chemistry**., v. 72, p. 3609, 2007.

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância Estimativa 2014: **Incidência de Câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação de Prevenção e Vigilância**. Rio de Janeiro: INCA, p. 124, 2014.

ISAACS, J. S.; JUNG, Y. J.; MIMNAUGH, E. G.; MARTINEZ, A.; CUTTITTA, F.; NECKERS, L. M. Hsp90 Regulates a von Hippel Lindau-independent Hypoxia-inducible Factor-1 $\alpha$ -degradative Pathway. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 29936-29944, 2002.

ISMAILI, L.; NADARADJANE, A.; NICOD, L. Synthesis and antioxidant activity evaluation of new hexahydropyrimido [5,4-c]quinoline-2,5-diones and 2 thioxohexahydropyrimido [5,4-c]quinoline-5-ones obtained by Biginelli reaction in two steps. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, p. 1270-1275, 2008.

JAIN, R. K. Barriers to Drug Delivery in Solid Tumors. **Scientific American**, v. 271, p. 58, 1994.

JANIN, Y. L. ATPase inhibitor of heart-shock protein 90, second season. **Drug Discovery Today**, v. 15, p. 342-353, 2010.

JOHNSTONE, R. W.; RUEFLI, A. A.; LOWE, S. W. Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. **Cell**, v. 108, n. 2, p. 153- 164, 2002.

JOSEPH, A. B.; NECKERS, L.; SMITH, A. B.; MAXWELL, A. BLAGG, B. S. J. Novobiocin: Redesigning a DNA gyrase inhibitor for selective inhibition of Hsp90. **Journal of American Chemical Society**, v. 128, p. 15529-15536, 2006.

KAAN, H. Y. K.; ULAGANATHAN, V.; RATH, O.; PROKOPCOVÁ, H.; DALLINGER, D.; KAPPE, C. O.; KOZIELSKI, F. Structural basis for inhibition of Eg5 by dihydropyrimidines: stereoselectivity of antimetabolic inhibitors enastron, dimethylenastron and fluorastrol. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 53, p. 5676-5683, 2010.

KAPPE, C. O. A reexamination of the mechanism of the Biginelli dihydropyrimidine synthesis. Support for an *N*-acyliminium ion intermediate. **Journal of Organic Chemistry**, v. 62, p. 7201-7204, 1997.

KAPPE, C. O. Biologically active dihydropyrimidones of the Biginelli-type — a literature survey. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 35, p. 1043, 2000.

KAPPE, C. O. Recent advances in the Biginelli dihydropyrimidine synthesis. New tricks from an old dog. **Accounts of Chemical Research**, v. 33, p. 879-888, 2000.

KAPPE, C. O. The generation of dihydropyrimidine libraries utilizing Biginelli multicomponent chemistry. **QSAR & Combinatorial Science**, v. 22, p. 630-645, 2003.

KATZUNG, B. B. **Farmacologia Básica e Clínica**. 1<sup>a</sup> Ed., Guanabara Koogan, 1994.

KUMAR, B. R. P.; SANKAR, G.; BAIG, R. B. N.; CHANDRASHEKARAM, S. Novel Biginelli dihydropyrimidines with potencial anticancer activity: a parallel synthesis and CoMSIA study. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, p. 4192-4198, 2009.

LANOOT, B.; VANCANNEYT, M.; CLEENWERCK, I.; WANG, L.; LI, W.; LIU, Z.; SWINGS, J. The search for synonyms among streptomycetes by using SDS-PAGE of whole-cell proteins. Emendation of the species *Streptomyces aurantiacus*, *Streptomyces cacaoi* subsp. *cacaoi*, *Streptomyces caeruleus* and *Streptomyces violaceus*. **International Journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 52, p. 823-829, 2002.

LE BRAS, G.; BEKAERT, A.; VIOSSAT, B.; PEYRAT, J.-F.; ALAMI, M.; BRION, J.-D.; LEMOINE, P. Z. Crystal structure of cyclonovobiocin, C<sub>44</sub>H<sub>42</sub>N<sub>2</sub>O<sub>12</sub>. **Zeitschrift für Kristallographie – New Crystal Structures**, v. 221, p. 381, 2006.

LE BRAS, G.; BEKAERT, A.; VIOSSAT, B.; PEYRAT, J.F.; ALAMI, M.; BRION, J.D.; LEMOINE, P.Z. Crystal structure of 3-[(2,2-dimethylchroman-6-yl)carbonylamino]-7-hydroxy-8-methyl-2-oxo-2H-chromen-4-yl toluene-4-sulfonate, C<sub>19</sub>H<sub>27</sub>NO<sub>8</sub>S. **Zeitschrift für Kristallographie – New Crystal Structures**, v. 222, p. 1, 2007.

LEOPOLDINO A. M.; SQUARIZE, C. H.; GARCIA, C. B.; ALMEIDA, L. O.; PESTANA, C. R.; SOBRAL, L. M.; UYEMURA, S. A.; TAJARA E. H.; GUTKIND, J. C. SET protein accumulates in HNSCC and contributes to cell survival: Antioxidant defense, Akt phosphorylation and AVOs acidification. **Oral Oncology**, v. 48, p. 1106-13, 2012.

LEWIS, R. J.; TSAI, F. T.; WIGLEY, D. B. Molecular mechanisms of drug inhibition of DNA gyrase. **BioEssays**, v. 18, p. 661–671, 1996.

LI, H.; CAI, L.; CHEN, Z. **Advances in Chemical Sensors**, 1<sup>a</sup> Ed., p. 121–150, W. Wang, 2012.

MALONEY, A.; WORKMAN, P. **Expert Opin Biol Ther**, v. 2, p. 3-24, 2002.

MANNICH, C. Synthesis of  $\beta$ -ketoic bases. **Journal of the Chemical Society**, v. 112, p. 634, 1917.

MARCU, M. G.; CHADLI, A.; BOUHOUCHE, I.; CATELLI, M.; NECKERS, L. M. The Heat Shock Protein 90 Antagonist Novobiocin Interacts with a Previously Unrecognized ATP-binding Domain in the Carboxyl Terminus of the Chaperone. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 37181-37816, 2000.

MARCU, M. G.; SCHULTE, T. W.; NECKERS, L. Novobiocin and related coumarins and depletion of heat shock protein 90-dependent signaling proteins. **Journal of National Cancer Institute**, v. 92, p. 242–248, 2000.

MAYER, T. U.; KAPOOR, T. M.; HAGGARTY, S. J.; KING, R. W.; SCHREIBER, S. L.; MITCHISON, T. J. Small molecule inhibitor of mitotic spindle bipolarity identified in a phenotypebased screen. **Science**, v. 286, p. 971-974, 1999.

MEYER, P.; PRODROMOU, C.; LIAO, C.; HU, B.; ROE, S. M.; VAUGHAN, C. K.; VLASIC, I.; PANARETOU, B.; PIPER, P. W.; PEARL, L. H. Structural basis for recruitment of the ATPase activator Aha1 to the Hsp90 chaperone machinery. **EMBO Journal**, v. 23, p. 1402-1410, 2004.

MORONI, E.; ZHAO, H.; BLAGG, B. S. J.; COLOMBO, G. Exploiting Conformational Dynamics in Drug Discovery: Design of C-Terminal Inhibitors of Hsp90 with Improved Activities. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 54, p. 195, 2014.

MÜLLER, B. A. Imatinib and its successors-how modern chemistry has changed drug development. **Current Pharmaceutical Design**, v. 15, p. 120-133, 2009.

MUNSTER, P. N.; MARCHION, D. C.; BASSO, A. D.; ROSEN, N. Degradation of HER2 by Ansamycins Induces Growth Arrest and Apoptosis in Cells with HER2 Overexpression via a HER3, Phosphatidylinositol 3'-Kinase-AKT-dependent Pathway. **Cancer Research**, v. 62, p. 3132-3137, 2002.

MURRAY, R. D. H. **Naturally Occurring Plant Coumarins**. p. 200-209, Springer Verlag Wien, 1978.

NEMOTO, T.; ORAHA-NEMOTO, Y.; OTA, M.; TAKAGI, T.; YOKOYAMA, K. Mechanism of dimer formation of the 90-KDa heat-shock protein. **European Journal of Biochemistry/FEBS**, v. 233, p 1-8, 1995.

PASSERINI, M. Isonitriles. II. Compounds with aldehydes or with ketones and monobasic organic acids. **Gazzetta Chimica Italiana**, v. 51, p. 181, 1921.

PATIL, A. D.; KUMAR, N. V.; KOKKE, C. W.; BEAN, M. F.; FREYER, A. J.; DE BROSSE, C.; MAI, S.; TRUNEH, A.; FAULKNER D. J.; CARTE, B.; BREEN, A. L.; HERTZBERG, R. P.; JOHNSON, R. K.; WESTLEY, J. W.; POTTST, B. C. M. Novel Alkaloids from the Sponge *Batzella* sp.: Inhibitors of HIV gp120-Human CD4 Binding. **Journal of Organic Chemistry**, v. 60, p. 1182-1188, 1995.

PDB - HSP90 – **Molecule of the month**. Acessado em 12/01/2015 - <http://www.rcsb.org/pdb/101/motm.do?momID=108>

RADANYI, C.; LE BRAS, G.; MESSAOUDI, S.; BOUCLIER, C.; PEYRAT, J.F.; BRION, J.D.; MARSAUD, V.; RENOIR, J.M.; ALAMI, M. Syntheses and preliminary pharmacological evaluation of the two epimers of the 5-F2t-isoprostane. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 18, p. 2495, 2008.

RATZKE, C.; MICKLER, M.; HELLENKAMP, B.; BUCHNER, J.; HUGEL, T. Dynamics of heat shock protein 90 C-terminal dimerization is an important part of its conformational

cycle. **Proceedings of Nation Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, p. 16101-16106, 2010.

ROCHA, D. R.; FERREIRA, V. F.; SANTOS, W. C. Aspectos da síntese orgânica no desenvolvimento de métodos e de moléculas biologicamente ativas. **Revista Processos Químicos**, v. 2, p. 9, 2008.

ROE, S. M.; PRODROMOU, C.; O'BRIEN, R.; LADBURY, J. E.; PIPER, P. W.; PEARL, L. H. Structural Basis for Inhibition of the Hsp90 Molecular Chaperone by the Antitumor Antibiotics Radicicol and Geldanamycin. . **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 42, p. 260, 1999.

ROVNYAK, G. C.; ATWAL, K. S.; HEDBERG, A.; KIMBALL, S. D.; MORELAND, S.; GOUGOUTAS, J. Z.; O'REILLY, B. C.; SCHWARTZ, J.; MALLEY, M. F. Dihydropyrimidine calcium channel blockers. 4. Basic 3-substituted-4-aryl-1,4-dihydropyrimidine-5-carboxylic acid esters. Potent antihypertensive agents. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 35, p. 3254-3263, 1992.

SANCHEZ, Y.; LINDQUIST, S. L. Hsp104 required for induced thermotolerance. **Science**, v. 248, p. 1112-1115, 2000.

SANGSTER, T. A.; QUEITSCH, C. The Hsp90 chaperone complex, an emerging force in plant development and phenotypic plasticity. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 8, p. 86-92, 2005.

SATPATI, A. S.; KUMBHAKAR, M.; NATH, S.; PAL, H. Photophysical Properties of Coumarin-7 Dye: Role of Twisted Intramolecular Charge Transfer State in High Polarity Protic Solvents. **Photochemistry and Photobiology**, v. 85, p. 119-129, 2009.

SHARGHI, H.; JOKAR, M. Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/MeSO<sub>3</sub>H: A Novel and Recyclable Catalyst for One-Pot Synthesis of 3,4-Dihydropyrimidinones or Their Sulfur Derivatives in Biginelli Condensation. **Synthetic Communications**, v. 39, p. 958-979, 2009.

SIVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7<sup>a</sup> ed., LTC Editora S. A., p. 490, 2000.

SLOBBE, P.; RUIJTER, E.; ORRU, R. V. A. Recent applications of multicomponent reactions in medicinal chemistry. **Medicinal Chemistry Communications**, v. 3, p. 1189-1218, 2012.

SOTI, C. RACZ, A. CSEMELY, P. A nucleotide-dependent molecular switch controls ATP binding at the C-terminal domain of Hsp90. N-terminal nucleotide binding unmask a C-terminal binding pocket. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 7066-7075, 2002.

SPECENIER, P.; VERMORKEN, J. B. Biologic Therapy in Head and Neck Cancer: A Road with Hurdles. **ISRN Oncology**, v. 2012, p. 163752, 2012.

SPECHT, D. P.; MARTIC, P. A.; FARID, S. Ketocoumarins: A new class of triplet sensitizers. **Tetrahedron**, v. 38, p. 1203-1211, 1982.

STEFANI, H. A.; OLIVEIRA, C. B.; ALMEIDA, R. B.; PEREIRA, C. M. P.; BRAGA, R. C.; CELLA, R.; BORGES, V. C.; SAVEGNAGO, L.; NOGUEIRA, C. W. Dihydropyrimidin-(2H)-ones obtained by ultrasound irradiation: a new class of potential antioxidant agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 30, p. 513-518, 2006.

STRECKER, A. The artificial synthesis of lactic acid and a new homologue of glycine. **Justus Liebigs Annalen der Chemie**, v. 75, p. 27, 1850.

SWEET, F. S.; FISSEKIS, J.D. Synthesis of 3,4-dihydro-2(1H)-pyrimidinones and the mechanism of the Biginelli reaction. **Journal of the American Chemical Society**, v. 95, p. 8741, 1973.

TIROLI-CEPEDA, A. O.; RAMOS, C. H. An Overview of the Role of Molecular Chaperones in Protein Homeostasis. **Protein and Peptide Letters**, v. 18, p. 101-109, 2011.

TOURÉ, B. B.; HALL, D. G. Natural Product Synthesis Using Multicomponent Reaction Strategies. **Chemical Reviews**, v. 109, p. 4439–4486, 2009.

UGI, I.; MEYR, R.; FETZER, U.; STEINBRUCKNER, C. Studies on isonitriles. **Angewandte Chemie**, v. 71, p. 386, 1959.

VALEUR, B. **Molecular Fluorescence: Principles and Applications**, p. 273–350, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2001.

VITÓRIO, F.; PEREIRA, T. M.; CASTRO, R. N.; GUEDES, G. P.; GRAEBIN, C. S.; KUMMERLE, A. E. Synthesis and mechanism of novel fluorescent coumarin–dihydropyrimidinone dyads obtained by the Biginelli multicomponent reaction. **New Journal of Chemistry**, v. 39, p. 2323-2332, 2015.

WHITESELL, L.; LINDQUIST, S. L. Hsp90 and the chaperoning of cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 5, p. 761-772, 2005.

WHITESELL, L.; MIMNAUGH, E. G.; DE COSTA, B.; MYERS, C. E.; NECKERS, L. M. Inhibition of heat shock protein Hsp90-pp60 heteroprotein complex formation by benzoquinone ansamycins: essential role for stress proteins in oncogenic transformation. **Proceedings of Nation Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, p. 8324-8328, 1994.

YOUNG, J. C.; MOAREFI, I.; HARLI, F. U. Hsp90: a specialized but essential protein-folding tool. **Journal of Cell Biology**, v. 154, p. 267-273, 2001.

ZHAO, H.; DONNELLY, A. C.; KUSUMA, B. R.; BRANDT, G. E. L.; BROWN, D.; RAJEWSKI, R. A.; VIELHAUER, G.; HOLZBEIERLEIN, J.; COHEN, M. S.; BLAGG, B. S. J. Engineering an Antibiotic to Fight Cancer: Optimization of the Novobiocin Scaffold to



Produce Anti-proliferative Agents. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 54, p. 3839-385, 2011.

## **7 – ANEXOS**

Fig. S1- S80 – Espectros de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  RMN e ESI.

Fig. S81 – Artigo Publicado

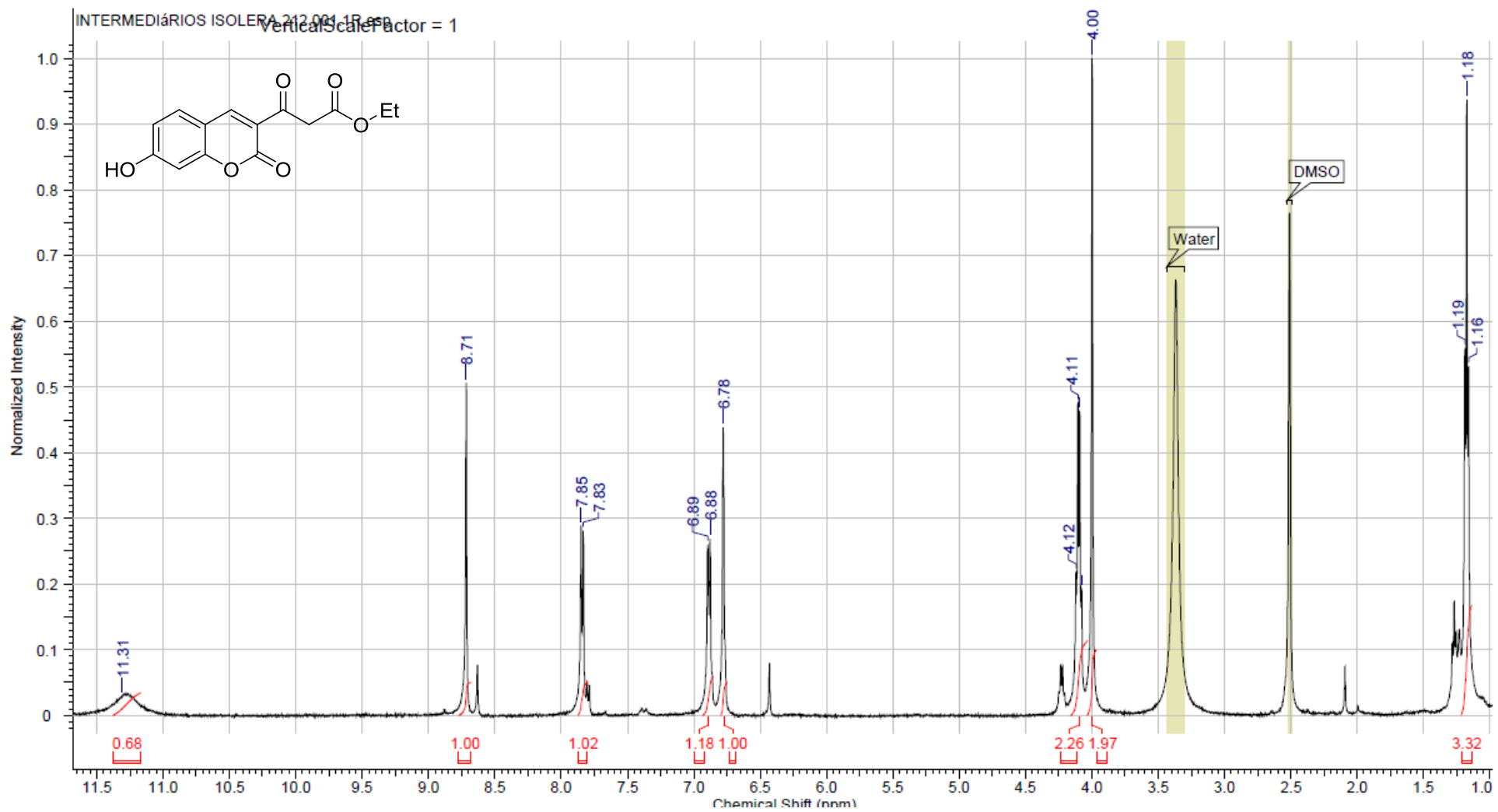


Fig. S1 Espectro de  $^1\text{H}$  RMN (500 MHz) de **105a** em  $\text{DMSO-}d_6$ .

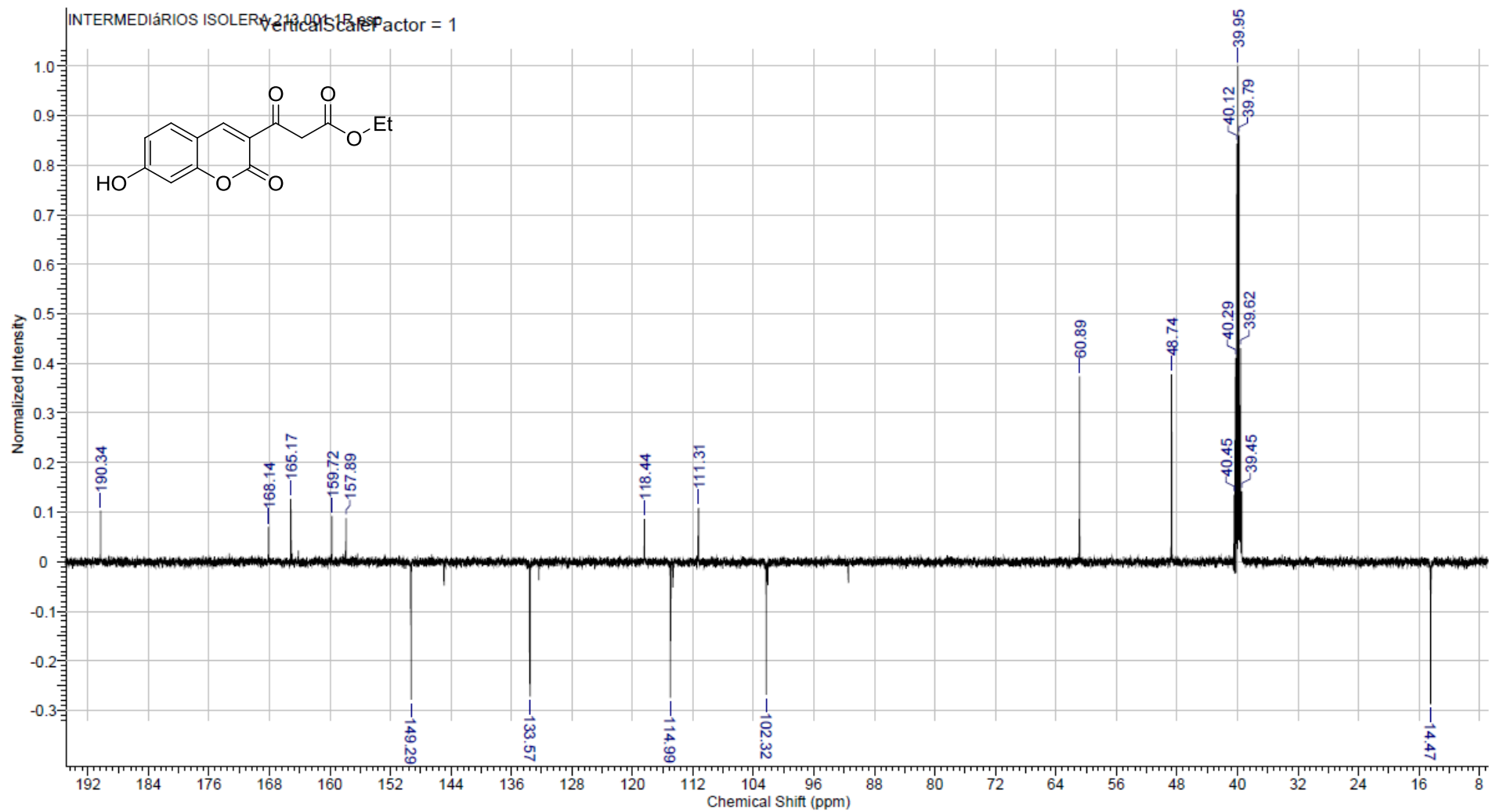


Fig. S2 Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN (125 MHz) de **105a** em  $\text{DMSO-}d_6$ .

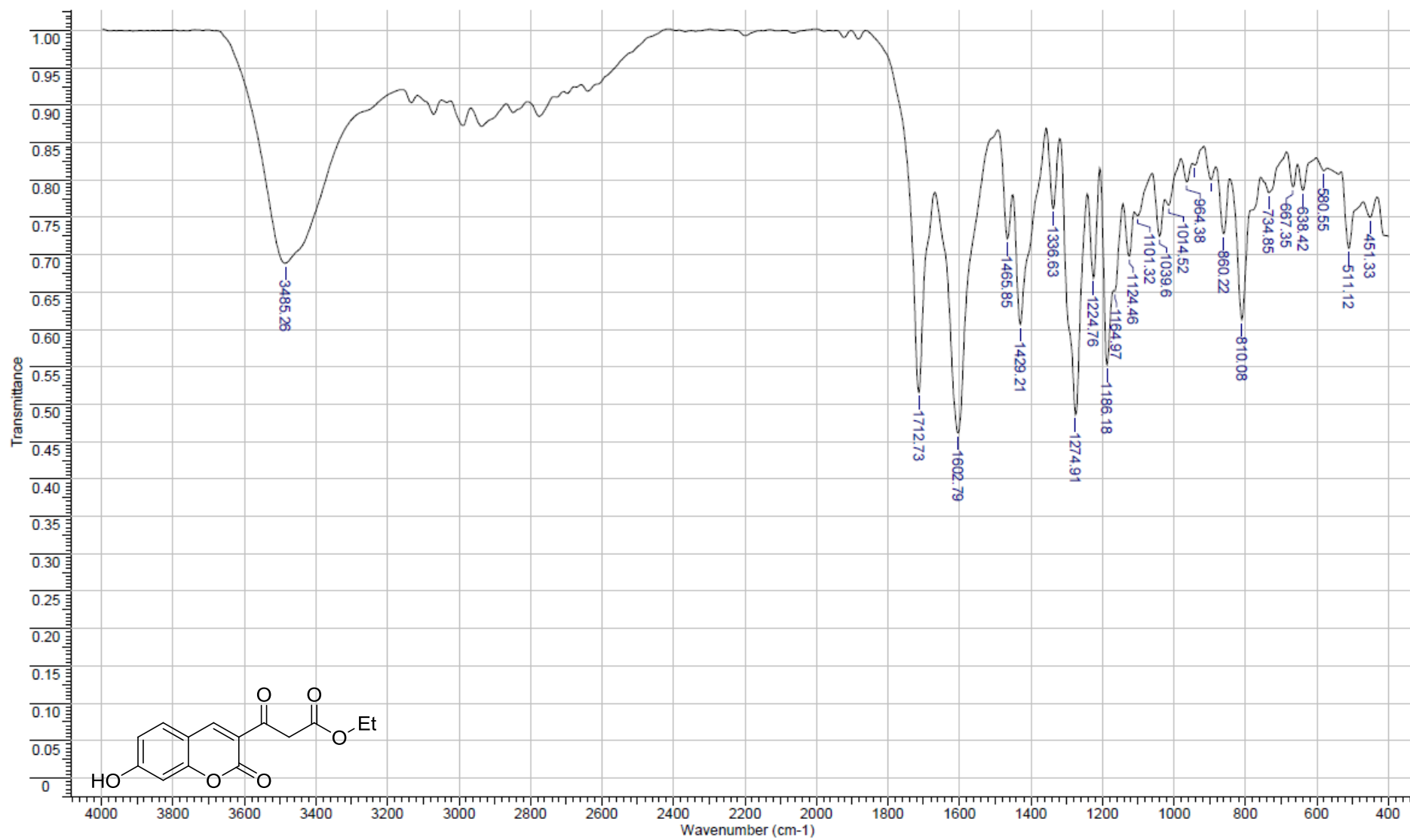


Fig. S3 Espectro de IV em pastilha de KBr de **105a**.

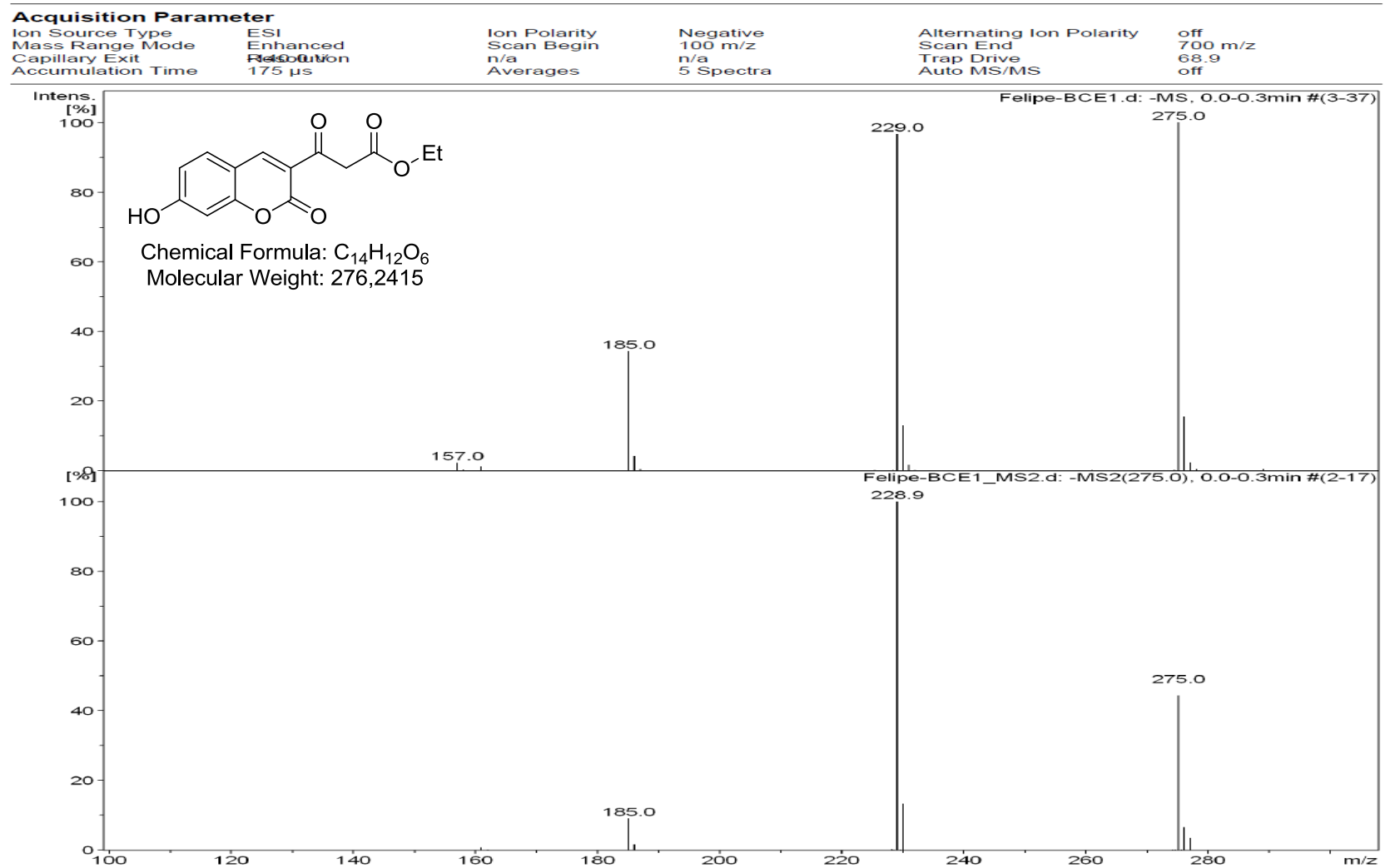


Fig. S4 Espectro ESI de **105a**.

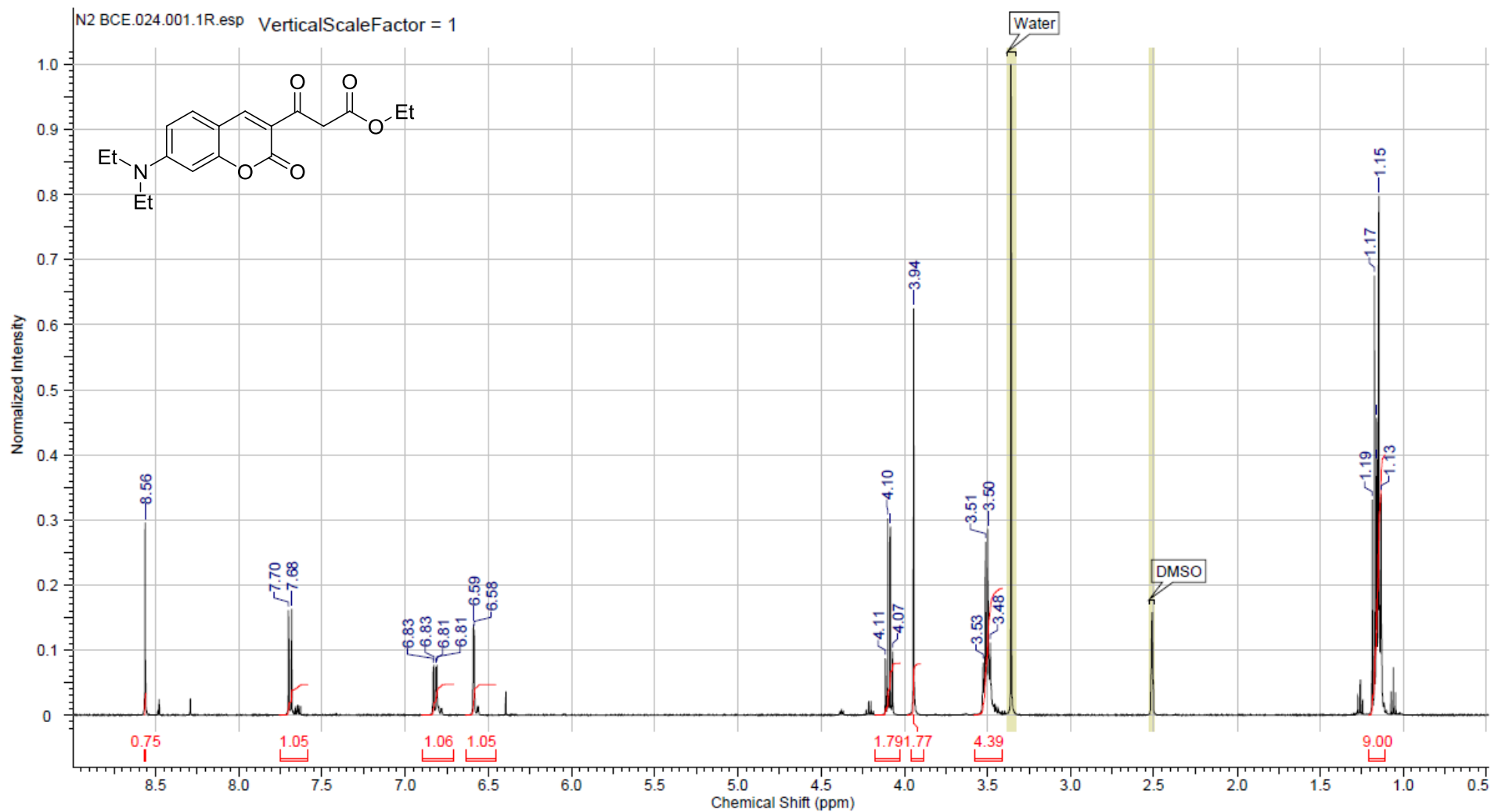


Fig. S5 Espectro de  $^1\text{H}$  RMN (500 MHz) de **105b** em  $\text{DMSO-}d_6$ .

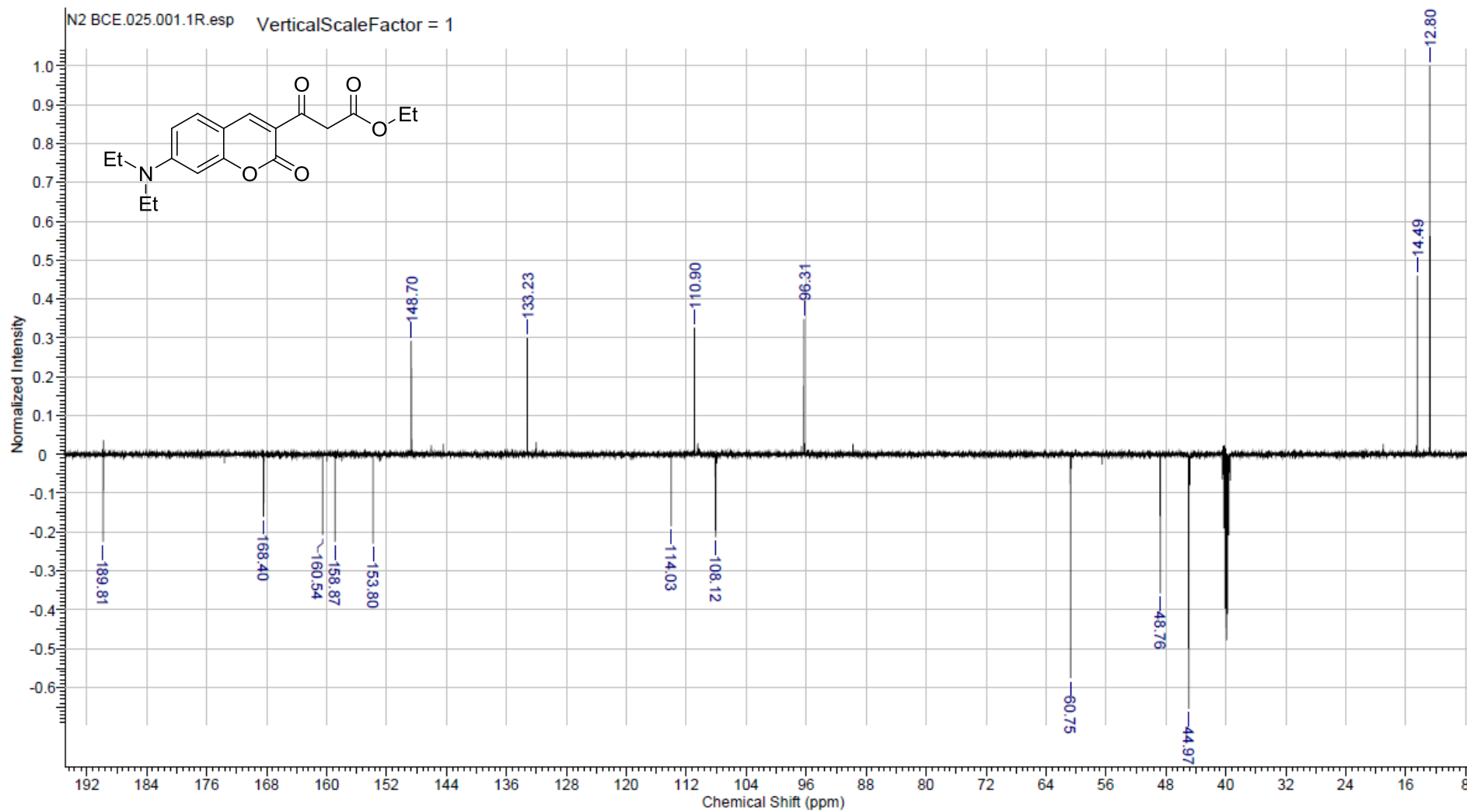


Fig. S6 Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN (125 MHz) de **105b** em  $\text{DMSO-}d_6$ .

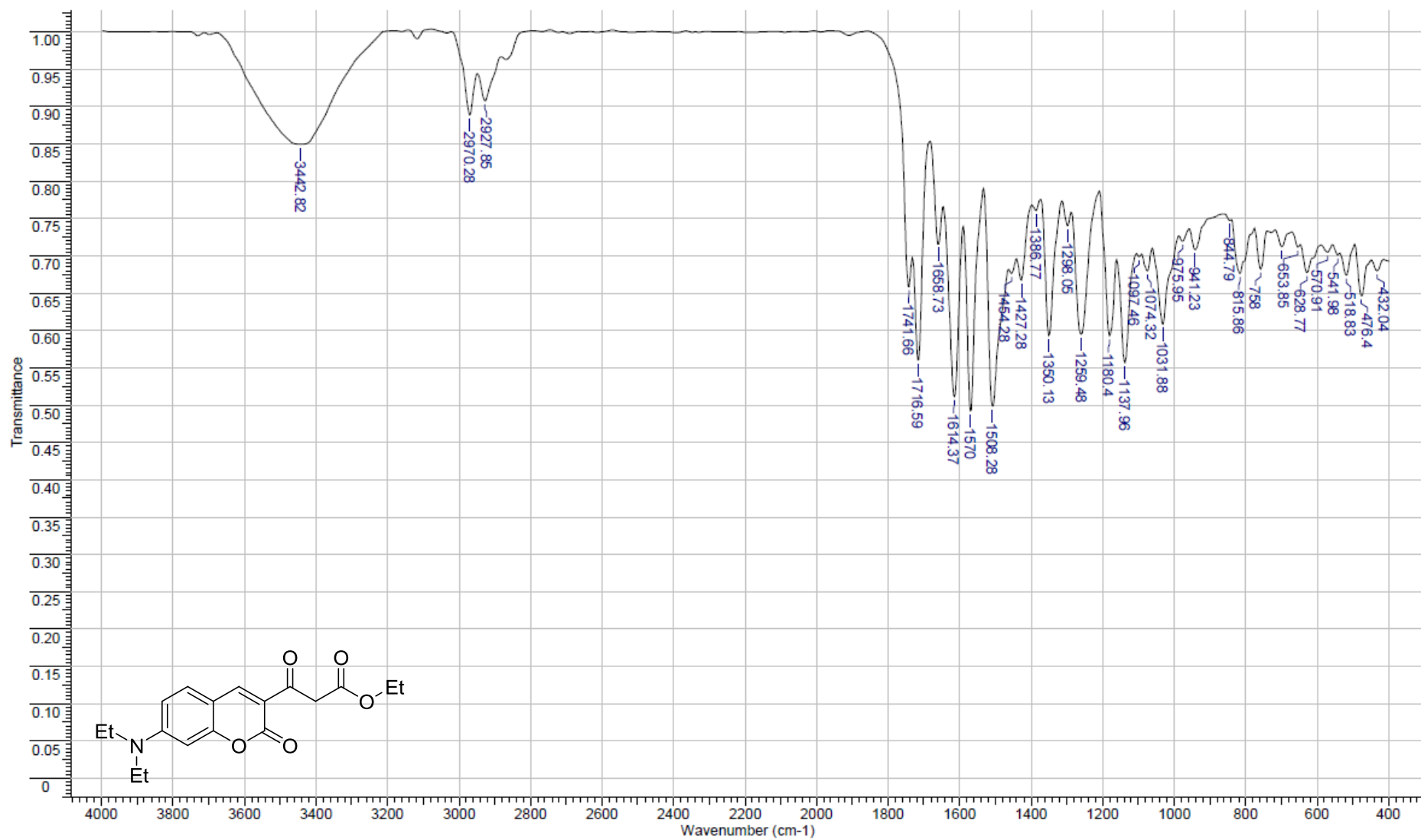


Fig. S7 Espectro de IV em pastilha de KBr de **105b**.



Acquisition Parameter					
Ion Source Type	ESI	Ion Polarity	Negative	Alternating Ion Polarity	off
Mass Range Mode	Enhanced	Scan Begin	100 m/z	Scan End	700 m/z
Capillary Exit	Resolution	n/a	n/a	Trap Drive	68.9
Accumulation Time	2130 $\mu$ s	Averages	5 Spectra	Auto MS/MS	off

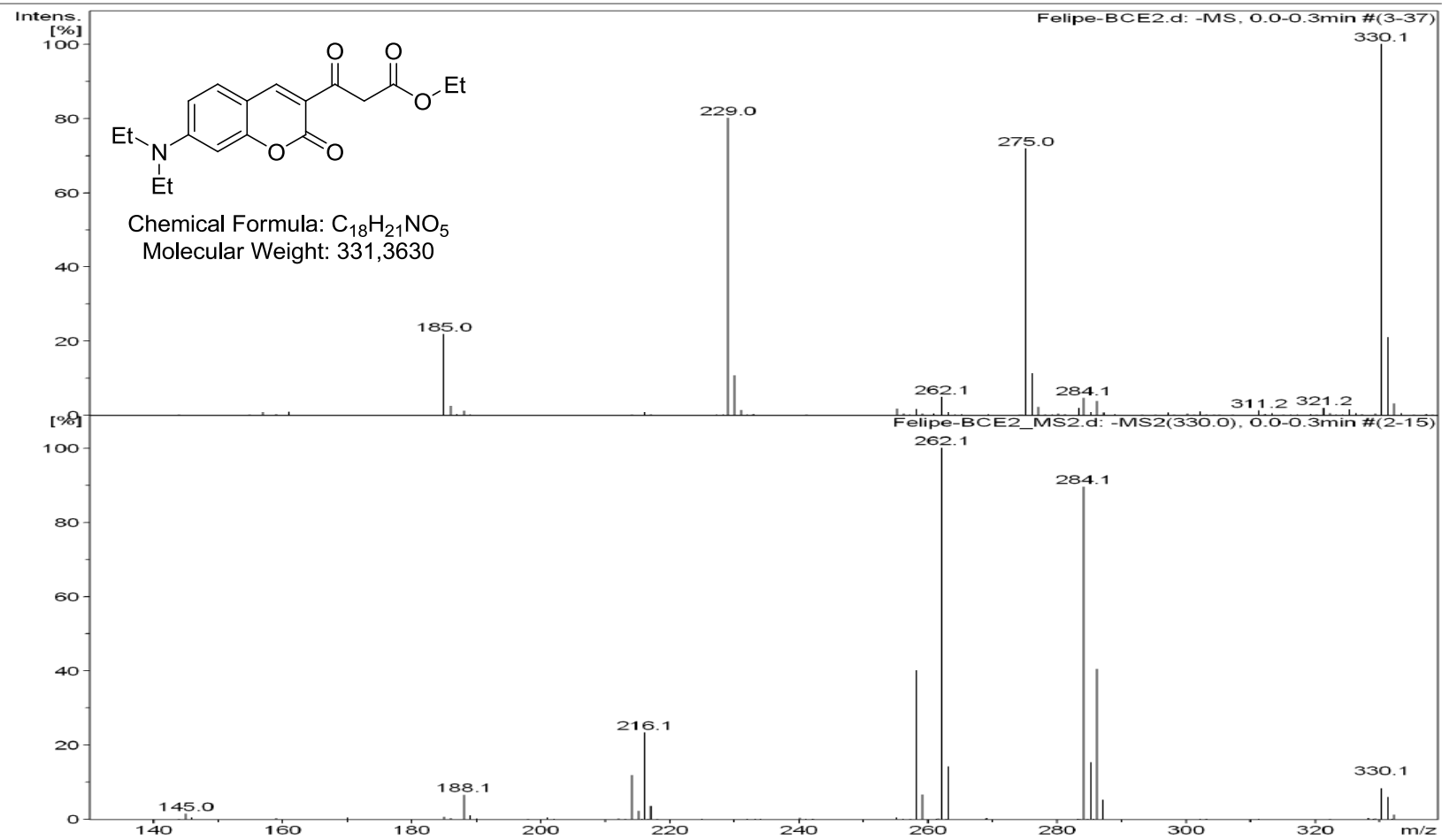


Fig. S8 Espectro ESI de **105b**.

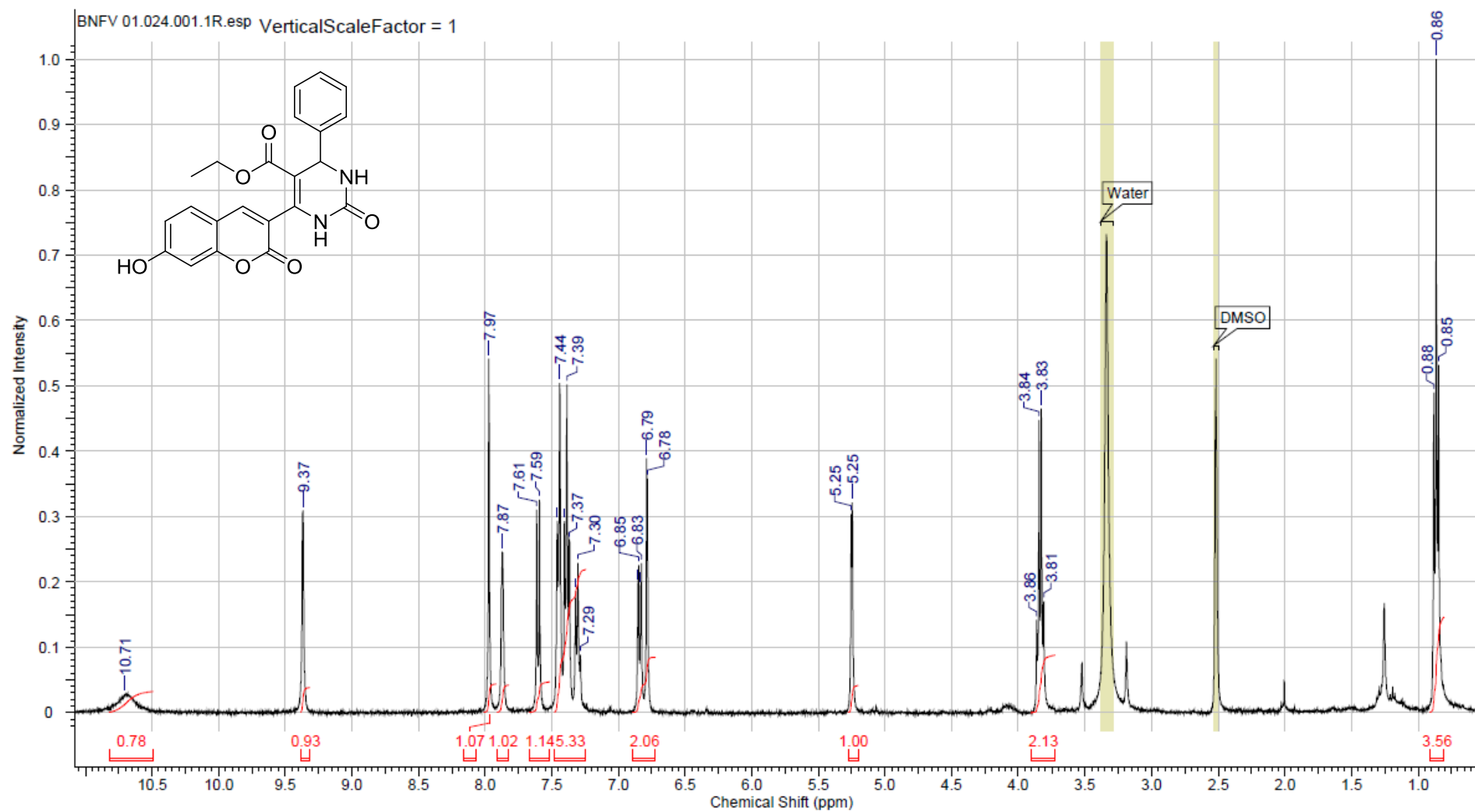


Fig. S9 Espectro de  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz) de **106a** em  $\text{DMSO-}d_6$ .

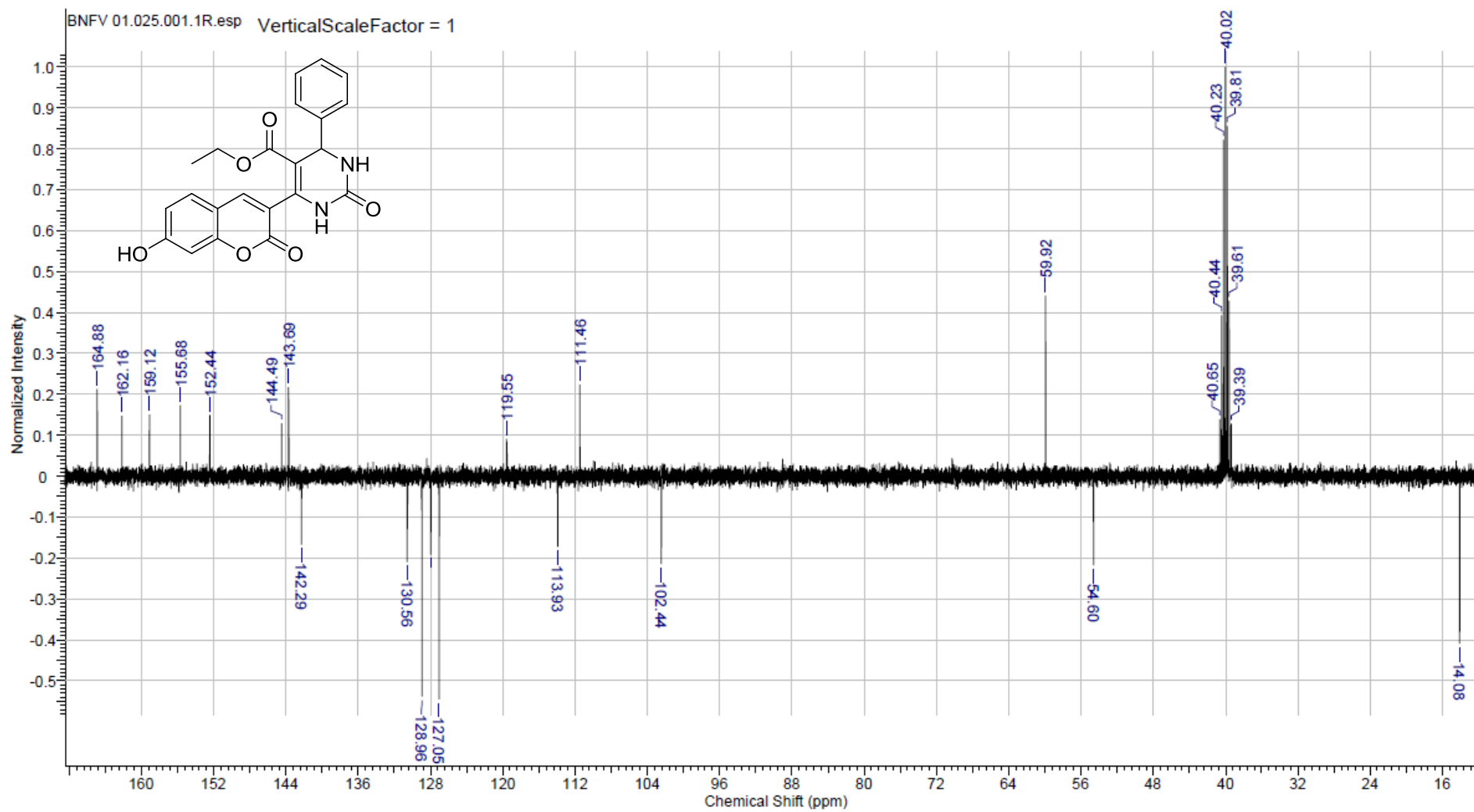


Fig. S10 Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN (100 MHz) de **106a** em  $\text{DMSO-}d_6$ .

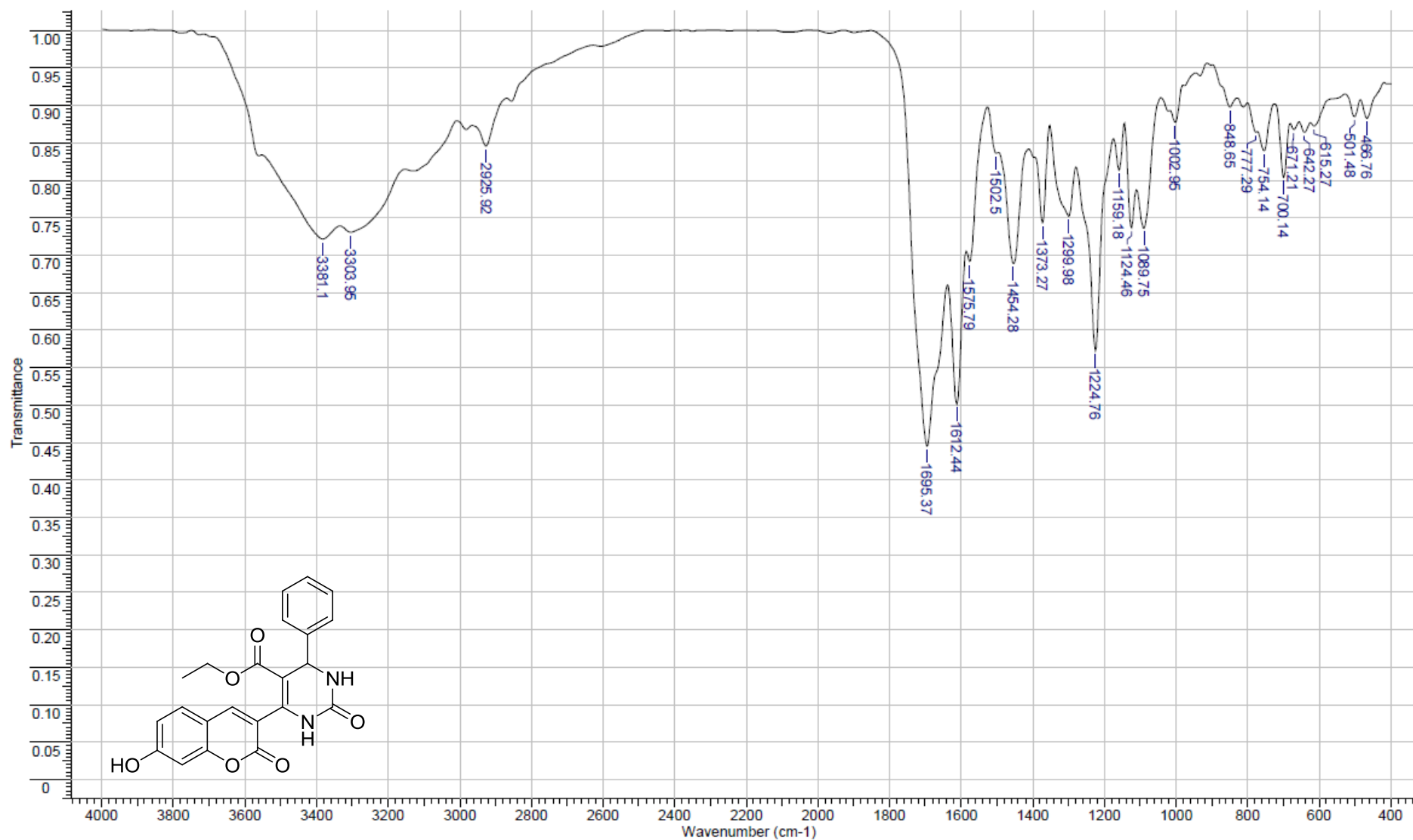


Fig. S11 Espectro de IV em pastilha de KBr de **106a**.

Acquisition Parameter		Ion Polarity	Negative	Alternating Ion Polarity
Ion Source Type	ESI	Scan Begin	100 m/z	off
Mass Range Mode	Enhanced Resolution	Scan End	n/a	700 m/z
Capillary Exit	Resolution	n/a	n/a	Trap Drive
Accumulation Time	219 $\mu$ s	Averages	5 Spectra	Auto MS/MS
				off

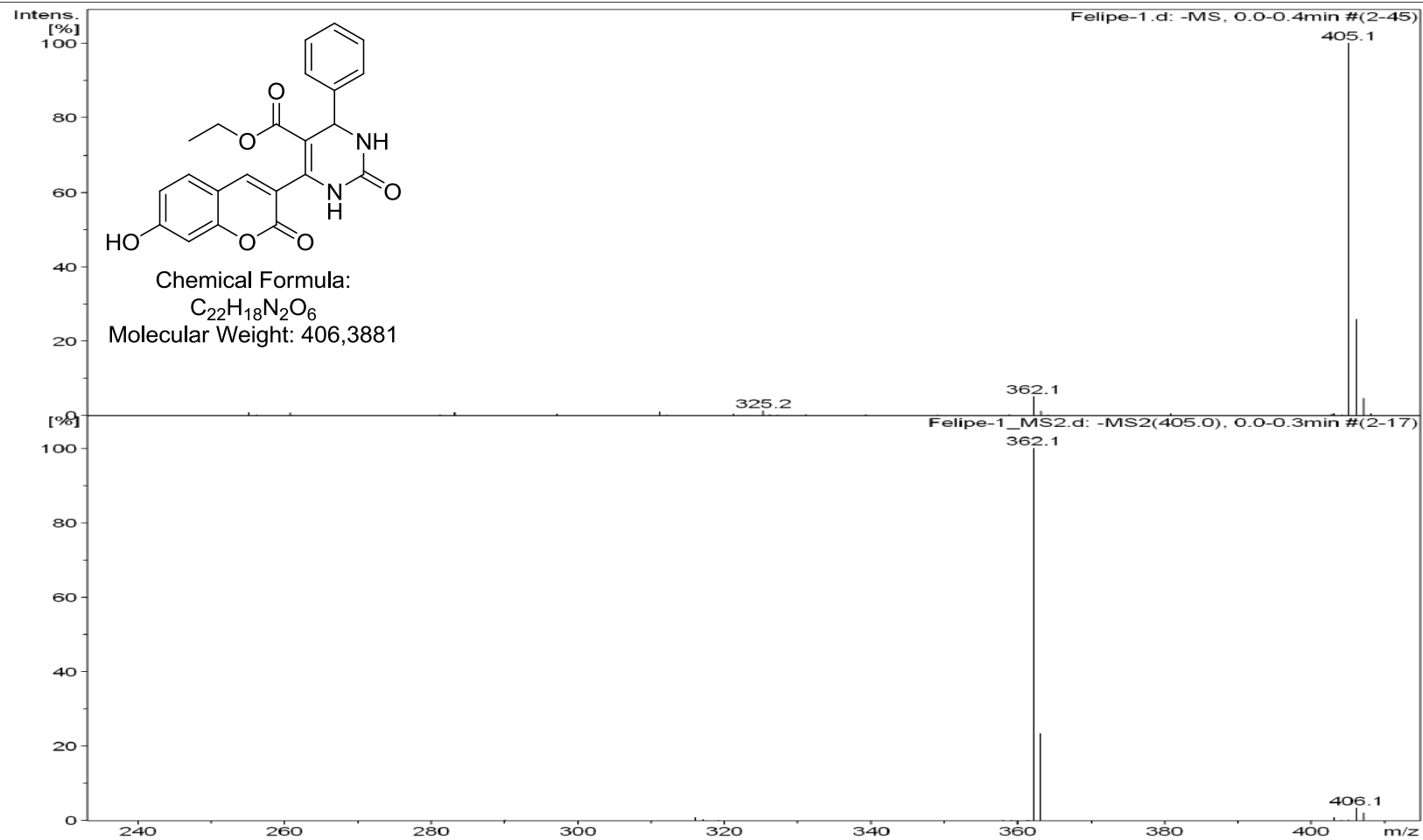


Fig. S12 Espectro ESI de 106a.

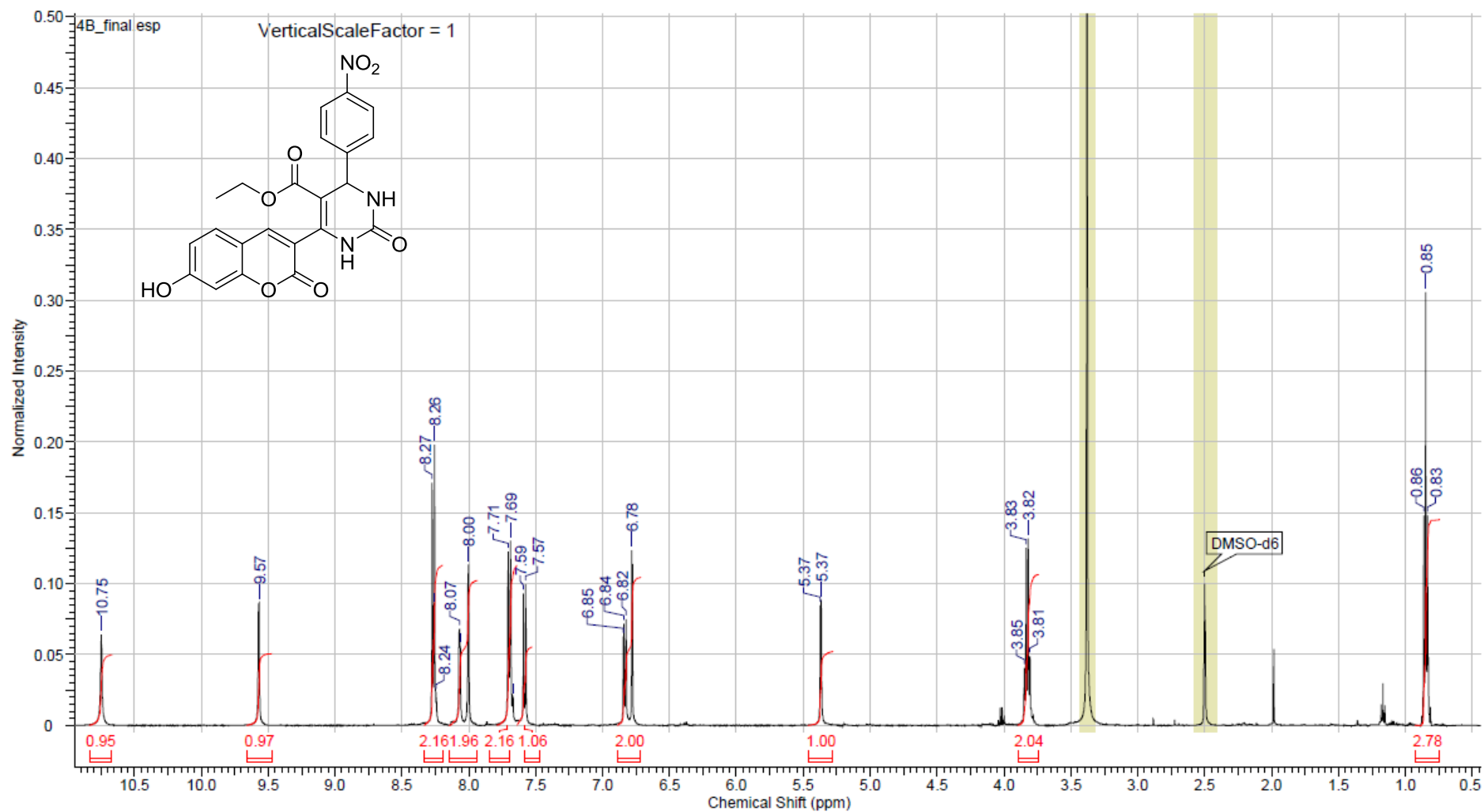


Fig. S13 Espectro de  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz) de **106b** em DMSO- $d_6$ .

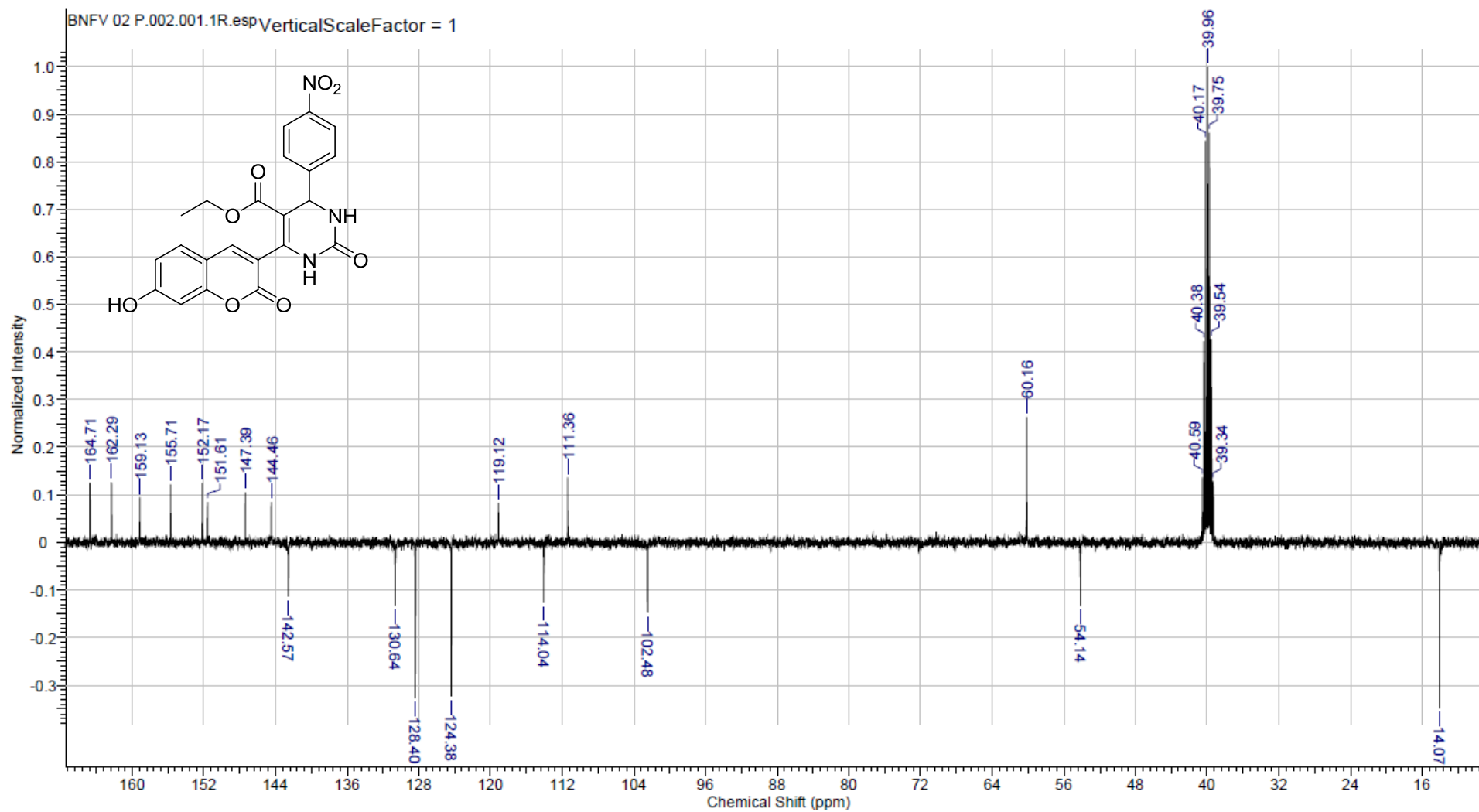


Fig. S14 Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN (100 MHz) de **106b** em  $\text{DMSO-}d_6$ .

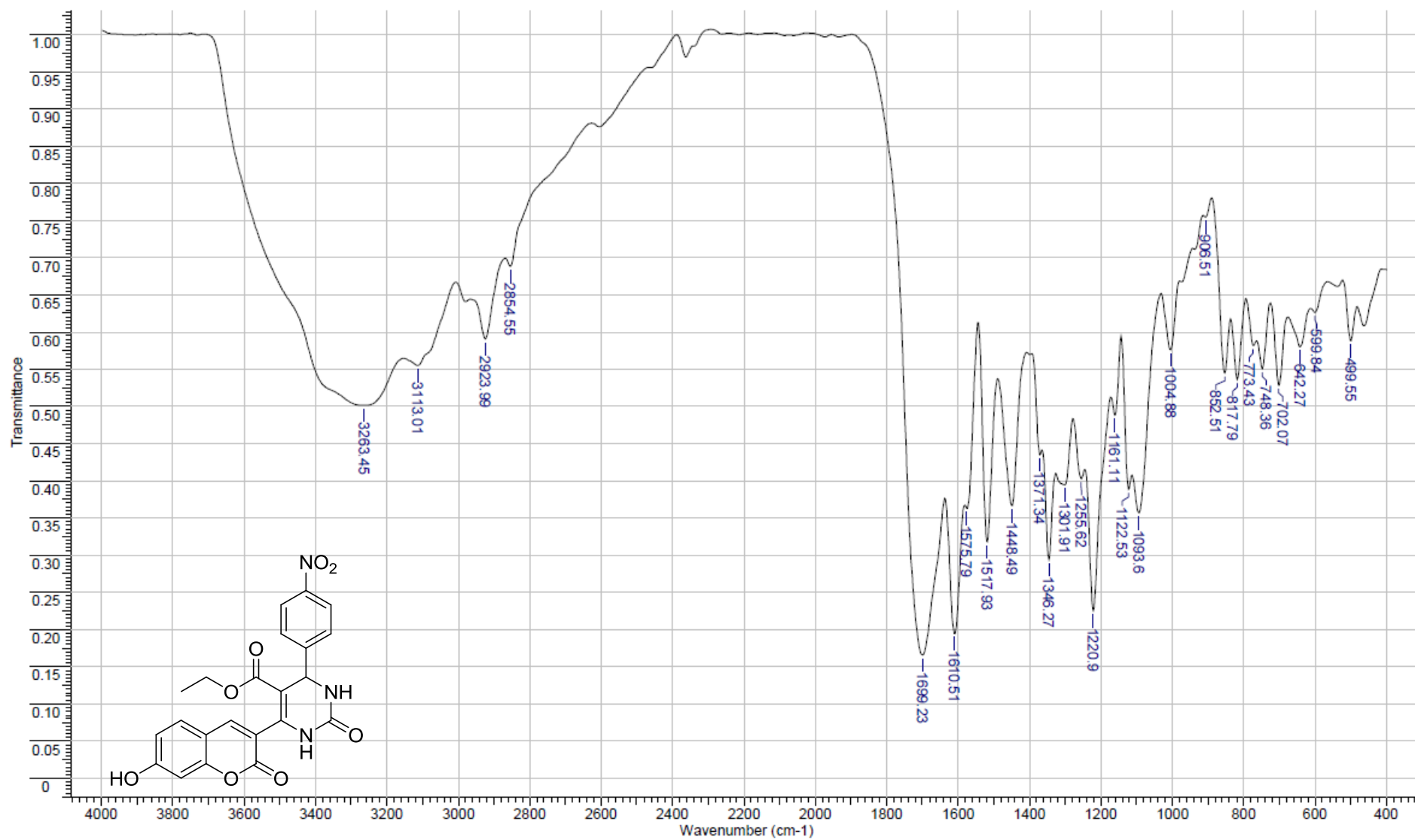


Fig. S15 Espectro de IV em pastilha de KBr de **106b**.



**Acquisition Parameter**

Ion Source Type	ESI	Ion Polarity	Negative	Alternating Ion Polarity	off
Mass Range Mode	Enhanced	Scan Begin	100 m/z	Scan End	700 m/z
Capillary Exit	Resolution	n/a	n/a	Trap Drive	68.9
Accumulation Time	13906 $\mu$ s	Averages	5 Spectra	Auto MS/MS	off

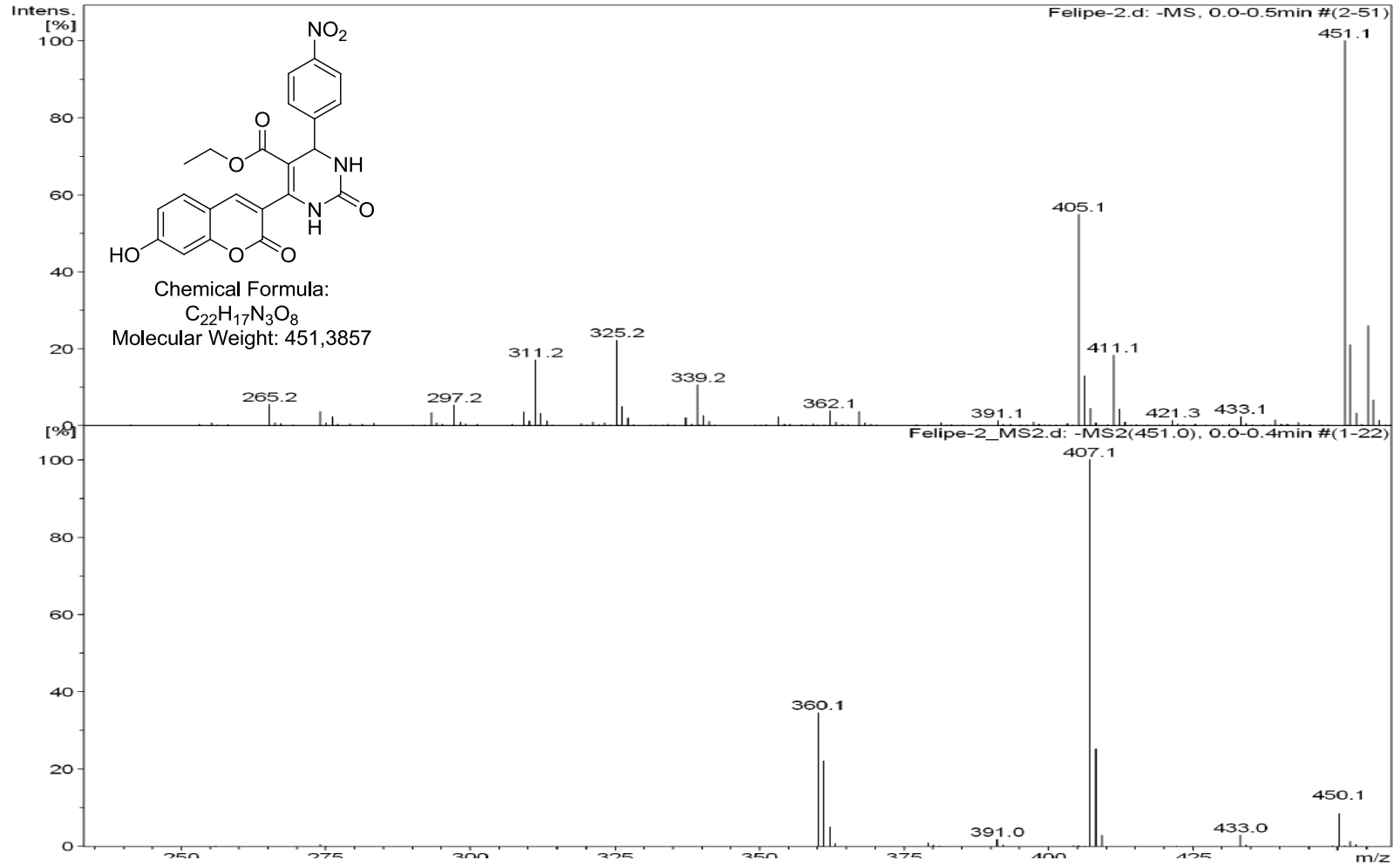


Fig. S16 Espectro ESI de 106b.

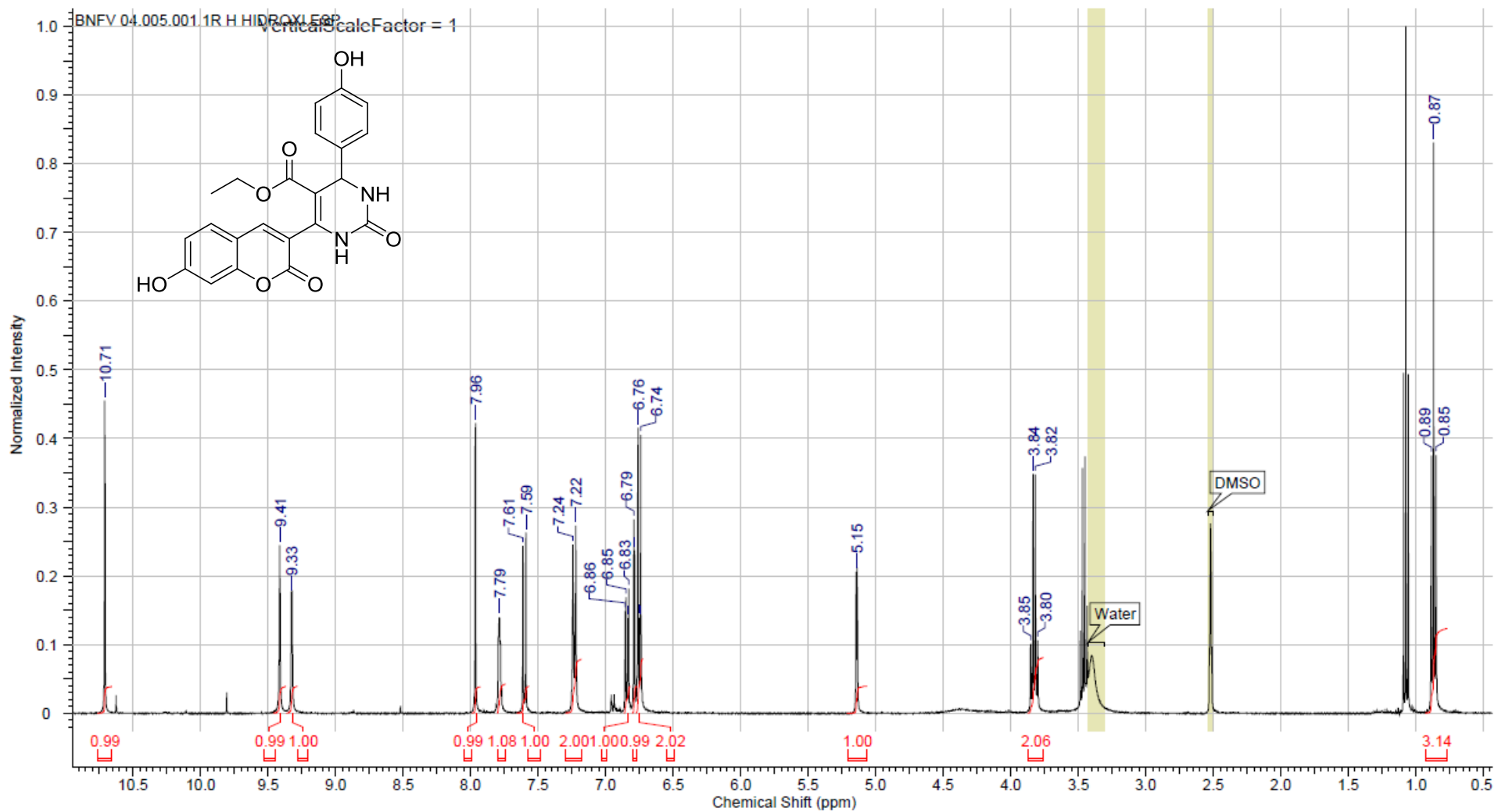


Fig. S17 Espectro de  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz) de **106c** em  $\text{DMSO-}d_6$ .

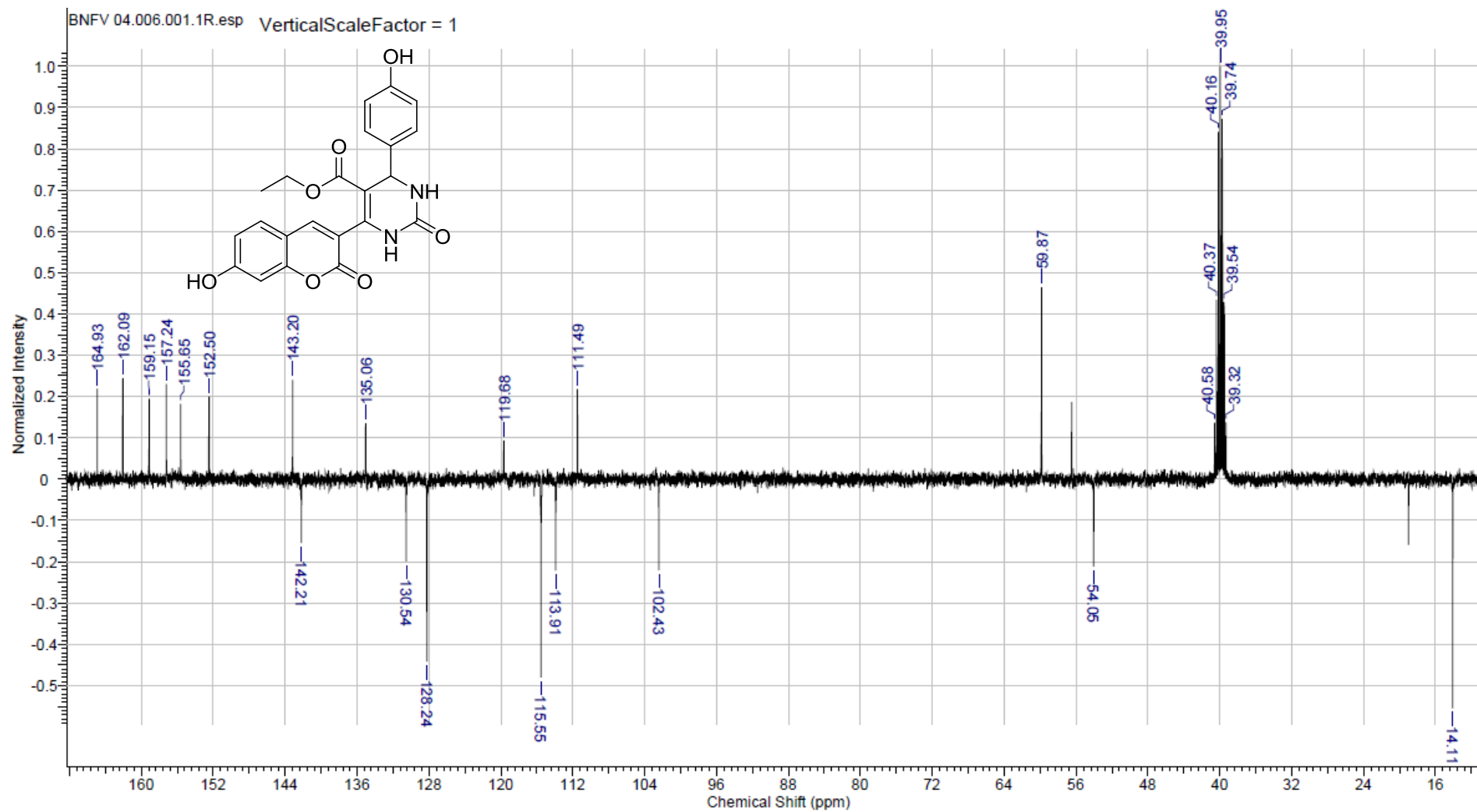


Fig. S18 Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN (100 MHz) de **106c** em  $\text{DMSO-}d_6$ .

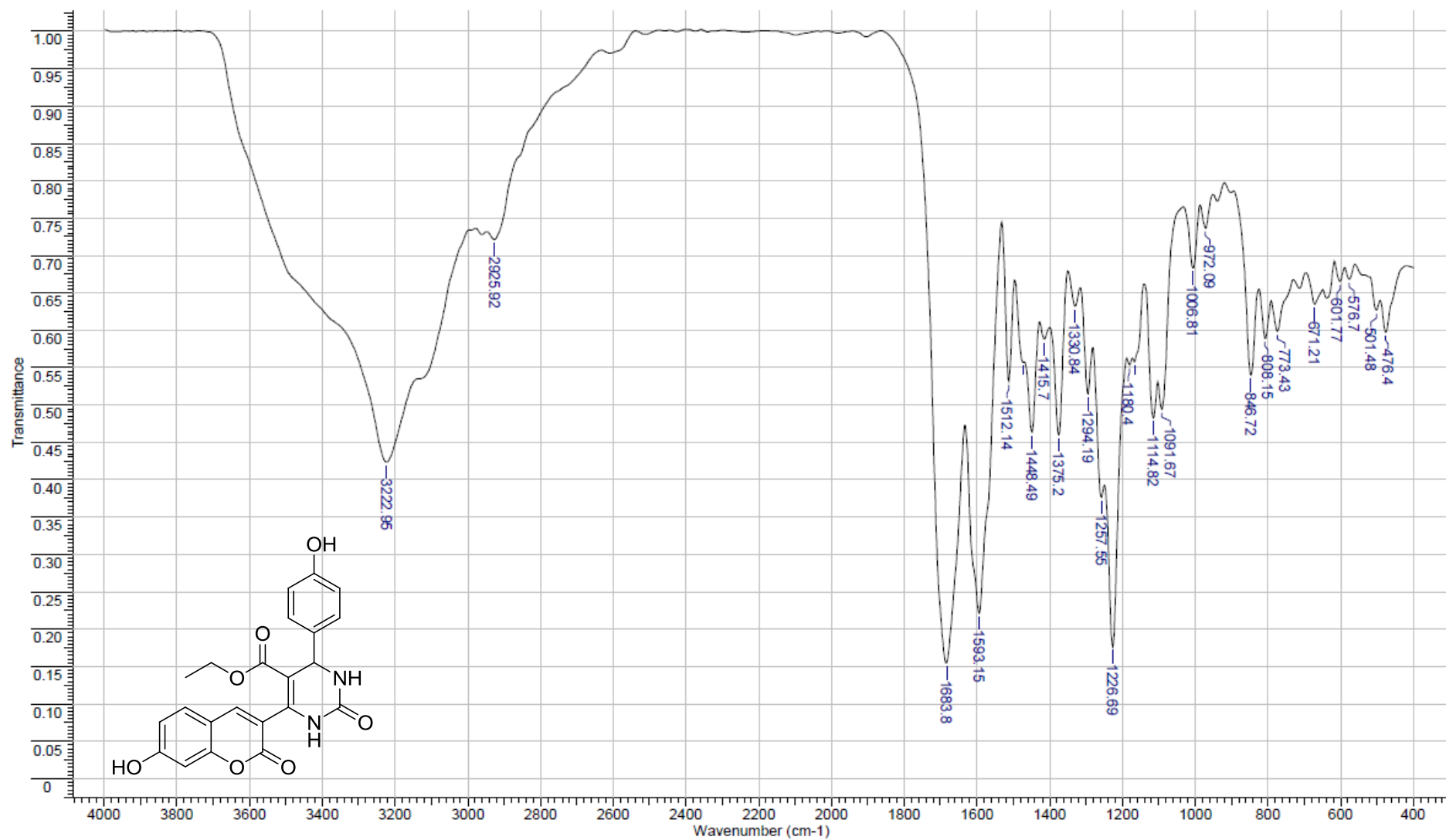


Fig. S19 Espectro de IV em pastilha de KBr de **106c**.

**Acquisition Parameter**

Ion Source Type	ESI	Ion Polarity	Negative	Alternating Ion Polarity	off
Mass Range Mode	Enhanced	Scan Begin	100 m/z	Scan End	700 m/z
Capillary Exit	Resolution	n/a	n/a	Trap Drive	68.9
Accumulation Time	332 $\mu$ s	Averages	5 Spectra	Auto MS/MS	off

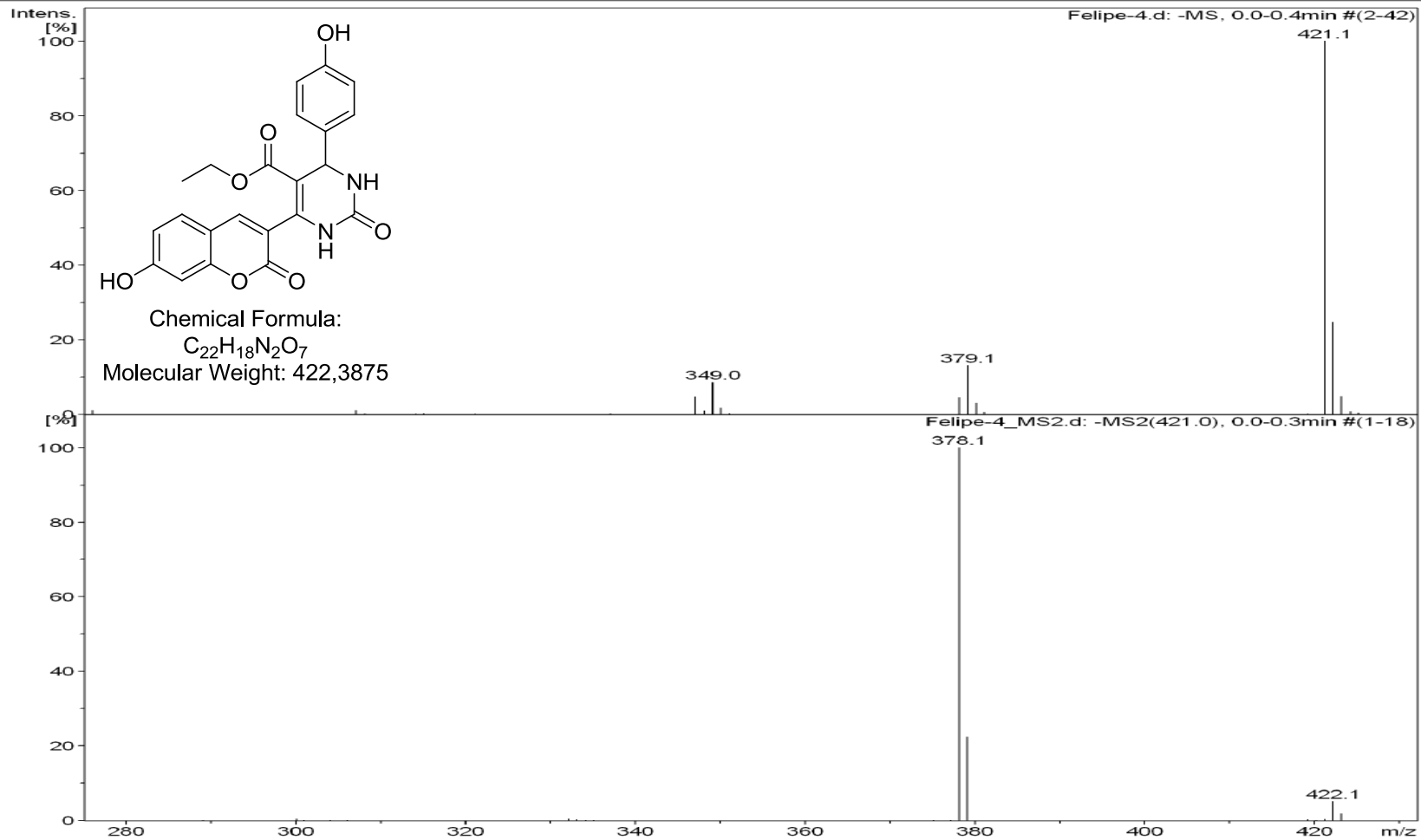


Fig. S20 Espectro ESI de 106c.

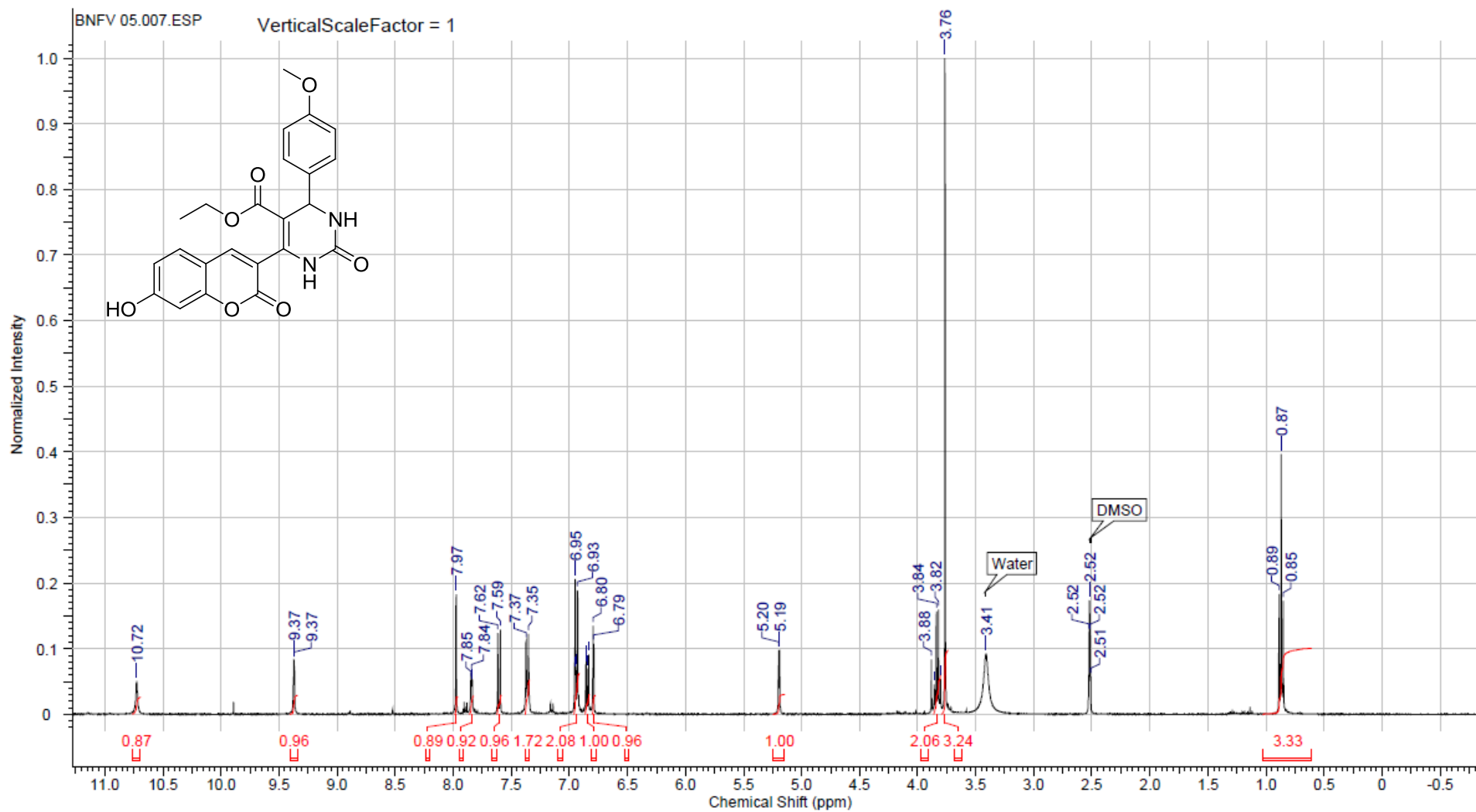


Fig. S21 Espectro de  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz) de **106d** em  $\text{DMSO-}d_6$ .

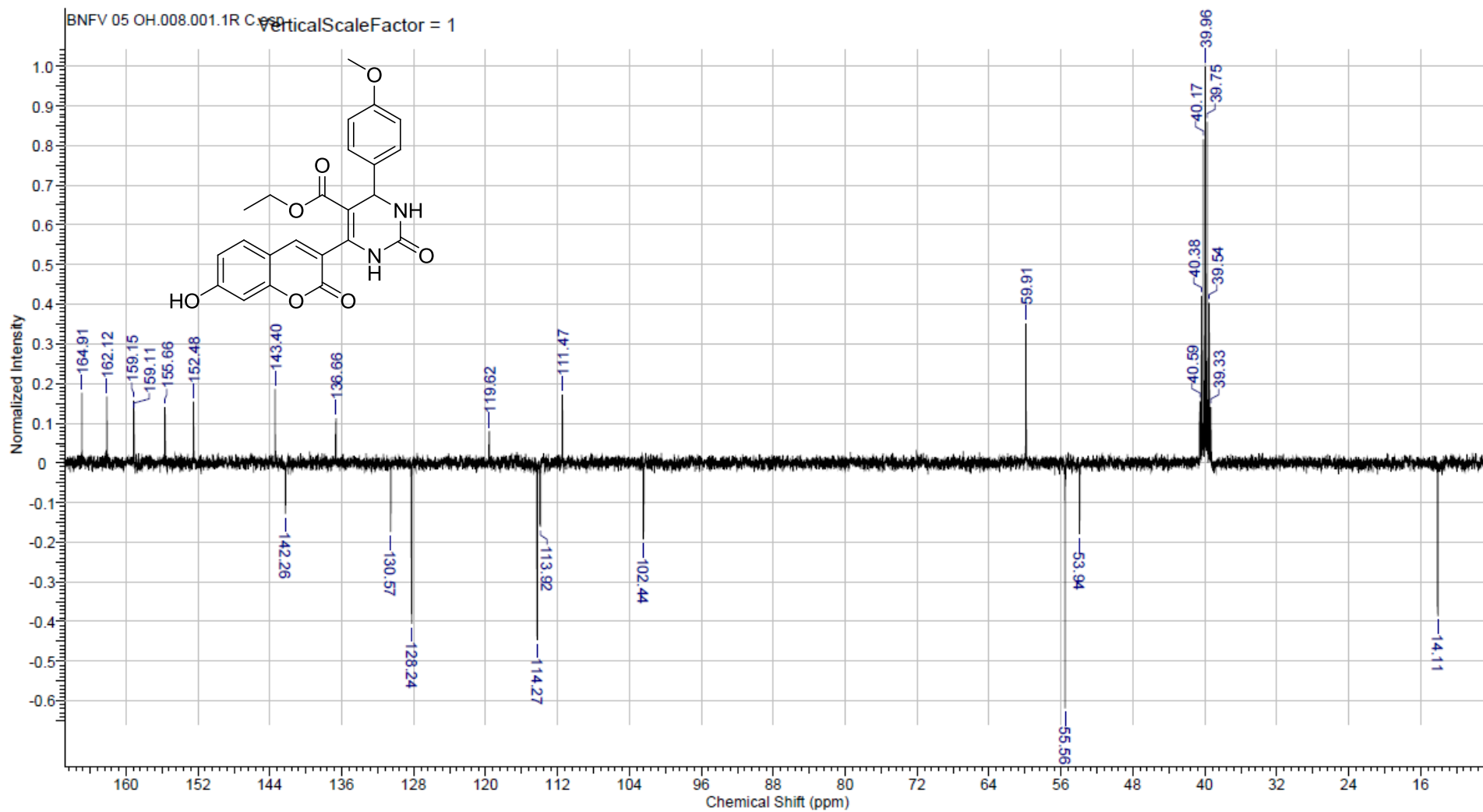


Fig. S22 Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN (100 MHz) de **106d** em  $\text{DMSO-}d_6$ .

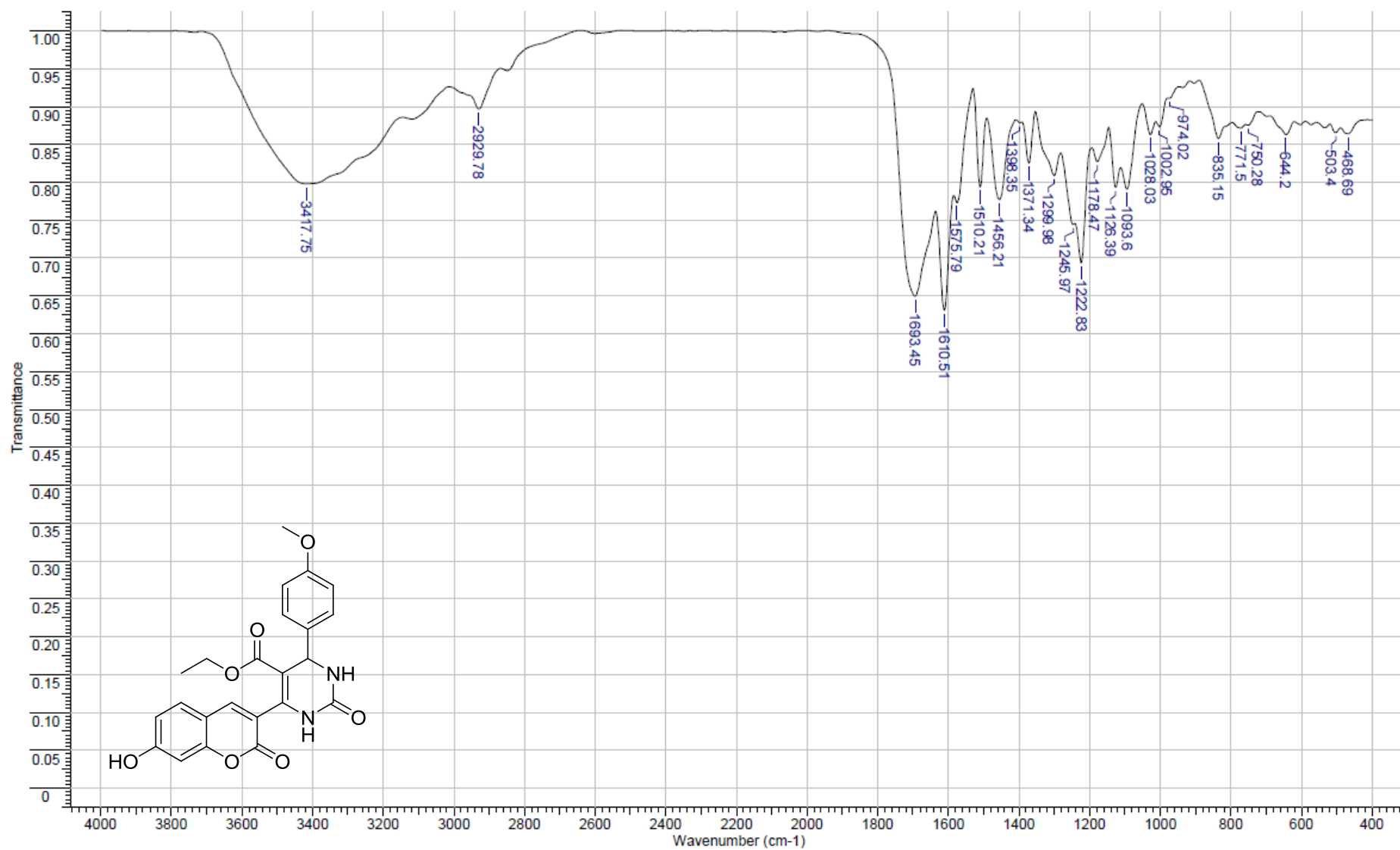


Fig. S23 Espectro de IV em pastilha de KBr de **106d**.



**Acquisition Parameter**

Ion Source Type	ESI	Ion Polarity	Negative	Alternating Ion Polarity	off
Mass Range Mode	Enhanced	Scan Begin	100 m/z	Scan End	700 m/z
Capillary Exit	Resolution	n/a	n/a	Trap Drive	68.9
Accumulation Time	139 $\mu$ s	Averages	5 Spectra	Auto MS/MS	off

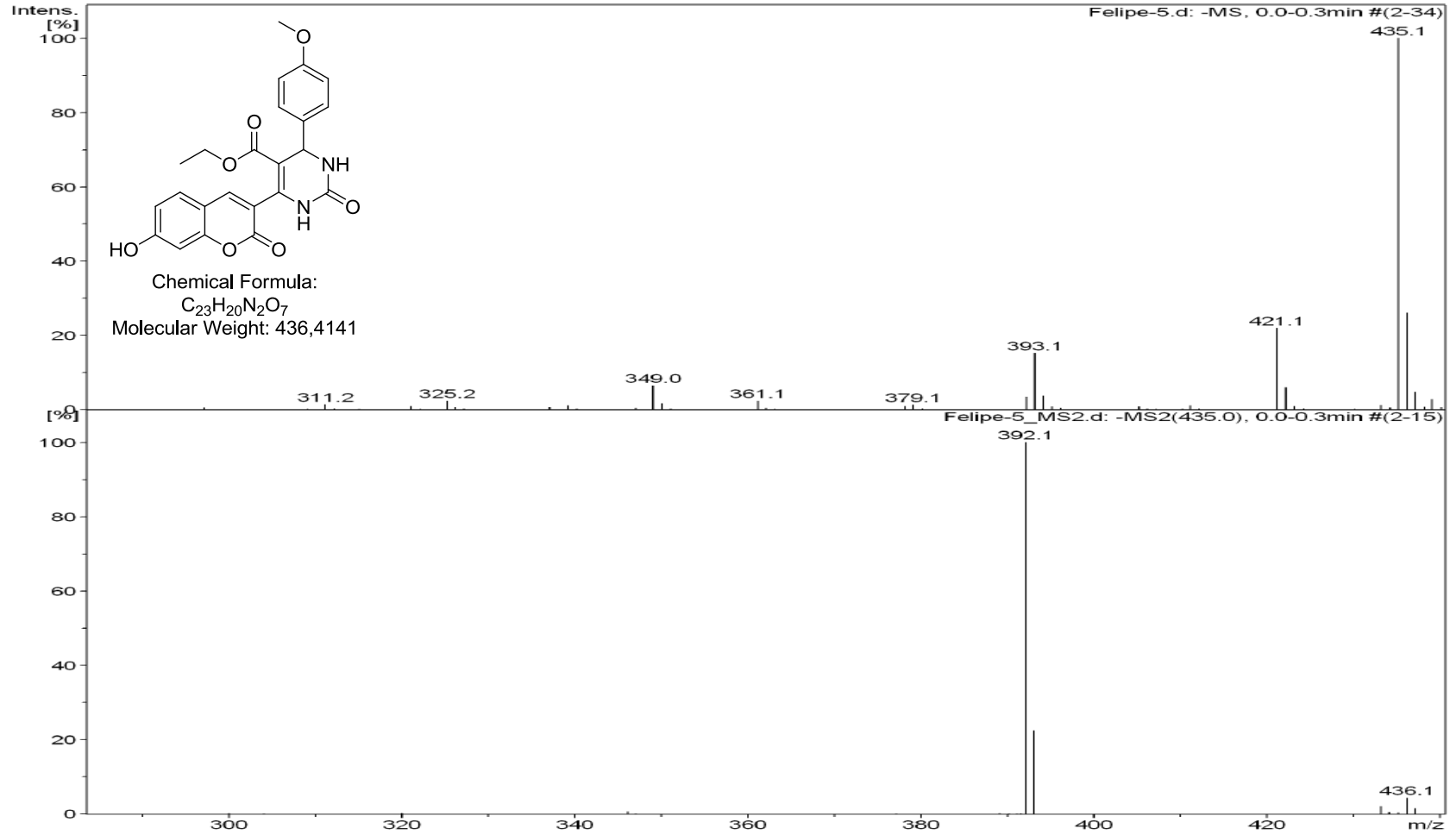


Fig. S24 Espectro de ESI de 106d.

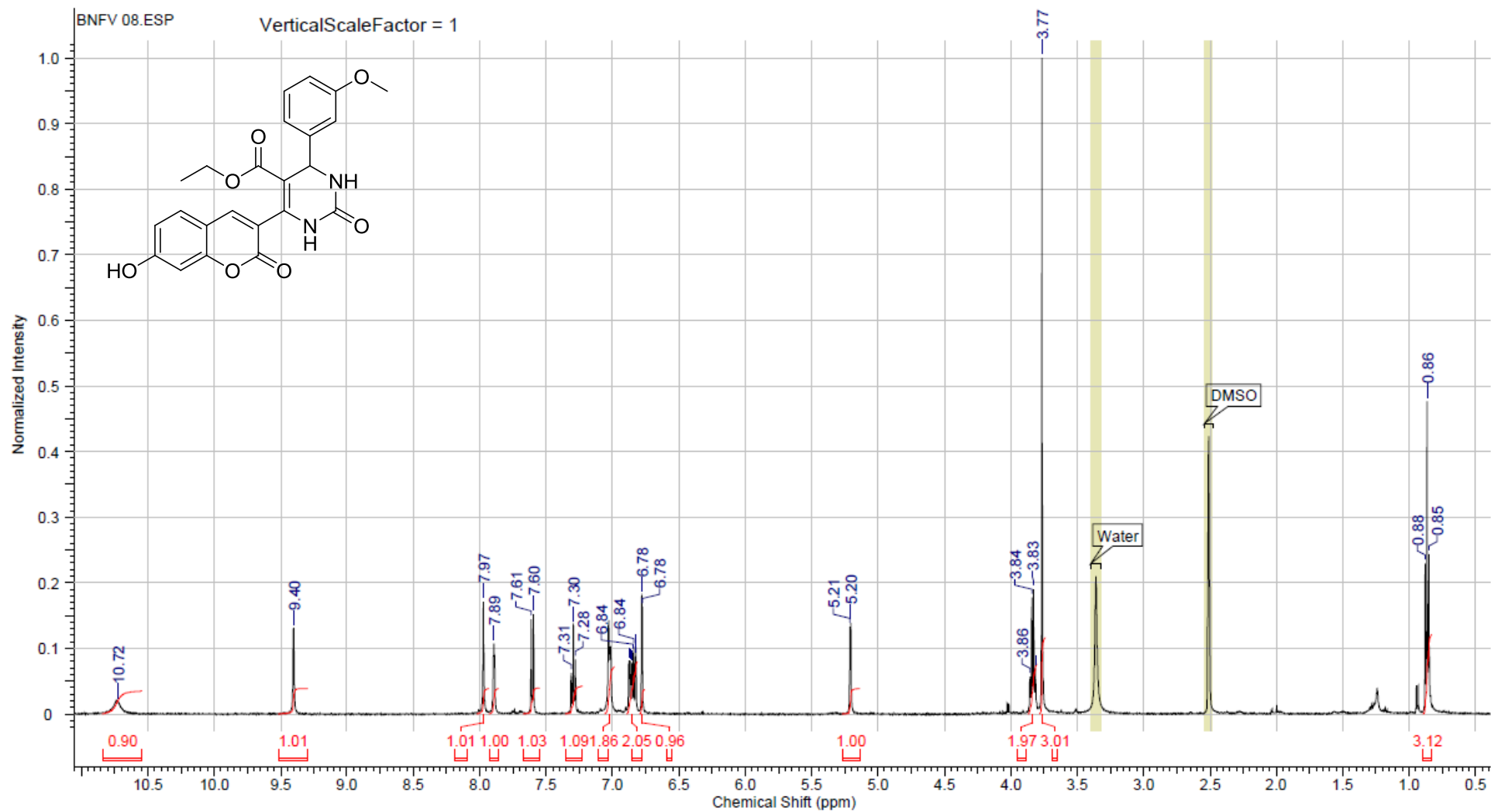


Fig. S25 Espectro de  $^1\text{H}$  RMN (500 MHz) de **106e** em  $\text{DMSO-}d_6$ .

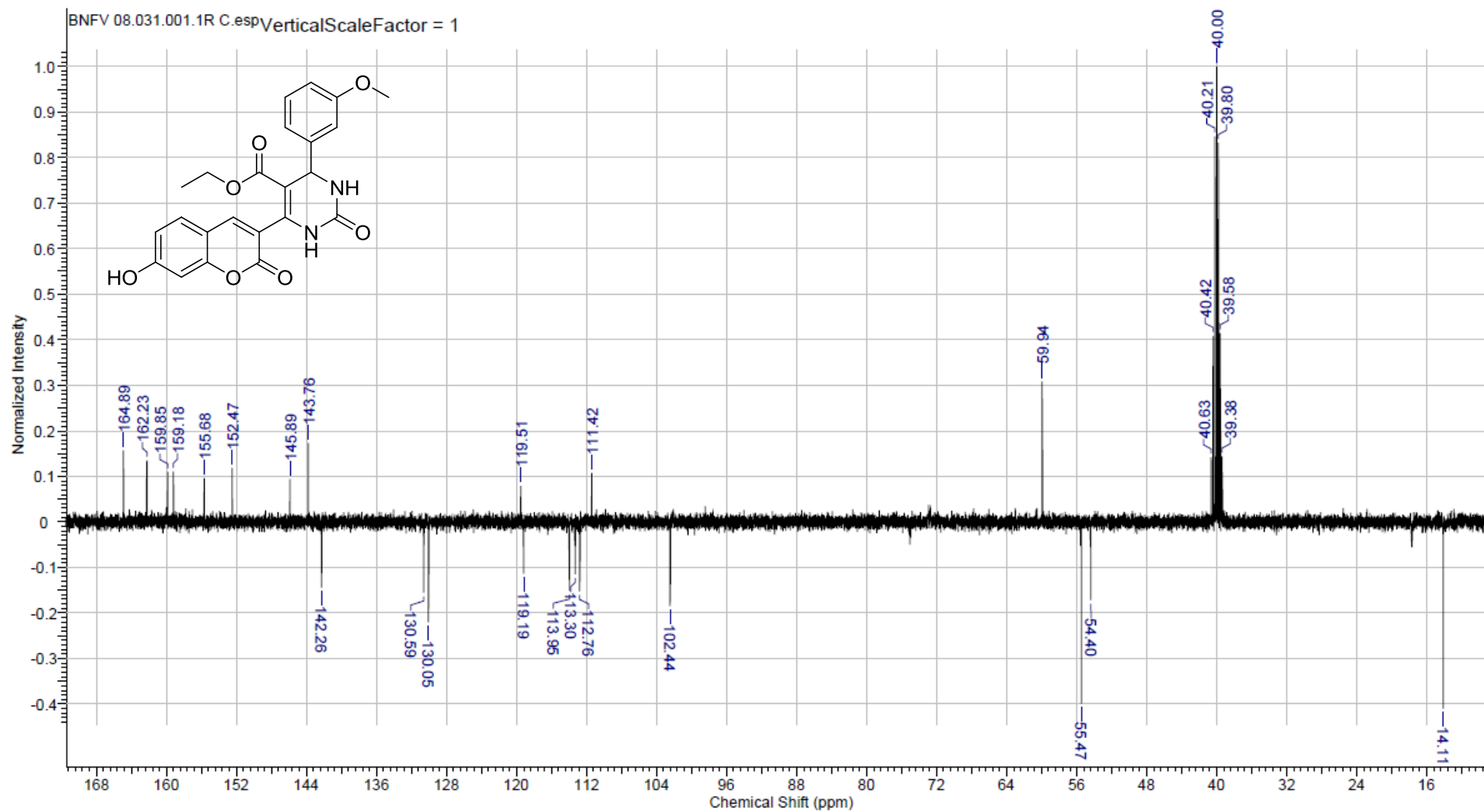


Fig. S26 Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN (125 MHz) de **106e** em  $\text{DMSO-}d_6$ .

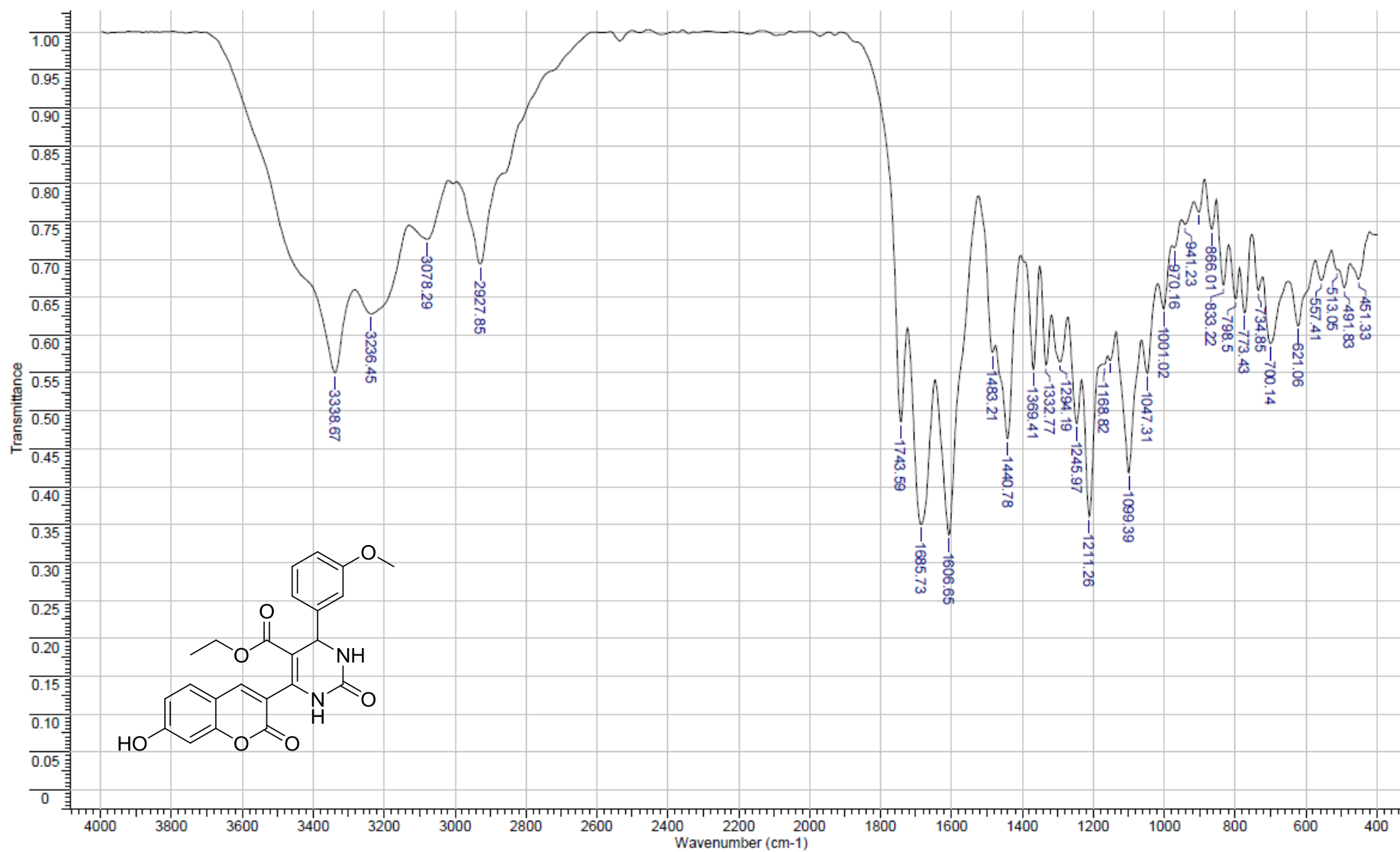


Fig. S27 Espectro de IV em pastilha de KBr de **106e**.

**Acquisition Parameter**

Ion Source Type	ESI	Ion Polarity	Negative	Alternating Ion Polarity	off
Mass Range Mode	Enhanced Resolution	Scan Begin	100 m/z	Scan End	700 m/z
Capillary Exit	Resolution	n/a	n/a	Trap Drive	68.9
Accumulation Time	110 $\mu$ s	Averages	5 Spectra	Auto MS/MS	off

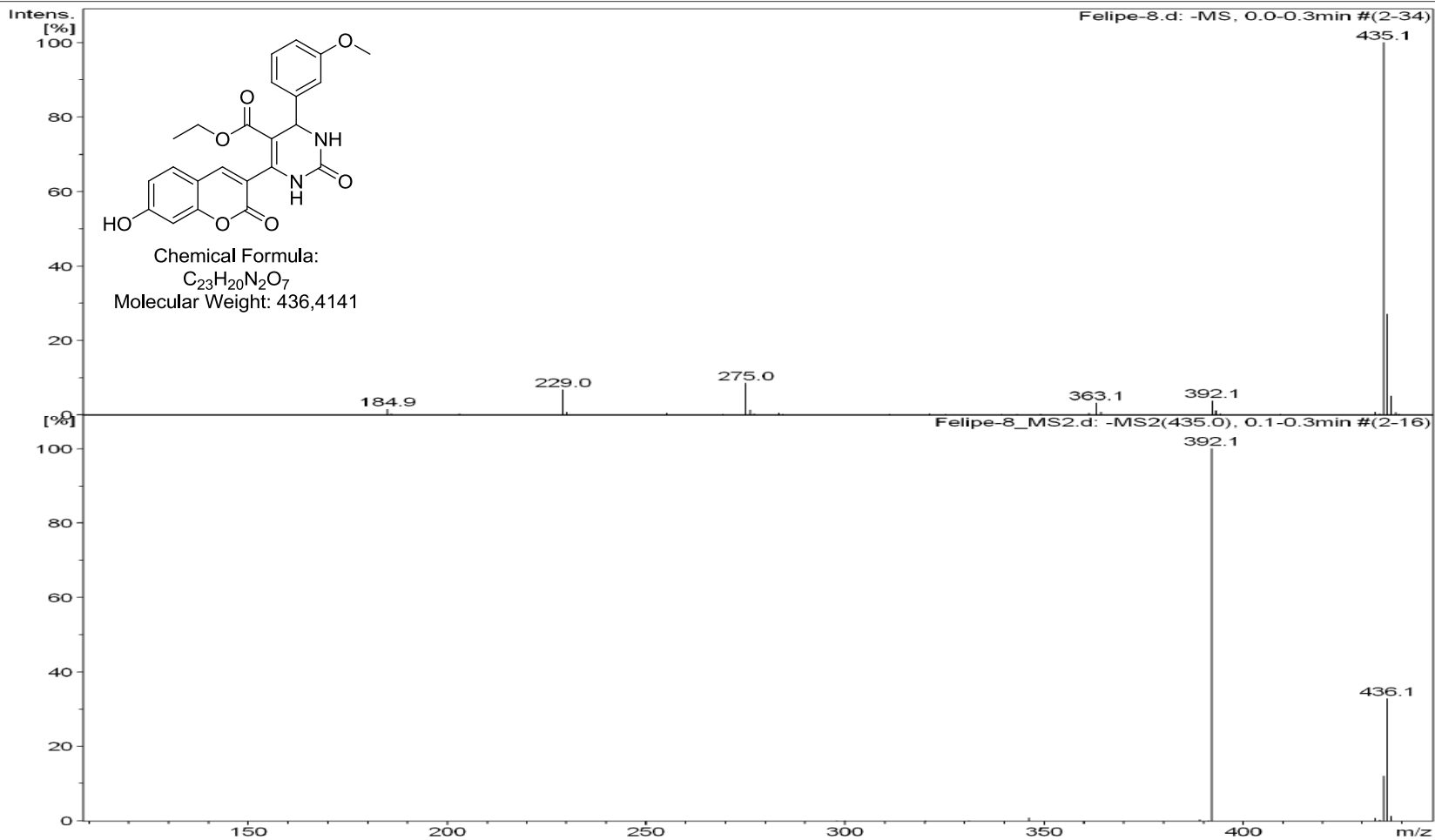


Fig. S28 Espectro de ESI de 106e.

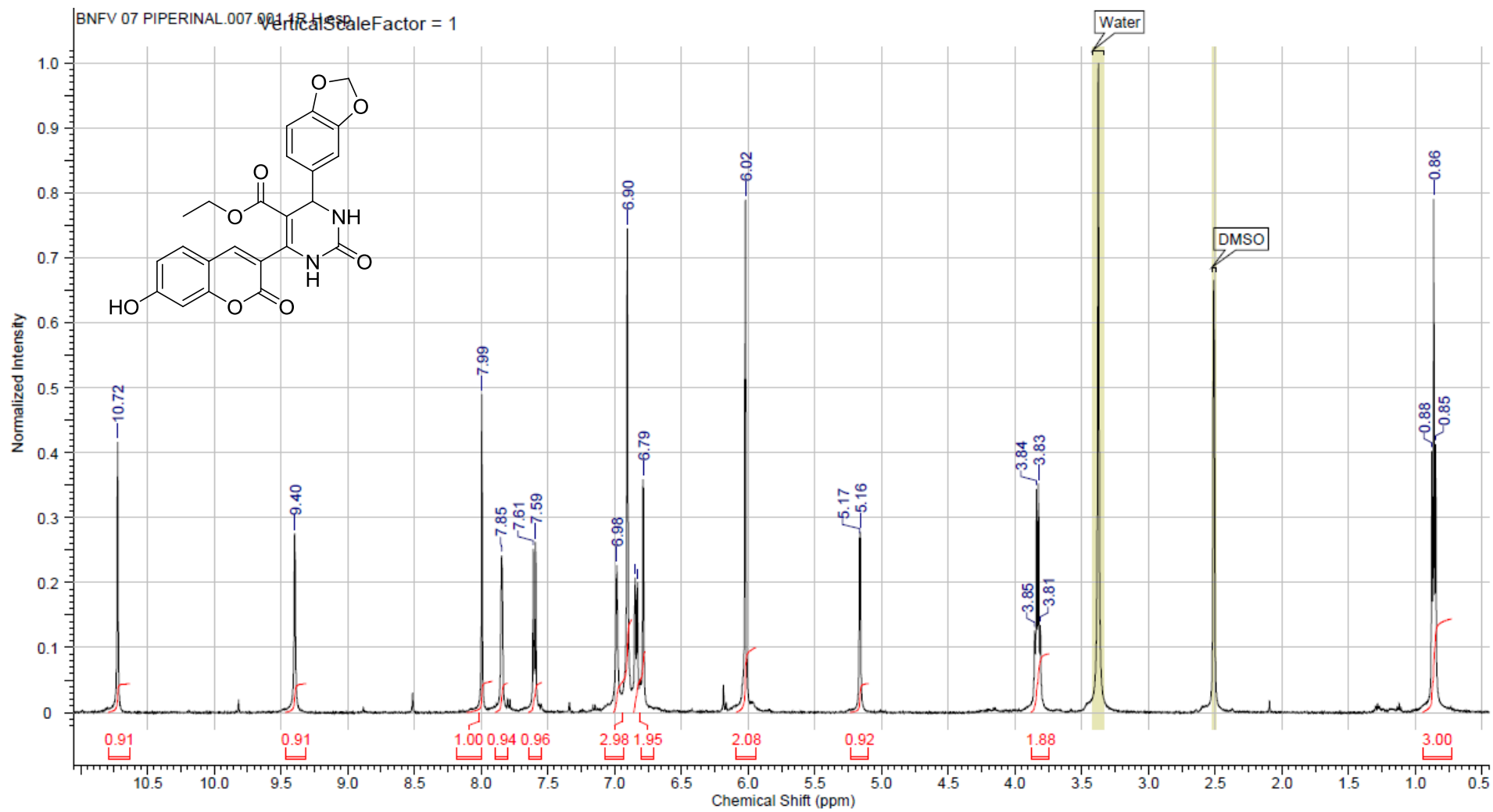


Fig. S29 Espectro de  $^1\text{H}$  RMN (500 MHz) de **106f** em DMSO- $d_6$ .

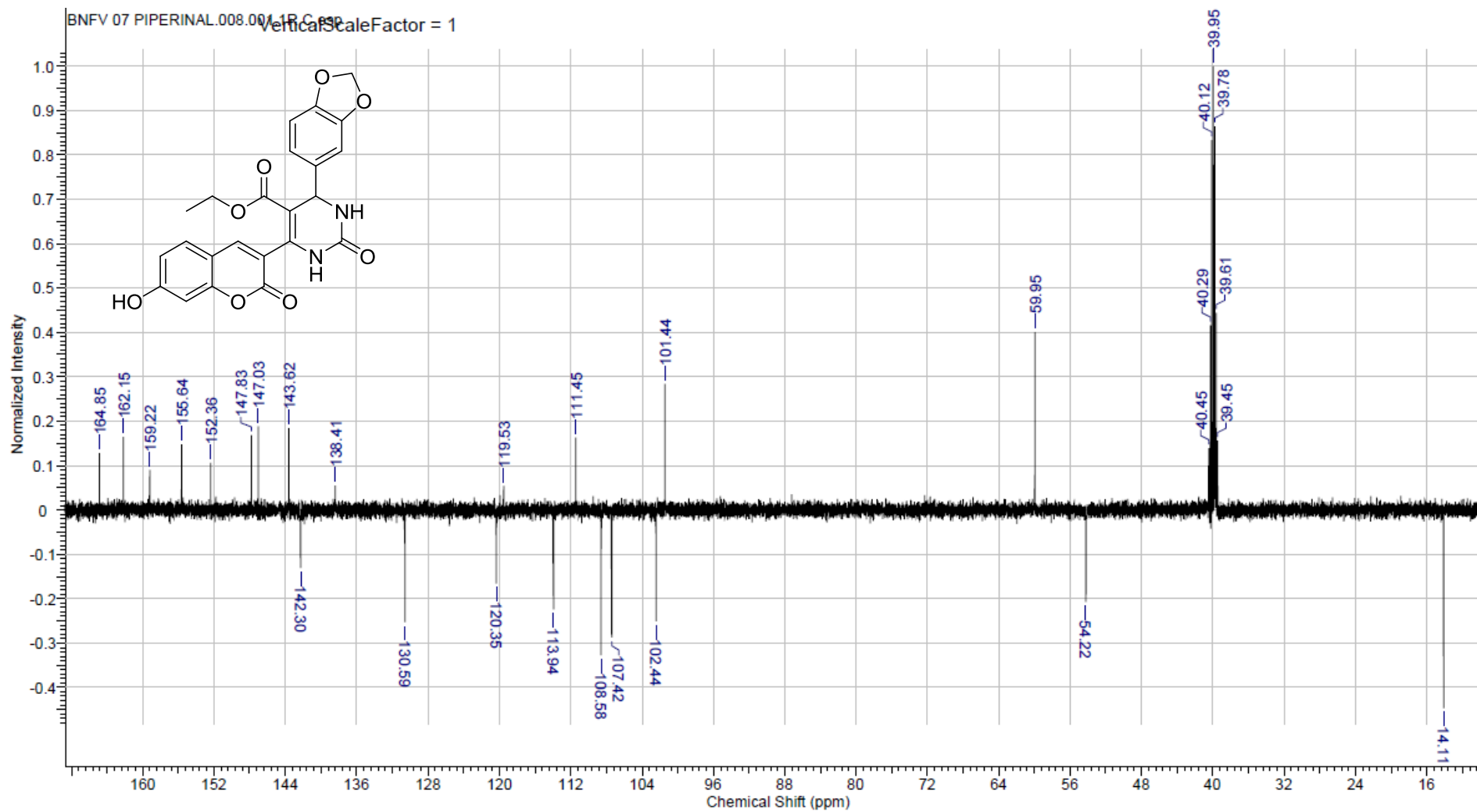


Fig. S30 Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN (125 MHz) de **106f** em  $\text{DMSO-}d_6$ .

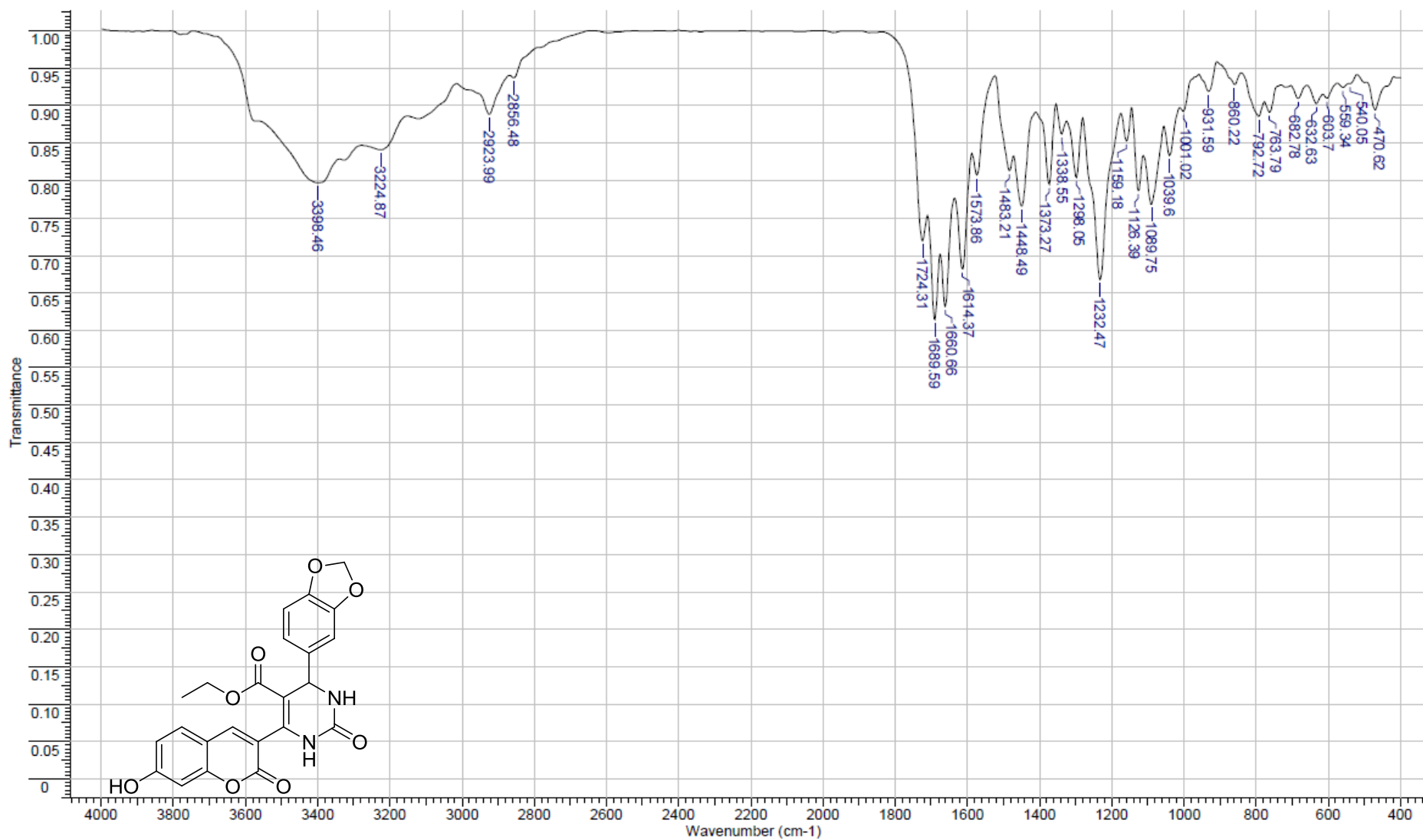


Fig. S31 Espectro de IV em pastilha de KBr de **106f**.



Acquisition Parameter		Ion Polarity	Negative	Alternating Ion Polarity
Ion Source Type	ESI	Scan Begin	100 m/z	off
Mass Range Mode	Enhanced Resolution	Scan End	n/a	700 m/z
Capillary Exit	187 $\mu$ s	Averages	5 Spectra	68.9
Accumulation Time				off

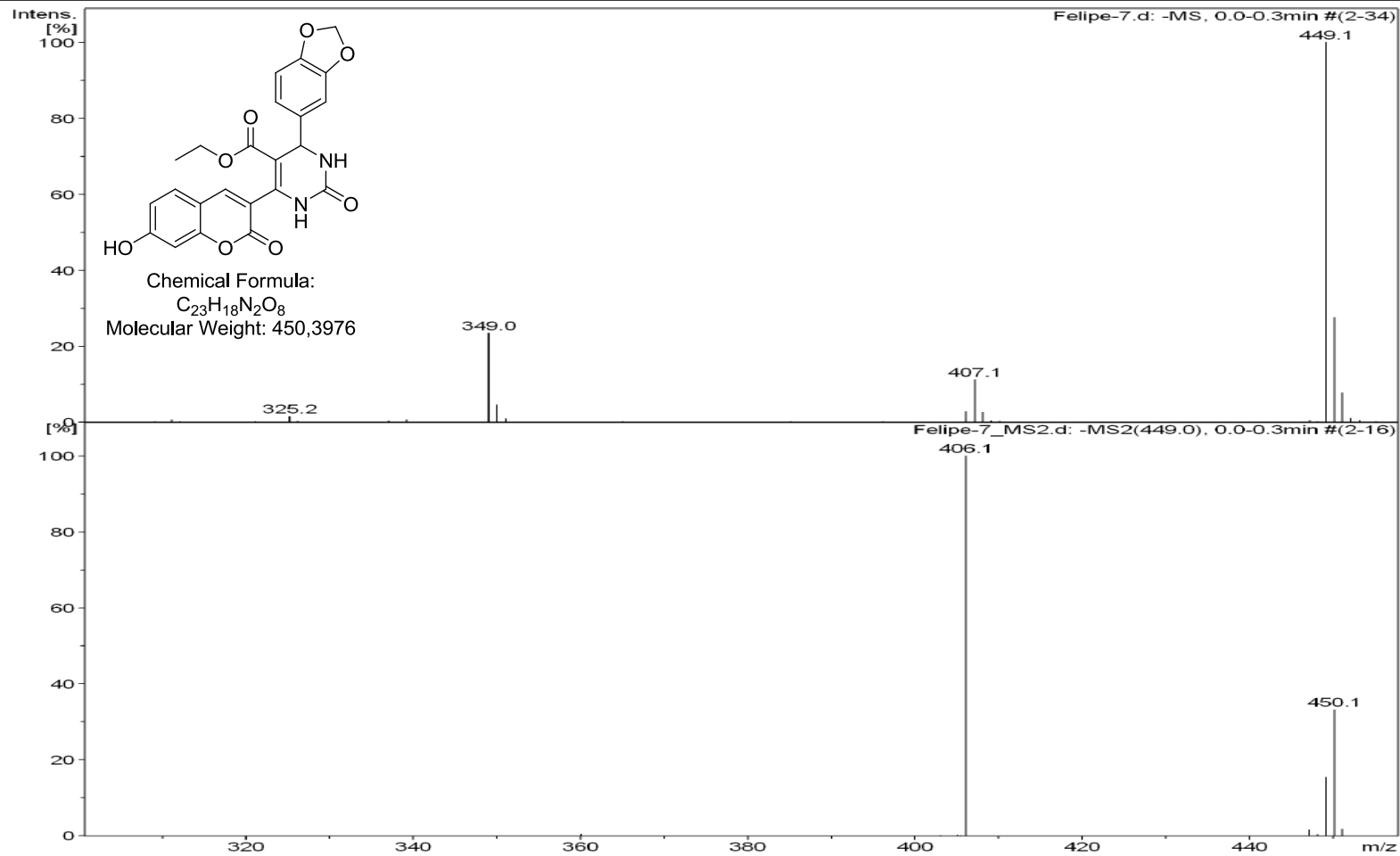


Fig. S32 Espectro de ESI de 106f.

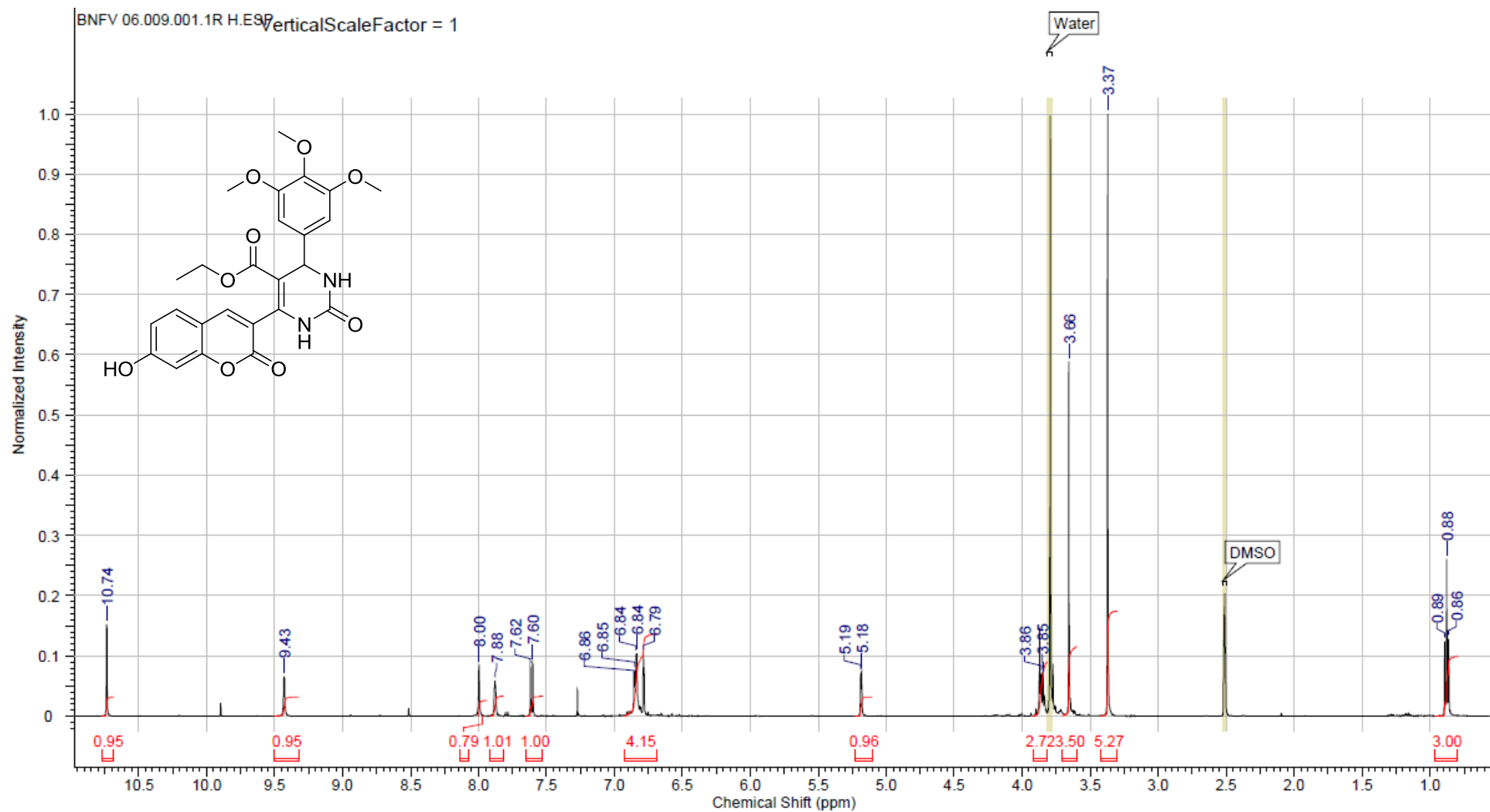


Fig. S33 Espectro de  $^1\text{H}$  RMN (500 MHz) de **106g** em  $\text{DMSO-}d_6$ .

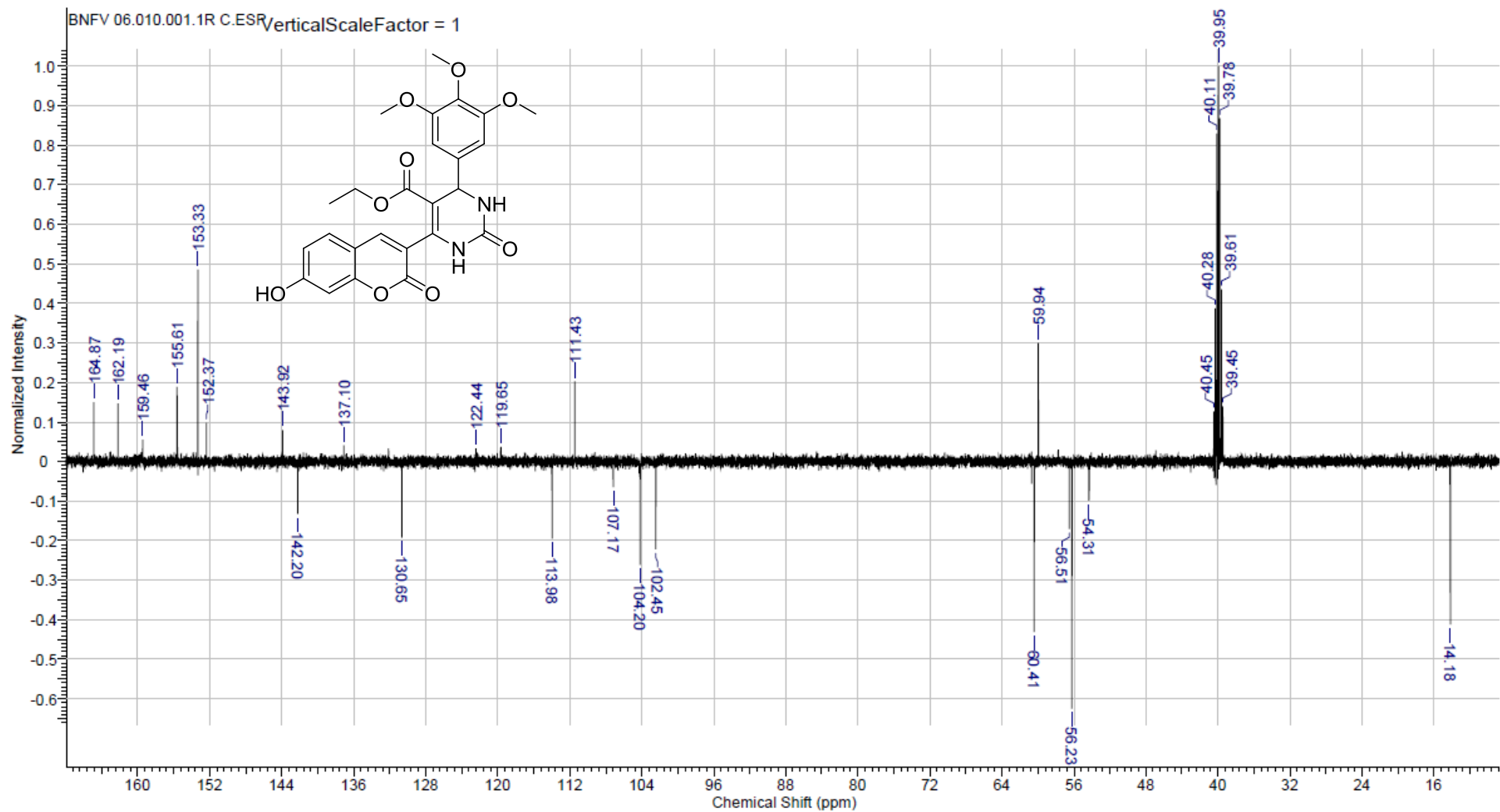


Fig. S34 Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN (125 MHz) de **106g** em  $\text{DMSO-}d_6$ .

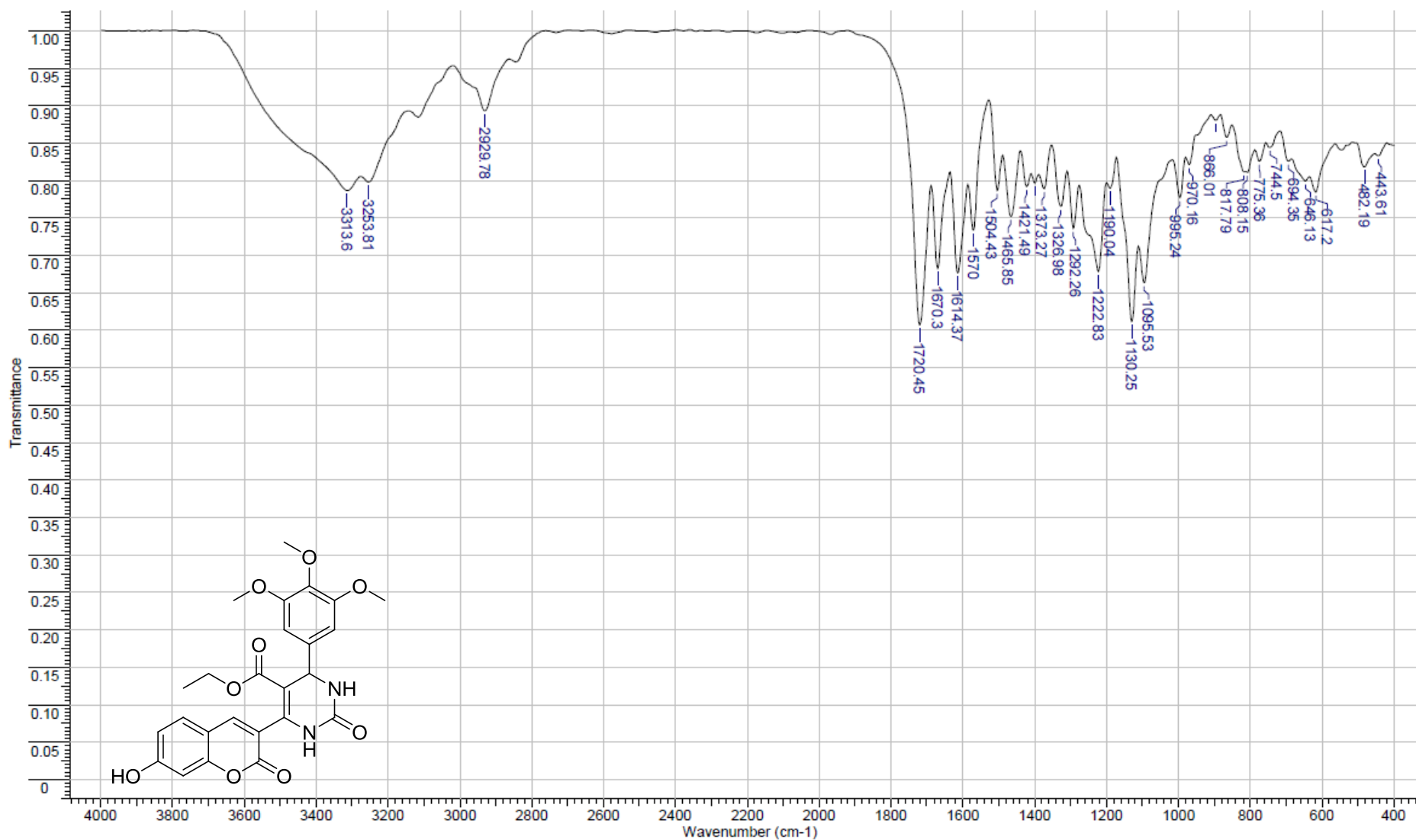


Fig. S35 Espectro de IV em pastilha de KBr de **106g**.

Acquisition Parameter		Ion Polarity	Negative	Alternating Ion Polarity	off
Ion Source Type	ESI	Scan Begin	100 m/z	Scan End	700 m/z
Mass Range Mode	Enhanced	n/a	n/a	Trap Drive	68.9
Capillary Exit	Resolution	Averages	5 Spectra	Auto MS/MS	off
Accumulation Time	2620 $\mu$ s				

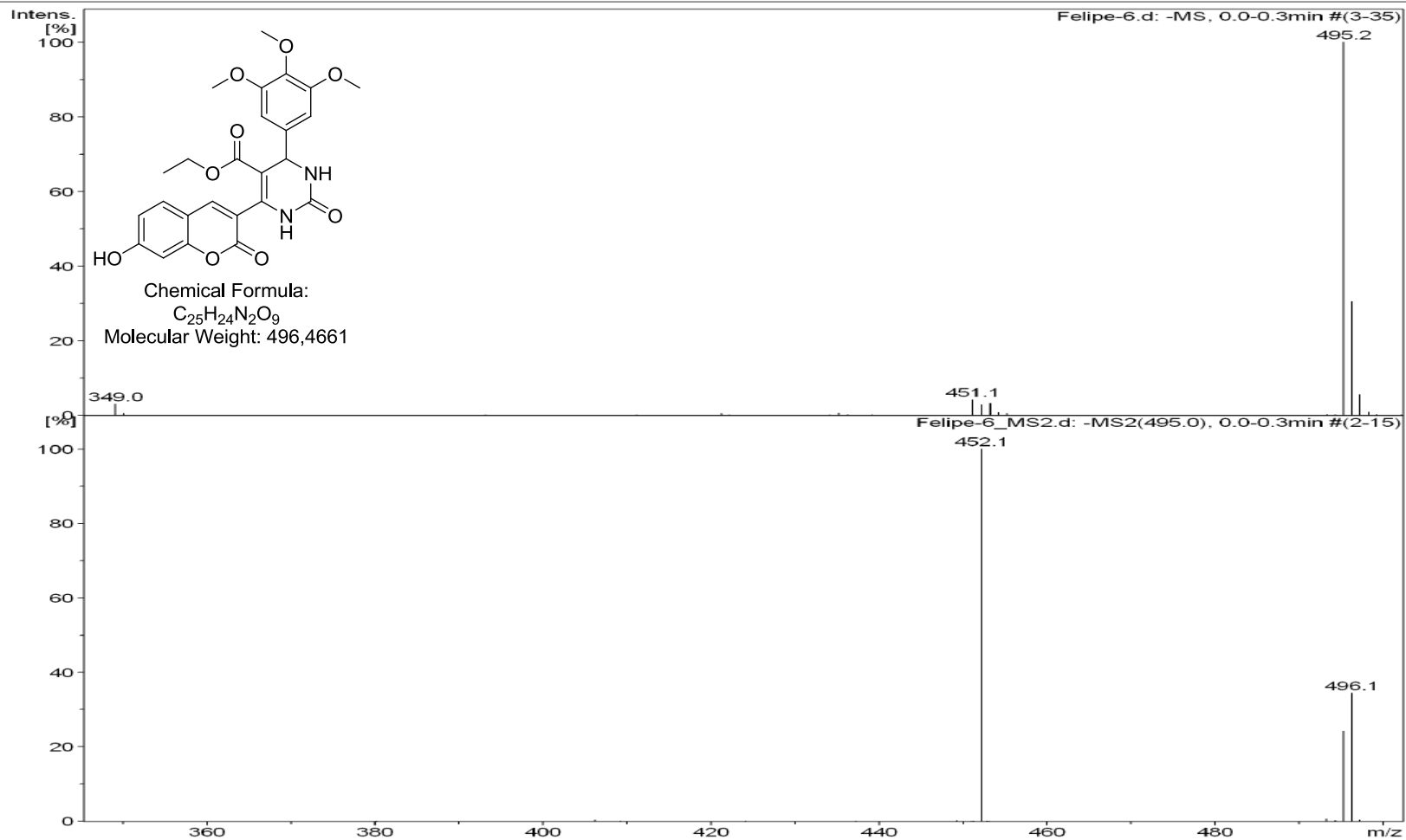


Fig. S36 Espectro de ESI de 106g.

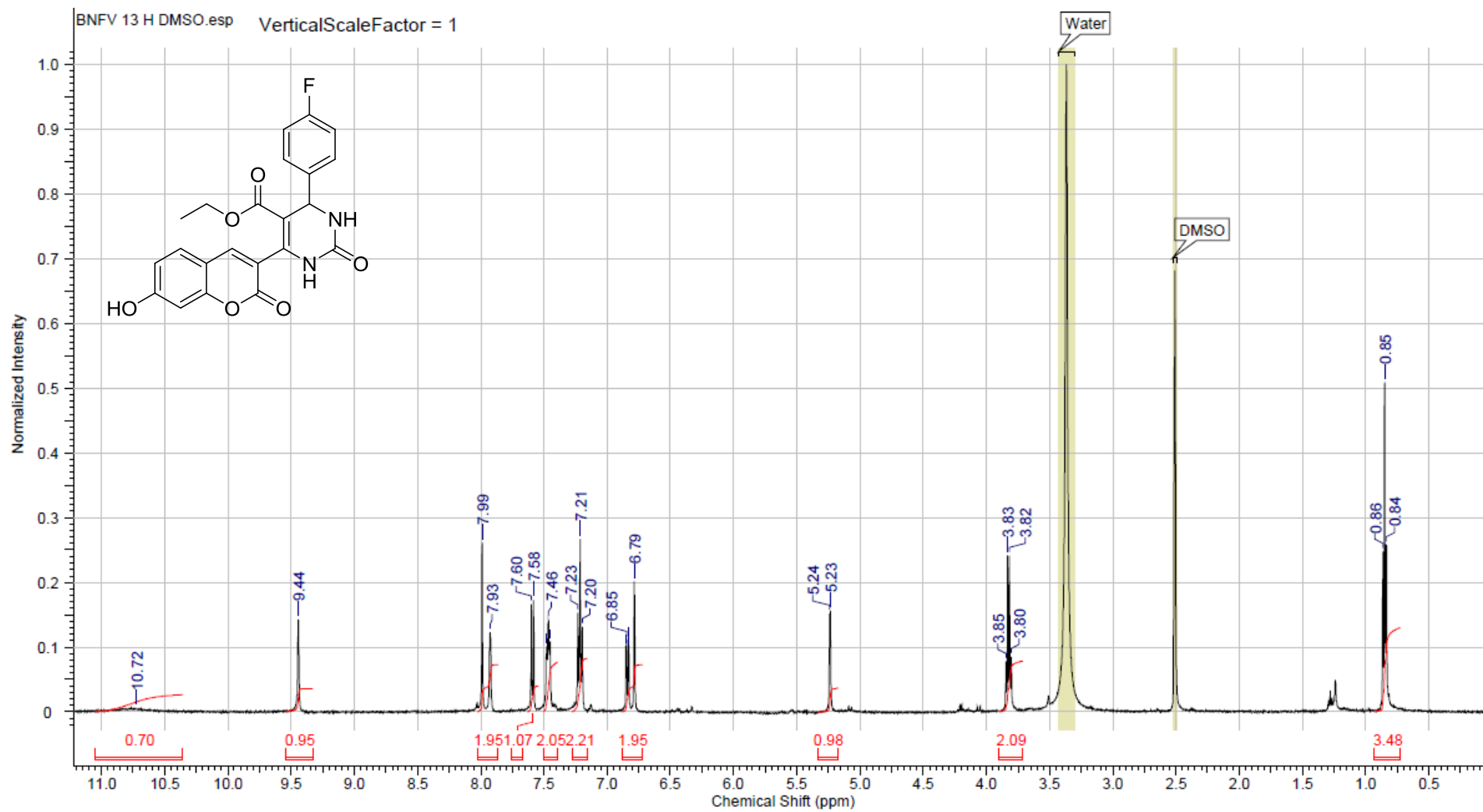


Fig. S37 Espectro de  $^1\text{H}$  RMN (500 MHz) de **106h** em  $\text{DMSO-}d_6$ .

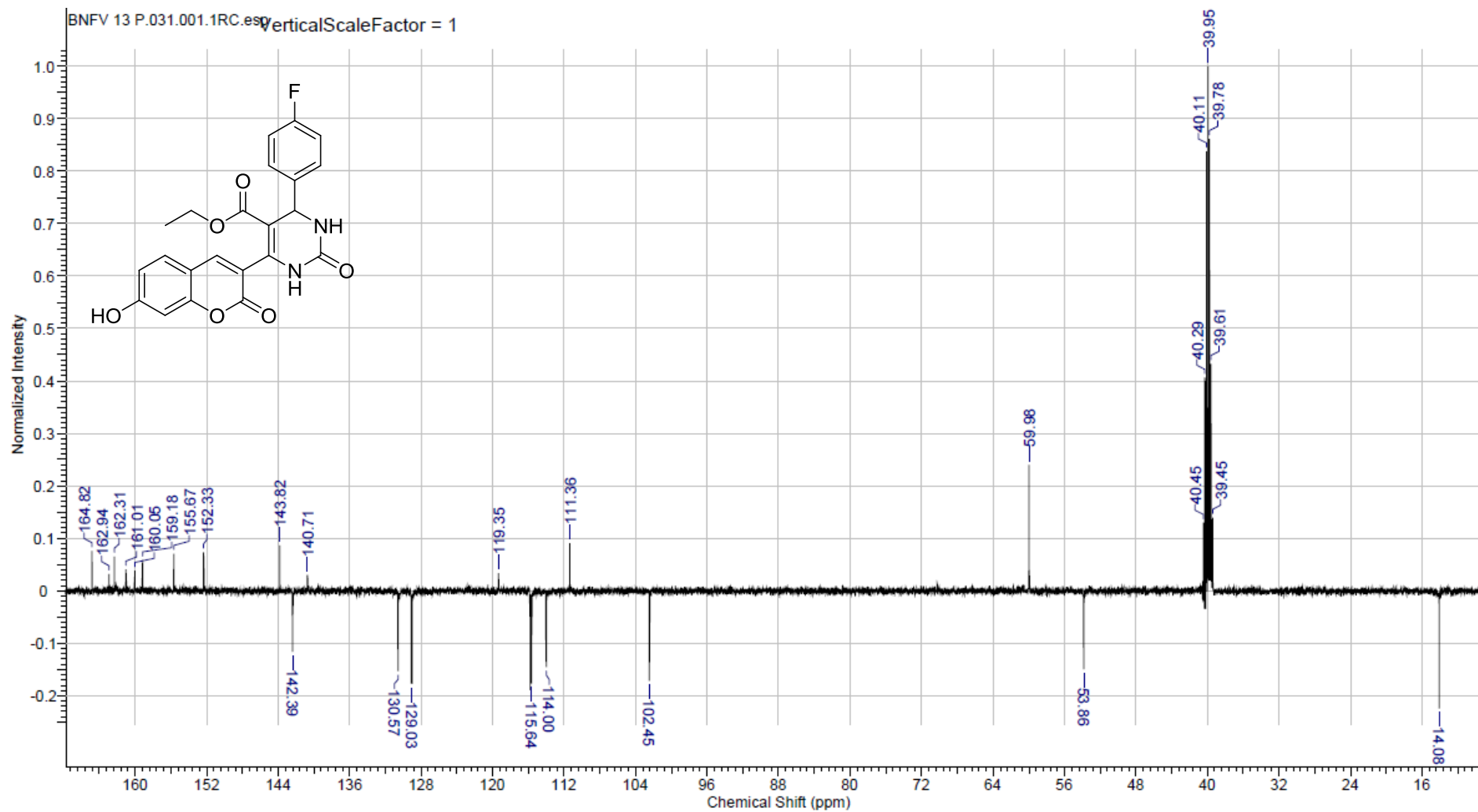


Fig. S38 Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN (125 MHz) de **106h** em  $\text{DMSO-}d_6$ .

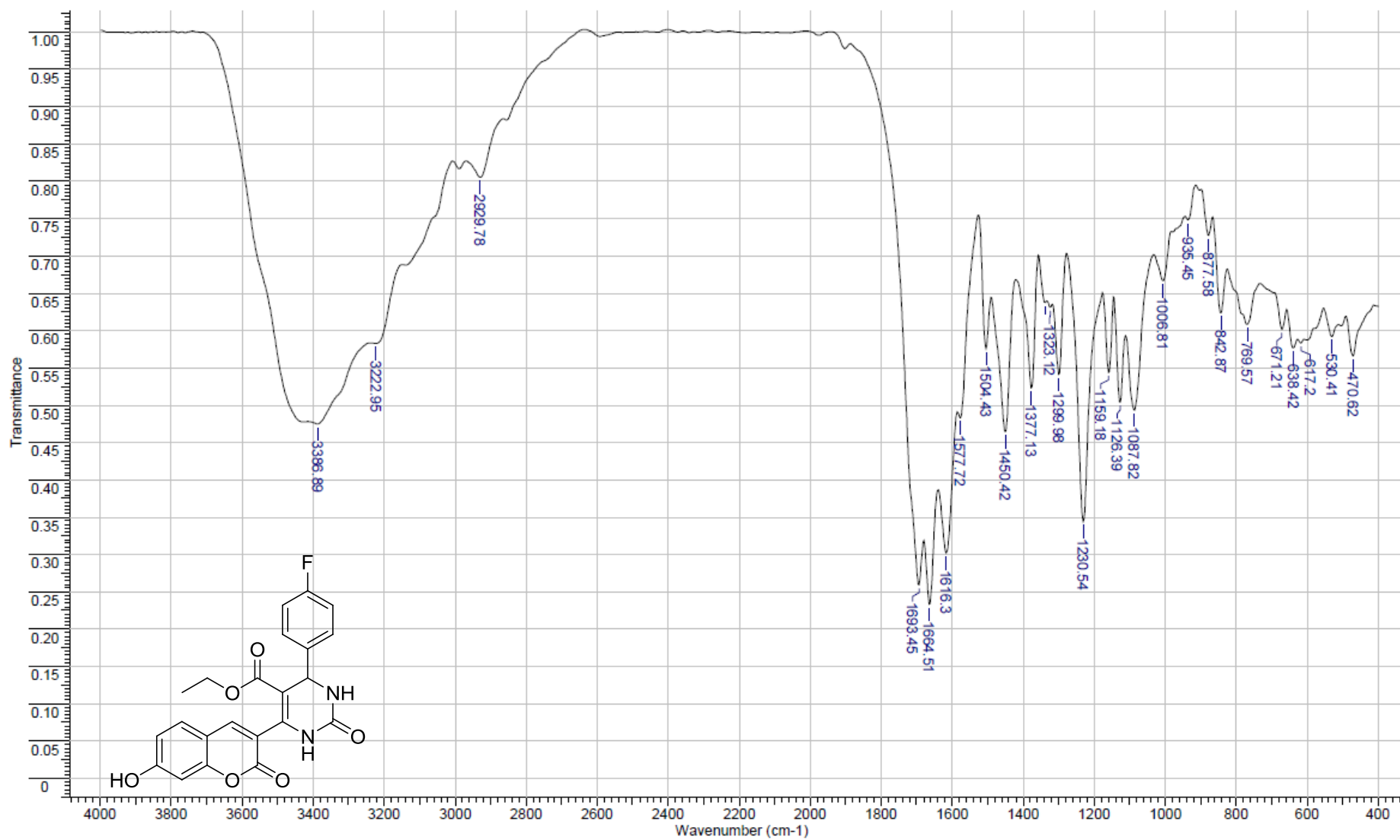


Fig. S39 Espectro de IV em pastilha de KBr de **106h**.



**Acquisition Parameter**

Ion Source Type	ESI	Ion Polarity	Negative	Alternating Ion Polarity	off
Mass Range Mode	Enhanced	Scan Begin	100 m/z	Scan End	700 m/z
Capillary Exit	Resolution	n/a	n/a	Trap Drive	68.9
Accumulation Time	169 $\mu$ s	Averages	5 Spectra	Auto MS/MS	off

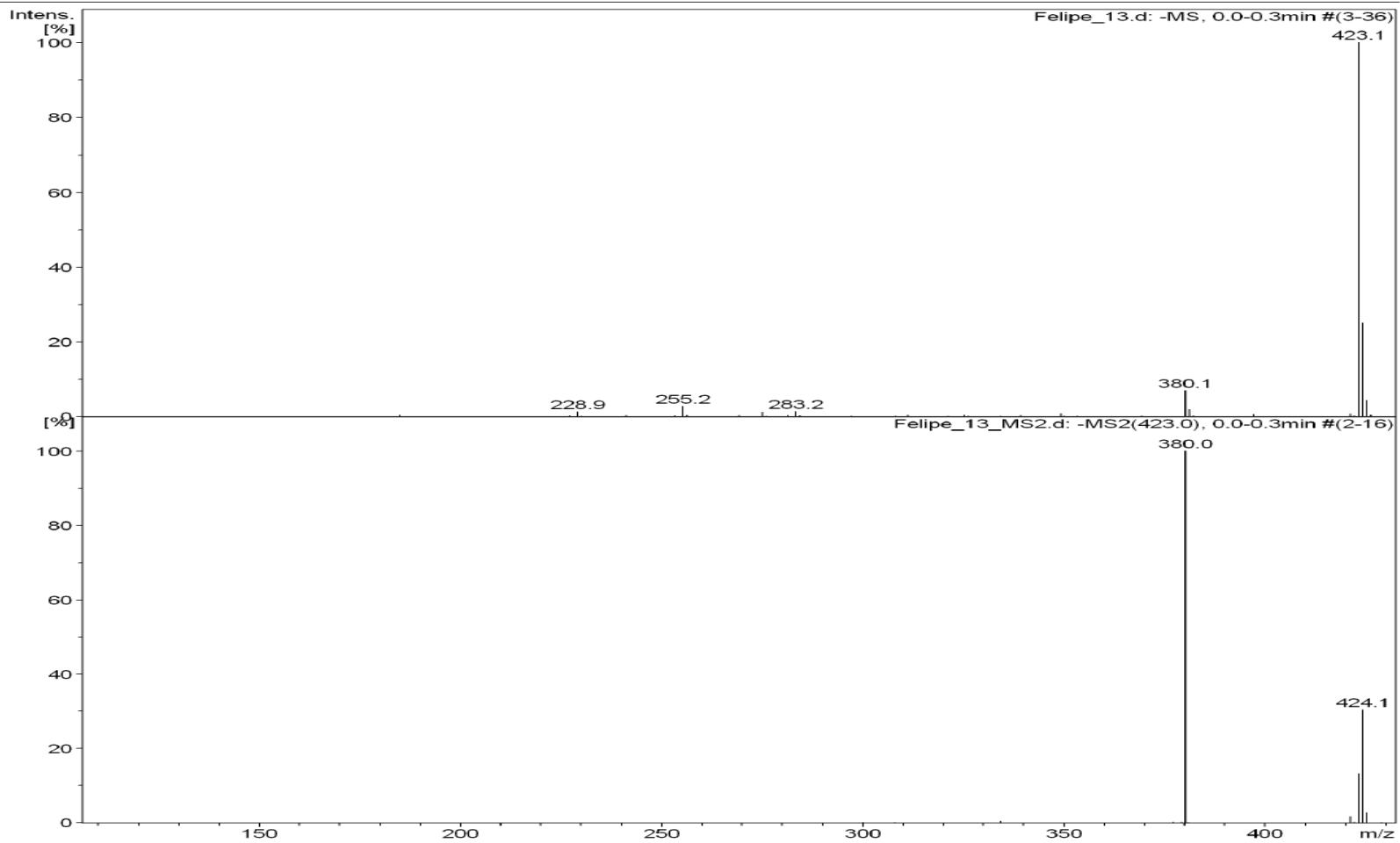


Fig. S40 Espectro de ESI de **106h**.

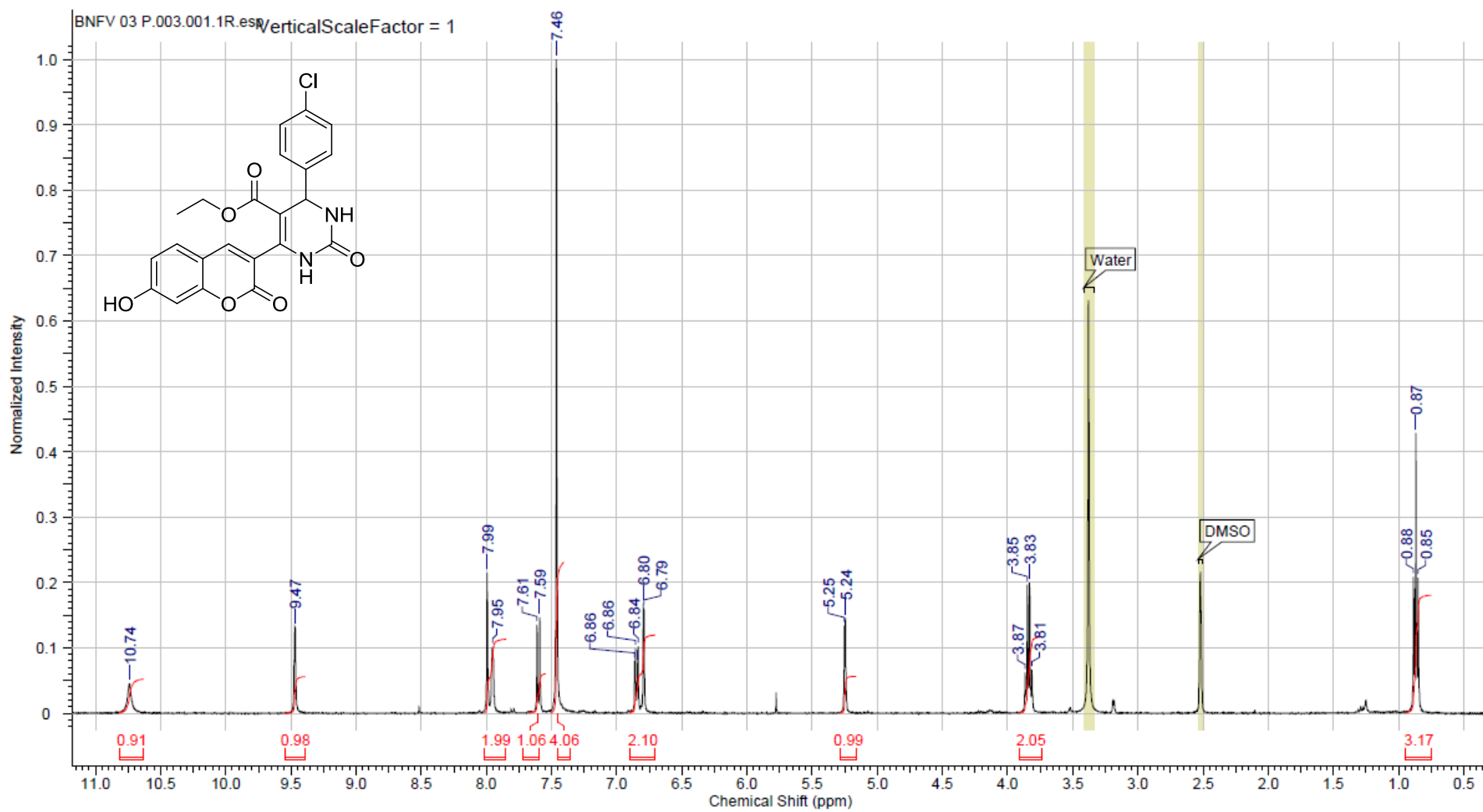


Fig. S41 Espectro de  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz) de **106i** em  $\text{DMSO-}d_6$ .

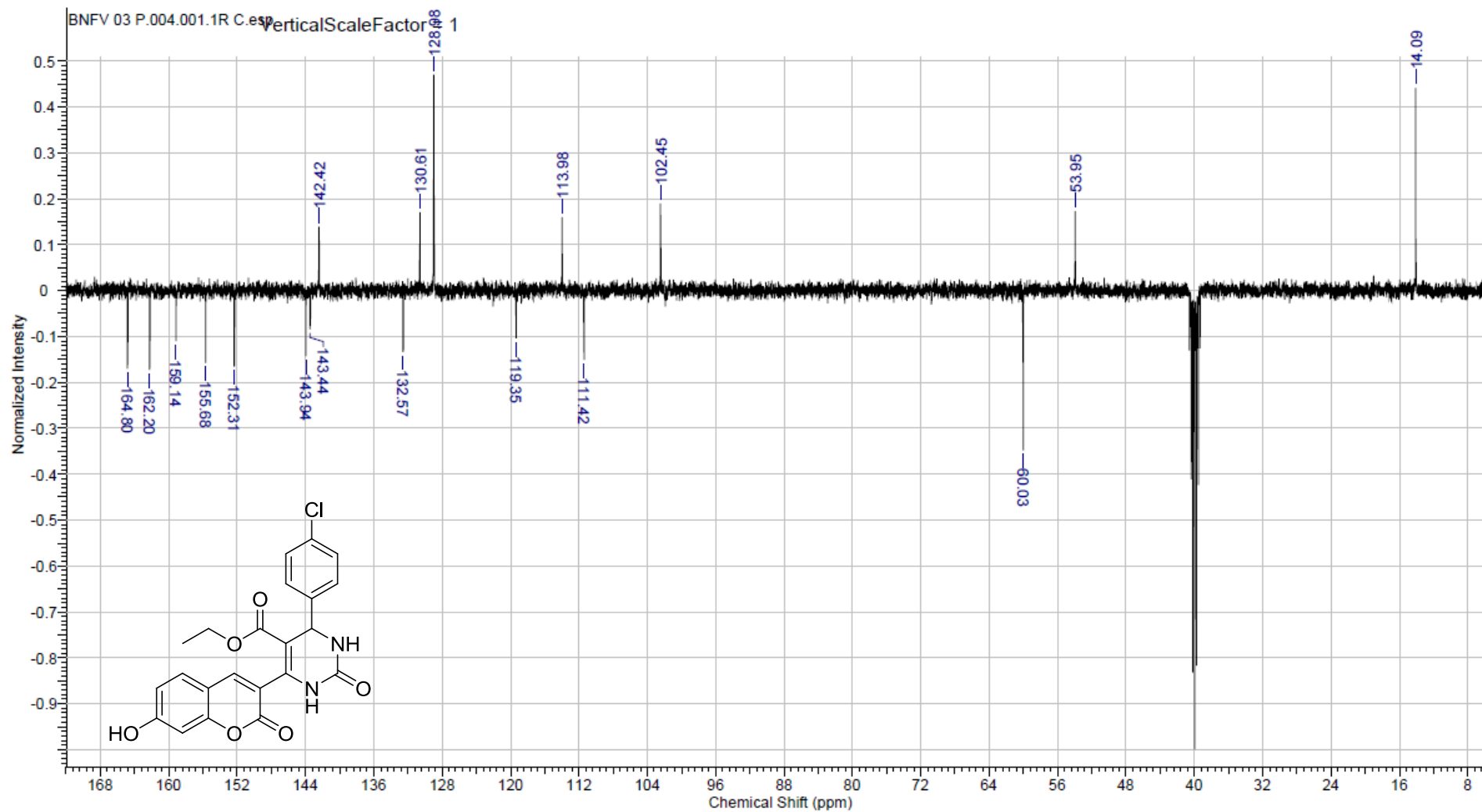


Fig. S42 Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN (100 MHz) de **106i** em  $\text{DMSO-}d_6$ .

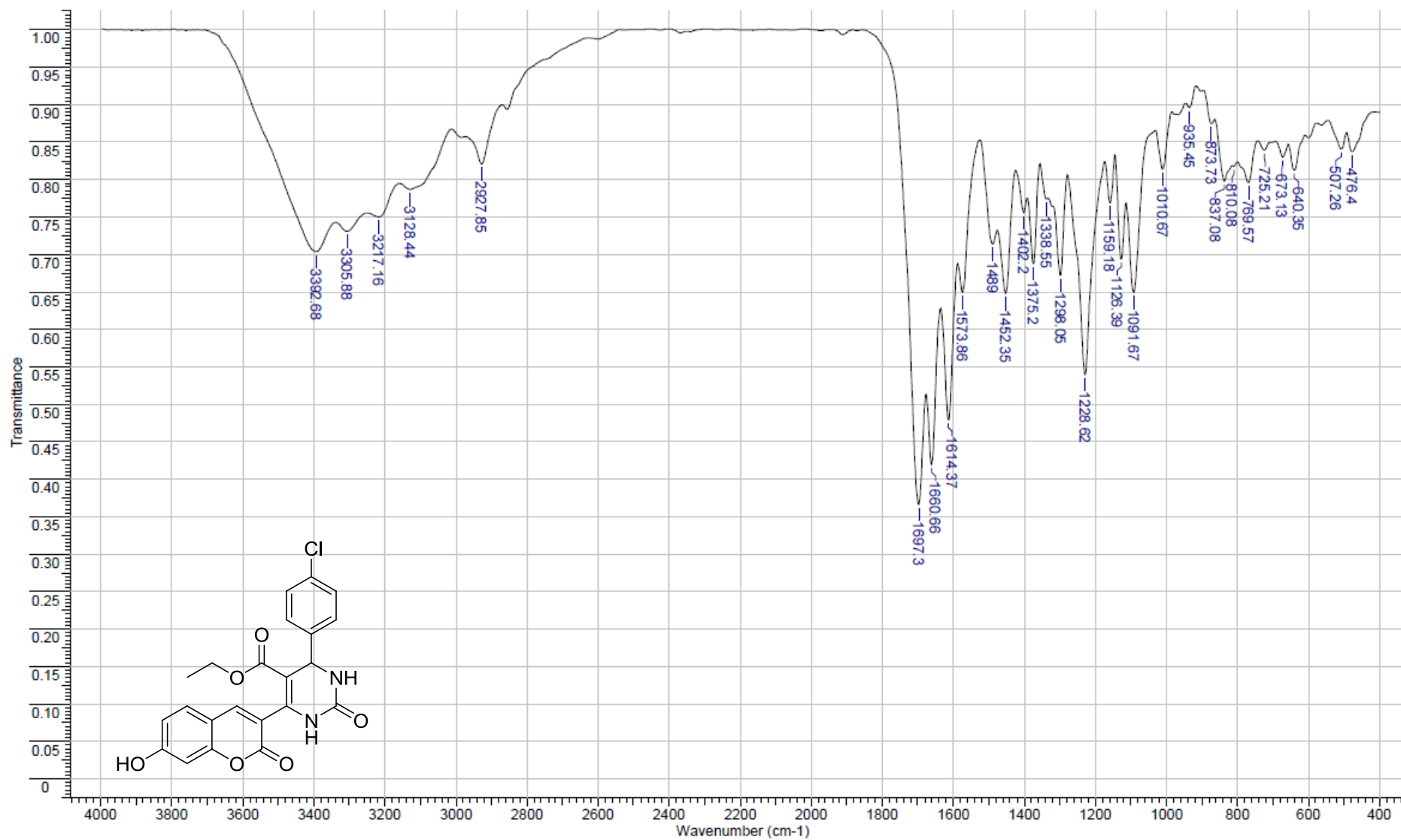
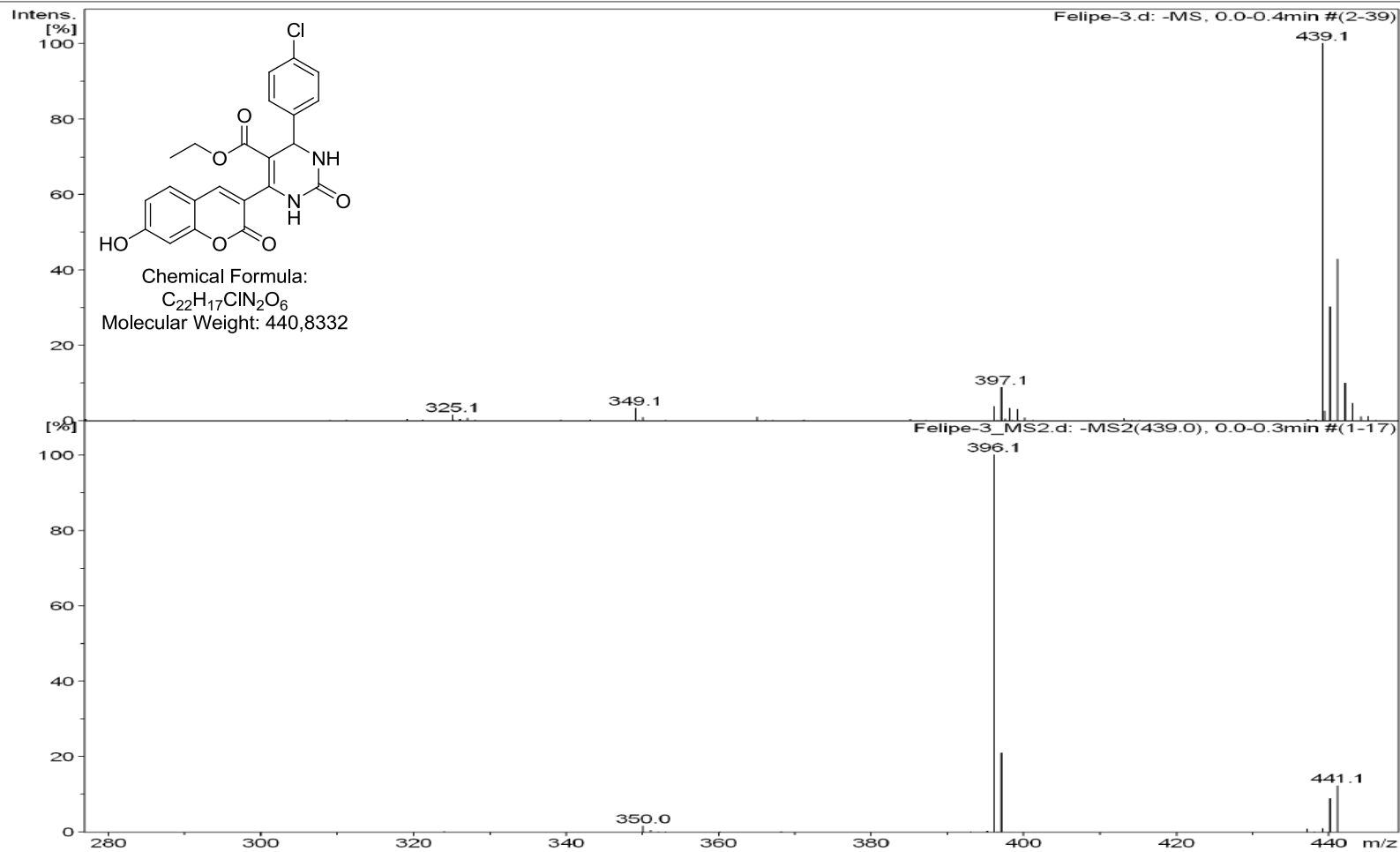


Fig. S43 Espectro de IV em pastilha de KBr de **106i**.

**Acquisition Parameter**

Ion Source Type	ESI	Ion Polarity	Negative	Alternating Ion Polarity	off
Mass Range Mode	Enhanced Resolution	Scan Begin	100 m/z	Scan End	700 m/z
Capillary Exit	Resolution	n/a	n/a	Trap Drive	68.9
Accumulation Time	527 $\mu$ s	Averages	5 Spectra	Auto MS/MS	off

Fig. S44 Espectro de ESI de **106i**.

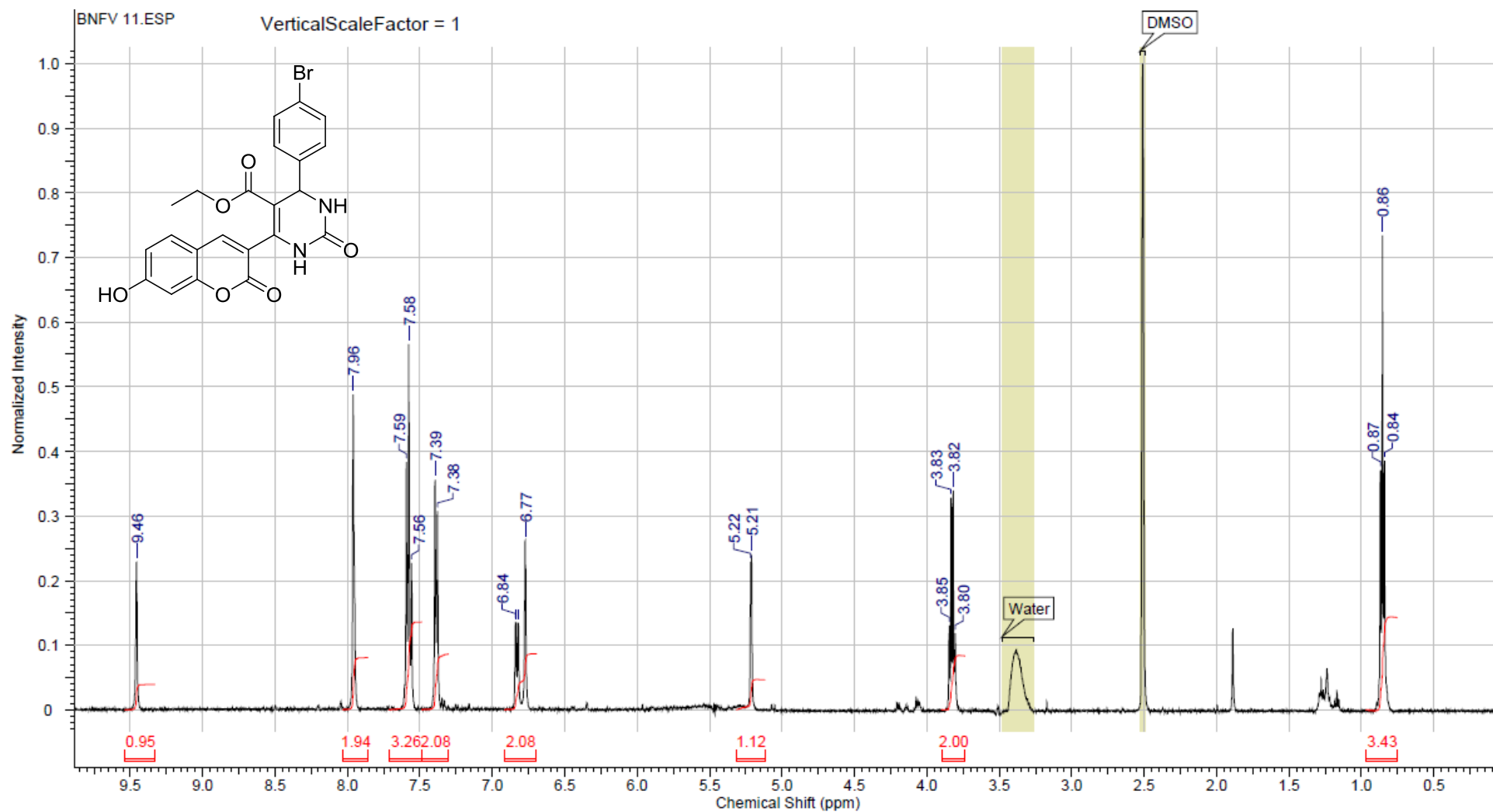


Fig. S45 Espectro de  $^1\text{H}$  RMN (500 MHz) de **106j** em  $\text{DMSO}-d_6$ .

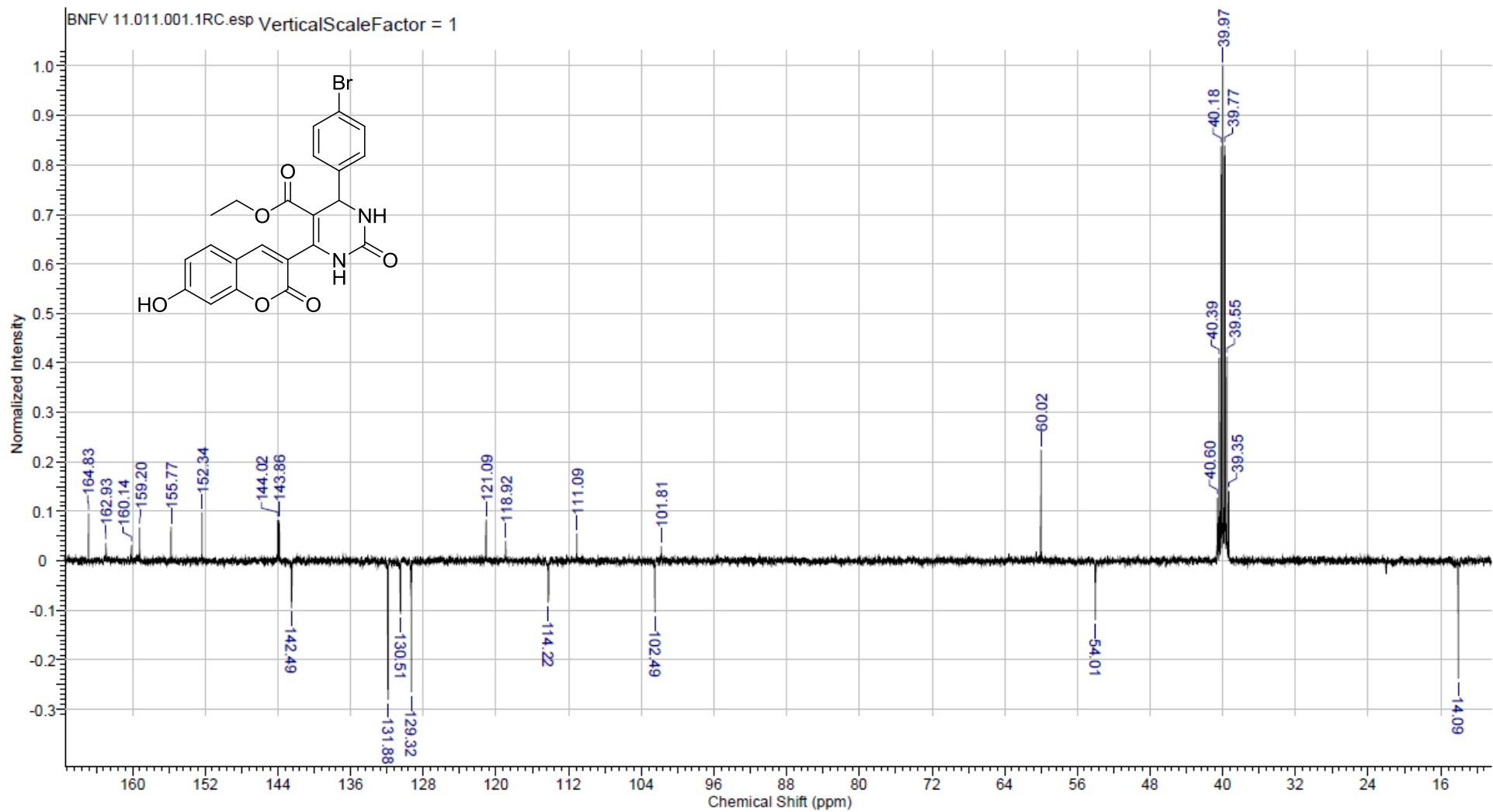


Fig. S46 Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN (125 MHz) de **106j** em  $\text{DMSO-}d_6$ .

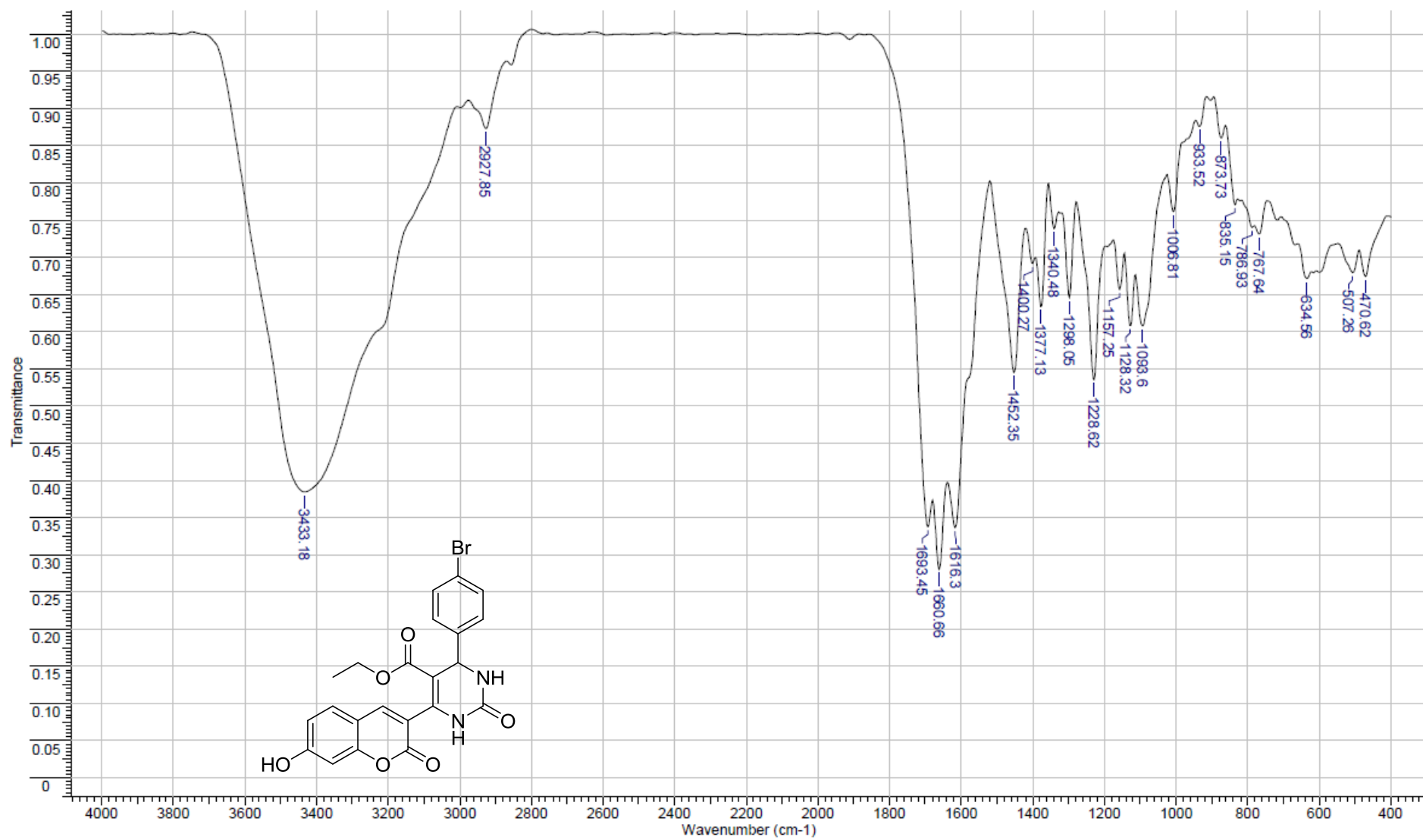
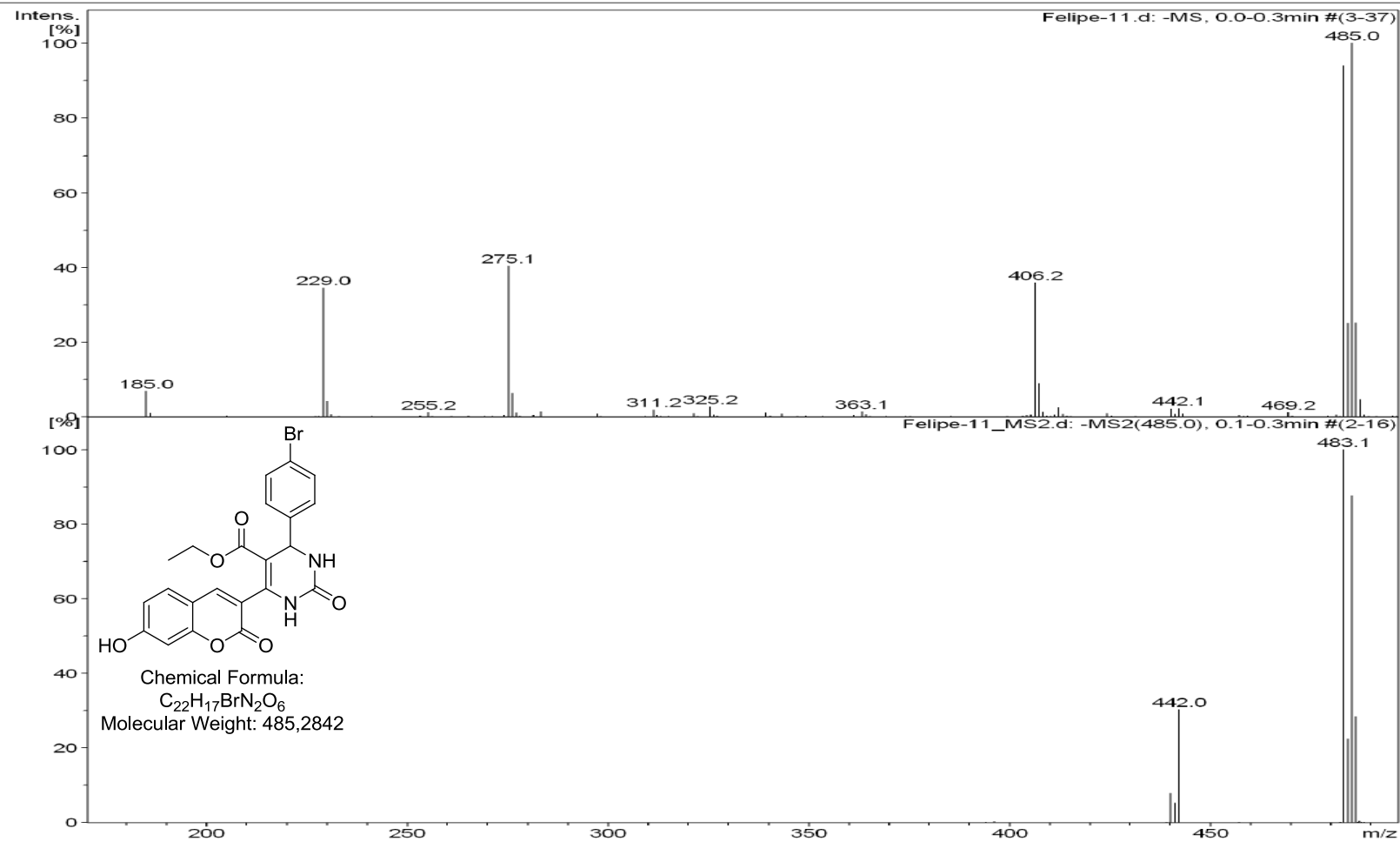


Fig. S47 Espectro de IV em pastilha de KBr de **106j**.



**Acquisition Parameter**

Ion Source Type	ESI	Ion Polarity	Negative	Alternating Ion Polarity	off
Mass Range Mode	Enhanced	Scan Begin	100 m/z	Scan End	700 m/z
Capillary Exit	Resolution	n/a	n/a	Trap Drive	68.9
Accumulation Time	3267 $\mu$ s	Averages	5 Spectra	Auto MS/MS	off

Fig. S48 Espectro de ESI de **106j**.

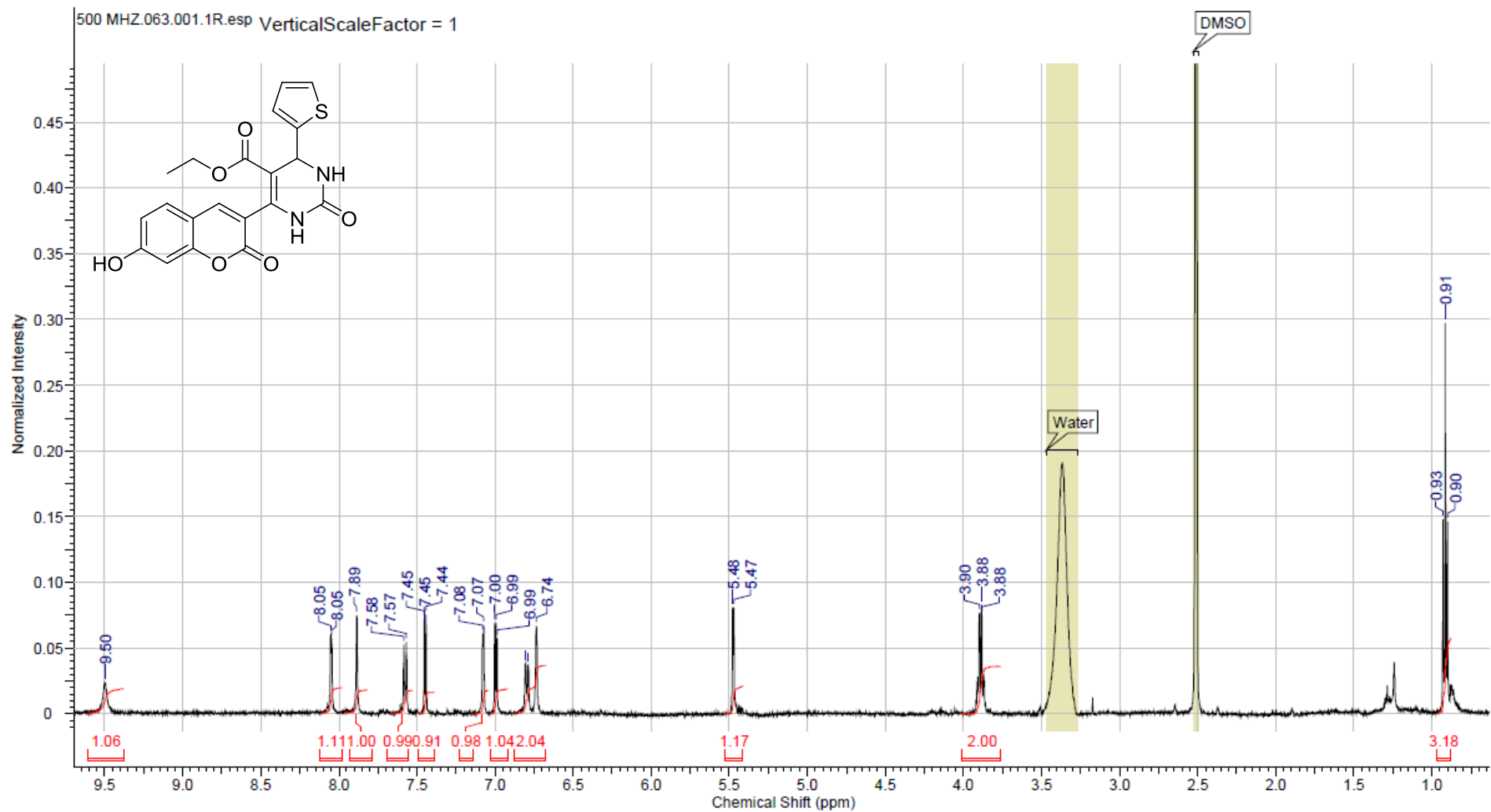


Fig. S47 Espectro de  $^1\text{H}$  RMN (500 MHz) de **106k** em  $\text{DMSO-}d_6$ .

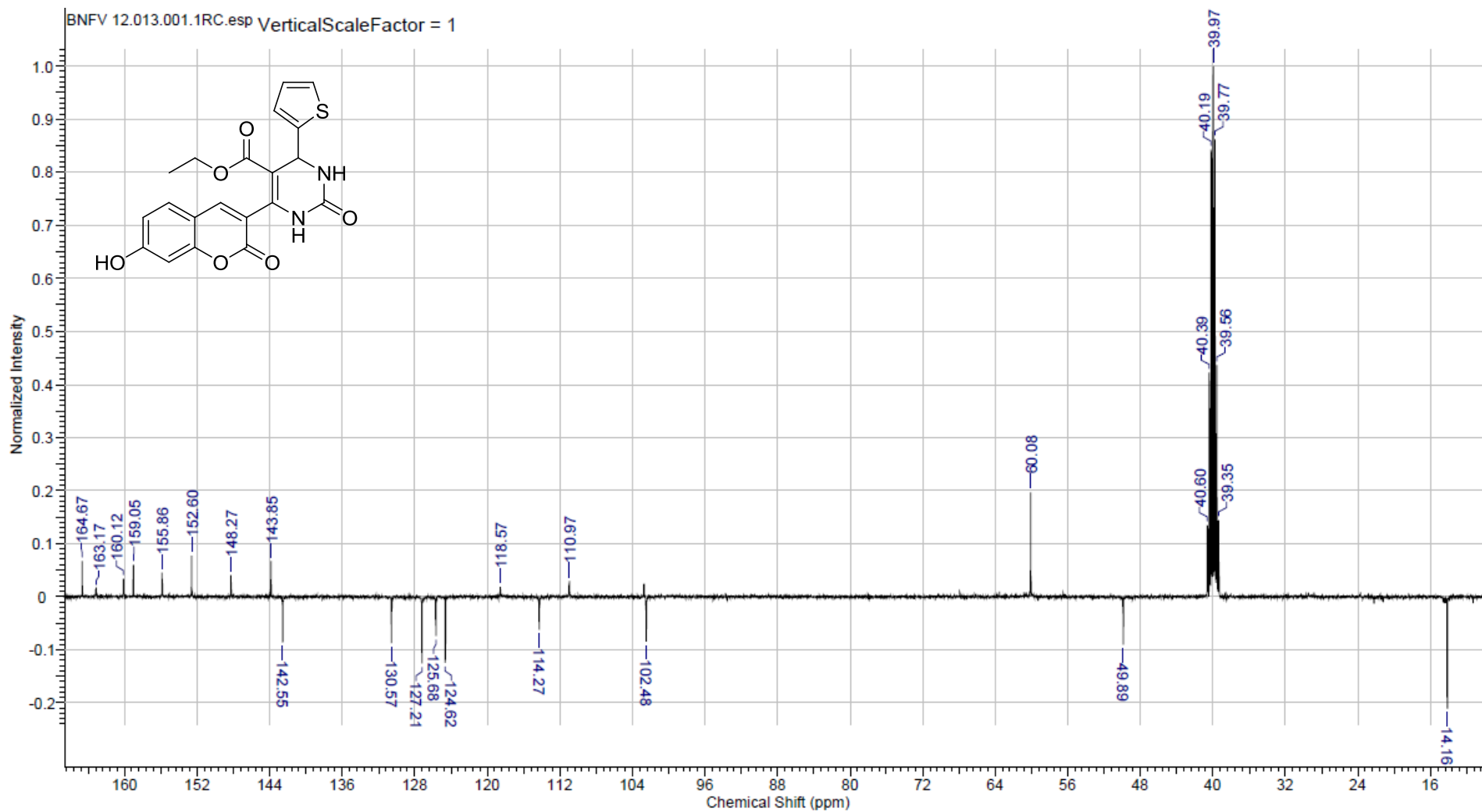


Fig. S48 Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN (125 MHz) de **106k** em  $\text{DMSO-}d_6$ .

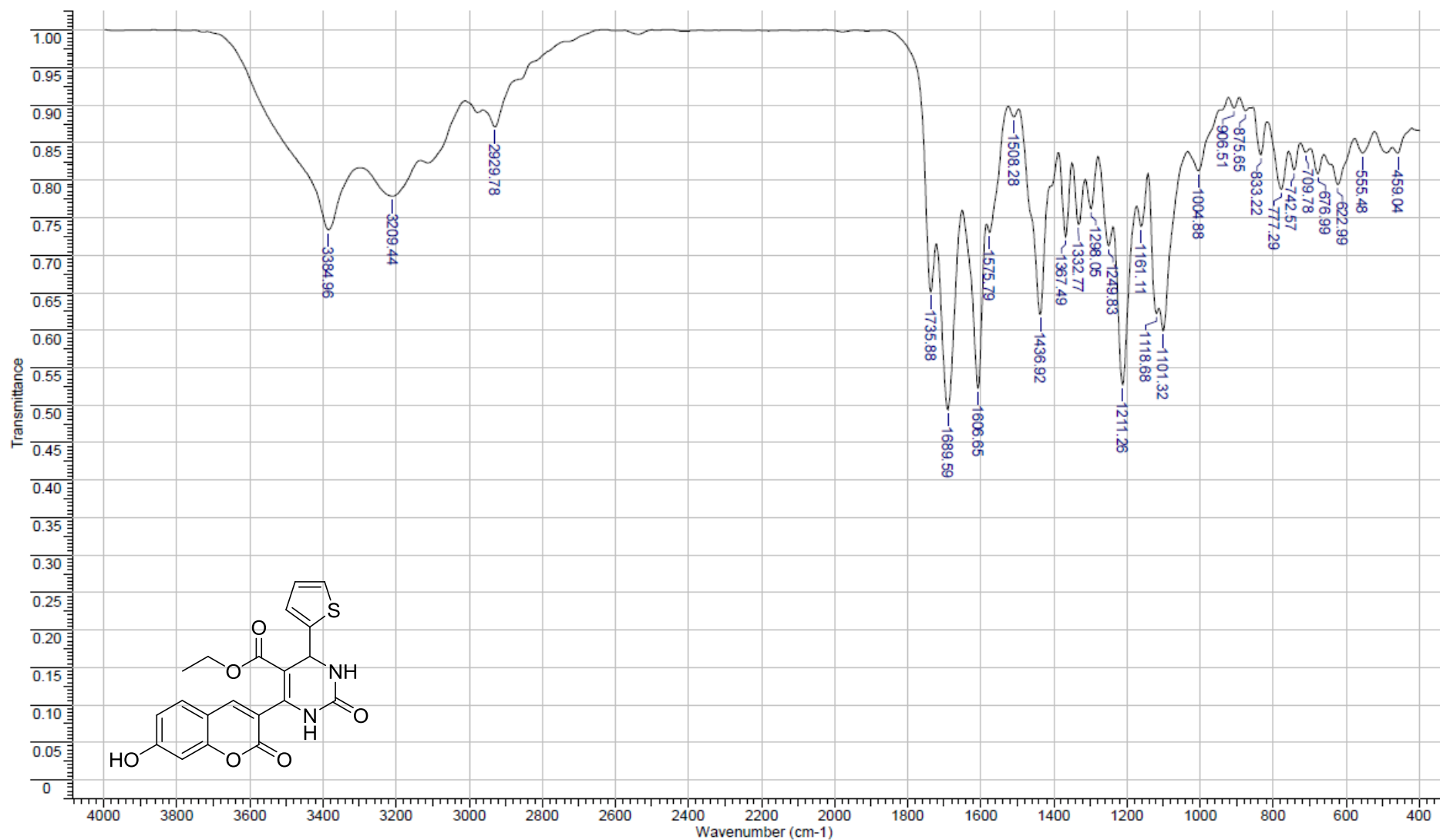
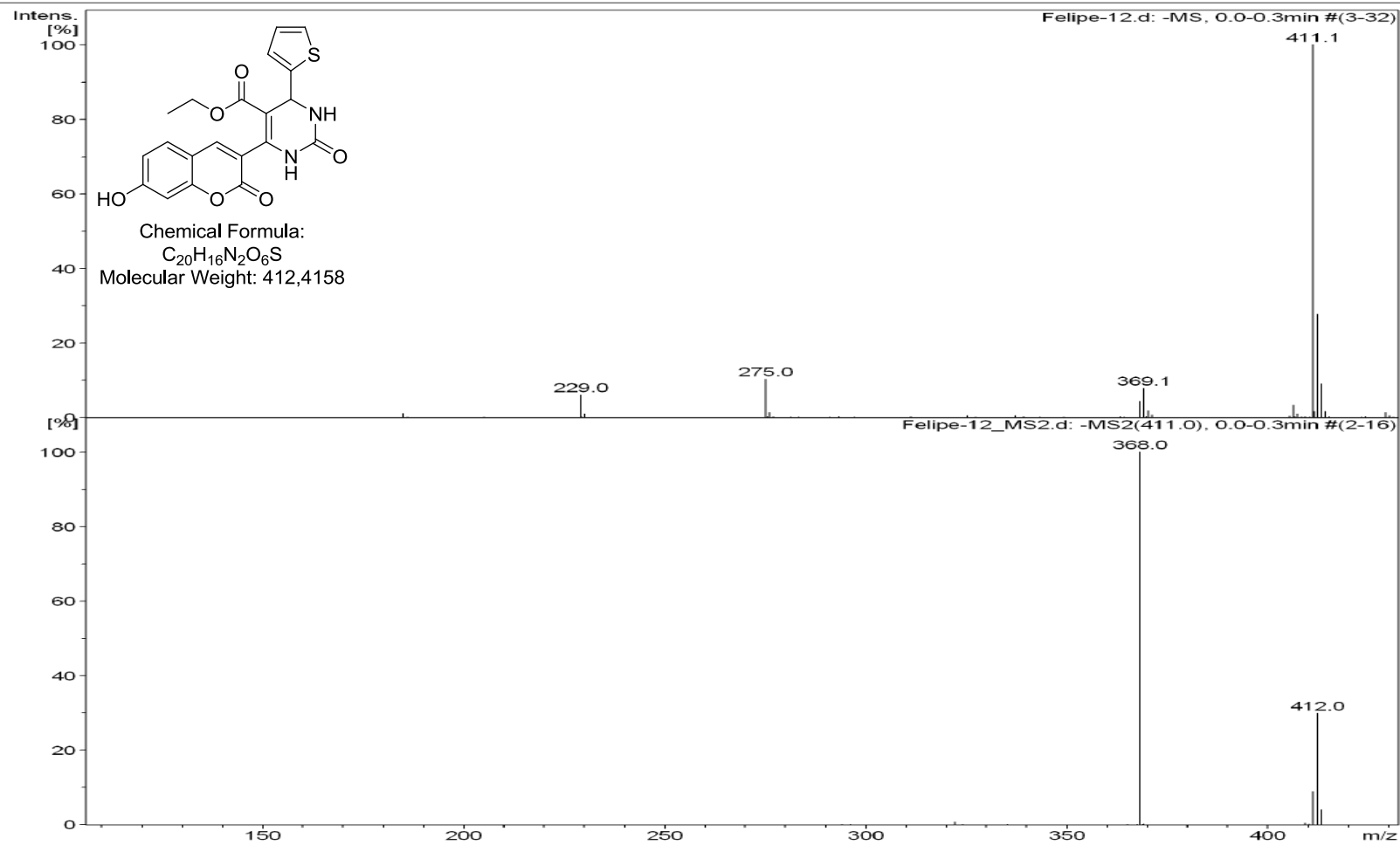


Fig. S49 Espectro de IV em pastilha de KBr de **106k**.

**Acquisition Parameter**

Ion Source Type	ESI	Ion Polarity	Negative	Alternating Ion Polarity	off
Mass Range Mode	Enhanced	Scan Begin	100 m/z	Scan End	700 m/z
Capillary Exit	Resolution	n/a	n/a	Trap Drive	68.9
Accumulation Time	918 $\mu$ s	Averages	5 Spectra	Auto MS/MS	off

Fig. S50 Espectro de ESI de **106k**.

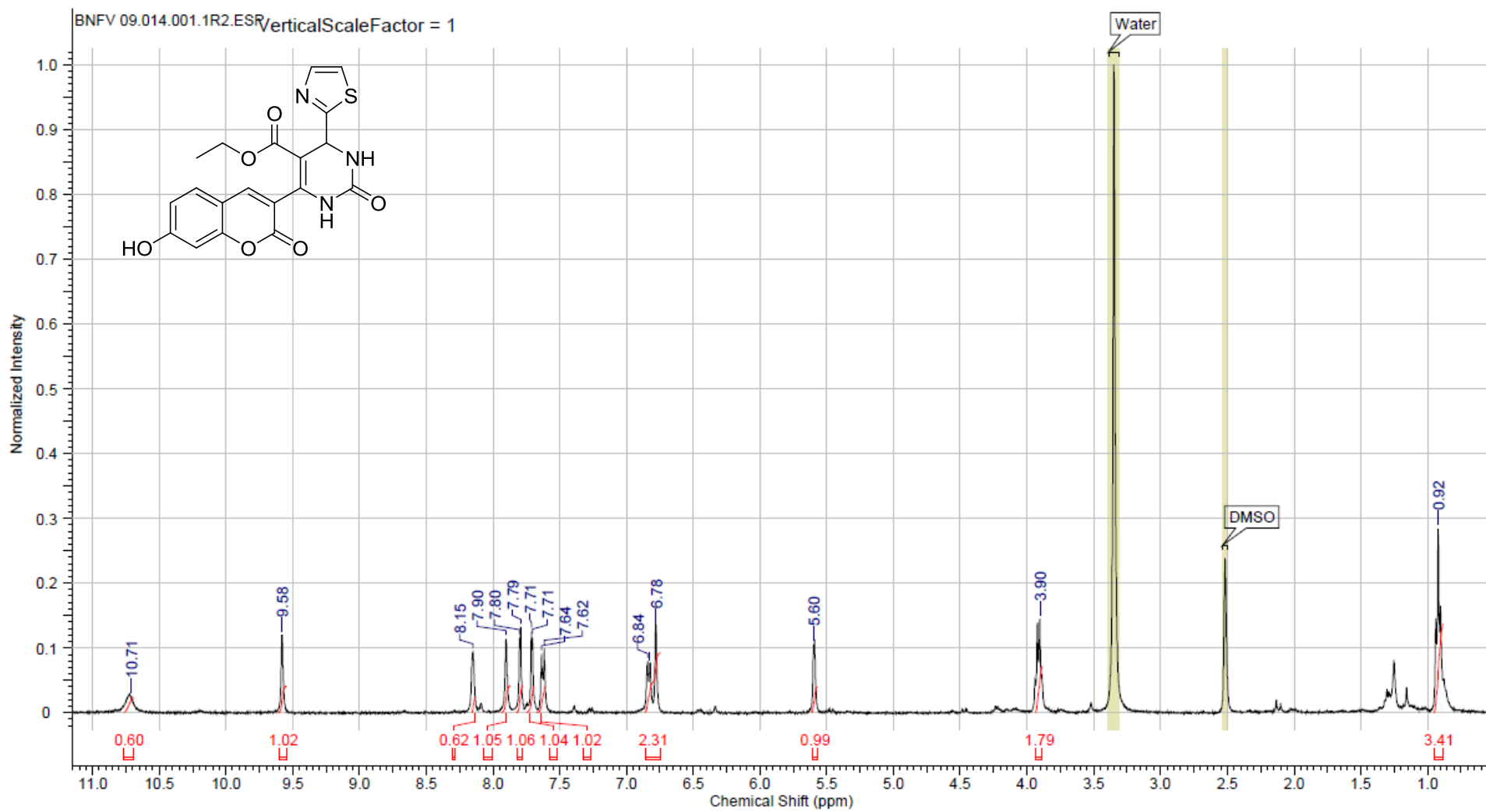


Fig. S51 Espectro de  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz) de **1061** em  $\text{DMSO-}d_6$ .

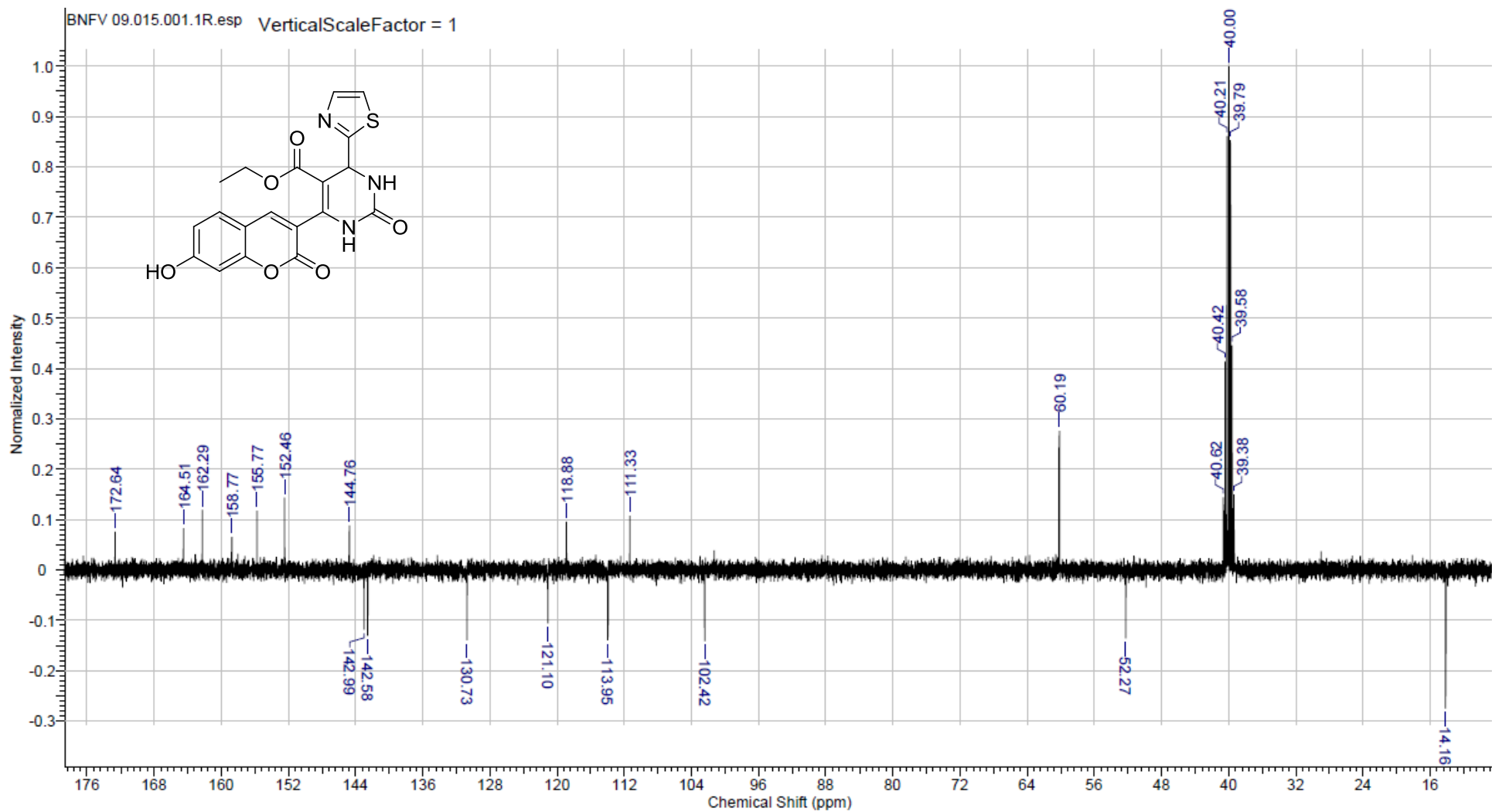


Fig. S52 Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN (100 MHz) de **1061** em  $\text{DMSO-}d_6$ .

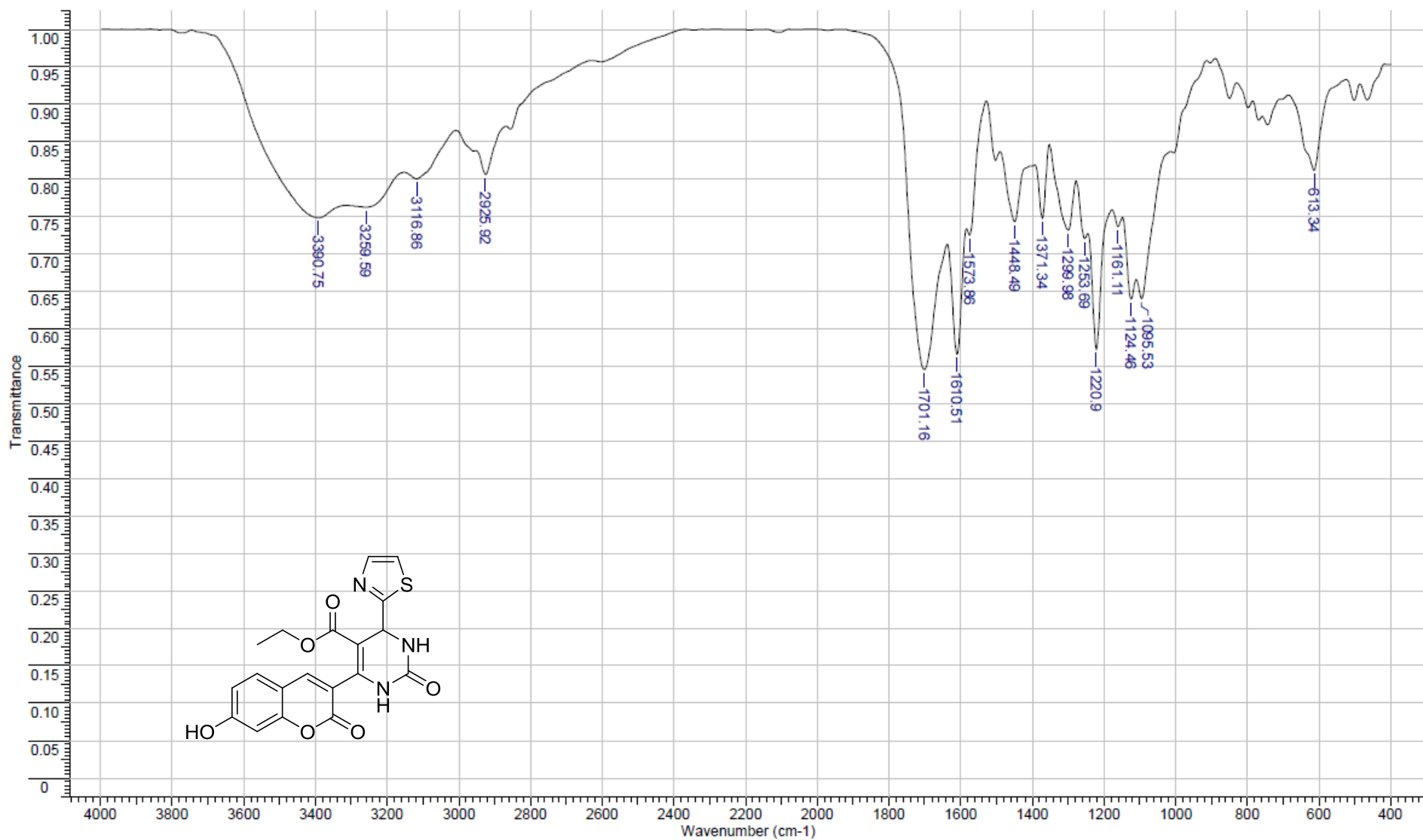
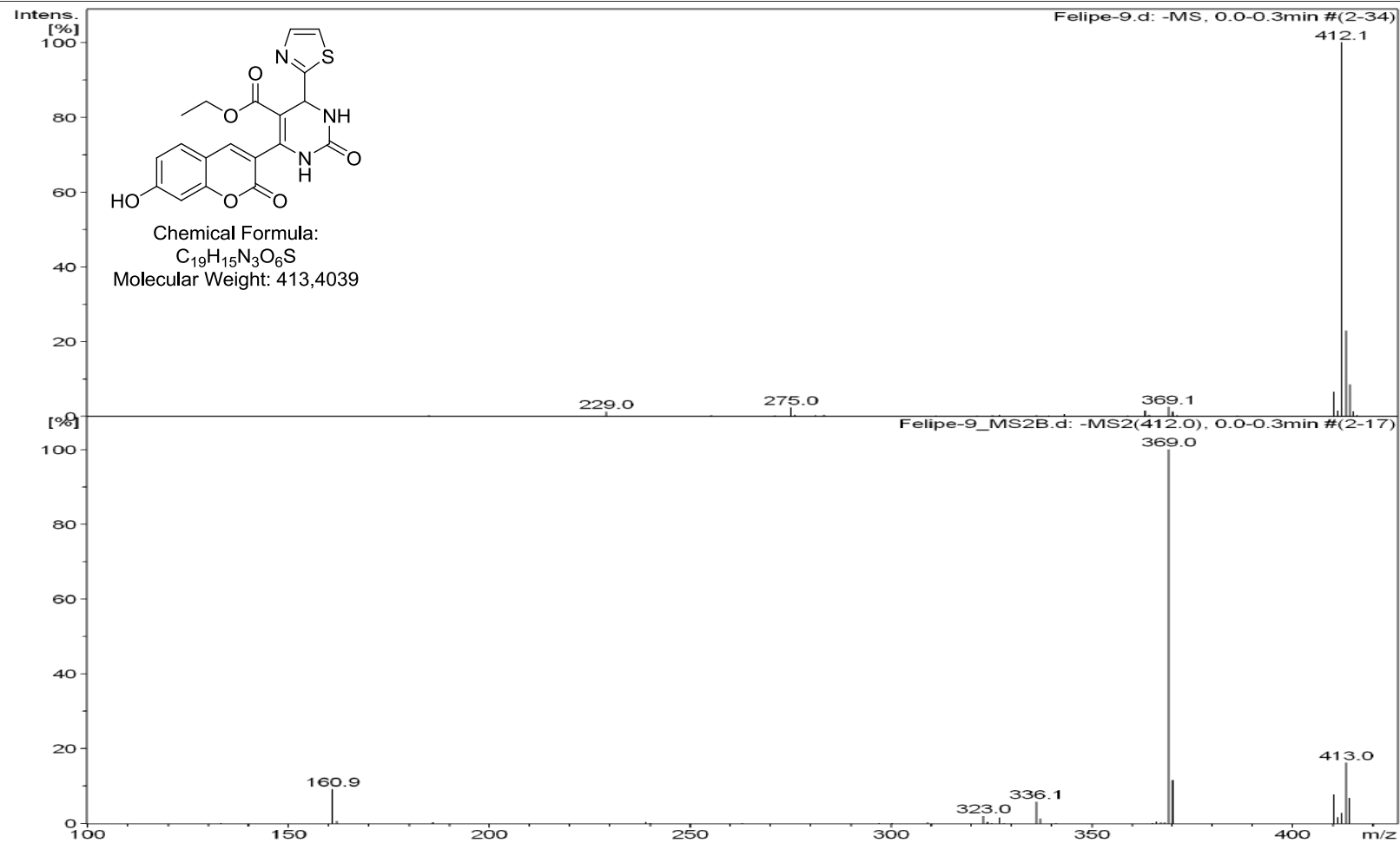


Fig. S53 Espectro de IV em pastilha de KBr de **106I**.



**Acquisition Parameter**

Ion Source Type	ESI	Ion Polarity	Negative	Alternating Ion Polarity	off
Mass Range Mode	Enhanced Resolution	Scan Begin	100 m/z	Scan End	700 m/z
Capillary Exit	Resolution	n/a	n/a	Trap Drive	68.9
Accumulation Time	199 $\mu$ s	Averages	5 Spectra	Auto MS/MS	off

Fig. S54 Espectro de ESI de **106l**.

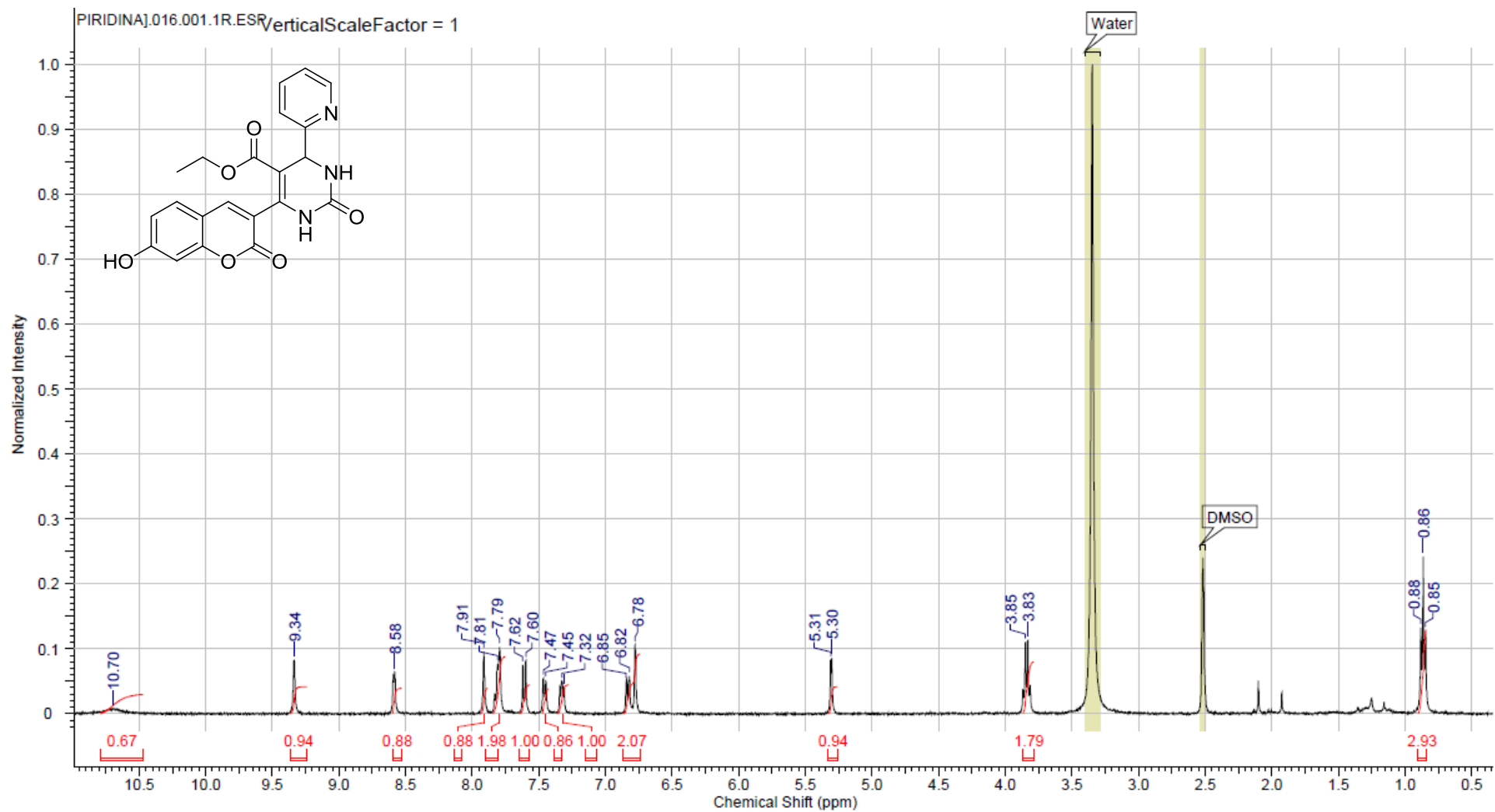


Fig. S55 Espectro de  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz) de **106m** em  $\text{DMSO-}d_6$ .

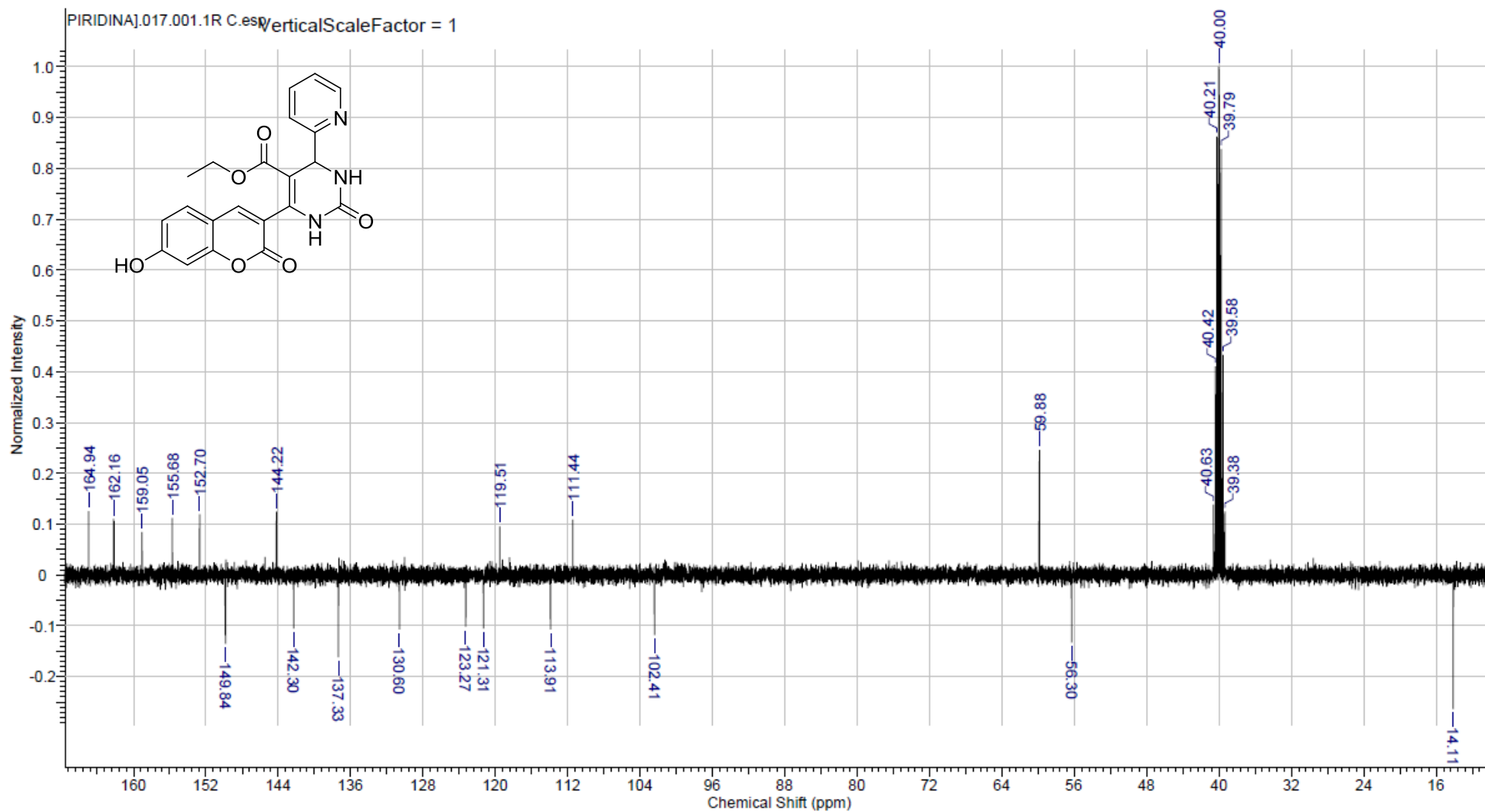


Fig. S56 Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN (100 MHz) de **106m** em DMSO-*d*<sub>6</sub>.

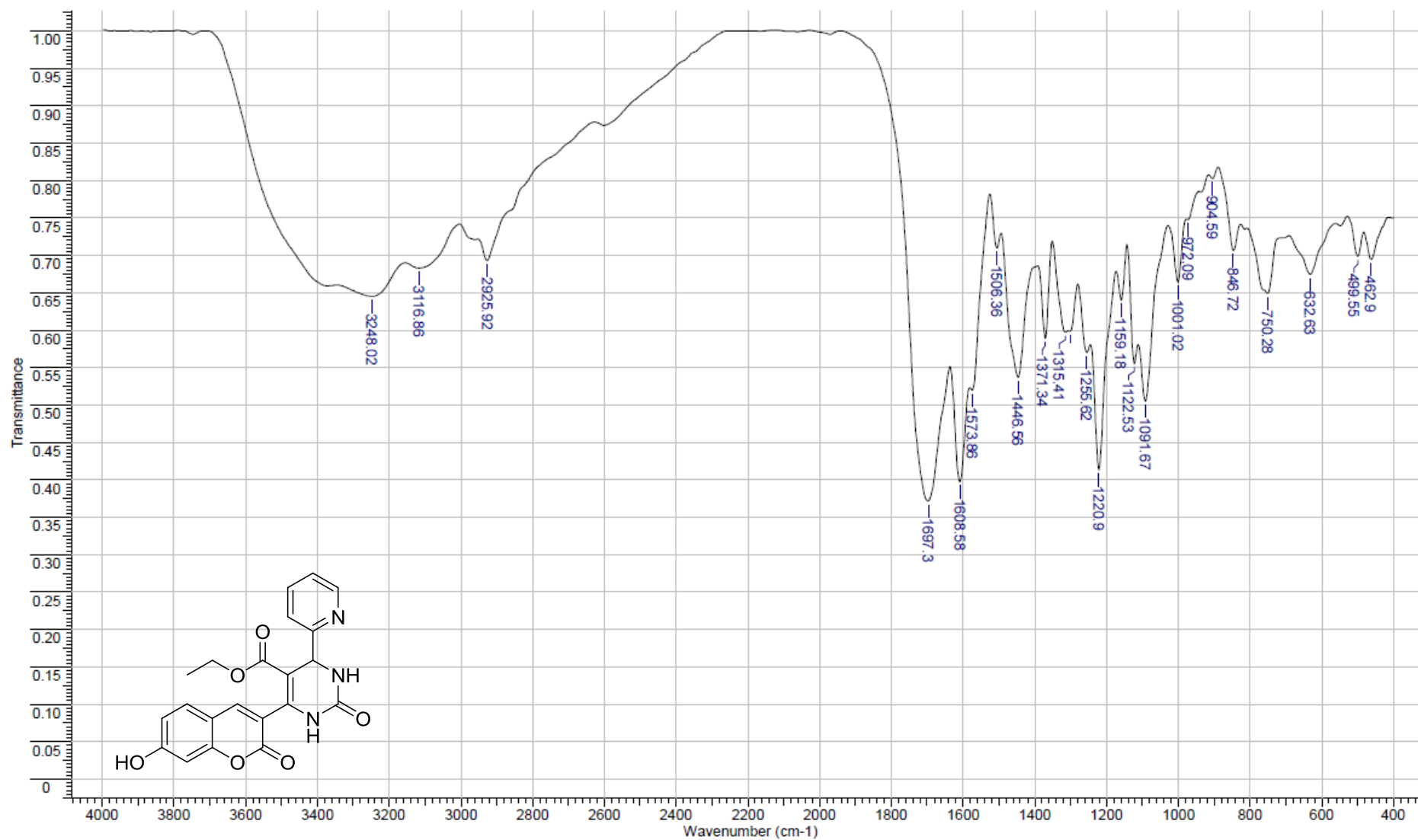


Fig. S57 Espectro de IV em pastilha de KBr de **106m**.

**Acquisition Parameter**

Ion Source Type	ESI	Ion Polarity	Negative	Alternating Ion Polarity	off
Mass Range Mode	Enhanced	Scan Begin	100 m/z	Scan End	700 m/z
Capillary Exit	Resolution	n/a	n/a	Trap Drive	68.9
Accumulation Time	94 $\mu$ s	Averages	5 Spectra	Auto MS/MS	off

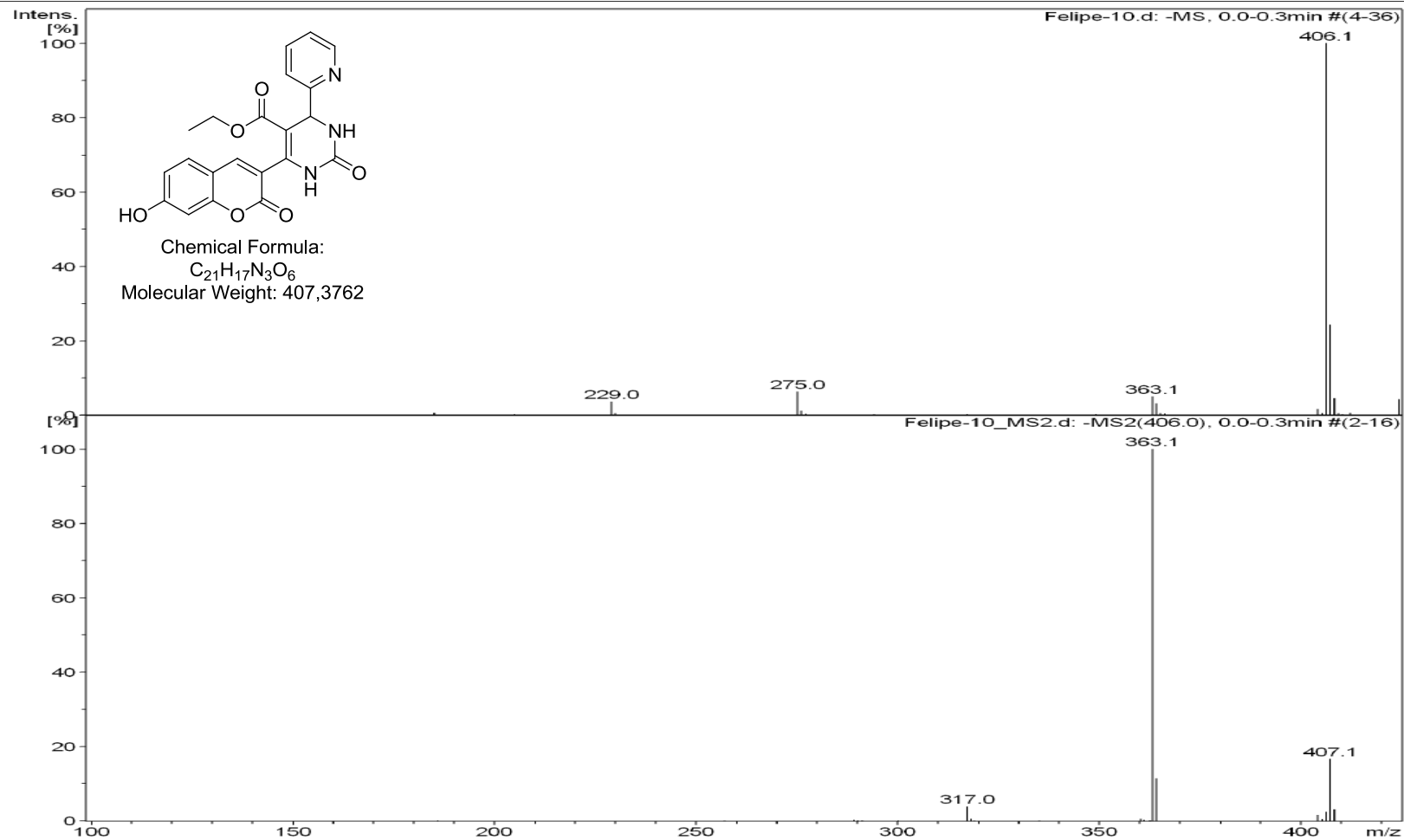


Fig. S58 Espectro de ESI de 106m.

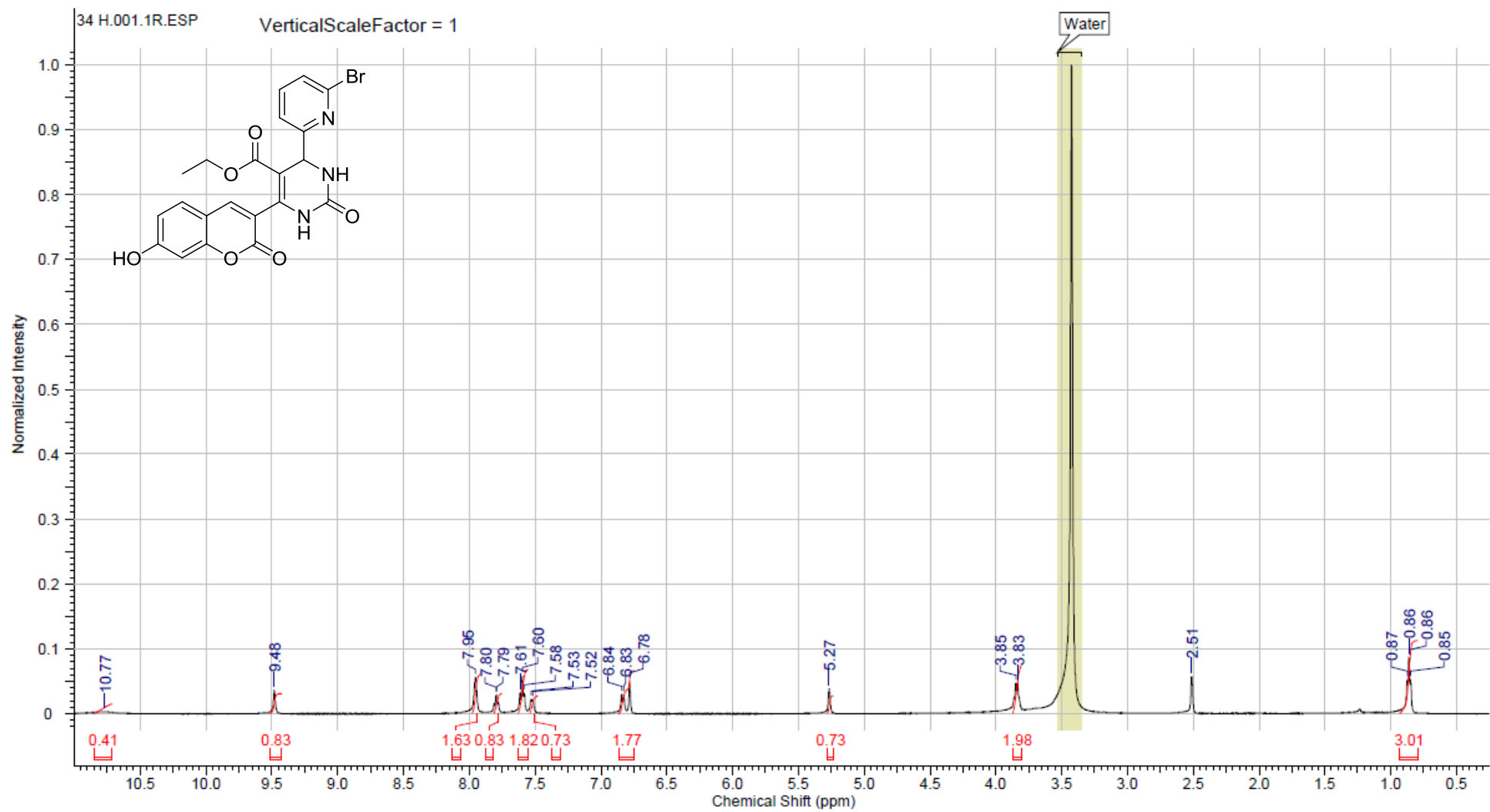


Fig. S59 Espectro de  $^1\text{H}$  RMN (500 MHz) de **106n** em  $\text{DMSO-}d_6$ .

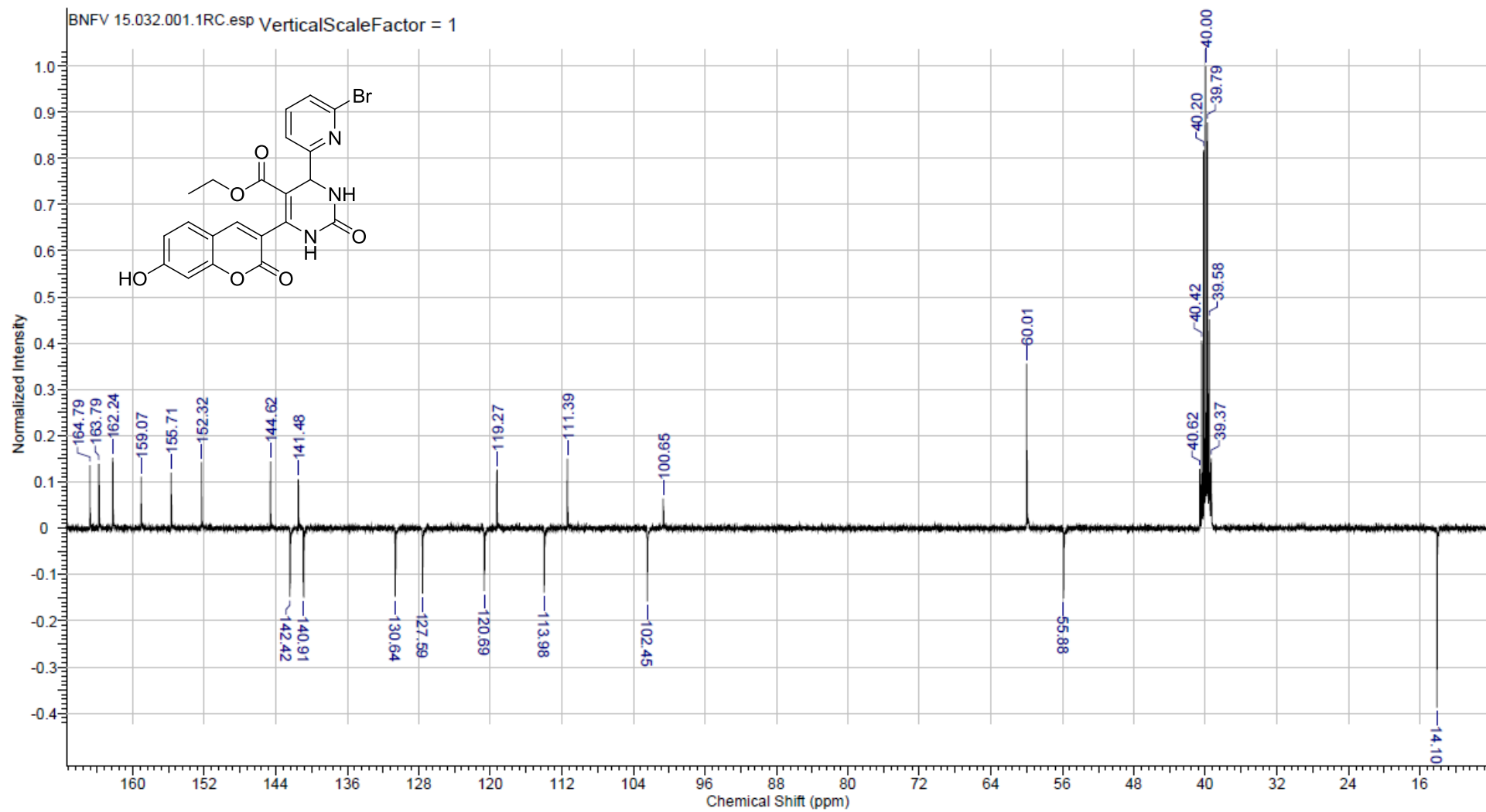


Fig. S60 Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN (125 MHz) de **106n** em  $\text{DMSO-}d_6$ .

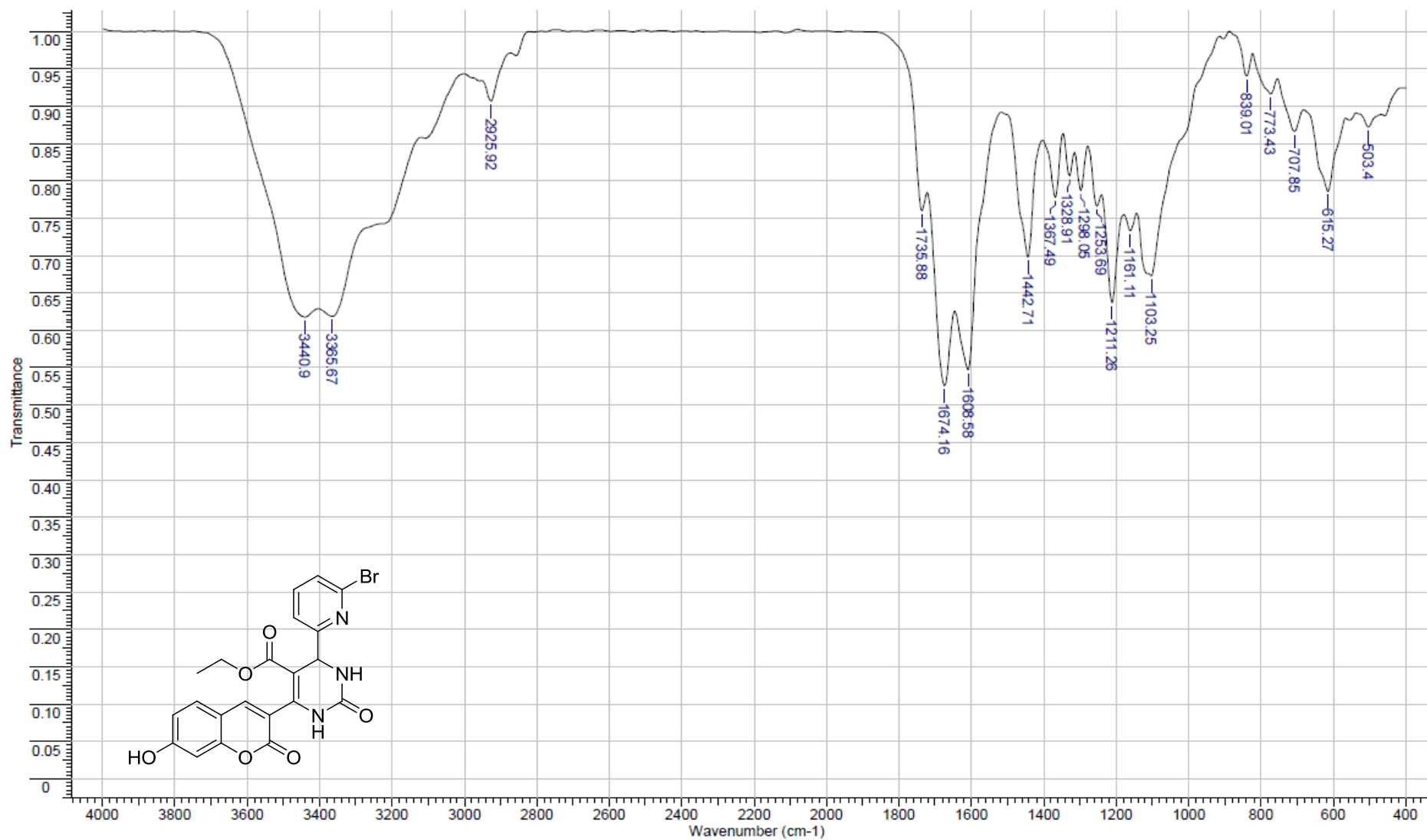


Fig. S61 Espectro de IV em pastilha de KBr de **106n**.



Acquisition Parameter		Ion Polarity	Negative	Alternating Ion Polarity	off
Ion Source Type	ESI	Scan Begin	100 m/z	Scan End	700 m/z
Mass Range Mode	Enhanced Resolution	n/a	n/a	Trap Drive	68.9
Capillary Exit	Resolution	Averages	5 Spectra	Auto MS/MS	off
Accumulation Time	2189 $\mu$ s				

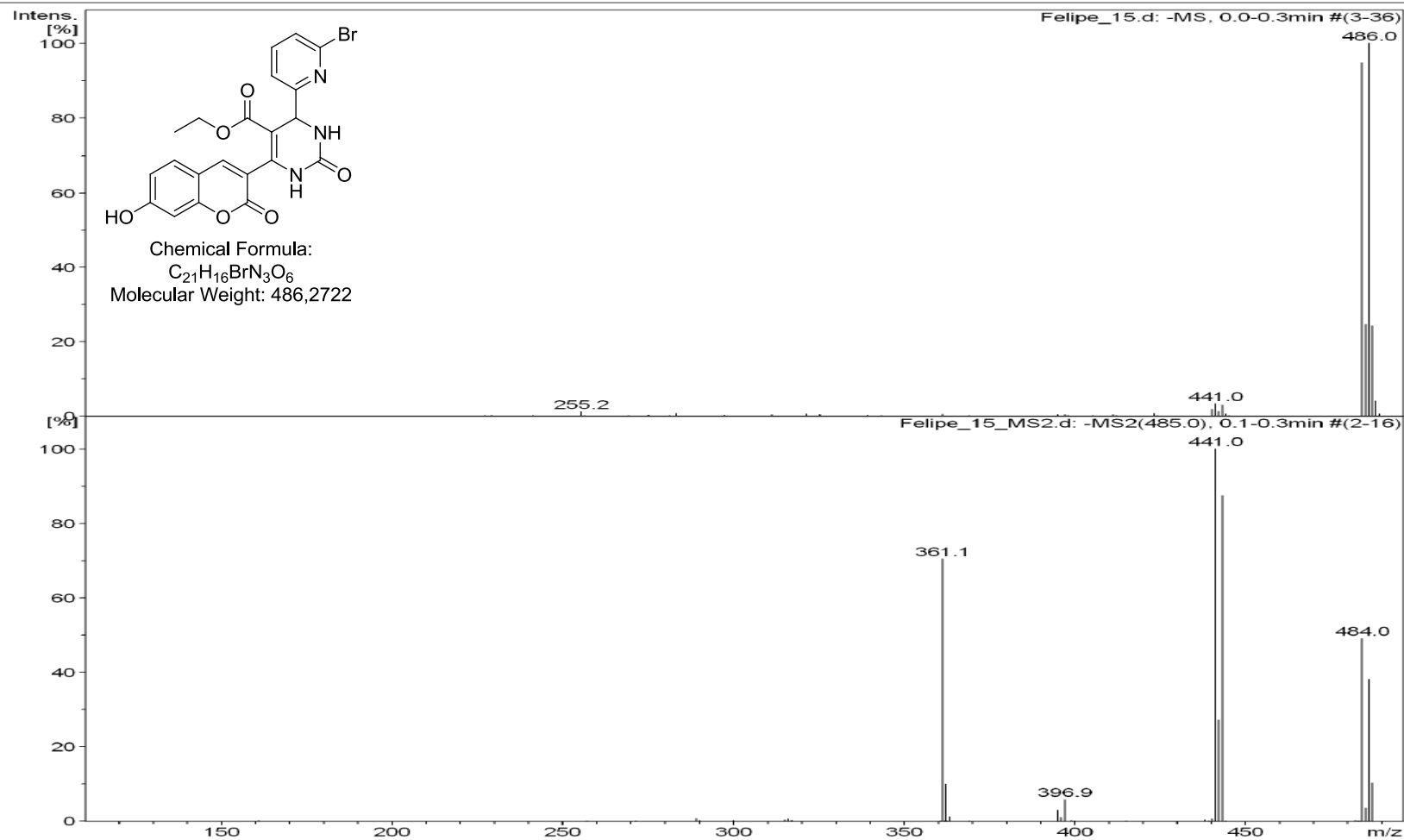


Fig. S62 Espectro de ESI de **106n**.

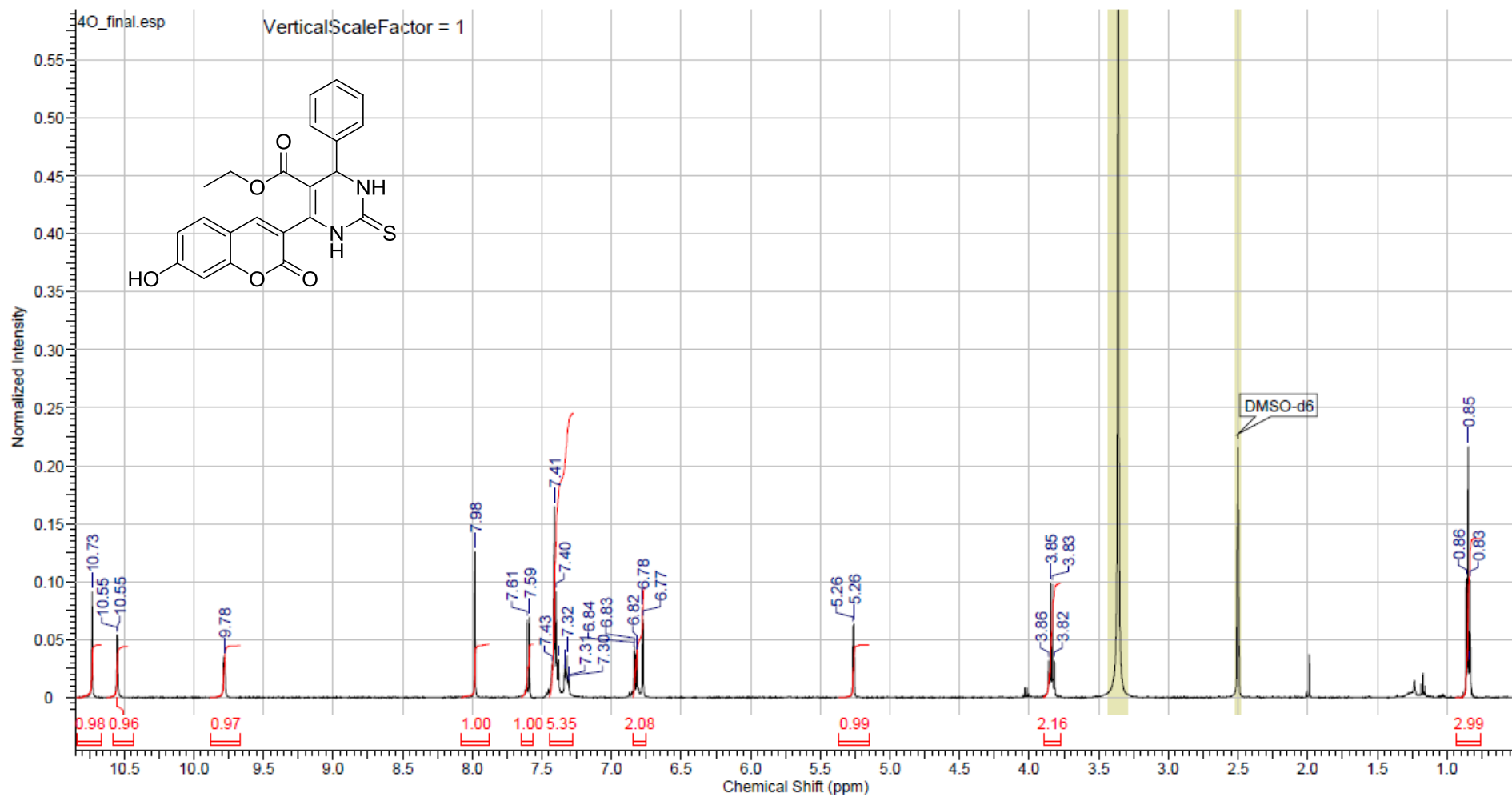


Fig. S61 Espectro de  $^1\text{H}$  RMN (500 MHz) de **106o** em  $\text{DMSO-}d_6$ .

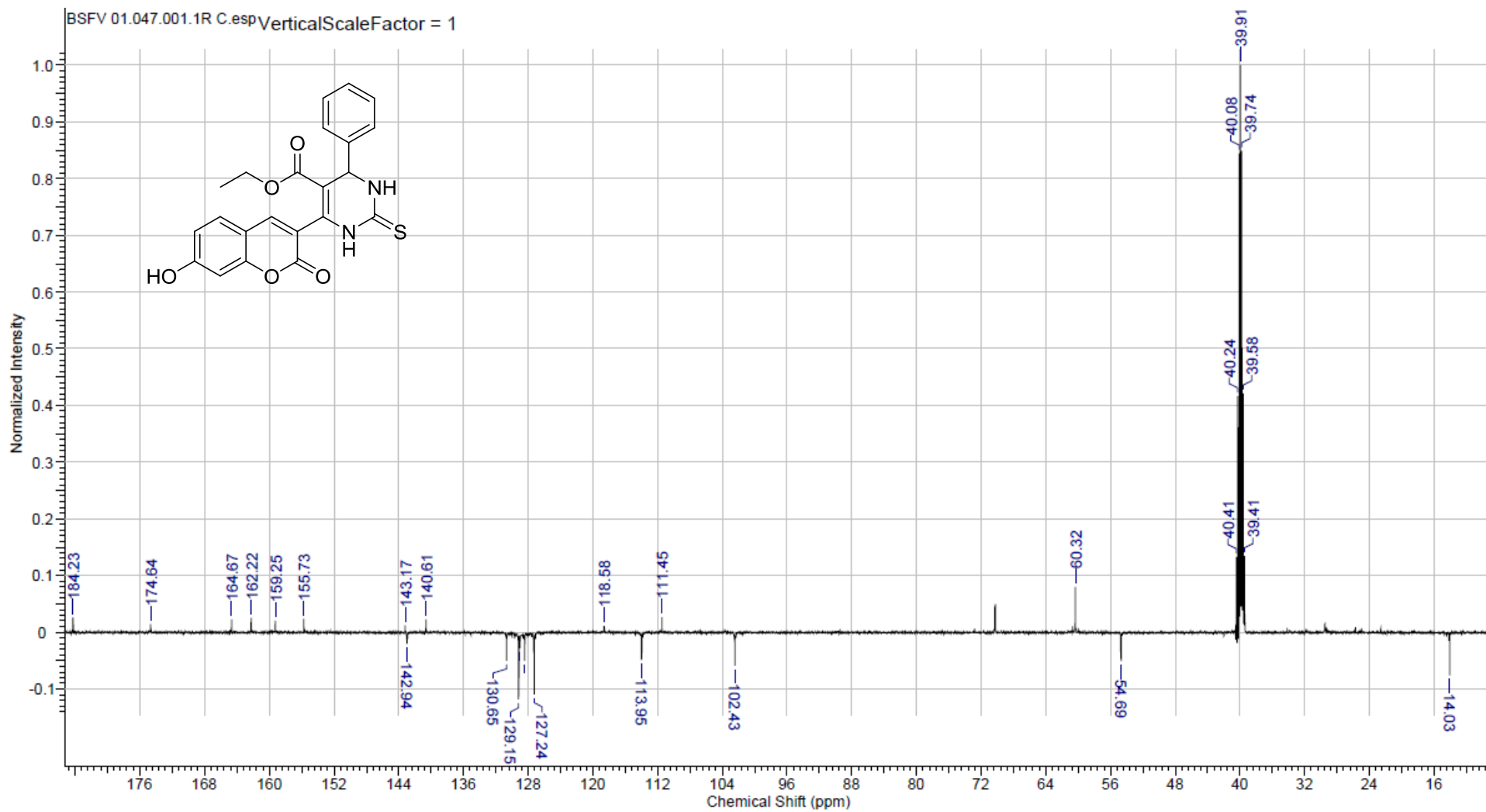


Fig. S62 Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN (125 MHz) de **106o** em  $\text{DMSO-}d_6$ .

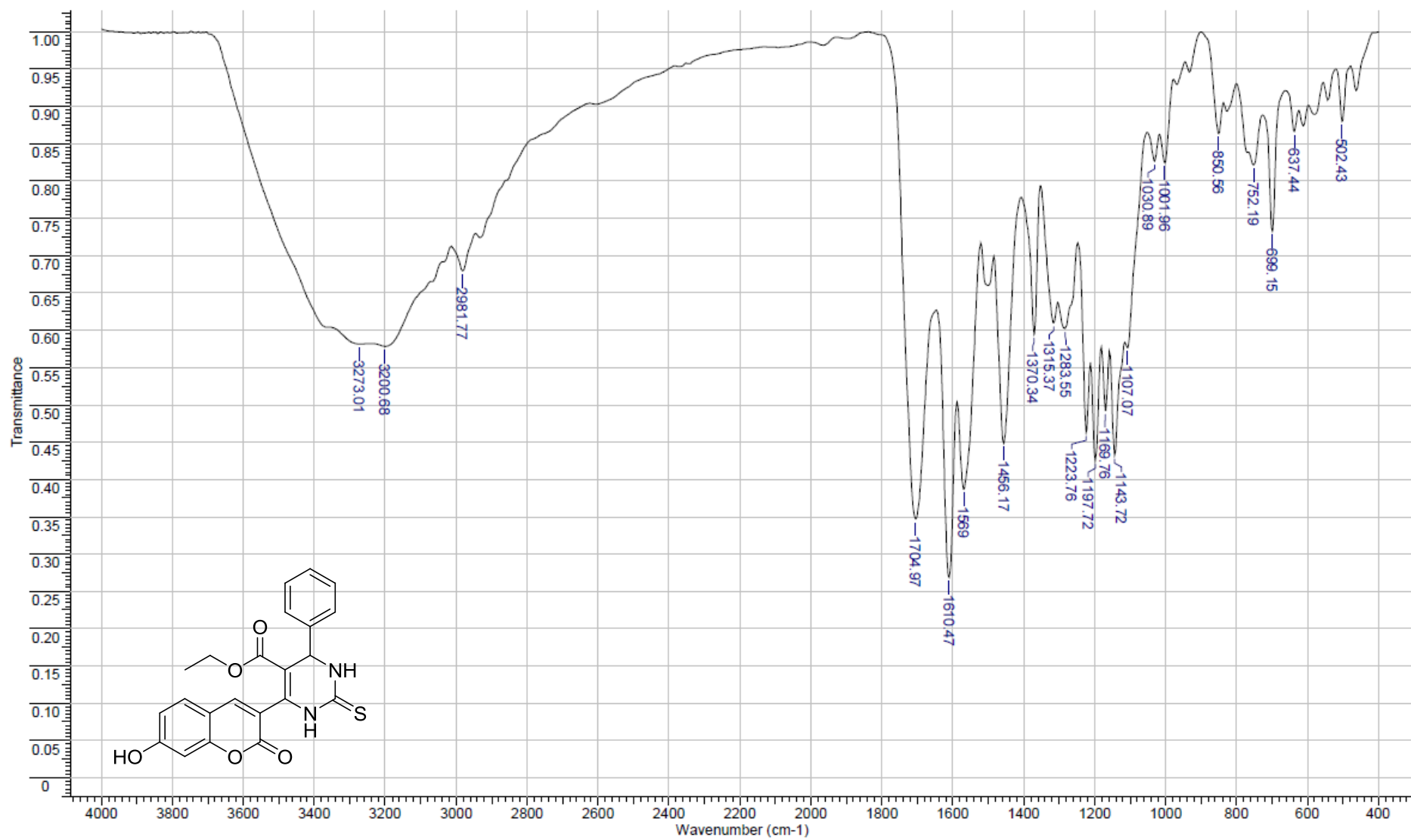
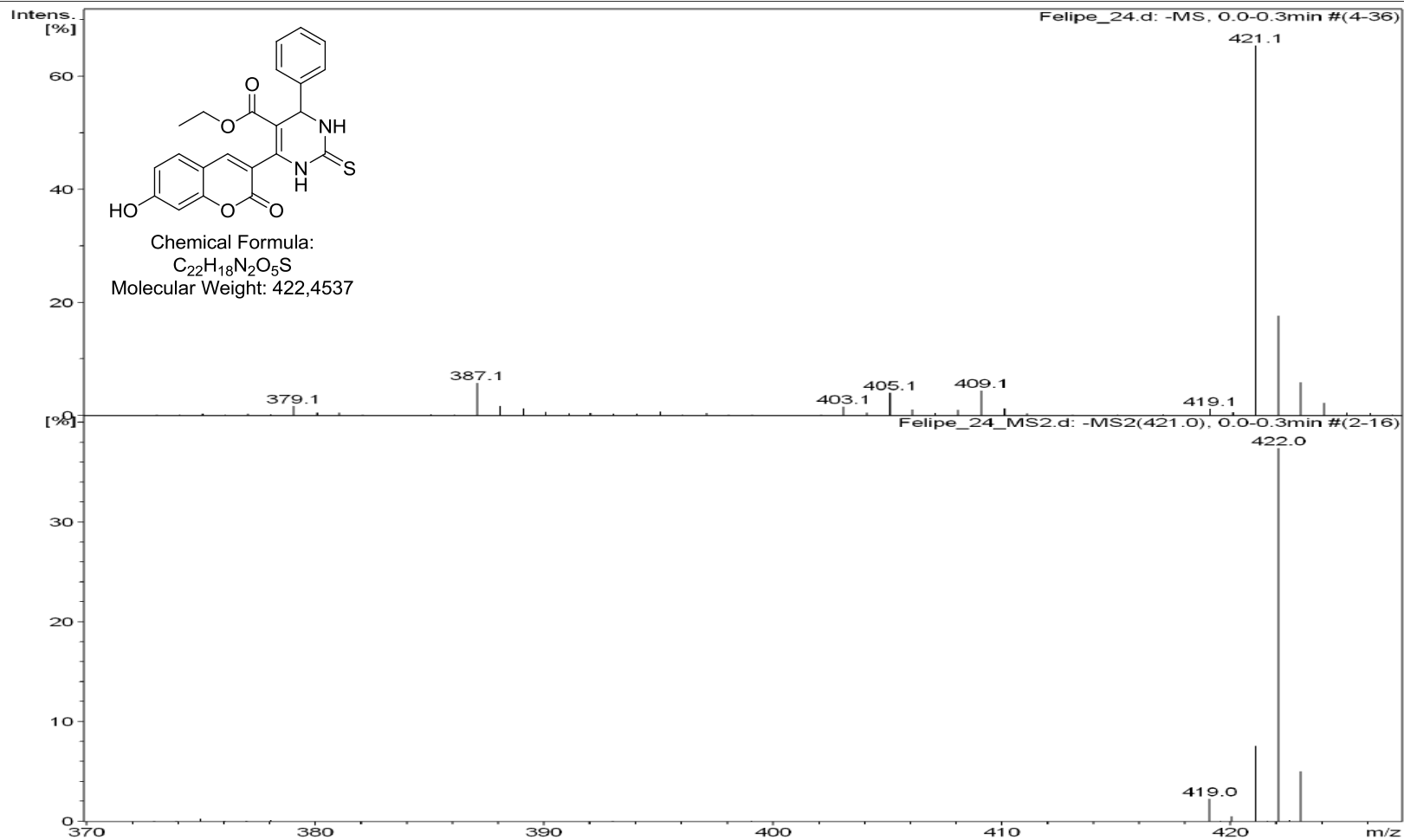


Fig. S63 Espectro de IV em pastilha de KBr de **106o**.

**Acquisition Parameter**

Ion Source Type	ESI	Ion Polarity	Negative	Alternating Ion Polarity	off
Mass Range Mode	Enhanced	Scan Begin	100 m/z	Scan End	700 m/z
Capillary Exit	Resolution	n/a	n/a	Trap Drive	68.9
Accumulation Time	413 $\mu$ s	Averages	5 Spectra	Auto MS/MS	off

Fig. S64 Espectro de ESI de **106o**.

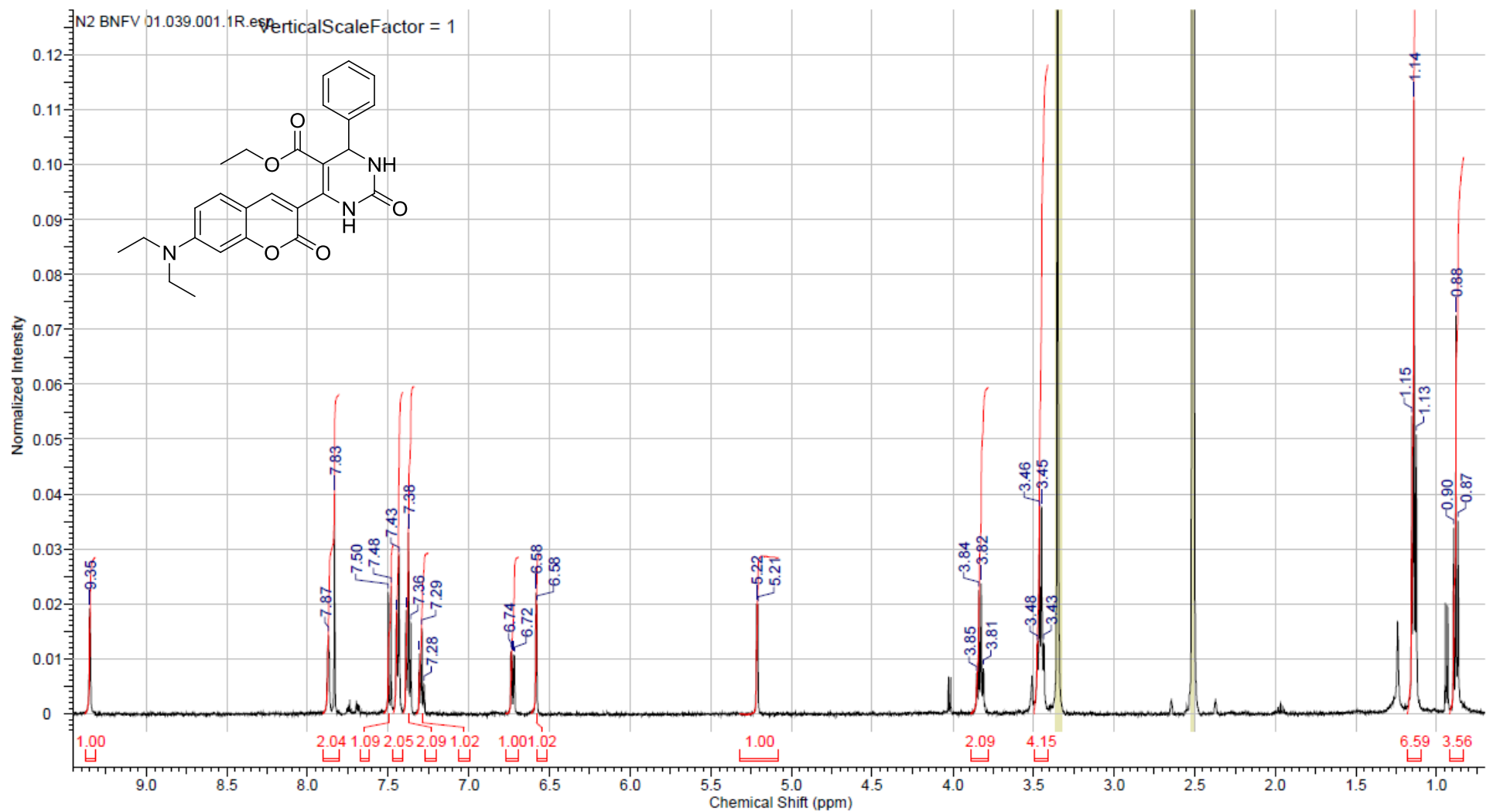


Fig. S65 Espectro de  $^1\text{H}$  RMN (500 MHz) de **106p** em  $\text{DMSO-}d_6$ .

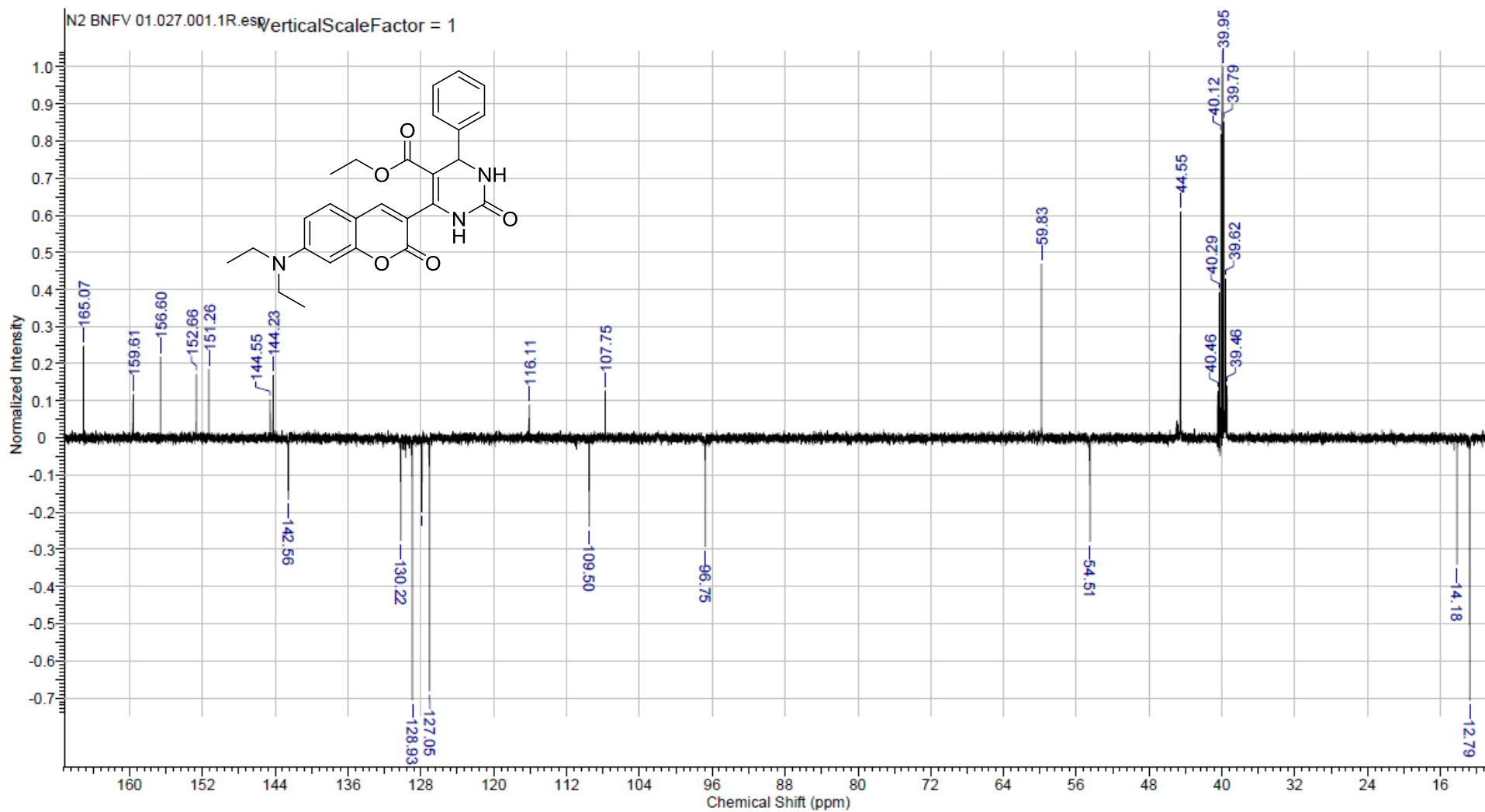


Fig. S66 Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN (125 MHz) de **106p** em  $\text{DMSO-}d_6$ .

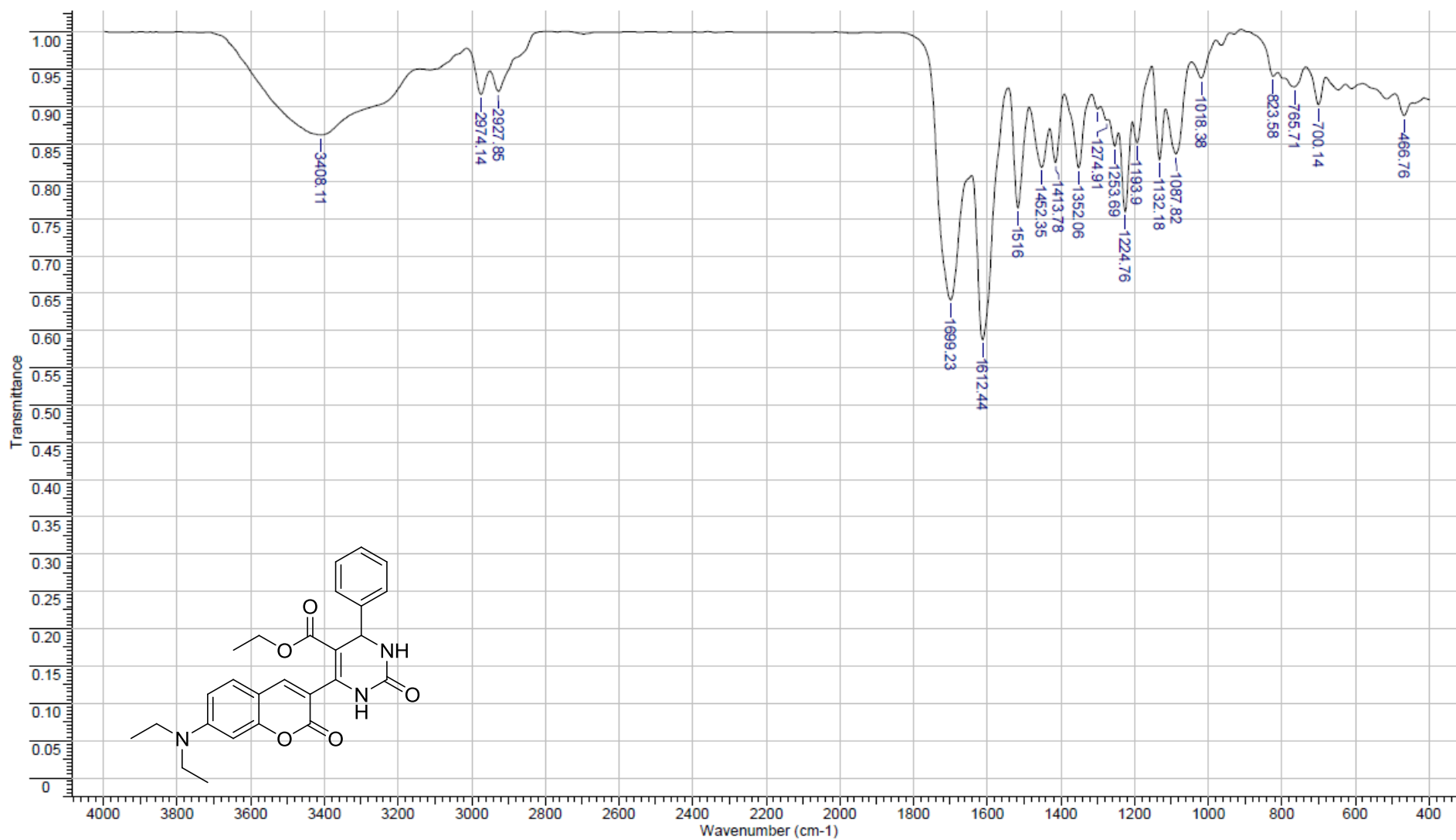


Fig. S67 Espectro de IV em pastilha de KBr de **106p**.



**Acquisition Parameter**

Ion Source Type	ESI	Ion Polarity	Negative	Alternating Ion Polarity	off
Mass Range Mode	Enhanced	Scan Begin	100 m/z	Scan End	700 m/z
Capillary Exit	Resolution	n/a	n/a	Trap Drive	68.9
Accumulation Time	2722 $\mu$ s	Averages	5 Spectra	Auto MS/MS	off

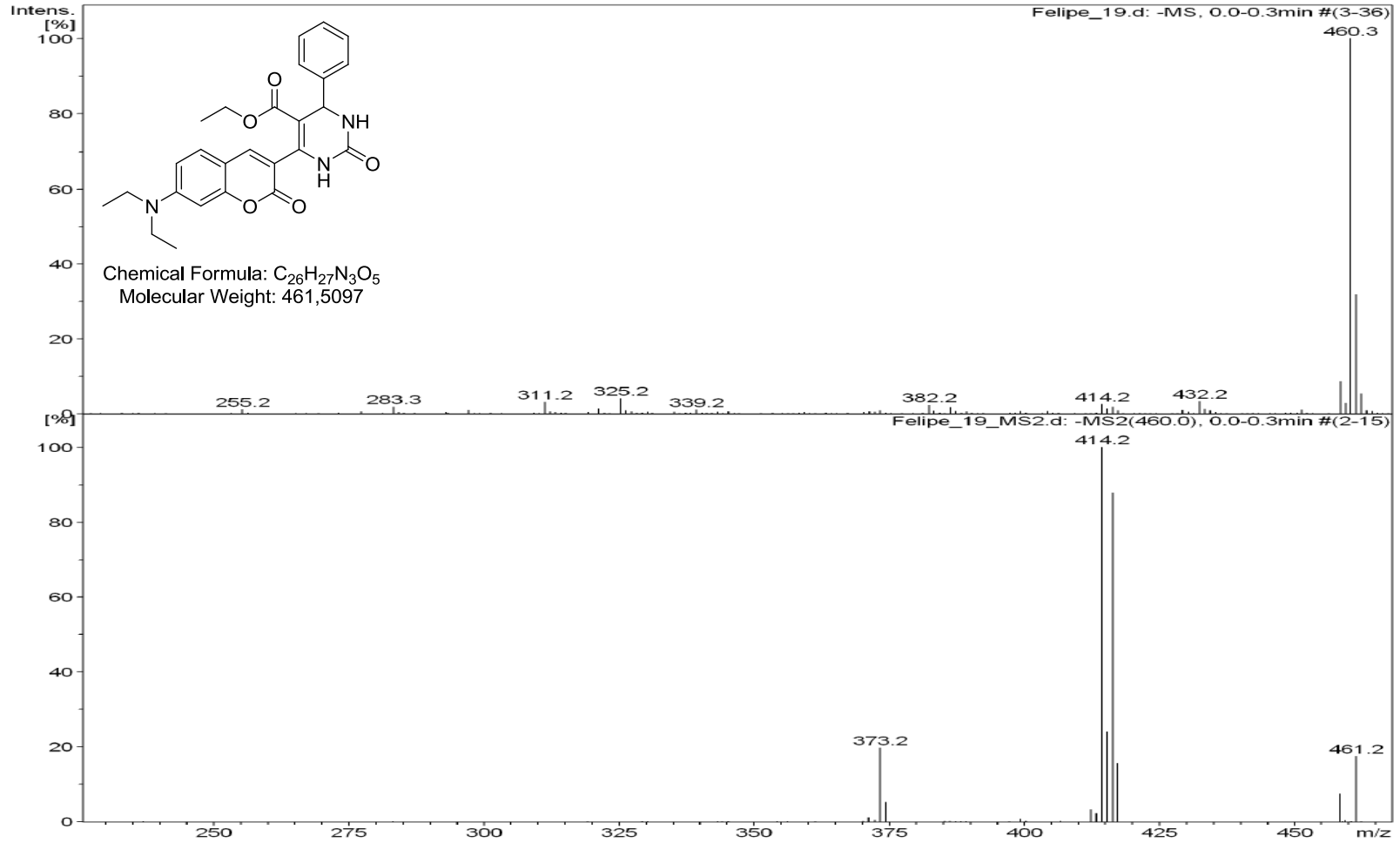


Fig. S68 Espectro de ESI de 106p.

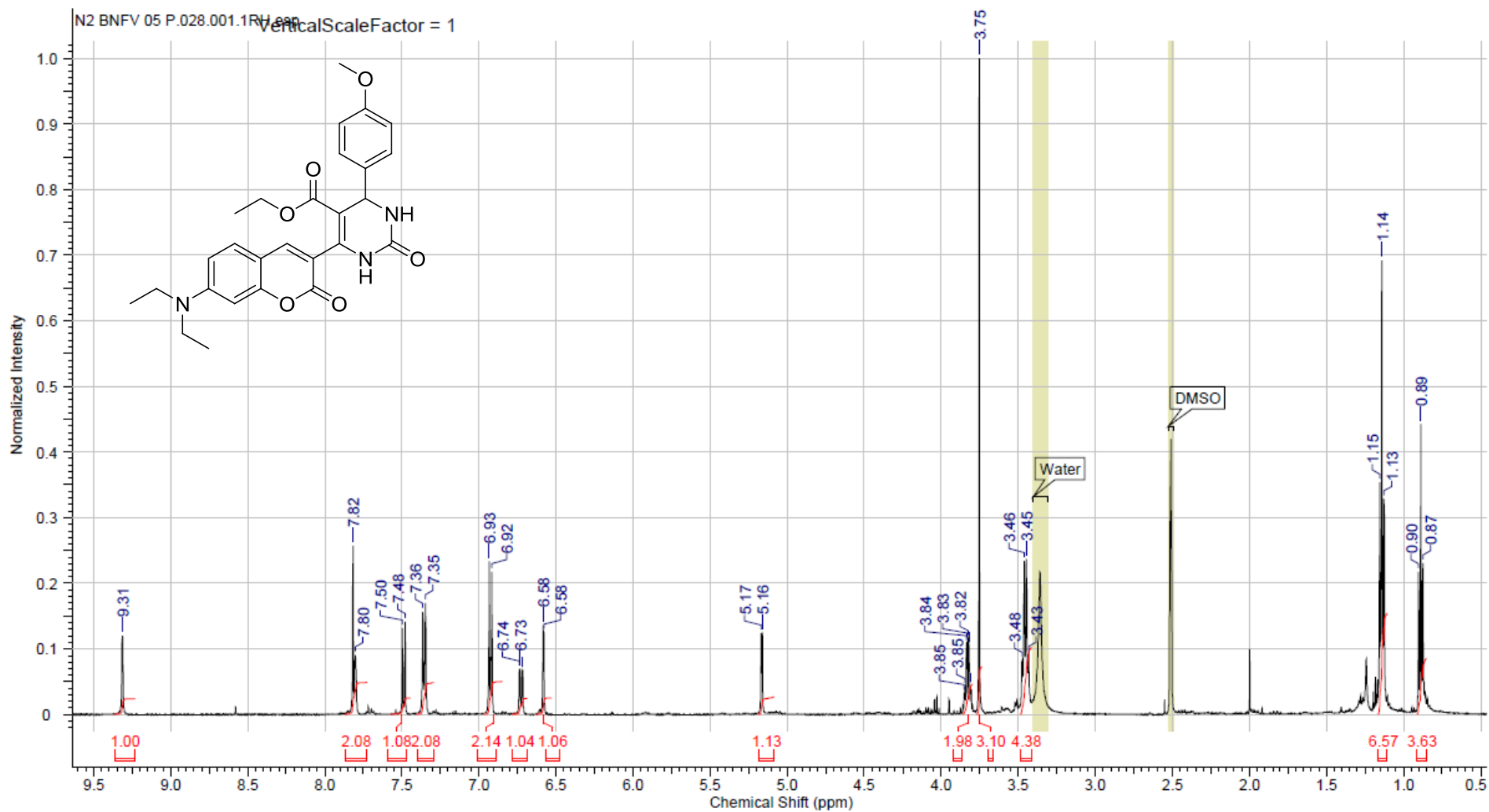


Fig. S69 Espectro de  $^1\text{H}$  RMN (500 MHz) de **106q** em  $\text{DMSO-}d_6$ .

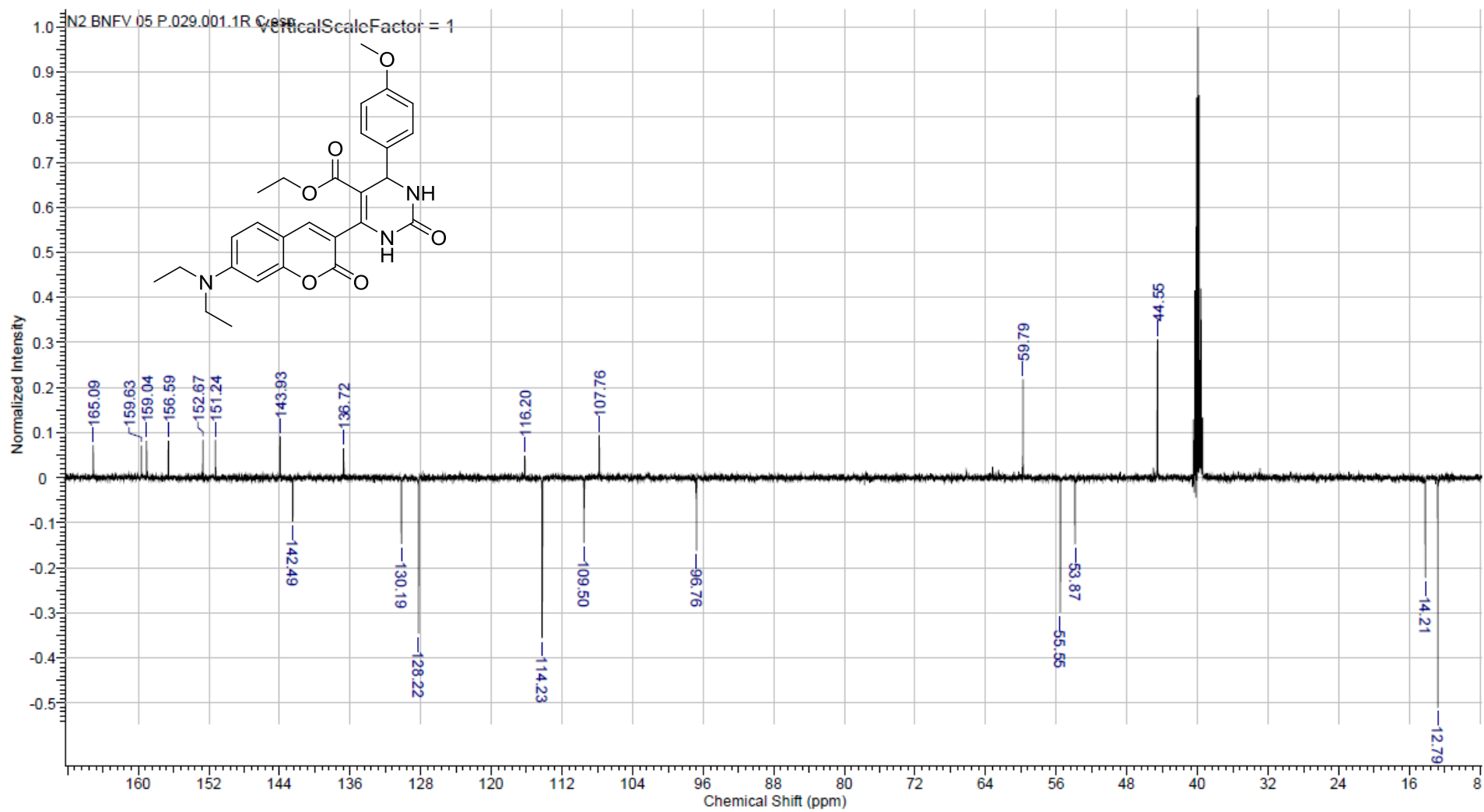


Fig. S70 Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN (125 MHz) de **106q** em  $\text{DMSO-}d_6$ .

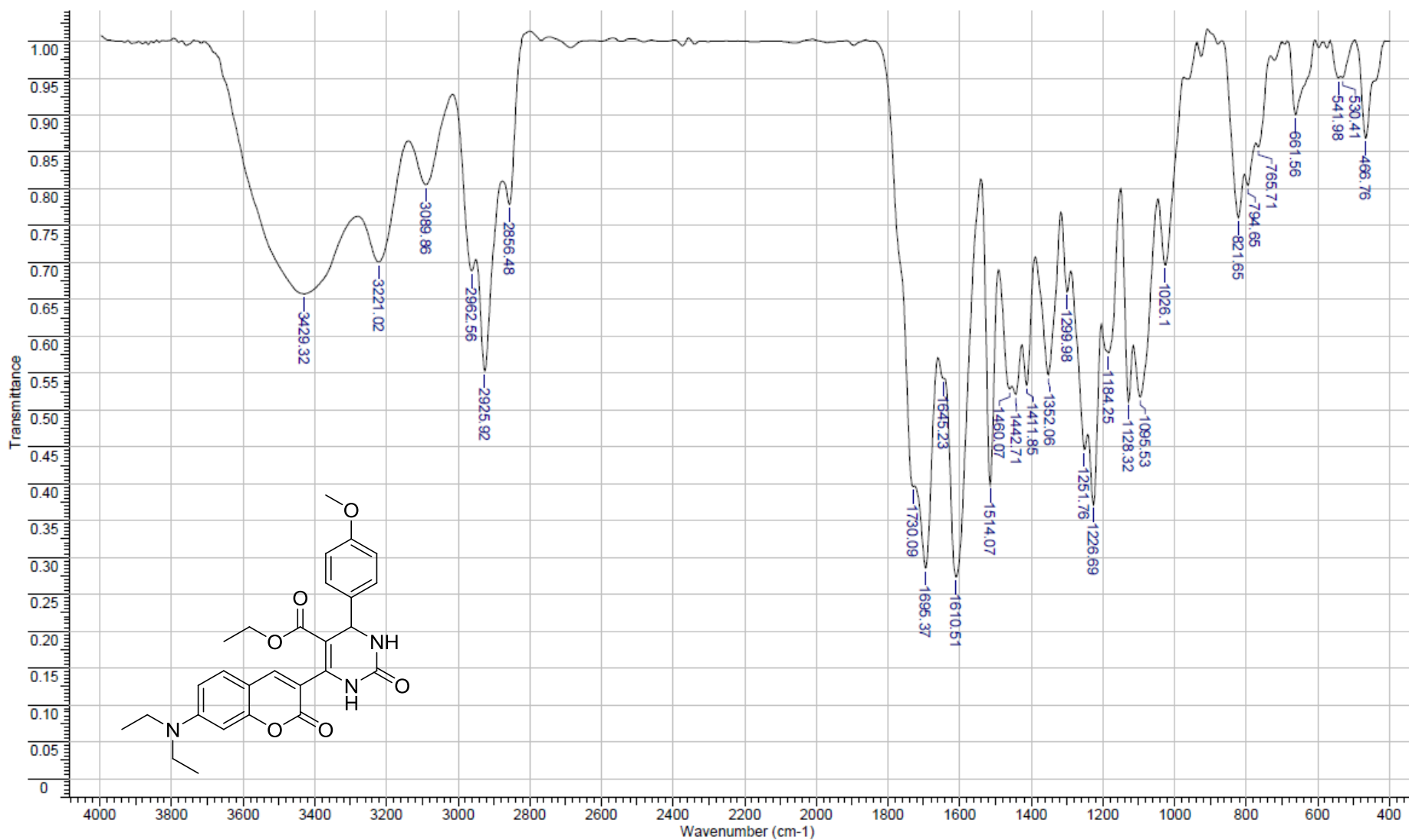


Fig. S71 Espectro de IV em pastilha de KBr de **106q**.

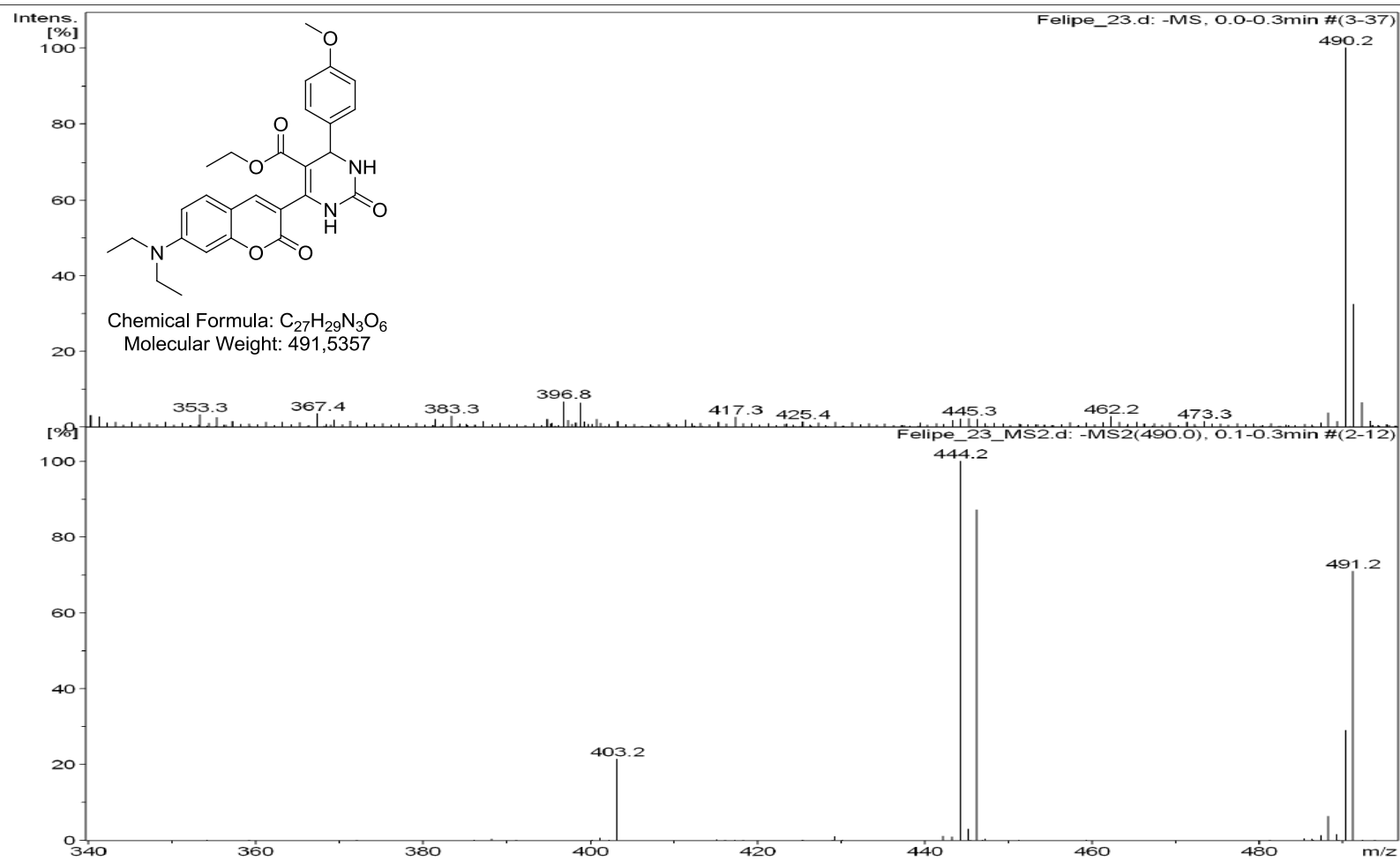


Fig. S72 Espectro de ESI de **106q**.

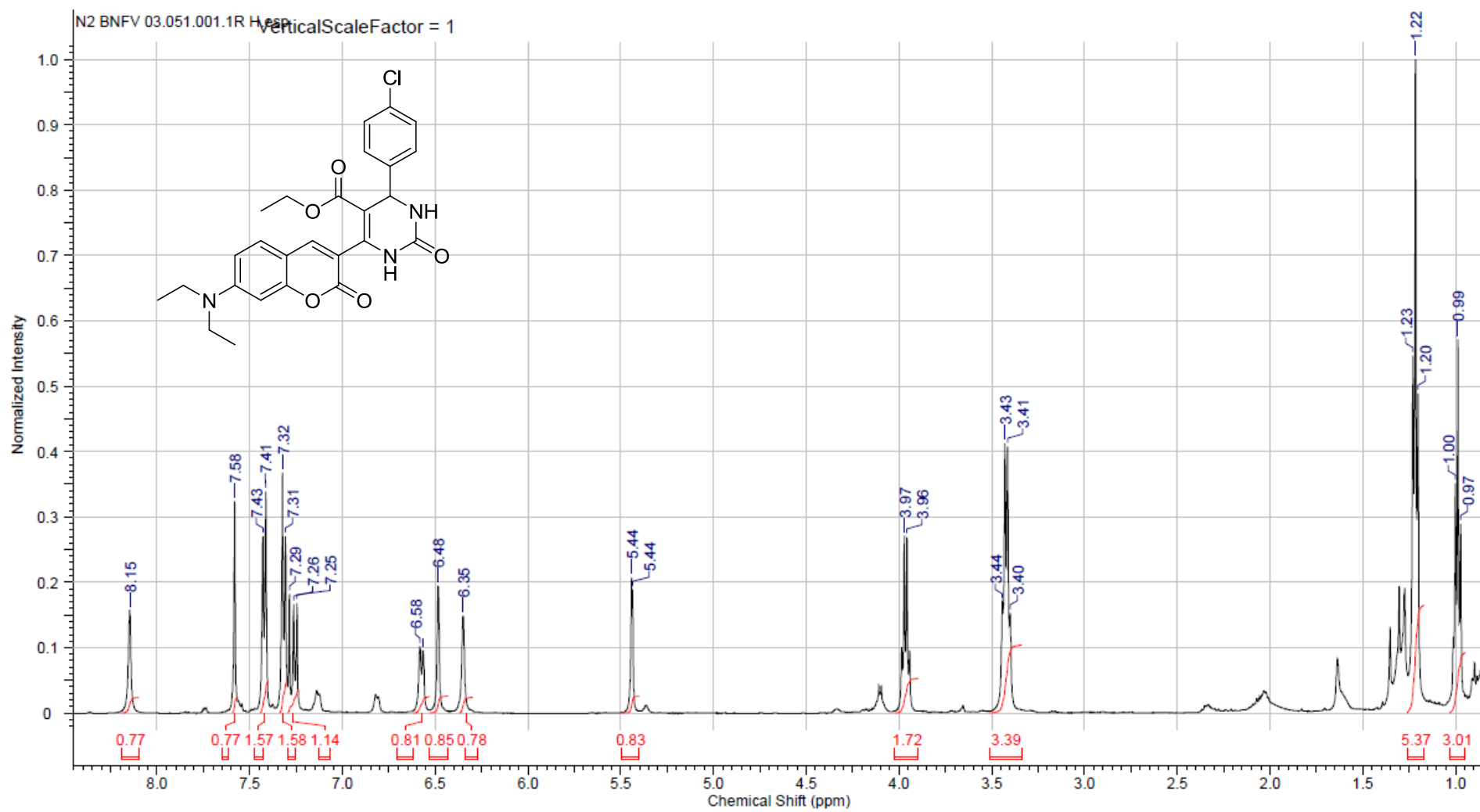


Fig. S73 Espectro de <sup>1</sup>H RMN (500 MHz) de **106r** em CDCl<sub>3</sub>.

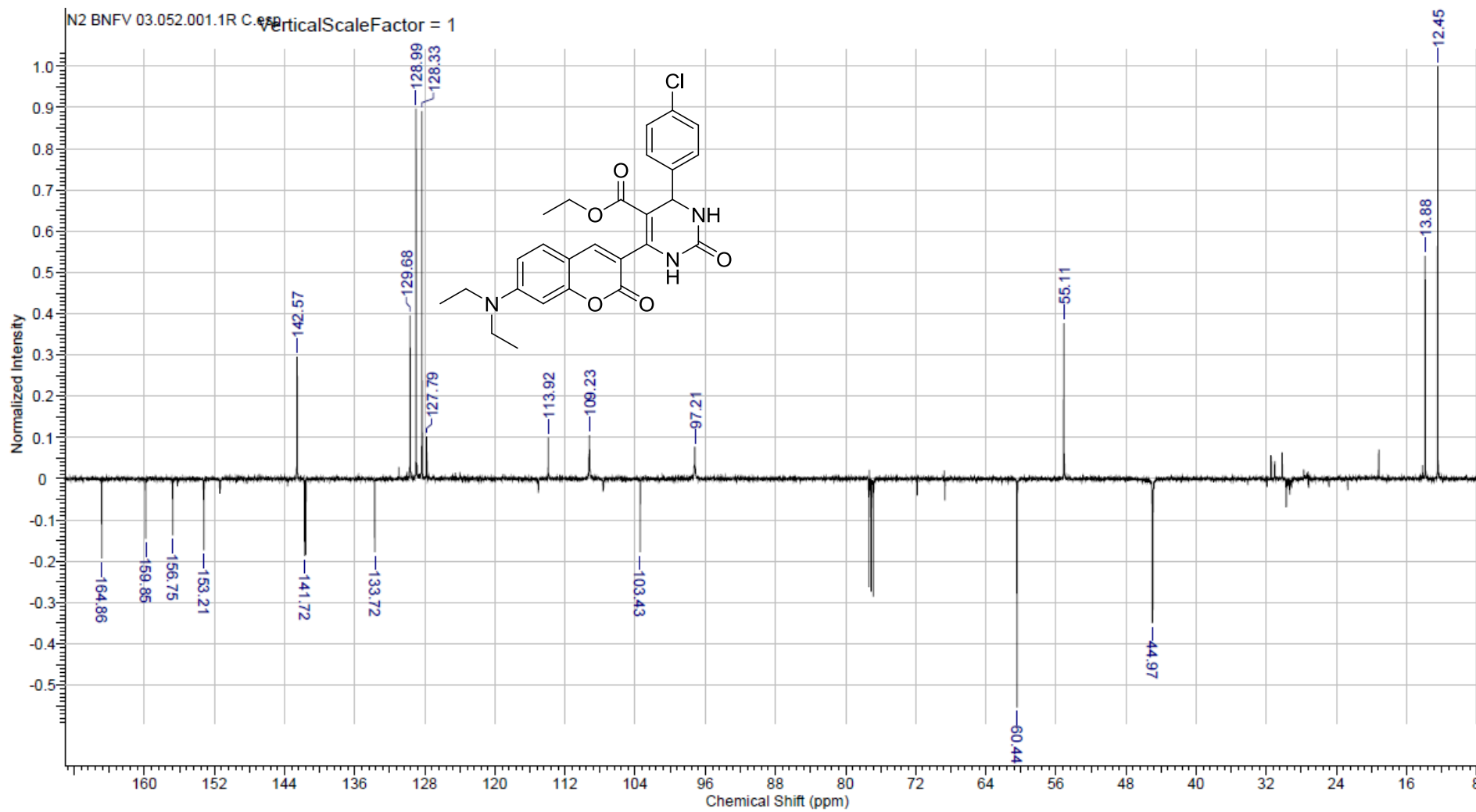


Fig. S74 Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN (125 MHz) de **106r** em  $\text{CDCl}_3$ .

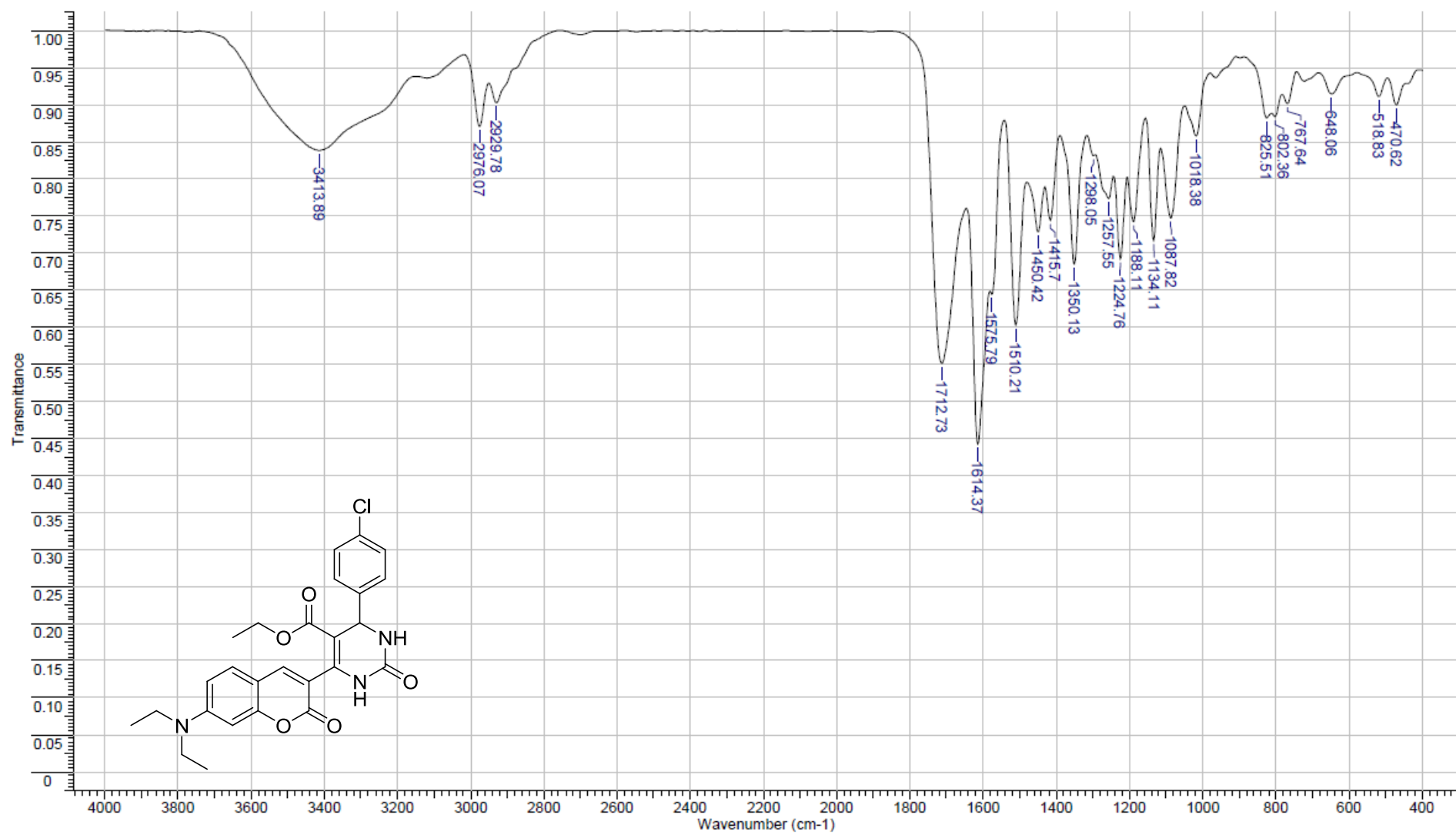
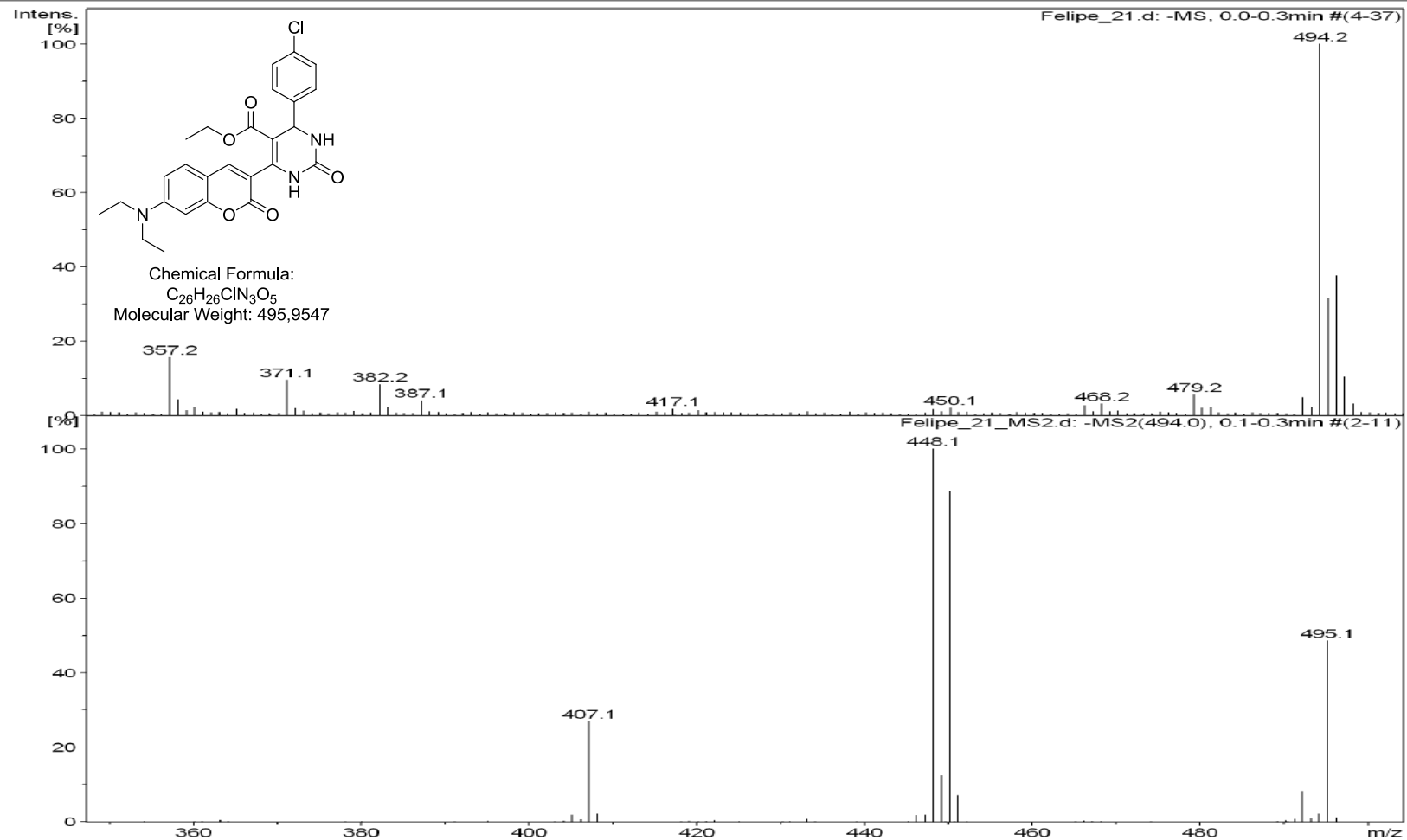


Fig. S75 Espectro de IV em pastilha de KBr de **106r**.



**Acquisition Parameter**

Ion Source Type	ESI	Ion Polarity	Negative	Alternating Ion Polarity	off
Mass Range Mode	Enhanced	Scan Begin	100 m/z	Scan End	700 m/z
Capillary Exit	Resolution	n/a	n/a	Trap Drive	68.9
Accumulation Time	74854 $\mu$ s	Averages	5 Spectra	Auto MS/MS	off

Fig. S76 Espectro de ESI de **106r**.

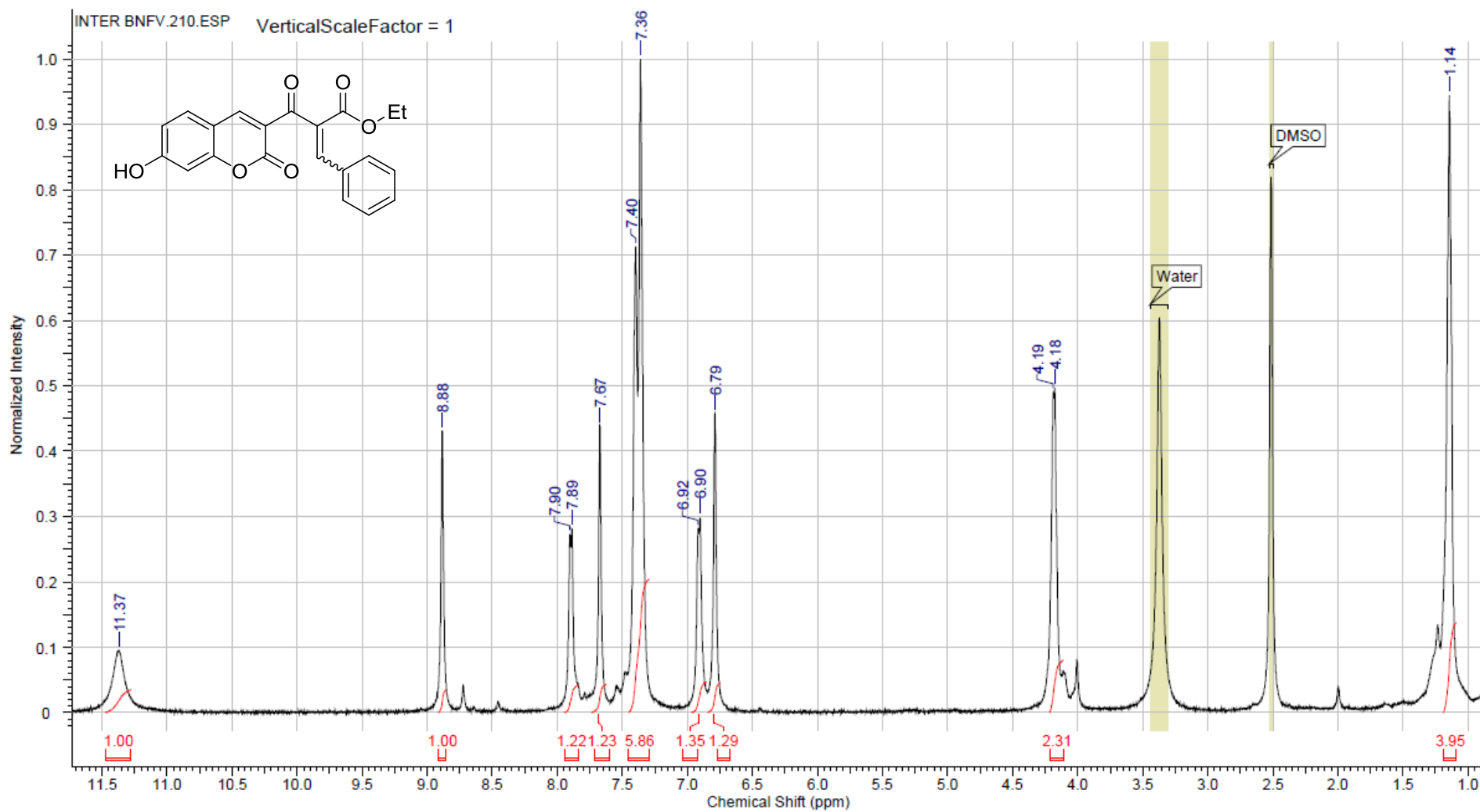


Fig. S77 Espectro de  $^1\text{H}$  RMN (500 MHz) de **121** em  $\text{DMSO-}d_6$ .

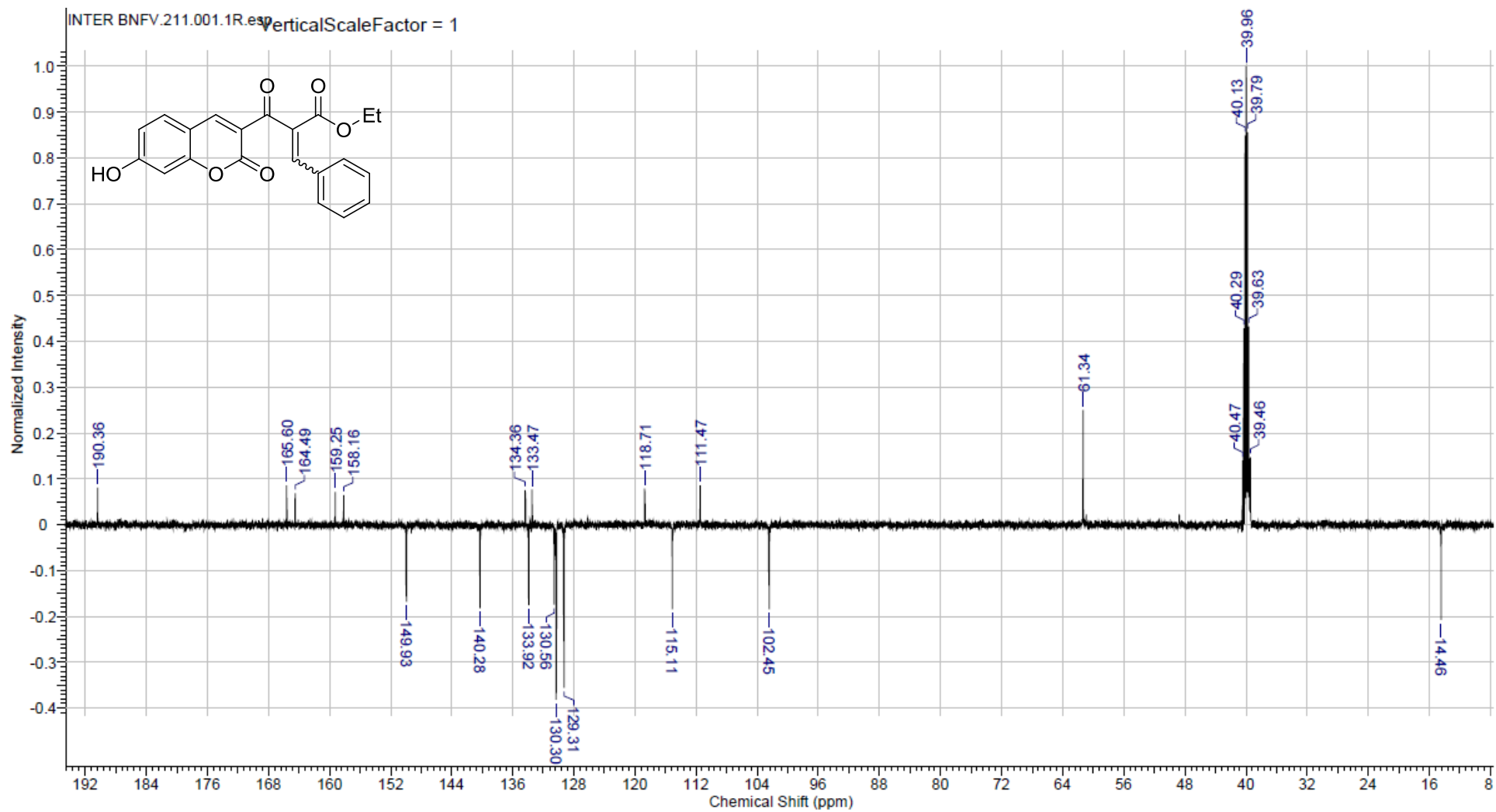


Fig. S78 Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN (125 MHz) de **121** em DMSO- $d_6$ .

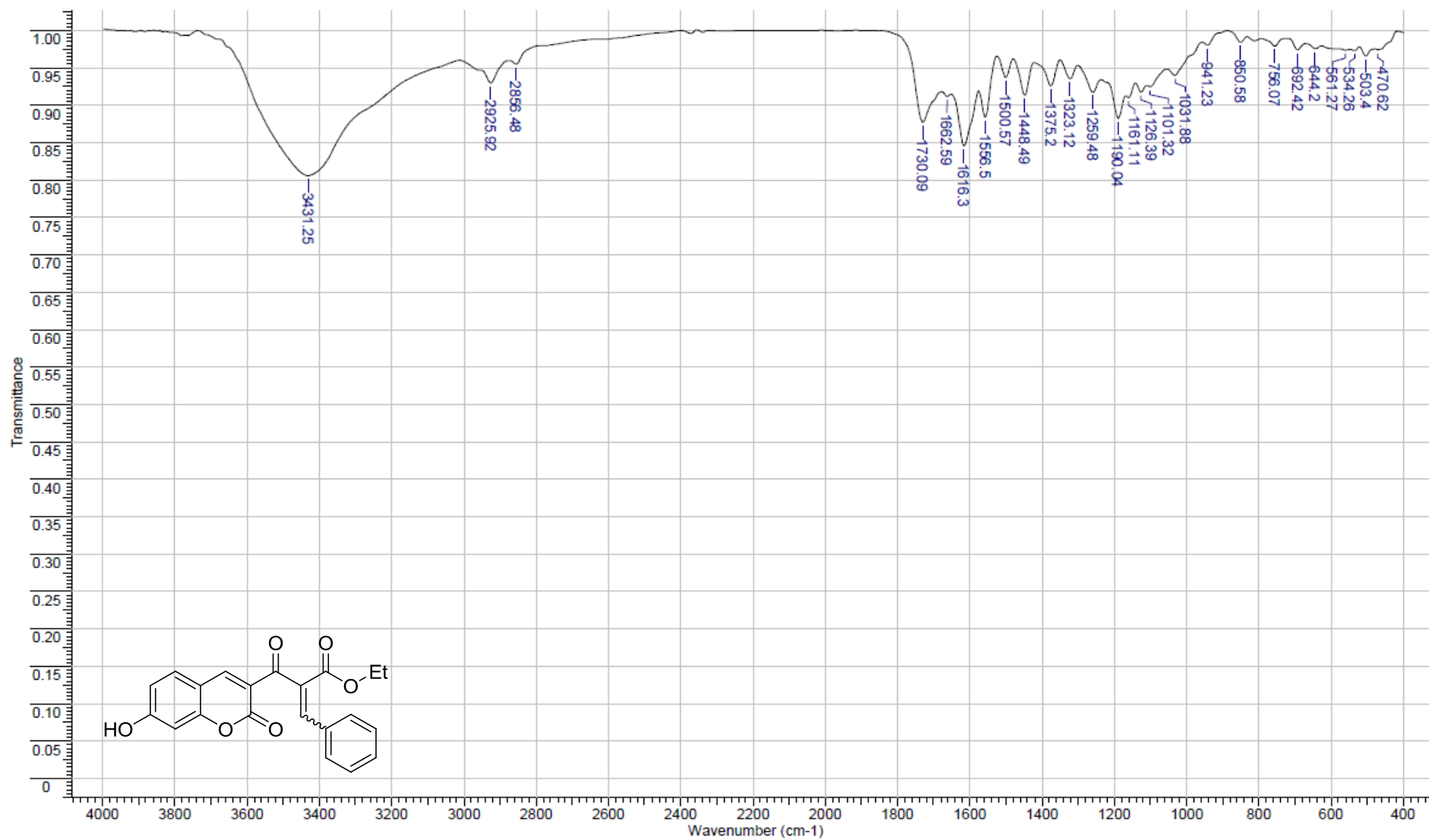


Fig. S79 Espectro de IV em pastilha de KBr de **121**.

**Acquisition Parameter**

Ion Source Type	ESI	Ion Polarity	Negative	Alternating Ion Polarity	off
Mass Range Mode	Enhanced	Scan Begin	100 m/z	Scan End	700 m/z
Capillary Exit	Resolution	n/a	n/a	Trap Drive	68.9
Accumulation Time	602 $\mu$ s	Averages	5 Spectra	Auto MS/MS	off

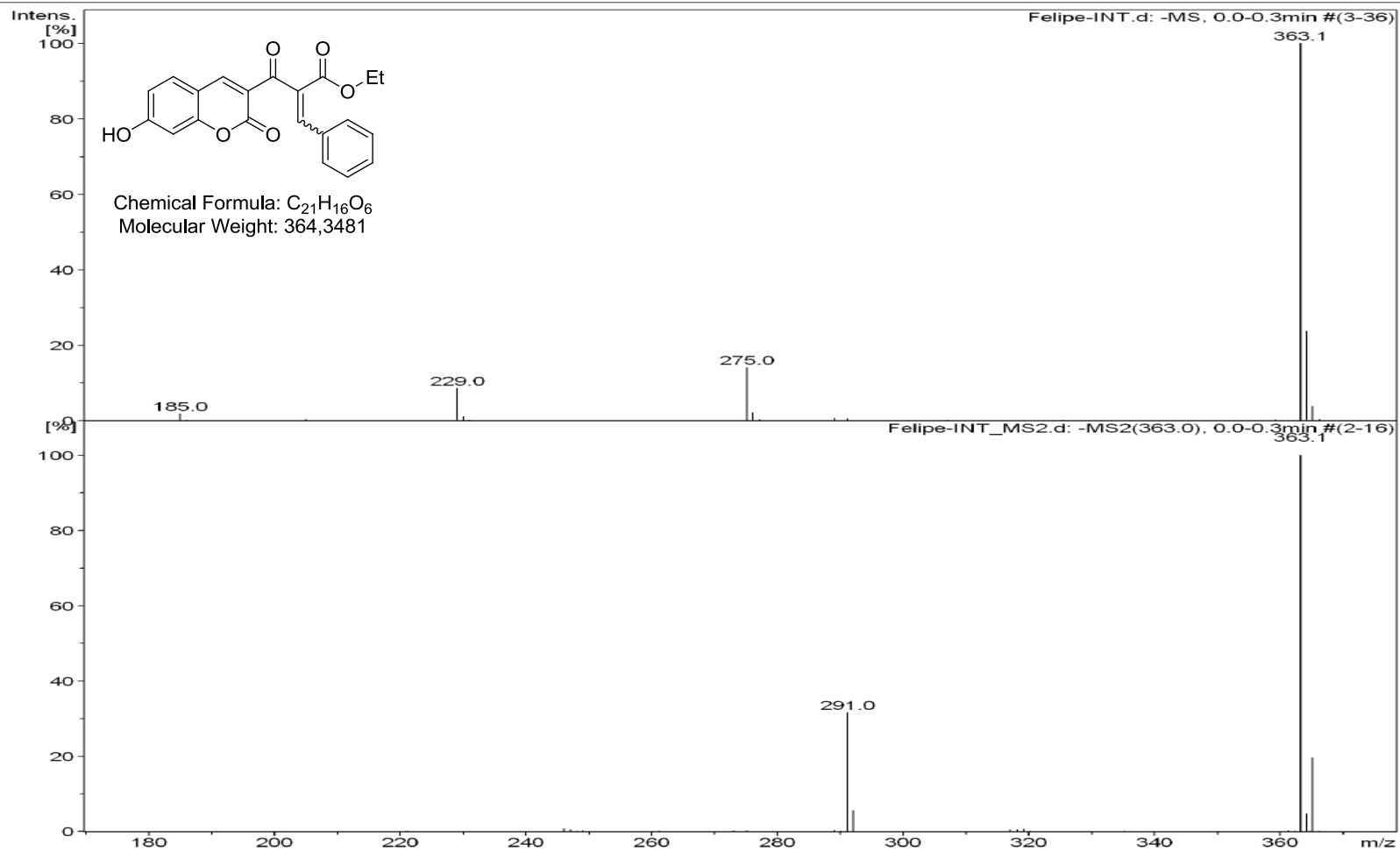


Fig. S80 Espectro de ESI de 121.



NJC

PAPER

[View Article Online](#)  
[View Journal](#) | [View Issue](#)



Cite this: *New J. Chem.*, 2015,  
39, 2323

## Synthesis and mechanism of novel fluorescent coumarin–dihydropyrimidinone dyads obtained by the Biginelli multicomponent reaction†

Felipe Vitória,<sup>ab</sup> Thiago Moreira Pereira,<sup>a</sup> Rosane Nora Castro,<sup>b</sup>  
Guilherme Pereira Guedes,<sup>b</sup> Cedric Stephan Graebin<sup>ab</sup> and  
Arthur Eugen Kümmerte<sup>\*ab</sup>

Received (in Montpellier, France)  
26th November 2014,  
Accepted 15th January 2015

DOI: 10.1039/c4nj02155j

[www.rsc.org/njc](http://www.rsc.org/njc)

The optimization of a Biginelli Multicomponent Reaction (MCR) protocol for obtaining a collection of 3,4-dihydropyrimidin-2(1*H*)-one/thione, with UV absorption and blue fluorescent properties, from synthetic coumarin beta-ketoester derivatives is described. This is the first report of Biginelli adducts bearing a coumarin nucleus in the  $\beta$ -ketoester moiety and their MCR mechanism seems to pass through a Knoevenagel intermediate, which was considered as unlikely before. A chemical library was obtained and the dihydropyrimidin-2(1*H*)-one nucleus formation confirmed by X-ray diffraction. Photophysical analyses of representative compounds in different solvents show good Stokes shifts in water that are associated to a postulated ICT process and  $pK_a$  determination make these compounds a good start point for new chemical and biological probes as well as useful pH indicators.