

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA

JOÃO EDUARDO ARANALDE LAVARDA

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA SÍNTESE DE HÍBRIDOS
PURINA-DIFENILUREIA VISANDO A APLICAÇÃO NA
TERAPIA-ALVO CONTRA O CÂNCER**

Porto Alegre
2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA

JOÃO EDUARDO ARANALDE LAVARDA

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA SÍNTESE DE HÍBRIDOS
PURINA-DIFENILUREIA VISANDO A APLICAÇÃO NA
TERAPIA-ALVO CONTRA O CÂNCER**

Trabalho de conclusão de curso apresentado junto à atividade de ensino “Trabalho de Conclusão de Curso – QUI” do Curso de Química, como requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel em Química.

Prof. Dr. João Paulo Bizarro Lopes
Orientador

Porto Alegre
2022

JOÃO EDUARDO ARANALDE LAVARDA

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA SÍNTESE DE HÍBRIDOS
PURINA-DIFENILUREIA VISANDO A APLICAÇÃO NA
TERAPIA-ALVO CONTRA O CÂNCER**

Trabalho de Conclusão de Curso

Aprovado pela banca examinadora em 05 de setembro de 2022

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. João Paulo Lopes
Orientador

Profª. Drª. Eliana Weber de Menezes
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profª. Drª. Leandra Franciscato Campo
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

CIP - Catalogação na Publicação

Lavarda, João Eduardo
DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA SÍNTESE DE
HÍBRIDOS PURINA-DIFENILUREIA VISANDO A APLICAÇÃO NA
TERAPIA ALVO CONTRA O CÂNCER / João Eduardo Lavarda.
-- 2022.
46 f.
Orientador: João Paulo Lopes.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto
de Química, Bacharelado em Química, Porto Alegre,
BR-RS, 2022.

1. Síntese Orgânica. 2. Química Orgânica. 3.
Química. I. Lopes, João Paulo, orient. II. Título.

Agradecimentos

Dedico esse espaço para agradecer aos meus pais Felipe e Luciana por sempre terem me apoiado durante a graduação. Aos meus tios e avós, que embora morem longe nunca deixaram de se fazer presentes e ser uma grande parte da minha vida. À minha namorada Isabella, por ter me acompanhado durante toda graduação e ser a melhor companhia para todos os momentos. Às minhas cachorrinhas, Ceci e Tuba, que ficaram ao meu lado durante toda escrita desse trabalho.

Ao meu professor orientador João Paulo, que me acolheu em seu grupo como o primeiro aluno e marcou minha transição para química orgânica. Aos colegas do laboratório K-216, sem os quais muito aprendizado não seria possível. Ao meu colega de laboratório Francisco que trabalhou diretamente comigo e nunca mediu esforços para ajudar. Agradeço também à empresa Kley Hertz, onde realizei estágio no último ano, e aos meus supervisores e colegas. Foi um período de muito crescimento profissional.

Aos meus amigos desde a infância Francisco, Rafael e Lucas por compartilharmos momentos incríveis juntos. Aos meus amigos e colegas da faculdade Clara, Laura, Duda, Pedro, Ana, Alex, Rodrigo, e todos que marcaram minha passagem pela graduação e sem os quais esse momento demoraria muito mais para chegar.

RESUMO

Sabe-se que o câncer é a segunda enfermidade com maior fatalidade do mundo. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estimou em 19 milhões o número de novos casos no ano de 2020, com índice de mortalidade de 51%. De outro lado, grande parte dos tratamentos farmacológicos utilizados são de ação citotóxica, ou seja, não possuem especificidade para células cancerosas e acabam afetando também o desenvolvimento de células saudáveis que possuem alta taxa de duplicação. Logo, torna-se extremamente necessário o estudo dos mecanismos que levam à proliferação de células tumorais para que o desenvolvimento de fármacos seja mais assertivo e o tratamento menos agressivo ao paciente. Tal modelo de descoberta de novas drogas é conhecido como terapia-alvo e tem crescido desde 2001, quando o órgão americano *Food and Drug Administration* (FDA) aprovou o primeiro fármaco de ação específica para câncer chamado Imatinibe. Esse medicamento inibe a proliferação descontrolada de células tumorais em pacientes portadores do cromossomo Filadélfia (gene BCR-ABL), uma mutação genética associada à leucemia mielóide crônica, e abriu caminho para a aprovação de fármacos visando outros alvos, como o receptor do fator de crescimento vascular endotelial (VEGFR) e as quinases dependentes de ciclinas (CDKs), abordados neste trabalho. O primeiro está envolvido na angiogênese tumoral e o segundo é responsável pela regulação do ciclo celular e sua superexpressão é um dos fatores causais do câncer de mama. Devido ao desenvolvimento de resistência às medicações existentes no mercado, novas gerações de moléculas ativas estão em constante estudo. Portanto, através de revisão bibliográfica e entendimento do mecanismo de ação dos fármacos, esse trabalho se propõe ao desenvolvimento de metodologia para síntese de um novo híbrido purina-difenilureia em três etapas, sendo 1) obtenção de uma *N*-fenilureia contendo um grupo amino livre ligado ao anel aromático; 2) cloração da hipoxantina; e 3) substituição nucleofílica aromática com os compostos obtidos anteriormente. Estes compostos baseiam-se na combinação da atividade de inibição de quinases inerente ao núcleo purina com a atividade de inibição da angiogênese tumoral, utilizando como plataforma o núcleo difenilureia, presente no fármaco Sorafenibe.

Palavras-chave: Câncer; Receptor do fator de crescimento endotelial; Quinases dependentes de ciclinas; Superexpressão; Híbridos; Purina-difenilureia.

ABSTRACT

It is known that cancer is the second most fatal illness in the world, according to the World Health Organization (WHO), which stipulated 19 million new cases in the year 2020 with a 51% mortality rate. Moreover, a large part of the drug treatments are cytotoxic once they do not have specificity to cancer cells, thus affecting the development of healthy cells with high duplication rates. Therefore, the study of the cancer cells proliferation mechanism becomes extremely necessary to help the drug discovery process be more assertive and the treatment less aggressive to the patient. This model of drug discovery is called targeted therapy. In 2001, the United States agency Food and Drug Administration (FDA) approved the first targeted therapy drug to treat cancer, Imatinib. It was found that this drug could inhibit the proliferation of cancer cells associated with chronic myeloid leukemia, in patients with positive Philadelphia chromosome (gene BCR-ABL). This drug paved the way for the approval of a variety of drugs directed to other biological targets responsible for the development of cancer, such as the vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR) and the cyclin-dependent kinases (CDKs), both studied in this work. The first one is involved in tumoral angiogenesis and the second is responsible for cell cycle control, and its superexpression is one of the causes of breast cancer. Due to the development of resistance to the existing medications, new generations of molecules are in constant study. Hence, through literature review and understanding of the kinase inhibitors pathways, this work proposes the development of a synthetic methodology for new purine-diphenylurea hybrids in three steps: 1) synthesis of a *N*-phenylurea containing a free amino group attached to the aromatic ring; 2) hypoxanthine chlorination; 3) nucleophilic aromatic substitution with the previously obtained molecules. These compounds intend to combine the kinase inhibitory activity inherent to the purine scaffold with the tumoral angiogenesis suppression given by the diphenylurea moiety, which is present in the already approved drug Sorafenib.

Keywords: Cancer; Vascular endothelial growth factor receptor; Cyclin-dependent kinases; Super expression; Hybrids; Purine-diphenylurea.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fármacos aprovados para inibição de quinases.	12
Figura 2 - Estruturas miméticas de ATP. Os números em parênteses se referem à quantidade de fármacos aprovados que contêm a estrutura nitrogenada	13
Figura 3 - Híbridos purina-difenilureia	14
Figura 4 - Fases do ciclo celular.....	15
Figura 5 - CDK2 (azul) acoplada à ciclina A (verde) com o ATP (rosa).....	16
Figura 6 – Estrutura de inibidores CDK2 e interação da C73 no sítio ativo da CDK2 com respectivos valores de IC50. Linhas pontilhadas representam interações de hidrogênio entre resíduos de aminoácidos da proteína e C73... ..	17
Figura 7 - Derivados purínicos em estudos clínicos	18
Figura 8 – Representação do VEGFR-2 ativado por um mensageiro externo (VEGF em rosa)	18
Figure 9 - Angiogênese e metástase	19
Figura 10 - Modo de ligação do sorafenibe A e lenvatinibe B com o VEGFR-2	20
Figura 11 – A) Drug-likeness B) Propriedades físico-químicas do híbrido purina-difenilureia	21
Figura 12 - Anel purínico	27
Figura 13 - Derivados naturais da purina	27
Figura 14 - Espectro de RMN de ¹ H (DMSO-d6) da difenilureia obtida.	33
Figura 15 - Espectro de RMN de ¹ H (DMSO-d6) da N-fenilureia obtida.	35
Figura 16 - Espectro de RMN ¹ H (DMSO d6) da 1-(3-aminofenil) -3-fenilureia. 37	
Figura 17 - Subproduto esperado pela reação de 1 equivalente de fenilenodiamina com 2 equivalentes de fenilsocianato.	37
Figura 18 - Plaquinha de CCD para a síntese descrita acima. Fase móvel A = Acetato de etila: Hexano (7:3); B = Acetato de etila: Hexano (6:4); C = Acetato de etila: Hexano (1:1).	38
Figura 19 - Espectro RMN ¹ H (DMSOd6) da 1-(3-aminofenil) -3-fenilureia	39
Figura 20 - Espectro de RMN ¹³ C APT (DMSO d6) da 1-(3-aminofenil) -3-fenilureia.....	40

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 - Síntese de ureias assimétricas catalisada por Pd.....	22
Esquema 2 - Mecanismo proposto	22
Esquema 3 - Rearranjo de Curtius para composto carbonilado com grupo de saída (GS).....	23
Esquema 4 - Síntese de difenilureias por rearranjo de curtius	23
Esquema 5 - (a) Proposta de síntese das fenil e difenilureias; (b) Redução do grupo nitro.	24
Esquema 6 - Ciclo catalítico proposto com L-prolina.....	25
Esquema 7 - Síntese de difenilureias a partir de isocianatos orgânicos. A espécie nucleofílica (12) pode ser obtida diretamente por utilização de uma diamina como material de partida ou pela adição de nitrofenil isocianato e posterior redução do $R_2=NO_2$ à $R_2=NH_2$	25
Esquema 8 - Híbridos de ressonância do fenilisocianato.	26
Esquema 9 - Cloração da hipoxantina.....	27
Esquema 10 - Cloração da hipoxantina com BTC/SOCl ₂	28
Esquema 11 - Mecanismo para síntese do híbrido	29
Esquema 12 - Tentativa de obtenção da N-fenilureia nas condições de Nagarkar e Telvekar.....	32
Esquema 13 - Obtenção da N-fenilureia nas condições de Tiwari e colaboradores.....	34
Esquema 14 - Decomposição do isocianato em água.....	34
Esquema 15 - Mecanismo da reação de adição em clorofórmio.....	36

LISTA DE ABREVIATURAS

FDA - *Food and Drug Administration*

ATP – *Adenosine triphosphate* (trifosfato de adenosina)

ADP – *Adenosine diphosphate* (difosfato de adenosina)

CDK – *Cyclin dependent kinase* (quinase dependente de ciclina)

HIV - Vírus da imunodeficiência humana

IC₅₀ - Concentração necessária para inibição de 50% da atividade enzimática presente no ensaio

VEGFR – *Vascular endothelial growth factor receptor* (receptor do fator de crescimento endotelial)

VEGF - *Vascular endothelial growth factor* (fator de crescimento endotelial)

LogP - Coeficiente de partição octanol/água

HBA – *Hydrogen bond acceptor* (aceptor de ligação de hidrogênio)

HBD – *Hydrogen bond donor* (doador de ligação de hidrogênio)

TMSN₃ - Azidotrimetilsilano

DMA - Dimetilaniolina

DMAP – Dimetilaminopiridina

BTC – *Bis(trichloromethyl)carbonate* (trifosgênio)

CCD - Cromatografia em camada delgada

RMN - Ressonância Magnética Nuclear

APT – *Attached proton test*

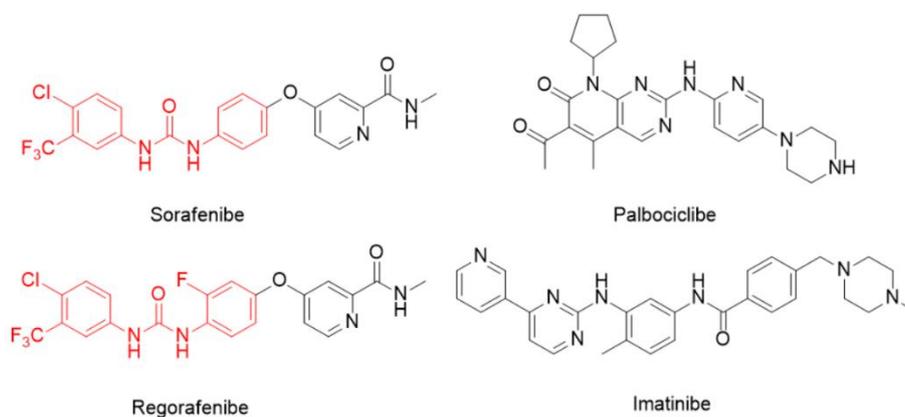
Sumário

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1 Quinases dependentes de ciclinas	14
2.2 Receptor do fator de crescimento vascular endotelial.....	18
2.3 Predição da drogabilidade	20
2.4 Metodologias de síntese.....	21
2.4.1 Difenilureias assimétricas	21
2.4.2 6-Cloro-9 <i>H</i> -purina	26
2.4.3 Híbrido Purina-Difenilureia	29
3. OBJETIVOS	31
3.1 Objetivo Geral	31
3.2 Objetivos Específicos	31
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4.1 Transamidação catalisada por L-prolina	32
4.2 Síntese de <i>N</i> -fenilureia com isocianato inorgânico	33
4.3 Síntese de 1,3-difenilureias não simétricas com isocianato orgânico	35
4.4 Síntese da 6-cloro-9 <i>H</i> -purina.....	40
5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	42
6 PARTE EXPERIMENTAL	43
6.1 Síntese da <i>N</i> -fenilureia	43
6.2 Síntese da 1,3-difenilureia	44
6.3 Síntese da 1-(3-aminofenil)-3-fenilureia.....	44
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

1 INTRODUÇÃO

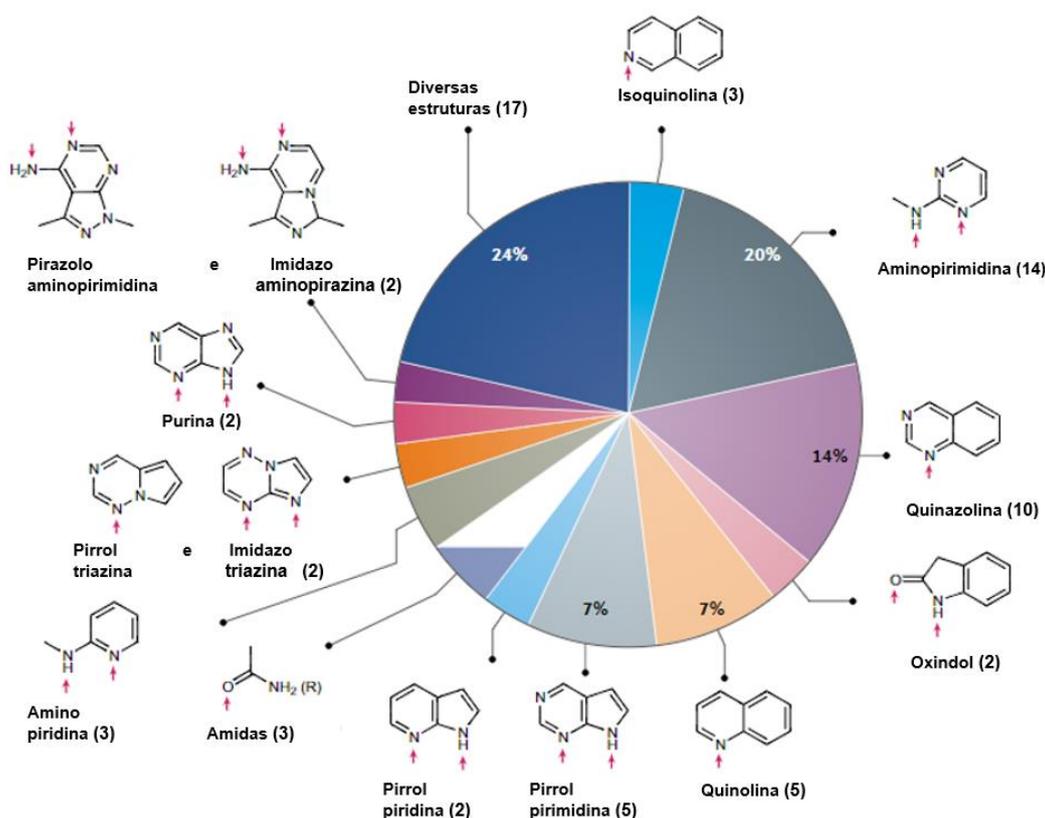
A partir de 2001, com a aprovação e o lançamento no mercado do Imatinibe (Figura 1), a leucemia mielóide crônica, antes considerada como uma condição altamente fatal, passou a ser controlada pela ingestão periódica do medicamento.¹ A eficácia do tratamento com Imatinibe chamou a atenção para o desenvolvimento de moléculas pequenas que pudessem ter atividade em outros tipos de câncer. A partir de constantes descobertas dos diferentes caminhos biológicos responsáveis pela evolução da doença, possibilita-se a construção de moléculas que visam interagir somente com a proteína associada ao crescimento do tumor, minimizando efeitos colaterais pela interação indevida com células saudáveis. Esta abordagem de tratamento denomina-se terapia-alvo. Atualmente, essa estratégia é amplamente utilizada em tratamentos de câncer de mama (Palbociclibe – *Pfizer*[®] (Figura 1)), pacientes com tumores sólidos na tireoide (Sorafenibe – *Bayer*[®] (Figura 1)), entre outros.² Até o ano de 2022, 73 moléculas inibidoras de quinases já foram aprovadas pelo FDA para uso comercial.³ Através de estudos guiados pelo desenvolvimento da química computacional e pela tecnologia de modelagem molecular, a qual permite simular as interações entre molécula e proteína, pesquisadores conseguiram identificar quais porções de uma molécula são essenciais para a interação com determinados tipos de enzimas quinases específicas.

Figura 1 – Fármacos aprovados para inibição de quinases.



Desses estudos, destacam-se os compostos heterocíclicos nitrogenados (Figura 2) – miméticos do ATP – como a purina, que está presente em dois medicamentos aprovados e possui conhecida seletividade para inibição de CDKs frente outras enzimas quinases.³ Outro importante grupo funcional na química orgânica, conhecido por sua atividade farmacofórica não só no combate ao câncer, mas também ao HIV e doenças bacterianas, são os derivados de ureia.⁴ Compostos contendo o núcleo difenilureia possuem atividade inibitória do domínio quinase do receptor VEGFR-2, promotor da angiogênese tumoral e já são comercializados para o tratamento de certos tipos de câncer, tais como os fármacos Sorafenibe e o Regorafenibe, mostrados na Figura 1.

Figura 2 - Estruturas miméticas de ATP. Os números em parênteses se referem à quantidade de fármacos aprovados que contêm a estrutura nitrogenada

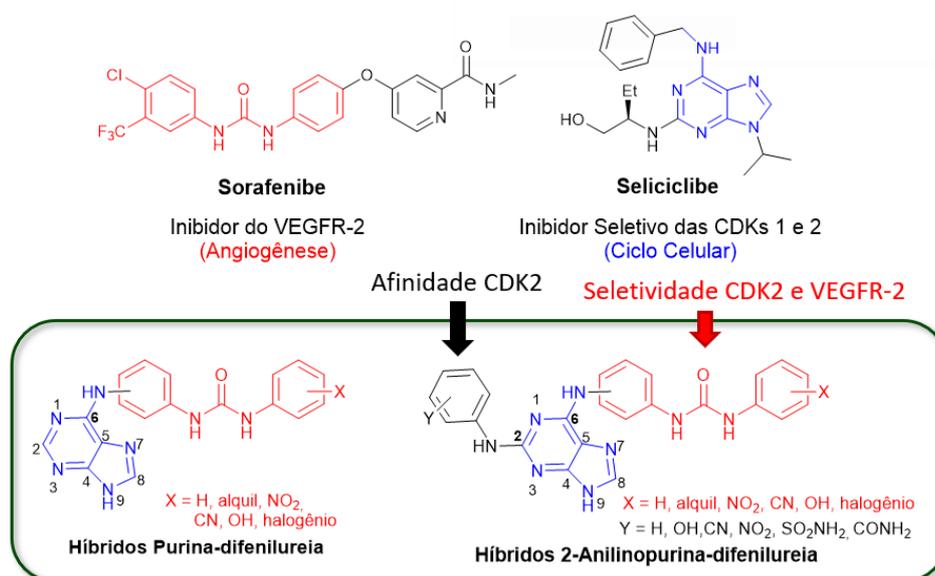


Fonte: Adaptado da referência [3]

Sabendo da atividade inibitória de quinases dos núcleos purina e difenilureia e suas atuações como farmacóforos para o controle do ciclo celular e da angiogênese, respectivamente, em células tumorais com auxílio da

predição da drogabilidade *in silico*, este projeto propõe o desenvolvimento de metodologia de síntese para híbridos inéditos purina-difenilureia. Essa proposta de híbrido multialvo - visa inibir mais de uma proteína com caminhos biológicos diferentes - pretende regular o avanço do ciclo celular, através de inibição de CDKs, e a angiogênese tumoral, inibindo o receptor VEGFR-2 (Figura 3). Como estratégia sintética serão estudadas as reações de transamidação a partir de anilinas e ureia, bem como metodologias alternativas utilizando isocianato de potássio e isocianato de fenila. Já o núcleo purina pretende-se obter a partir do produto natural hipoxantina.

Figura 3 - Híbridos purina-difenilureia



2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

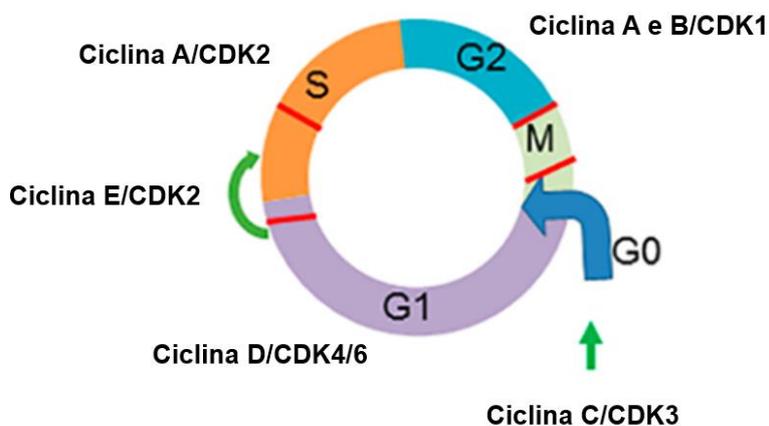
2.1 Quinases dependentes de ciclinas

As proteínas quinases dependentes de ciclinasⁱ são extremamente importantes no processo de multiplicação celular, o qual pode ser dividido em duas fases: mitose e interfase (Figura 4). Para que haja efetivamente a duplicação celular na mitose, diversos mecanismos de crescimento celular são ativados durante a interfase, a qual pode ser dividida em três subfases. Portanto,

ⁱ Proteína responsável pela ativação das CDKs.

a preparação para a mitose inicia-se através da duplicação de organelas promovida pela subfase G_1 , conhecida também como Gap 1, ou intervalo 1. Uma vez concluída com sucesso, a próxima subetapa chama-se *S* – *synthesis* – dentro da qual o material genético é duplicado. Uma vez que o organismo identifica que não houve defeito na duplicação do DNA, passa-se para a última etapa da interfase, chamada G_2 , ou intervalo 2, na qual há o agregamento dos microtúbulos que serão utilizados na mitose para separação genética e crescimento da célula.⁵

Figura 4 - Fases do ciclo celular.



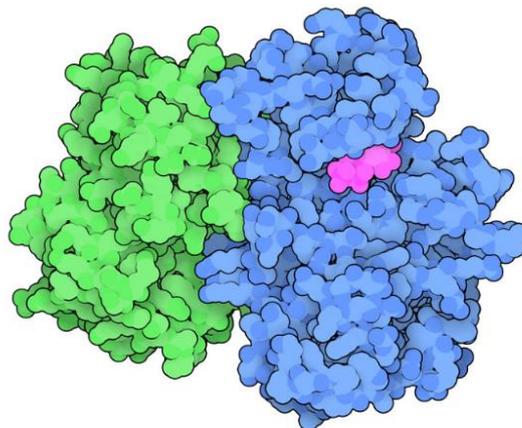
Fonte: Adaptado da referência [5]

A progressão do ciclo celular é coordenado pelas CDKs, uma vez que estas são responsáveis pela entrega de sinais para que o mesmo continue ou seja interrompido, agindo como *checkpoints*. Para tanto, nosso organismo sintetiza uma proteína denominada ciclina, que por sua vez se liga à uma enzima CDK, ativando-a para sinalização celular (Figura 5). A enzima quinase, agora na sua conformação ativa, hidrolisa uma molécula de ATP à ADP e transfere o grupo fosfato à outra proteína, ativando-a para a transdução de sinal.⁶ Resume-se, portanto, o papel das quinases pela fosforilação de proteínas que agem no controle de diversos mecanismos celulares, como duplicação, apoptose, síntese proteica, entre outros.

Na subfase G_1 , o complexo CDK2-ciclina E e CDK4/6-ciclina D fazem a varredura para identificar problemas no crescimento celular; já em S, CDK2-ciclina A certificam a replicação do DNA. Uma vez adentrada na subfase G_2 ,

CDK1 com ciclinas B e A realizam o último *checkpoint* antes da mitose. Além disso, em G₀, fase dita estacionária, antes da célula entrar em G₁, outro complexo CDK3-ciclina C está de mediador.

Figura 5 - CDK2 (azul) acoplada à ciclina A (verde) com o ATP (rosa).

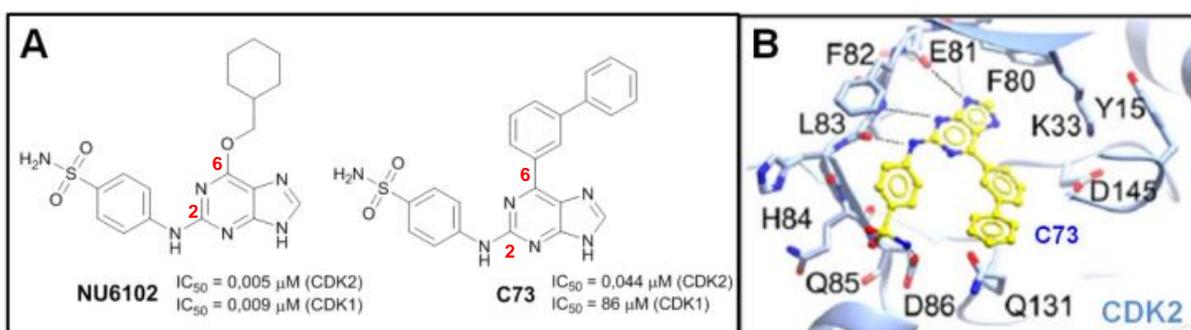


Fonte: GOODSELL, David. **Cyclin and Cyclin-dependent Kinase**. Disponível em: <https://pdb101.rcsb.org/motm/236>. Acesso em: 10 set. 2022.

Em doenças como o câncer, onde a multiplicação celular ocorre de forma desenfreada, a produção de ciclinas está muito acima do normal e, por consequência, proteínas quinases iniciam o processo de fosforilação descontroladamente. A partir dessa observação, tornou-se possível o desenvolvimento de fármacos que visam regular a transdução do sinal de forma seletiva em células cancerosas através da mimetização do ATP. Essas moléculas pequenas contêm heterociclos nitrogenados que possuem a capacidade de interagir com o sítio de ligação da adenina com as CDKs (Figura 6), inibindo a ligação do ATP, e portanto a sinalização para crescimento e divisão celular.⁷ Percebe-se que a molécula C73 realiza três ligações de hidrogênio dentro do domínio catalítico da CDK2, com o aminoácido Glu81 (oxigênio da carbonila e NH da amida) e com Leu83 (oxigênio carbonílico). Ainda, o substituinte sulfonamida na posição 2 no anel purínico encontra-se na parte interna do sítio ativo, realizando interações de hidrogênio adicionais com o aminoácido Asp86. Já o substituinte na posição 6 da purina acomoda-se no bolso hidrofóbico rico em glicina da quinase. Sendo assim, através de estudos de

cristalografia e inibição *in vitro* de CDKs, *Coxon et al* elucidaram a importância de grupos volumosos substituídos na posição 6 do anel purínico, para maior seletividade de CDK2 frente outras CDKs, e na posição 2, para maior potência pelas interações de hidrogênio adicionais.

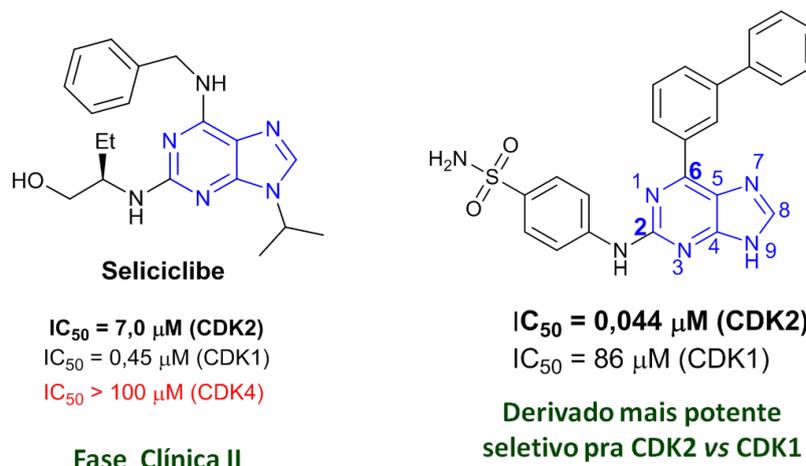
Figura 6 – Estrutura de inibidores CDK2 e interação da C73 no sítio ativo da CDK2 com respectivos valores de IC₅₀. Linhas pontilhadas representam interações de hidrogênio entre resíduos de aminoácidos da proteína e C73.



Fonte: Adaptado da referência [7]

A primeira e segunda geração de moléculas representadas pelo Roscovitine® (Seliciclib) e Dinaciclib, entre outros, se mostraram pouco efetivos nos tratamentos de pacientes com tumores sólidos e desencadearam efeitos colaterais indesejados durante estudos clínicos de fase II. Sendo assim, grande parte das moléculas não avançaram além desta etapa.⁸

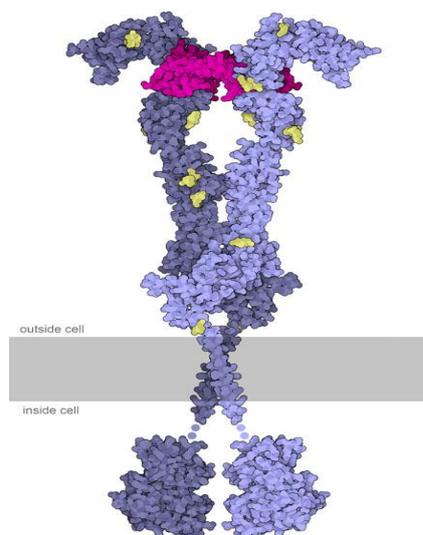
Dessa forma, continuou-se o desenvolvimento de novos fármacos que possuam maior atividade e seletividade, evidenciada pelo Palbociclib, já aprovado pelo FDA, direcionado para CDK4/6. Além disso, diversas moléculas estão em estudos clínicos para CDK2, como o derivado purínico C73 (Figura 6A), exibindo valores de IC₅₀ de 44 nM. Nesse caso, observou-se que a substituição nas posições **6** e **2** do núcleo purina são importantes para seletividade pró CDK2, Figura 7.

Figura 7 - Derivados purínicos em estudos clínicosCoxon, C. R. *et al.*, *J. Med. Chem.* **2017**, *60*, 1746

2.2 Receptor do fator de crescimento vascular endotelial

O receptor do fator de crescimento vascular endotelial é uma proteína transmembrana com um domínio catalítico interno quinase (Figura 8) responsável por sinalizar a angiogênese, ou seja, quando ativado sinaliza o crescimento de novos vasos sanguíneos.⁹

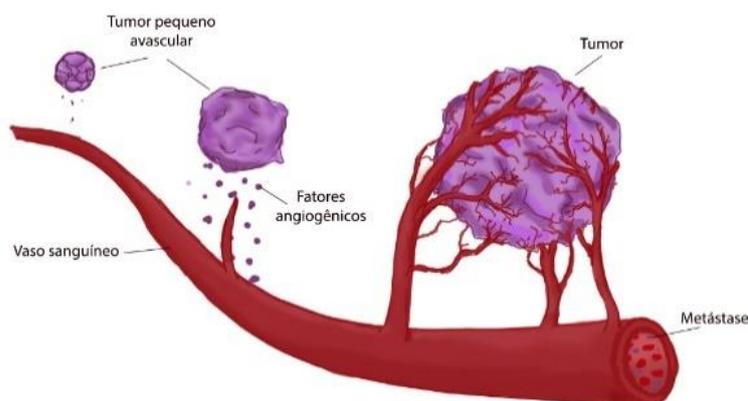
Figura 8 – Representação do VEGFR-2 (azul) ativado por um mensageiro externo (VEGF em rosa)



Fonte: CARTAGENA, Ethan; GELASHVILI, Mariam; KEYES, Jasmine; ROSENZWEIG, Elizabeth; GOODSELL, David S.; BURLEY, Stephen K.. **Vascular Endothelial Growth Factor (VegF) and Angiogenesis**. Disponível em: <https://pdb101.rcsb.org/motm/267>. Acesso em: 10 set. 2022

Células tumorais, assim como as saudáveis, possuem a capacidade de sintetizar o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), responsável pela ativação desses receptores. Portanto, no intuito de obter um maior suporte de nutrientes e oxigênio, células tumorais aumentam a produção de VEGF, os quais ativam os receptores transmembrana, dimerizando-os. Uma vez na sua conformação ativa, VEGFRs iniciam a transmissão de mensagens para a célula através de uma cascata de fosforilações, coordenada pelo domínio quinase.¹⁰ Sendo assim, o tumor passa a ser irrigado por novos vasos sanguíneos (Figura 9) e ganha suprimentos necessários para crescer e até mesmo entrar em metástase – quando as células cancerosas se infiltram na corrente sanguínea e se instalam em outros locais.

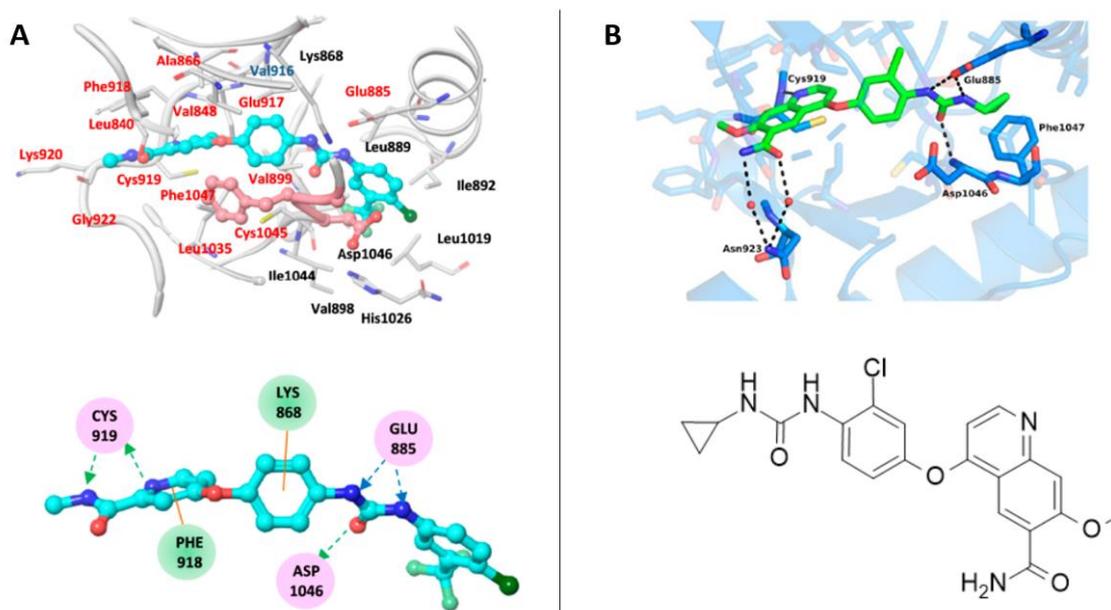
Figura 9 - Angiogênese e metástase



Fonte: FERON, Matheus Rizzatti. **Angiogênese**. Disponível em: <https://archive.org/details/angio2>. Acesso em: 11 set. 2022

Em 2005, com a aprovação do primeiro fármaco com especificidade para inibição do subtipo VEGFR-2, o Sorafenibe, identificou-se que o núcleo difenilureia é um dos responsáveis pela efetividade da molécula (Figura 10A), devido às interações de hidrogênio com os resíduos Glu885 (glutamato) e Asp1046 (aspartato).¹¹ Outro derivado de ureia, desenvolvido pela Eisai® e aprovado em 2015 pelo FDA, o lenvatanibe é uma nova geração de inibidor VEGFR-2, utilizado no tratamento de pacientes com câncer de tireóide em metástase e apresenta valores de IC₅₀ nanomolar (Figura 10B).¹²

Figura 10 - Modo de ligação do Sorafenibe (A) e Lenvatinibe (B) com o VEGFR-2



Fonte: A) Adaptado da referência [11] B) Adaptado da referência [12]

2.3 Predição da drogabilidade

Para fármacos que se pretende a administração via oral, existe um conjunto de parâmetros que pode auxiliar na predição de sua eficácia. Uma vez que esse tipo de administração de medicamentos não é 100% biodisponívelⁱⁱ(como no caso de drogas intravenosas), eles devem passar por fenômenos de absorção e distribuição pelo organismo. Em sua pesquisa, Lipinsky determinou um conjunto de regras que são comuns para quase 90% dos medicamentos aprovados na época, sendo estas: 1) massa molar menor do que 500 g/mol; 2) não mais do que 10 sítios aceptores de ligação de hidrogênio; 3) não mais que 5 sítios doadores de ligação de hidrogênio; 4) $\log P$ ⁱⁱⁱ menor que 5.¹³

Existem ferramentas online gratuitas que utilizam cálculos teóricos para realizar uma predição da drogabilidade. No caso do site *Molispiration*[®], foi implementado um sistema Bayesiano estatístico que compara a molécula a ser testada com centenas de outras já comercializadas, no intuito de encontrar um denominador comum, levando em conta fatores como tamanho, superfície polar, estabilidade metabólica, entre outros. Na Figura 11, observa-se que o híbrido

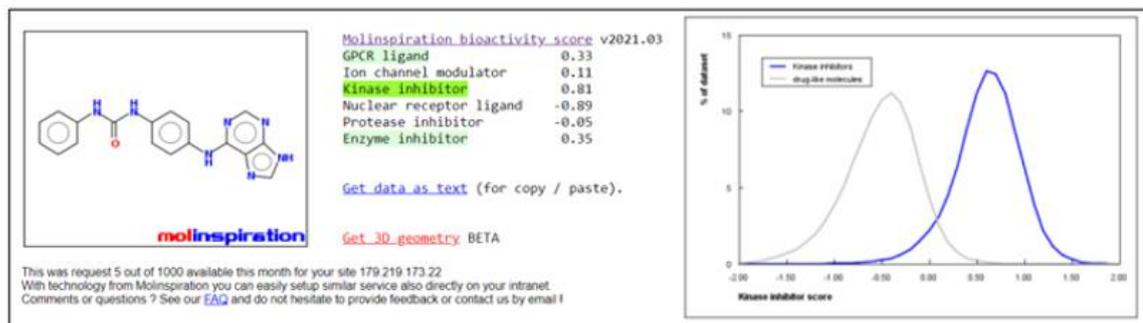
ⁱⁱ Concentração e velocidade que um princípio ativo de medicamento adentra o sistema circulatório

ⁱⁱⁱ Coeficiente de partição octanol/água

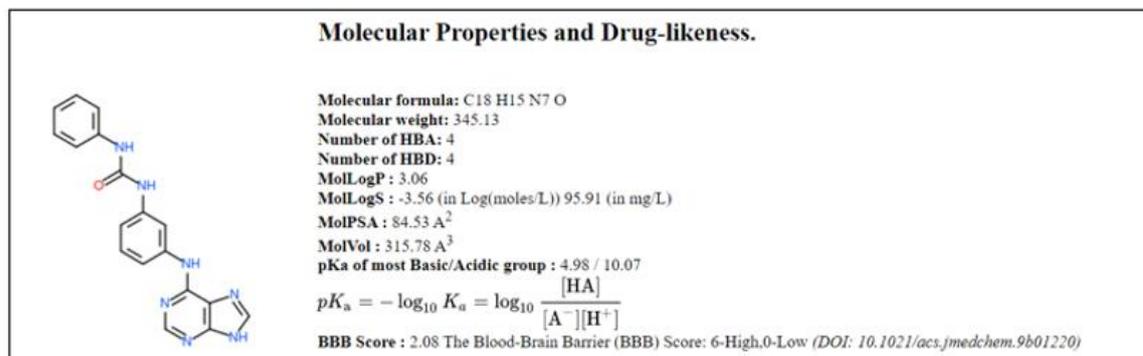
purina-diufenilureia não viola nenhuma das regras de Lipinsky e tem potencial para inibição de quinases.

Figura 11 – A) Drogabilidade do híbrido purina-difenilureia B) Propriedades físico-químicas do híbrido purina-difenilureia

A



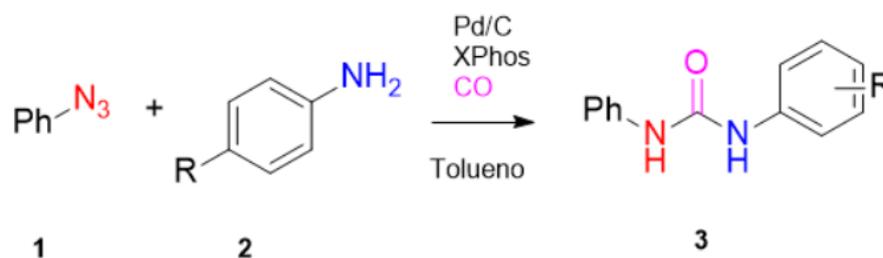
B



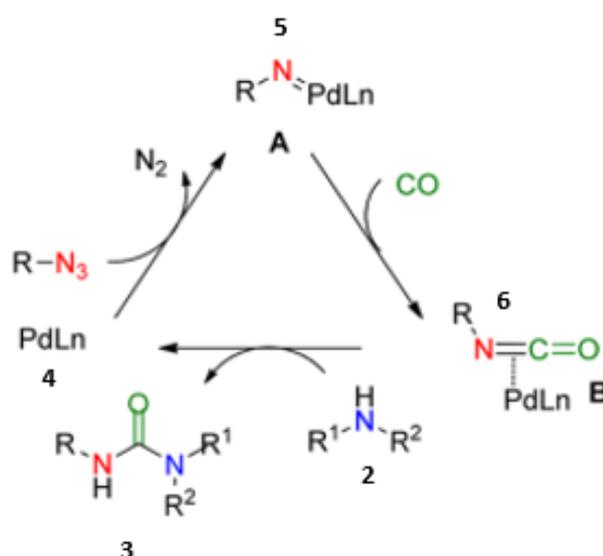
2.4 Metodologias de síntese

2.4.1 Difenilureias assimétricas

Isocianatos desempenham um importante papel na síntese de ureias substituídas. Isso se deve à eletrofilicidade do carbono central, ligado ao nitrogênio e oxigênio, que sofre ataque nucleofílico de aminas e anilinas. Em 2016, Zhao e colaboradores publicaram uma metodologia para a síntese de derivados de ureias (**3**) a partir de azidas (**1**) e anilinas (**2**) empregando paládio sobre carbono (Pd/C) como catalizador e geração *in situ* do isocianato (Esquema 1).¹⁴

Esquema 1 - Síntese de ureias assimétricas catalisada por Pd

O mecanismo proposto envolve a dissociação do paládio e a solubilização no meio para catálise homogênea (Esquema 2). A espécie $\text{Pd}(\text{XPhos})^{\text{IV}}$ (**4**) coordena a azida com liberação de nitrogênio gasoso. Devido à ausência de reagentes carbonilados, foi introduzido com balão com atmosfera de monóxido de carbono, o qual se insere na espécie paládio-nitreno (**5**) gerando um isocianato (**6**). Por fim, a anilina ataca o carbono eletrofílico para formação do produto desejado (**3**) e ocorre a regeneração do catalisador. Um estudo de eficiência do catalisador mostrou que o paládio pode ser reutilizado em até cinco ciclos sem quedas significantes de rendimento, uma vez que este é recuperado por redeposição sobre o carbono.

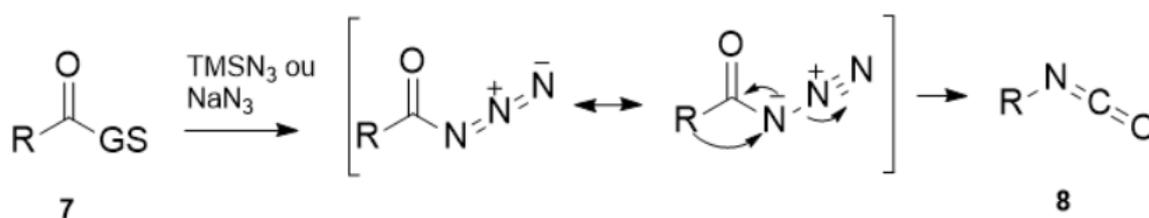
Esquema 2 - Mecanismo proposto

Fonte: Adaptado da referência [14]

^{iv} Ligante de fosfina comumente utilizado em catálise com metais de transição.

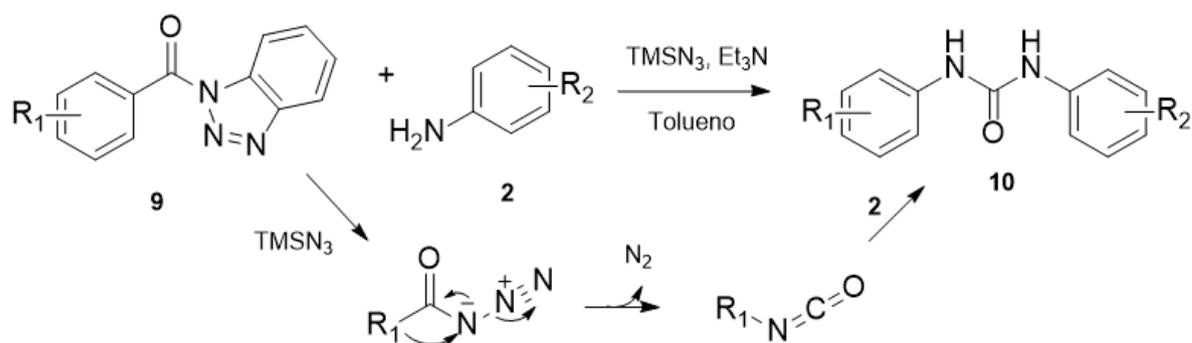
Alternativamente, no esforço de eliminar o uso de metais de transição, pesquisadores desenvolveram outro método para síntese de ureias assimétricas a partir da formação *in situ* de isocianato pelo rearranjo de Curtius (Esquema 3). Sob aquecimento, a azida se decompõe em nitrogênio gasoso para formação do respectivo isocianato (**8**). De maneira análoga, o isocianato é atacado por uma espécie nucleofílica amino para resultar em derivados de ureia.

Esquema 3 - Rearranjo de Curtius para composto carbonilado com grupo de saída (GS).



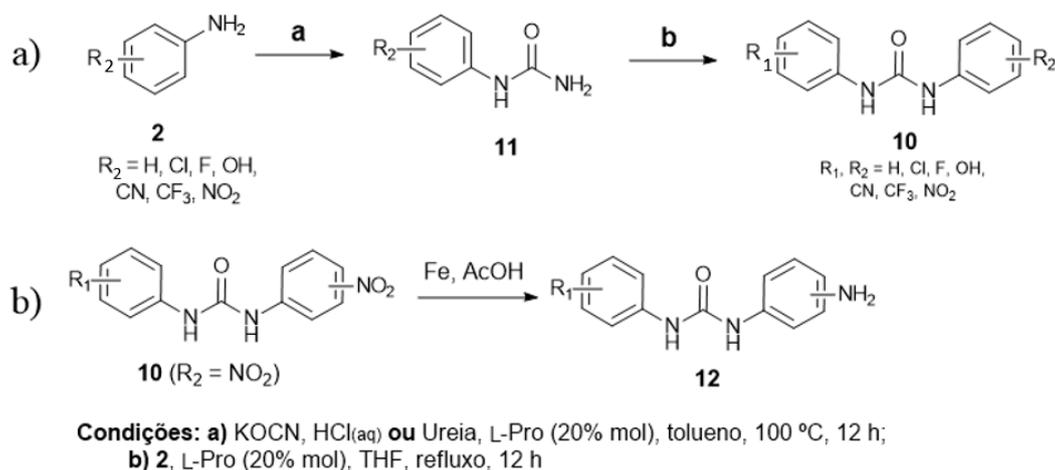
Em outro artigo publicado, Singh e colaboradores partiram de *N*-acilbenzotriazóis (**9**), os quais possuem um bom grupo de saída e são suscetíveis ao ataque nucleofílico de uma azida, nesse caso azidotrimetilsilano (TMSN_3) para formação de acilazida e posterior isocianato pelo rearranjo de Curtius (Esquema 4).¹⁵ Através do ataque de anilinas (**2**), obtém-se difenilureias assimétricas. Além de altos rendimentos e tempos curtos de reação, cerca de uma hora, grande parte das difenilureias sintetizadas não necessitaram de purificação por cromatografia em coluna.

Esquema 4 - Síntese de difenilureias por rearranjo de Curtius

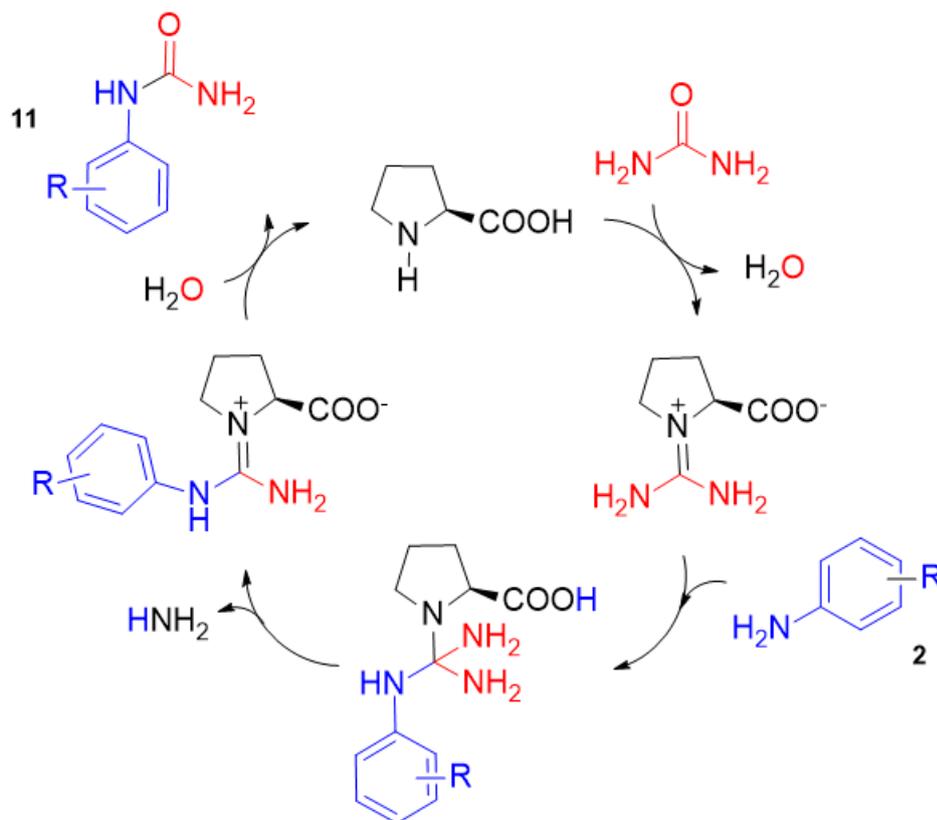


Em 2017 Nagarkar *et al* desenvolveram uma metodologia para síntese de ureias não simétricas a partir de reagentes mais acessíveis, ureia e anilinas (**2**), Esquema 5, empregando apenas L-prolina como catalisador. O uso de excesso de ureia deve conduzir à formação de *N*-fenilureias (**11**), intermediários para a obtenção de difenilureias não simétricas (**10**), Esquema 5a.¹⁶ Partindo-se de nitroanilinas (**2**, R₁ = NO₂), formam-se difenilureias contendo o grupo nitro em um dos dois anéis aromáticos (**10**, R₁ = NO₂). O grupo nitro pode então ser reduzido, formando os intermediários de interesse deste trabalho, as anilino-fenilureias (**12**) (Esquema 5b).

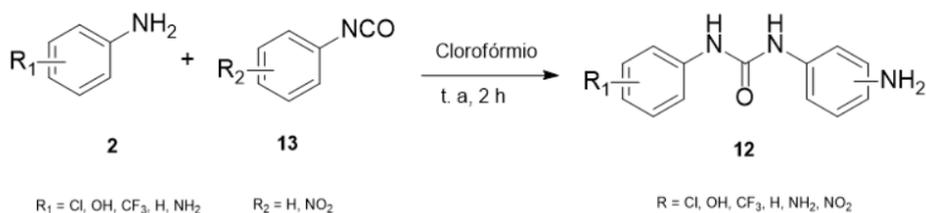
Esquema 5 - (a) Proposta de síntese das fenil e difenilureias; (b) Redução do grupo nitro.



No mecanismo proposto (Esquema 6), a ureia reage com a L-prolina para formação do íon imínio. Este sofrerá ataque nucleofílico da anilina (**2**) e posterior eliminação de amônia para restabelecimento do íon. Por final, a hidrólise do imínio leva à formação do produto desejado (**11**) e regeneração do catalisador.

Esquema 6 - Ciclo catalítico proposto com L-prolina

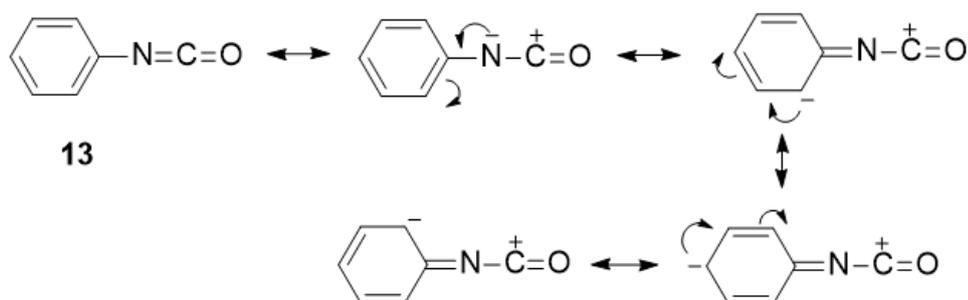
Outra importante abordagem para síntese de ureias assimétricas envolve o uso de isocianatos orgânicos e inorgânicos como material de partida.¹⁷⁻¹⁸ Como citado no Esquema 5(a), o sal isocianato de potássio na presença de anilina e em meio ácido resulta na formação da *N*-fenilureia (11). Sendo assim, a reação entre anilinas e isocianatos orgânicos, como fenilisocianato, pode conduzir à formação de difenilureias assimétricas em apenas uma etapa (Esquema 7).¹⁸

Esquema 7 - Síntese de difenilureias a partir de isocianatos orgânicos.

A espécie nucleofílica (12) pode ser obtida diretamente por utilização de uma diamina como material de partida ou pela adição de nitrofenil isocianato e

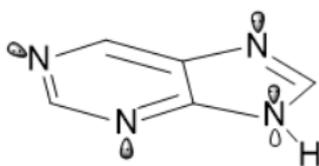
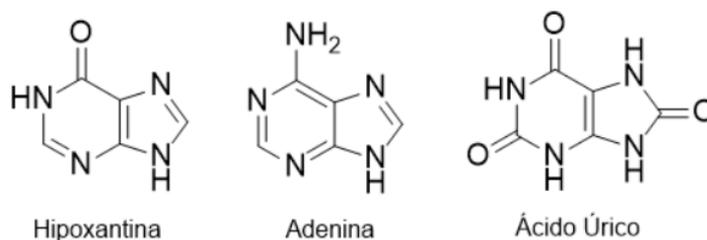
posterior redução do $R_2=NO_2$ à $R_2=NH_2$. A reação procede por um mecanismo de adição nucleofílica, iniciado pelo ataque nucleofílico do par de elétrons livres do nitrogênio da anilina ao carbono eletrofílico do isocianato. A alta reatividade do fenilisocianato não se explica somente pelo efeito indutivo sofrido pelo carbono pelos átomos vizinhos mais eletronegativos, mas também pela ressonância. O anel aromático, retirador de densidade eletrônica, permite a estabilização da carga negativa em híbridos de ressonância zwitteriônicos, conforme Esquema 8. Dessa forma, o carbono fica ainda mais eletrofílico, carregado positivamente.

Esquema 8 - Híbridos de ressonância do fenilisocianato.

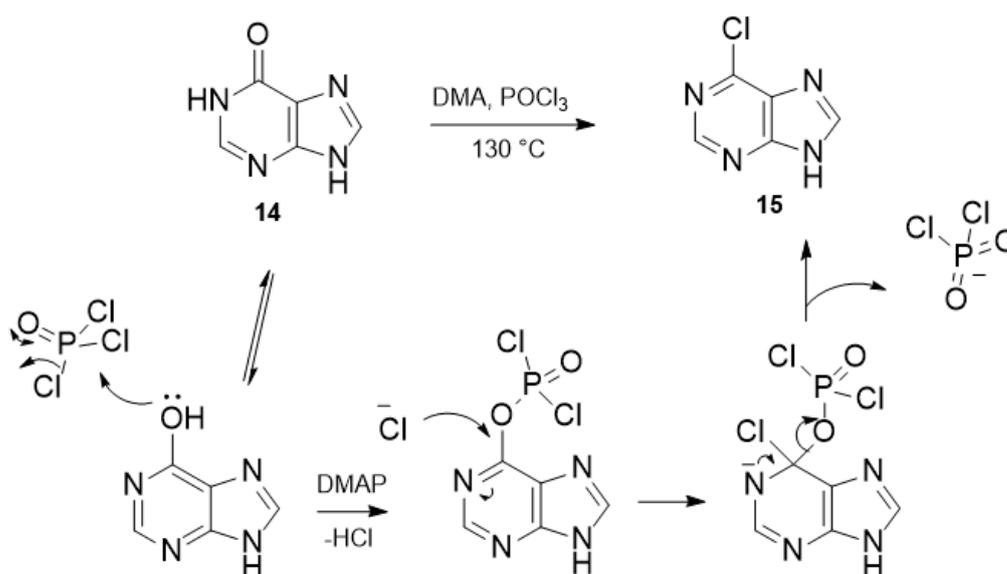


2.4.2 6-Cloro-9H-purina

A purina é constituída por dois anéis aromáticos heterocíclicos fundidos, imidazol e pirimidina - com três sítios básicos aceptores de ligação de hidrogênio pelo par de elétrons livre fora do plano do anel e um nitrogênio doador de ligação de hidrogênio com elétrons conjugados com o sistema π aromático, (Figura 12). Seus derivados são de importante valor biológico, uma vez que ocorrem naturalmente. A adenina – constituinte dos ácidos nucleicos -, o ácido úrico e a própria hipoxantina são exemplos de derivados purínicos (Figura 13).

Figura 12 - Anel purínico.**Figura 13** - Derivados naturais da purina.

A 6-Cloro-9*H*-purina (**15**) pode ser obtida pela reação de cloração da hipoxantina (**14**) com excesso de POCl_3 , conforme descrito por OIengiski e colaboradores, em elevadas temperaturas ($130\text{ }^\circ\text{C}$) e na presença de uma base não nucleofílica, como dimetilanimilina (DMA) ou dimetilaminopiridina (DMAP) devido à formação de ácido clorídrico pelo ataque do oxigênio ao fósforo (Esquema 9).¹⁹

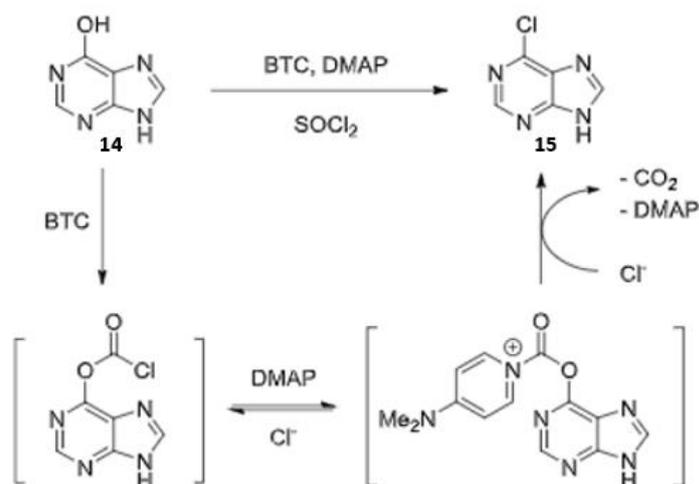
Esquema 9 - Cloração da hipoxantina

Fonte: Adaptado da referência [19]

De acordo com o mecanismo, o tautomerismo cetó-enólico permite o ataque do par de elétrons livre do oxigênio hibridizado sp^3 ao fósforo, facilitando a eliminação de íon cloreto. Na sequência, o cloreto ataca a posição 6 do anel purínico, promovendo uma substituição nucleofílica aromática com eliminação do íon diclorofosfato, o qual é um ótimo grupo de saída pela deslocalização da carga negativa entre os dois oxigênios.

Além do uso de $POCl_3$, recentemente Wang e colegas desenvolveram uma metodologia nova para a cloração de heterociclos nitrogenados sem uso de reagentes fosforados, na presença de trifosgênio (BTC) e cloreto de tionila ($SOCl_2$), com rendimento de 90%, Esquema 10.²⁰ A presença de trifosgênio se mostrou necessária para conversões altas, uma vez que o rendimento cai para 15% na presença de apenas cloreto de tionila. Esse método se torna vantajoso também pela aplicação em síntese *one-pot*. Os autores afirmam que o cloreto de tionila pode ser evaporado após a reação de cloração para posterior adição direta do nucleófilo ao meio reacional, eliminando a necessidade de se isolar o produto da cloração.

Esquema 10 - Cloração da hipoxantina com BTC/ $SOCl_2$

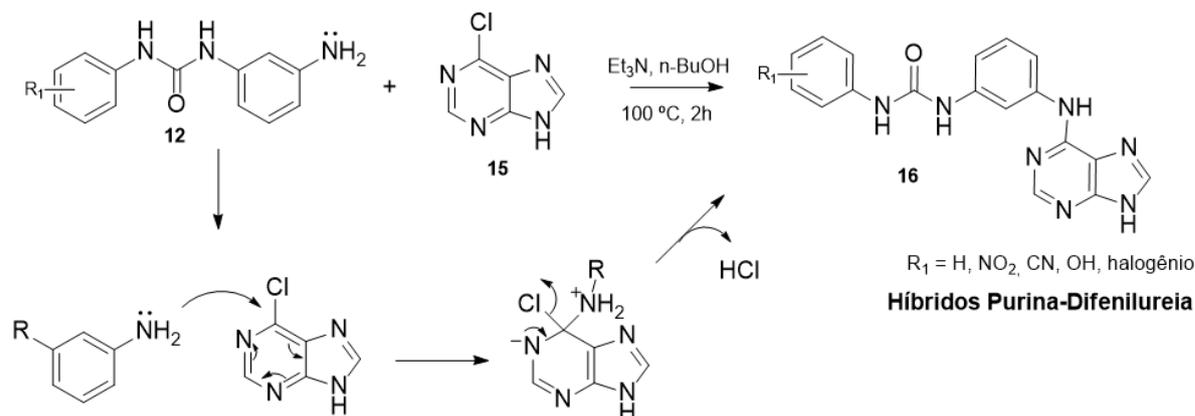


Fonte: Adaptado da referência [20].

2.4.3 Híbrido Purina-Difenilureia

Após a obtenção das espécies nucleofílicas (**12**), pretende-se promover a substituição nucleofílica aromática na 6-cloro-9*H*-purina (**15**), Esquema 8. Esse mecanismo não segue a lógica de outras substituições conhecidas, como SN_1 e SN_2 , pois a formação de cátion arila não é estável e o carbono a ser atacado não é sp^3 . Portanto, segue-se com um mecanismo de adição seguida de eliminação (Esquema 11), sendo que na primeira etapa há o ataque do nucleófilo e a quebra de aromaticidade (etapa lenta e determinante) e na segunda etapa há a eliminação do grupo de saída, nesse caso o cloro. Para que a reação aconteça, portanto, deve-se fornecer condições termodinamicamente favoráveis – altas temperaturas – e o anel aromático necessita de substituintes retiradores de carga por efeito mesomérico para estabilização da carga negativa causada pelo rompimento da aromaticidade. Comumente, utiliza-se grupos NO_2 para esse efeito, porém, nesse caso, os nitrogênios do heterociclo também atuam como estabilizadores da carga. Após o ataque nucleofílico, rapidamente restabelece-se a aromaticidade com a expulsão do grupo de saída, o cloro.

Esquema 11 - Mecanismo para síntese do híbrido



Fonte: Adaptado da referência [21]

Em 2008, Oumata e colaboradores realizaram a aminação da 2,6-dicloro-9*H*-purina com anilinas e aminas. Após aquecimento a 100 °C por 2 horas na presença de trietilamina e utilizando *n*-butanol como solvente, os autores obtiveram seletivamente 6-amino- e 6-anilino-purinas em bons rendimentos (45-

77%).²¹ Posteriormente, Vincetti *et al* reportaram a mesma reação em 10 minutos com rendimentos de até 80% pelo auxílio de irradiação de microondas.²² Pretende-se estudar essas condições para obtenção dos híbridos derivados de purina (**16**).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Neste trabalho, propõe-se desenvolvimento de uma metodologia para a síntese de híbridos purina-difenilureia a partir do produto natural hipoxantina. Espera-se, através desse, combinar atividade inibitória da angiogênese tumoral com a do ciclo celular.

3.2 Objetivos Específicos

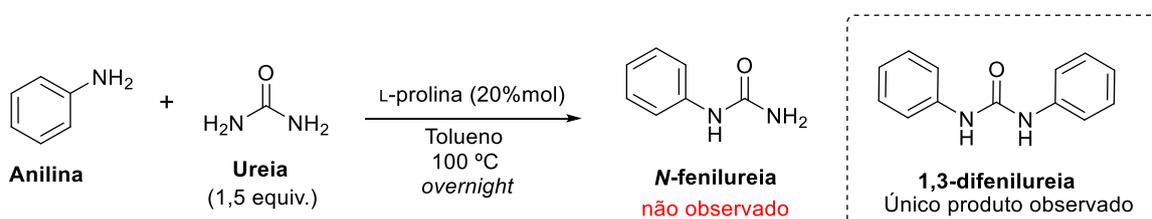
- (i) Revisão bibliográfica de moléculas pequenas com atividade inibitória de proteínas quinases associadas à proliferação de células tumorais e seu modo de ação;
- (ii) Síntese, caracterização e purificação de difenilureias através de diferentes métodos descritos na literatura;
- (iii) Síntese e purificação da 6-Cloro-9*H*-purina utilizando POCl₃ como agente clorante;
- (iv) Revisão de métodos para síntese de híbridos anilino-purina para obtenção de molécula inédita para inibição da angiogênese tumoral e ciclo celular.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Transaminação catalisada por L-prolina

De acordo com o procedimento elaborado por Nagarkar e Telvekar¹⁶, a síntese de difenilureias não simétricas é realizada em duas etapas (Esquema 12), sendo que primeiramente deve-se sintetizar *N*-fenilureias utilizando o aminoácido L-prolina como catalisador. No entanto, encontrou-se dificuldade em solubilizar a ureia em tolueno, solvente que os autores afirmam ser o ideal para a reação e formação do produto. Na única ocasião em que se observou a completa dissolução da ureia, antes da adição de anilina, o produto obtido, após purificação por cromatografia em coluna, foi a 1,3-difenilureia. O ponto de fusão de 240 °C condiz com o esperado pela literatura e o RMN de ¹H evidencia a formação da difenilureia (Figura 14)

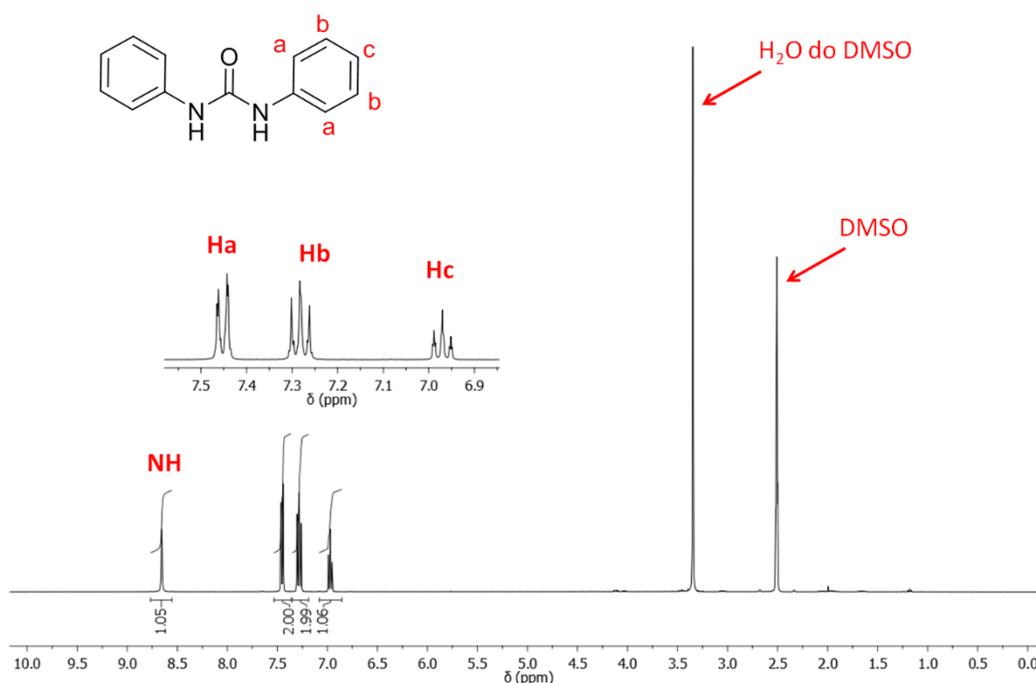
Esquema 12 - Tentativa de obtenção da *N*-fenilureia nas condições de Nagarkar e Telvekar.



Conforme o espectro de RMN de ¹H (Figura 14), em 8,7 ppm está evidenciado o singlete do hidrogênio ligado ao nitrogênio (H-N). Uma vez que a molécula é simétrica, o mesmo sinal equivale para ambos N-H ligados à carbonila, resultando em um valor de integração igual à 1. Na região entre 6,9 ppm e 7,4 ppm observa-se os hidrogênios aromáticos. O dubleto de dubletos em 7,4 ppm pode ser atribuído aos hidrogênios orto em relação ao grupo ureia (Ha). Embora seja esperado que esses hidrogênios fossem mais blindados, devido ao efeito de blindagem *orto* do par de elétrons do nitrogênio, o grupo ureia é um doador fraco para o anel aromático, uma vez que o par de elétrons está conjugado com a carbonila. Além disso, olhando para as constantes de acoplamento, $J = 8,5$ e $1,1$ Hz, identifica-se que o segundo valor é referente à um ⁴J. Portanto, o próton Ha está acoplado com um hidrogênio a 3 ligações e com

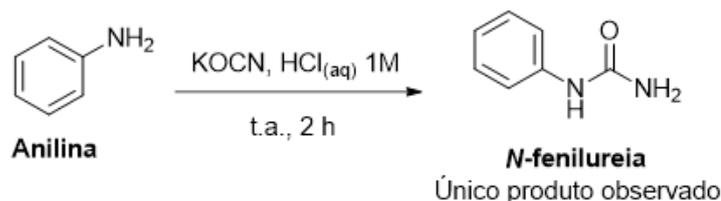
outro a 4, concluindo-se que este é referente ao hidrogênio *orto*. Já o sinal observado em 7,3 ppm possui dois valores de J obtidos, 8,5 e 7,5 Hz, ambos coerentes com 3J . Logo, esse sinal corresponde aos hidrogênios em *meta* (Hb), onde o primeiro valor se refere ao acoplamento com o Ha, e o segundo ($J = 7,5$ Hz) refere-se ao acoplamento 3J com o hidrogênio Hc, em posição *para* ao grupo ureia. Para este último hidrogênio, o sinal é um tripleto em 6,9 ppm com ${}^3J = 7,5$ Hz.

Figura 14 - Espectro de RMN de ${}^1\text{H}$ (DMSO- d_6) da difenilureia obtida.

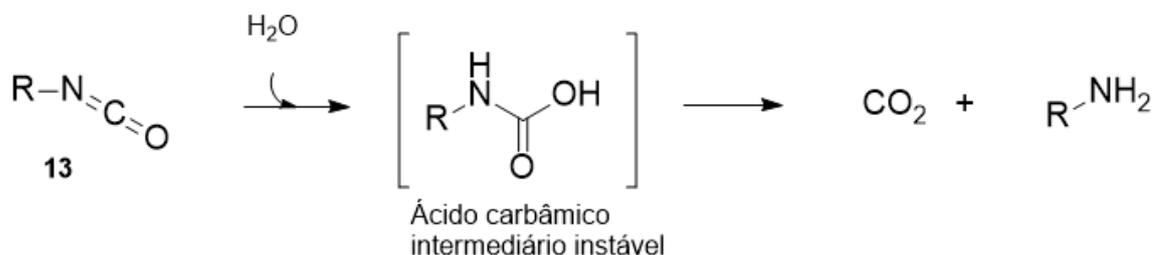


4.2 Síntese de *N*-fenilureia com isocianato inorgânico

Devido às dificuldades de solubilização e o controle estequiométrico do caminho reacional mencionado anteriormente, buscou-se outra metodologia na literatura, dessa vez com isocianatos. De acordo com o procedimento descrito por Tiwari e colaboradores para síntese de *N*-fenilureias¹⁷ (Esquema 13), um excesso de isocianato de potássio é adicionado a uma mistura de HCl 1M contendo anilina à temperatura ambiente.

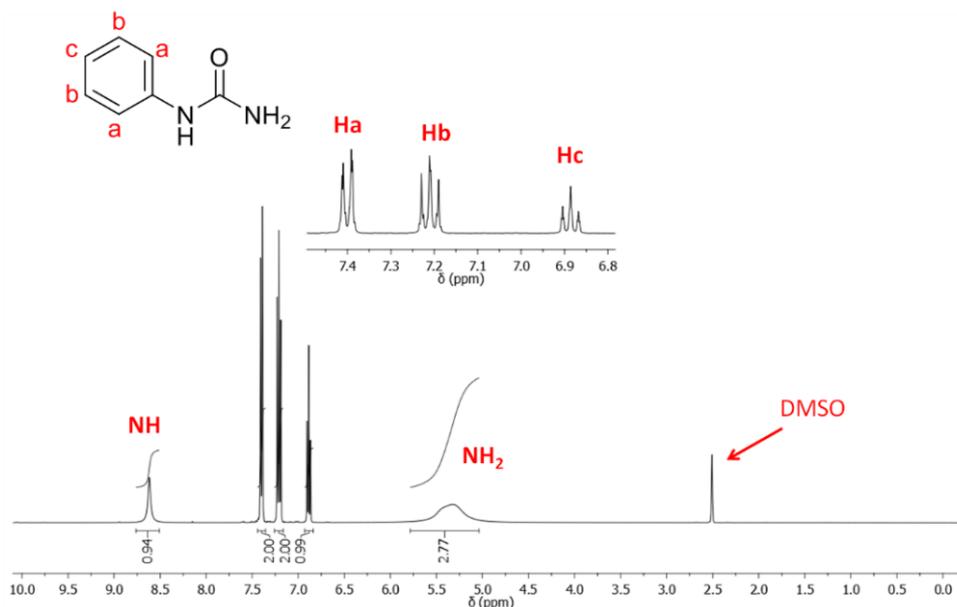
Esquema 13 - Obtenção da N-fenilureia nas condições de Tiwari e colaboradores.

O uso de meio aquoso para a reação justifica-se pois o isocianato inorgânico não é um bom eletrófilo, já que está carregado negativamente. O meio prótico permite a protonação do oxigênio para que o ataque nucleofílico da anilina seja efetivo. No entanto, sabe-se que isocianatos decompõem na água formando CO_2 , conforme o Esquema 14. Logo, é muito importante o uso de pequena quantidade de solvente e excesso de isocianato para que a reação ocorra com bons rendimentos.

Esquema 14 - Decomposição do isocianato em água

Ao testar o procedimento no laboratório, notou-se que houve a formação imediata de um sólido branco, o qual foi deixado sob agitação por cerca de 2 horas. Decorrido esse tempo, o produto foi filtrado a vácuo e pesado, obtendo-se um rendimento de 70%. O ponto de fusão experimental foi de 145 °C, condizente com a literatura, e o RMN de ^1H é mostrado na Figura 15.

Figura 15 - Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6) da N-fenilureia obtida.



Diferencia-se a difenilureia da *N*-difenilureia pelo pico alargado em 5,4 ppm referente aos hidrogênios do grupo amino (NH_2). A formação de ligação de hidrogênio entre o produto e a água presente no solvente utilizado para preparo da amostra é responsável não só pelo alargamento do pico de NH_2 , mas possivelmente também pela ausência do sinal característico da H_2O no DMSO, em 3,4 ppm.

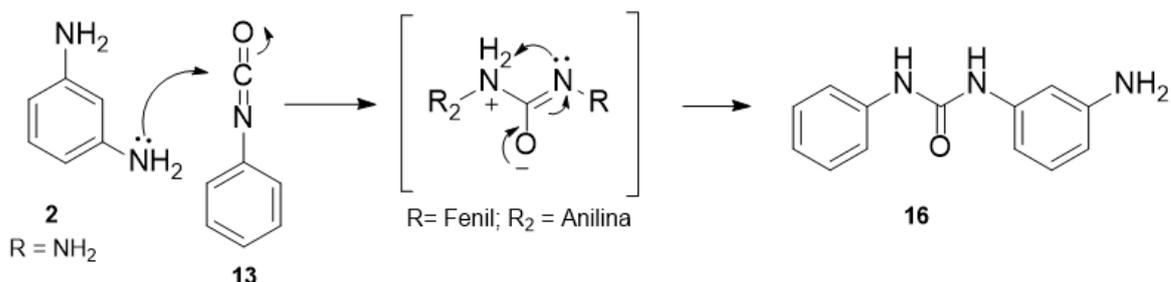
Uma vez atestado a efetividade para síntese da monofenilureia por essa metodologia, futuramente o grupo pretende testar a reação de transaminação com L-prolina partindo da monofenilureia para síntese de novas moléculas difenilureias não simétricas.

4.3 Síntese de 1,3-difenilureias não simétricas com isocianato orgânico

Atestada a efetividade da reação de adição entre anilina e o eletrófilo isocianato, definiu-se uma metodologia mais assertiva para a síntese da 1-(3-aminofenil)3-fenilureia em uma etapa através de *meta*-fenilenodiamina e fenilisocianato. Jiyun Hu e colaboradores¹⁸ descreveram essa síntese pela adição de 1 equivalente de isocianato de fenila a uma solução de fenilenodiamina em clorofórmio gota a gota. Pela alta reatividade do eletrófilo, a reação de adição

(Esquema 15) pode proceder sem meio prótico, ao contrário do isocianato de potássio.

Esquema 15 - Mecanismo da reação de adição em clorofórmio.



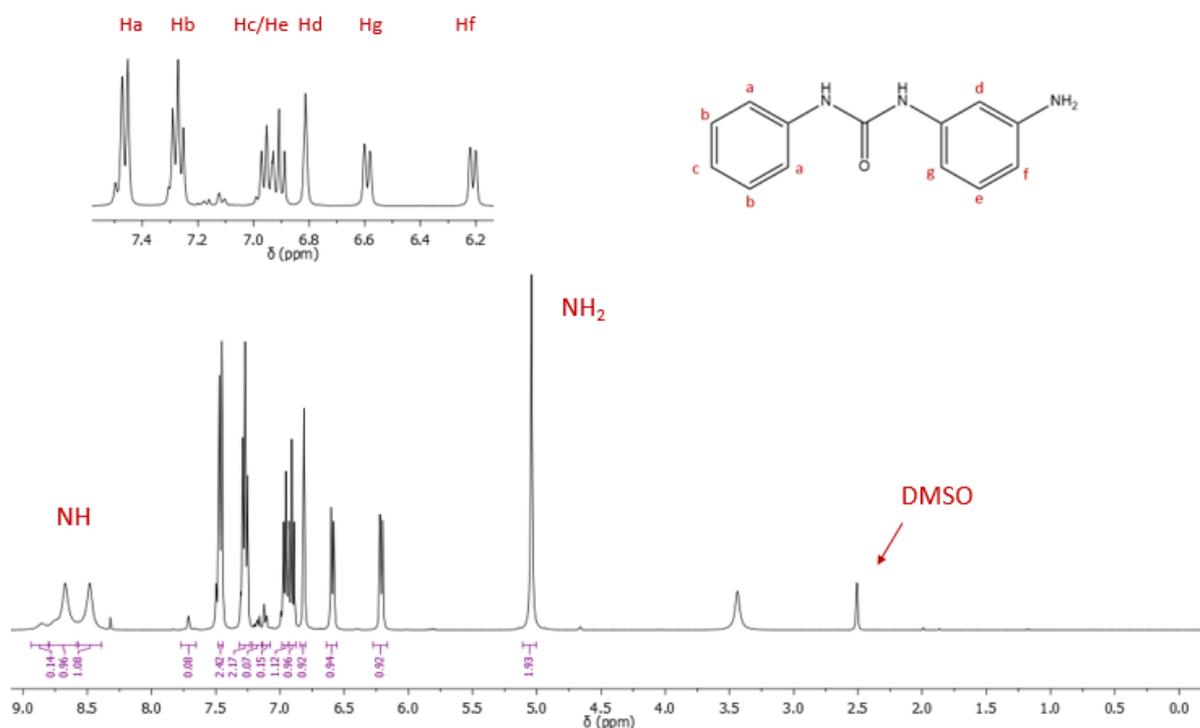
Primeiramente, para testar tais condições, foi necessária a purificação da *meta*-fenilenodiamina, uma vez que o reagente, por se decompor facilmente com luz e umidade, é comercializado em forma de sal cloridrato. Portanto, este foi solubilizado em água e filtrado. Após, adicionou-se NaOH até pH básico. Para extração do reagente para fase orgânica, colocou-se etanol e carbonato de potássio para efeito *salting out*. A fenilenodiamina em etanol é seca em rota evaporador e bomba de alto vácuo.

Em posse dos reagentes devidamente purificados, testou-se o procedimento com um leve excesso de fenilenodiamina e adição gota a gota de fenilisocianato diluído em clorofórmio. O sólido branco resultante foi filtrado e seco a vácuo. O ponto de fusão experimental foi de 200 °C, próximo do obtido por Kadam *et al.*²³

De acordo com o espectro de RMN (Figura 16), pode-se evidenciar a formação da 1-(3-aminofenil)-3-fenilureia. Em 8,67 ppm e 8,48 ppm encontram-se os hidrogênios NH da ureia. O dubleto em 7,46 ppm, com valor de integração para dois, corresponde aos hidrogênios Ha, e o tripleto próximo, 7,27 ppm, aos hidrogênios Hb. Na região de 6,95 a 6,90 ppm há a sobreposição de dois tripletos representados por Hc e He, respectivamente. Chegando em valores mais baixos de deslocamento químico estão os hidrogênios *orto* e *para* ao NH₂. Devido à blindagem exercida pelo grupo anilino, em 6,81 ppm está o tripleto a ⁴J referente ao Hd, *orto* ao NH₂. Já, em 6,59 e 6,21 ppm evidenciam-se duplos dubletos, Hf e Hg, os quais acoplam ³J com He e a ⁴J entre si. Por fim, o singlete na região

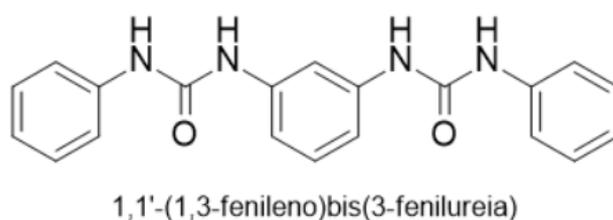
de 5,04 ppm confirma a presença do NH₂.

Figura 16 - Espectro de RMN ¹H (DMSO d₆) da 1-(3-aminofenil)-3-fenilureia.



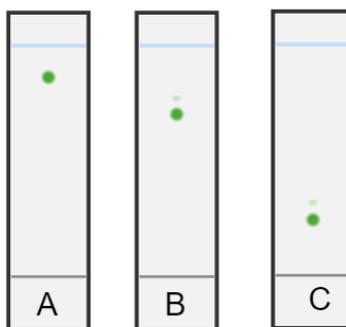
Embora tenha sido usado excesso de fenilenodiamina com adição gota a gota de isocianato, não foi o suficiente para prevenir que os dois NH₂ da diamina reagissem. Observa-se, portanto, que o espectro mostra sinais referentes à existência de 1-1'-(1,3-fenileno)bis(3-fenilureia), subproduto da reação, Figura 17. Esses podem ser identificados em 8,85 ppm, o qual se refere ao segundo grupo ureia presente na molécula e entre 6,9 e 7,0 ppm, onde se encontram os sinais dos hidrogênios do anel aromático central.

Figura 17 - Subproduto esperado pela reação de 1 equivalente de fenilenodiamina com 2 equivalentes de fenilisocianato.



Portanto, seguiu-se com a purificação em coluna para separação dos produtos. Foi utilizado um método de eluição por gradiente de fase móvel, aumentando-se a polaridade no intuito de evitar a coeluição. Aqui, encontrou-se dificuldade em separar o subproduto do 1-(3-aminofenil)3-fenilureia, pois ambos possuem fatores de retenção muito próximos ($r_f = 0,8$ e $0,7$ respectivamente) e a mancha do contaminante é muito fraca (Figura 18). Logo, não foi possível de evitar certa coeluição, e o produto alvo isolado teve apenas 36% de rendimento.

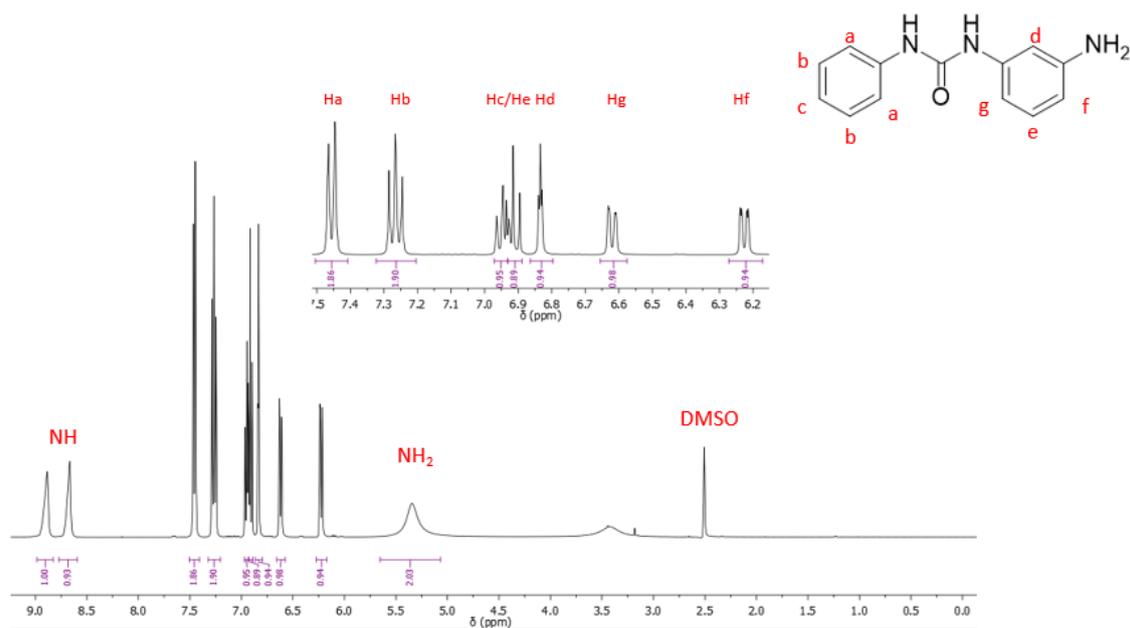
Figura 18 - Plaquinha de CCD para a síntese descrita acima. Fase móvel A = Acetato de etila: Hexano (7:3); B = Acetato de etila: Hexano (6:4); C = Acetato de etila: Hexano (1:1).



Para otimizar essa metodologia, outra síntese foi realizada, porém dessa vez com funil de adição ao invés de pipeta pasteur para melhor controle do tempo de adição de fenilisocianato. Mais uma vez observou-se a formação de subproduto, porém, a fim de evitar coluna cromatográfica para purificação, realizou-se filtração com metanol, uma vez que Barisic e colaboradores atestaram a insolubilidade da 1,1'-(1,3-fenileno)bis(3-fenilureia) no álcool.²⁴ Desta vez, conseguiu-se um rendimento de 72,50% para o produto puro.

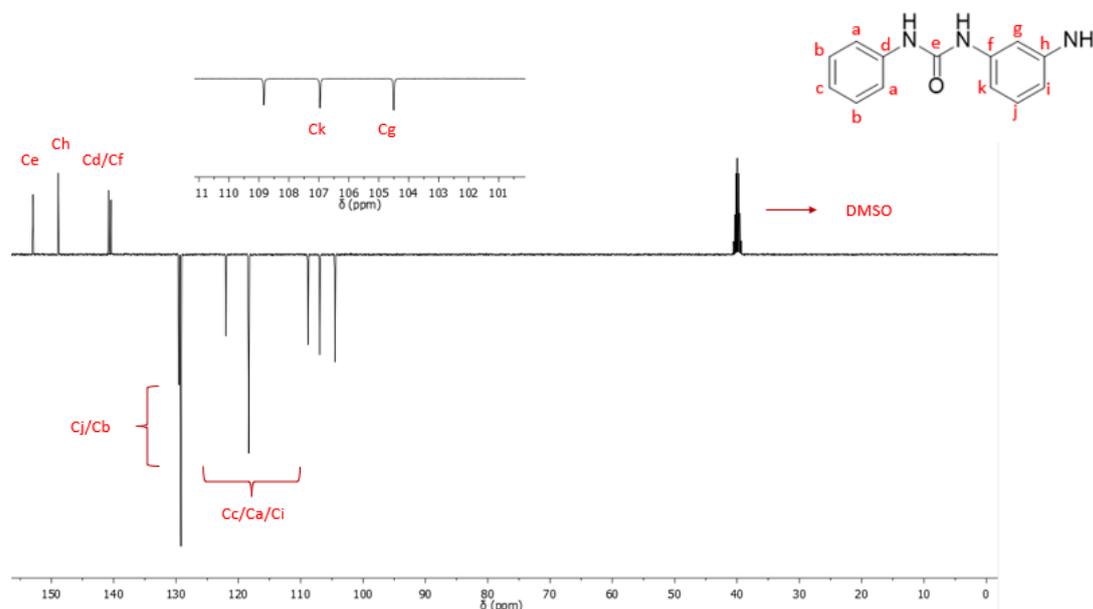
Observa-se que no RMN de ^1H (Figura 19), para o produto purificado com filtração em metanol, estão presentes os mesmos picos referentes à 1-(3-aminofenil)-3-fenilureia encontrados no espectro da Figura 16. No entanto, os sinais do subproduto que eram identificados em 8,85 ppm para os NHs da ureia duplicada e entre 6,9 e 7ppm para o anel aromático central não estão mais presentes.

Figura 19 - Espectro RMN ^1H (DMSO d_6) da 1-(3-aminofenil) -3-fenilureia



No caso do RMN APT de ^{13}C , Figura 20, os picos para cima são atribuídos aos carbonos sem hidrogênios da molécula, que por sua vez estão inseridos em um ambiente químico mais deficiente em elétrons. Portanto, em 153 ppm evidencia-se o carbono carbonílico Ce, mais deficiente em densidade eletrônica, seguido pelos carbonos ligados diretamente ao nitrogênio Ch, Cd e Cf. Na sequência encontram-se os carbonos meta à ureia: Cj e Cb entre 130 e 129 ppm. Sofrendo blindagem pelo NH da ureia, na região entre 122 e 109 ppm estão os carbonos em *orto* e *para* - Cc e Ca - e o carbono Ci *orto* ao NH₂. Já os carbonos que sofrem blindagem pela ressonância do par de elétrons do NH₂ e do NH, Ck e Cg, encontram-se nos menores valores de deslocamento químico, 106 e 104 ppm, respectivamente.

Figura 20 - Espectro de RMN ^{13}C APT (DMSO d_6) da 1-(3-aminofenil) -3-fenilureia.



4.4 Síntese da 6-cloro-9H-purina

Para a tentativa de obtenção da 6-cloropurina seguiu-se o método com POCl_3 como agente clorante adaptado de Olenigski.¹⁹ A reação foi realizada em refluxo a 115-120 °C e foi utilizada uma base não nucleofílica como catalisador, uma vez que há alta liberação de HCl, no caso o DMAP.

Após agitação e refluxo até completa solubilização dos materiais de partida e mudança de coloração de amarelo a um caramelo alaranjado, evaporou-se o solvente em bomba de alto vácuo e adicionou-se ao bruto uma solução de carbonato de sódio até pH=10 para desprotonação dos nitrogênios básicos. Apesar da tentativa de extração com diclorometano e etanol, todo produto permaneceu na fase aquosa. Seguiu-se então com evaporação no rota evaporador e aplicação do sólido resultante em coluna cromatográfica para purificação.

Aqui encontrou-se uma dificuldade na aplicação do produto, uma vez que todo sal básico utilizado no tratamento da reação somou-se ao bruto após secagem da água. Logo, a massa de sólido a ser aplicada torna-se muito alta, dificultando a separação efetiva do produto e DMAP. De toda forma, seguiu-se

com a coluna em gradiente diclorometano:metanol (70:30 – 50:50). Percebeu-se coeluição do DMAP com o possível produto, então outra corrida foi feita com as frações contaminadas para obtenção de um sólido amarelo em pequena quantidade.

Em sequência, pensou-se em eliminar o uso de base no tratamento da reação afim de evitar a aplicação de uma massa muito grande na coluna cromatográfica. Além disso, considerou-se possível que os íons OH^- em excesso possam estar revertendo a reação, causando a perda de cloropurina que eventualmente tenha se formado. Portanto, seguiu-se o mesmo procedimento anterior, porém o tratamento da reação envolveu apenas a secagem do POCl_3 em bomba de alto vácuo e aplicação direta na coluna cromatográfica conforme descrito por Battaglia *et al.*²⁵ Além do mais, otimizou-se as proporções de eluente para diclorometano: metanol (90:10) isocrático. No entanto, novamente o sólido amarelo isolado teve um baixíssimo rendimento, indicando que possa haver necessidade de ajustes do método reacional também, como aumento do excesso de agente clorante.

A caracterização da 6-cloropurina depende somente de RMN, uma vez que o ponto de fusão na literatura não está bem definido, ultrapassando os 300 graus, e não há padrão de 6-cloropurina para comparação em plaqueta de CDD. No entanto, a amostra preparada para RMN recristalizou no tubo e o espectro obtido não foi satisfatório para concluir se houve ou não formação de produto.

5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Conforme discutido neste trabalho, a metodologia de síntese para as estruturas desejadas está avançada, uma vez que os desafios iniciais do grupo de pesquisa para obtenção de derivados de ureia e da 6-cloropurina foram estudados.

Definiu-se que a melhor rota sintética para obtenção de *N*-fenilureias e difenilureias não simétricas é através da reação entre isocianatos e anilinas ao invés da transamidação a partir da ureia. Apesar de certas sensibilidades inerentes ao manuseio de isocianatos - alta reatividade do fenilisocianato e decomposição do isocianato de potássio - os métodos se mostraram eficientes, rápidos e de fácil purificação. Além disso, atestou-se que a reação de transamidação entre ureia e anilina catalisada por L-prolina também é efetiva, porém há uma dificuldade de solubilização da ureia e de controle estequiométrico, obtendo-se o produto majoritário 1,3-difenilureia. Portanto, as próximas investigações para obtenção de difenilureias com variados grupos funcionais consistirá na combinação dos métodos mencionados anteriormente.

Ainda, com relação à reação de cloração da hipoxantina, diferentes formas de purificação foram testadas, com variações de fase móvel e tratamento do bruto reacional. Através destas, concluiu-se que o problema deve estar no processo da reação, portanto novas sínteses deverão ser conduzidas com variações de tempo e nas quantidades de agente clorante para obtenção de maiores rendimentos para caracterização completa.

Ademais, a obtenção dos híbridos purina-difenilureia deve ser condizente com os métodos descritos na literatura que utilizam o núcleo purina com nucleófilos moderados como derivados anilínicos.

6 PARTE EXPERIMENTAL

Apenas os solventes de grau industrial como acetato de etila, hexano e diclorometano foram purificados por destilação antes do uso; todos os outros solventes e reagentes foram adquiridos comercialmente em grau para análise (P.A). Para cromatografia em coluna, empregou-se sílica-gel 60 Å, 70-230 mesh como fase estacionária.

O andamento das reações foi acompanhado por cromatografia em camada delgada obtida em lâminas de alumínio *Merck*® 60 Å com indicador UV F254.

Para determinação do ponto de fusão, foi utilizado equipamento da Stuart Scientific modelo SMP3.

Os espectros de RMN foram obtidos por espectrômetro Bruker 400 (9,3 Tesla), operando em frequência de 400 MHz para o hidrogênio e 100 MHz para carbono-13. Os deslocamentos químicos estão expressos em ppm (δ), sendo o sinal do teramethylsilano a referência em 0,0 ppm e as constantes de acoplamento (J) em Hertz. As abreviaturas seguem conforme: s de singleto, d para dubleto, dd para dubleto de dubleto, t para tripleto, tt para tripleto de tripletos, m para multiplete.

6.1 Síntese da *N*-fenilureia

Procedimento adaptado de Tiwari.¹⁷ Em um balão de fundo redondo de 25 mL, foram adicionados 6 mL de HCl 1 M e 0,36 mL de anilina (4 mmol) até homogeneidade. Após, colocou-se 0,714 g de KOCN (8,8 mmol) com a formação imediata de um sólido branco. A mistura reacional foi deixada sob agitação por 2 horas e o precipitado foi filtrado e lavado com mais 15 mL de HCl 1 M. Após secagem em estufa e bomba de alto vácuo, obteve-se 70% de rendimento.

Ponto de fusão: 149 °C

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.62 (s, 1H), 7.50 – 7.33 (m, 2H), 7.27 – 7.13 (m, 2H), 6.89 (tt, J = 7.3, 1.2 Hz, 1H), 5.32 (s, 3H).

6.2 Síntese da 1,3-difenilureia

Em um balão de fundo redondo de 50 mL, foram adicionados 0,986 g de ureia (16,42 mmol), 0,378 g de L-prolina (3,28 mmol) em 21 mL de tolueno. A mistura reacional foi deixada em agitação e refluxo até completa dissolução da ureia. Então, adicionou-se 1 mL de anilina (10,95 mmol) e a reação foi deixada por 24 horas. Apesar da existência de um pouco de material de partida revelado pela CCD, retirou-se a reação devido à formação de um sólido branco. O precipitado foi lavado e filtrado com tolueno, e o bruto seguiu para purificação por coluna cromatográfica com gradiente de hexano:acetato de etila (70:30 – 40:60). Juntou-se as frações nas quais o produto foi identificado, porém o RMN indicou a formação da 1,3-difenilureia, quando se esperava a formação somente de 1-fenilureia.

^1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 8.66 (s, 1H), 7.45 (dd, J = 8.6, 1.1 Hz, 2H), 7.31 – 7.25 (m, 2H), 7.00 – 6.94 (m, 1H).

6.3 Síntese da 1-(3-aminofenil)-3-fenilureia

Para purificação do cloridrato de fenilenodiamônio, cerca de 1 g foi dissolvido em água e filtrado de forma simples com papel filtro. Ao líquido, adicionou-se etanol e carbonato de potássio até completa separação de fases. A fase orgânica foi separada, coletada e seca com sulfato de magnésio. Após nova filtração e secagem em bomba de vácuo, obteve-se a fenilenodiamina purificada.

Logo em seguida, em balão de fundo redondo de 150 mL, 1,010 g de fenilenodiamina (10 mmol) foram adicionados em 80 mL de clorofórmio até completa solubilização. Conectou-se um funil de adição à boca do balão e nele se adicionou uma mistura de 20 mL de clorofórmio e 0,764 mL de fenilisociano (7 mmol). A torneira do funil foi aberta para uma vazão de aproximadamente uma gota a cada dois segundos. Após 10 minutos, a solução começou a turvar pela precipitação de sólido branco. Terminada a adição, o produto foi filtrado e lavado com clorofórmio e seco em bomba de alto vácuo. A plaquinha de CCD em hexano:acetato (1:1) mostrou que além do produto alvo (R_f = 0,3) também havia formado 1,1'-(1,3-fenileno)bis(3-fenilureia) com r_f = 0,4. Logo, solubilizou-se o produto em metanol e separou-se o líquido contendo o produto do precipitado.

Após mais uma rodada de secagem a vácuo, obteve-se a 1-(3-aminofenil)-3-fenilureia purificada com 72,50% de rendimento.

Ponto de fusão: 200 °C

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 8.98 – 8.83 (m, 1H), 8.77 – 8.59 (m, 1H), 7.51 – 7.41 (m, 2H), 7.32 – 7.21 (m, 2H), 6.97 – 6.93 (m, 1H), 6.93 – 6.89 (m, 1H), 6.83 (t, $J = 2.1$ Hz, 1H), 6.62 (ddd, $J = 8.0, 2.1, 1.0$ Hz, 1H), 6.23 (ddd, $J = 7.9, 2.2, 0.9$ Hz, 1H), 5.34 (s, 2H).

^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 152.98, 148.90, 140.84, 140.44, 129.54, 129.23, 122.00, 118.34, 108.84, 106.97, 104.50.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Cohen, P., Cross, D. & Jänne, P. A. Kinase drug discovery 20 years after imatinib: progress and future directions. *Nature Reviews Drug Discovery* vol. 20 551–569 (2021).
2. Finn, R. S. et al. Palbociclib and Letrozole in Advanced Breast Cancer. *New England Journal of Medicine* 375, 1925–1936 (2016).
3. Attwood, M. M., Fabbro, D., Sokolov, A. v., Knapp, S. & Schiöth, H. B. Trends in kinase drug discovery: targets, indications and inhibitor design. *Nature Reviews Drug Discovery* vol. 20 839–861 (2021).
4. Ghosh, A. K. & Brindisi, M. Urea Derivatives in Modern Drug Discovery and Medicinal Chemistry. *J Med Chem* 63, 2751–2788 (2020).
5. Tadesse, S., Caldon, E. C., Tilley, W. & Wang, S. Cyclin-Dependent Kinase 2 Inhibitors in Cancer Therapy: An Update. *Journal of Medicinal Chemistry* vol. 62 4233–4251 (2019).
6. Peters, D. *Kinase Inhibitors: An Introduction* (2019).
7. Coxon, C. R. et al. Cyclin-Dependent Kinase (CDK) Inhibitors: Structure-Activity Relationships and Insights into the CDK-2 Selectivity of 6-Substituted 2-Arylamino-purines. *J Med Chem* 60, 1746–1767 (2017).
8. DiPippo, A. J., Patel, N. K. & Barnett, C. M. Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors for the Treatment of Breast Cancer: Past, Present, and Future. *Pharmacotherapy* vol. 36 652–667 (2016).
9. Amadio, M., Govoni, S. & Pascale, A. Targeting VEGF in eye neovascularization: What's new?: A comprehensive review on current therapies and oligonucleotide-based interventions under development. *Pharmacological Research* vol. 103 253–269 (2016).
10. Shen, S., Dean, D. C., Yu, Z. & Duan, Z. Role of cyclin-dependent kinases (CDKs) in hepatocellular carcinoma: Therapeutic potential of targeting the CDK signaling pathway. *Hepatology Research* 49, 1097–1108 (2019).
11. Okamoto, K. et al. Distinct binding mode of multikinase inhibitor lenvatinib revealed by biochemical characterization. *ACS Med Chem Lett* 6, 89–94 (2015).
12. Ayala-Aguilera, C. C. et al. Small Molecule Kinase Inhibitor Drugs (1995–2021): Medical Indication, Pharmacology, and Synthesis. *Journal of Medicinal*

- Chemistry vol. 65 1047–1131 (2022).
13. C.A. Lipinski, F. Lombardo, B.W. Dominy, P.J. Feeney, Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 46, 3–26 (2001).
 14. Zhao, J. et al. Pd/C Catalyzed Carbonylation of Azides in the Presence of Amines. *Org Lett* 18, 1736–1739 (2016).
 15. Singh, A. S., Agrahari, A. K., Singh, S. K., Yadav, M. S. & Tiwari, V. K. An Improved Synthesis of Urea Derivatives from N - Acylbenzotriazole via Curtius Rearrangement. *Synthesis (Germany)* 51, 3443–3450 (2019).
 16. Nagarkar, A. G. & Telvekar, V. N. L-Proline Catalyzed Synthesis of Various N-substituted Urea and Unsymmetrical N,N'-disubstituted Urea. *Lett Org Chem* 15, 926–930 (2017).
 17. Tiwari, L., Kumar, V., Kumar, B. & Mahajan, D. A practically simple, catalyst free and scalable synthesis of: N -substituted ureas in water. *RSC Adv* 8, 21585–21595 (2018).
 18. Hu, J. et al. (Thio)urea-Based Covalent Organic Framework as a Hydrogen-Bond-Donating Catalyst. *ACS Appl Mater Interfaces* 12, 29212–29217 (2020).
 19. Olenginski, L. T. & Dayie, T. K. Chemo-enzymatic synthesis of [2- ¹³C, 7-¹⁵N]-ATP for facile NMR analysis of RNA. *Monatsh Chem* 151, 1467–1473 (2020).
 20. Wang, J. et al. Efficient Phosphorus-Free Chlorination of Hydroxy Aza-Arenes and Their Application in One-Pot Pharmaceutical Synthesis. *Org Process Res Dev* 24, 146–153 (2020).
 21. Oumata, N. et al. Roscovitine-derived, dual-specificity inhibitors of cyclin-dependent kinases and casein kinases 1. *J Med Chem* 51, 5229–5242 (2008).
 22. Vincetti, P. et al. Discovery of Multitarget Antivirals Acting on Both the Dengue Virus NS5-NS3 Interaction and the Host Src/Fyn Kinases. *J Med Chem* 58, 4964–4975 (2015).
 23. Kadam, S. A. et al. Towards the Discrimination of Carboxylates by Hydrogen-Bond Donor Anion Receptors. *Chemistry - A European Journal* 21, 5145–5160 (2015).
 24. Barišić, D. et al. Protonation and Anion Binding Properties of Aromatic Bis-Urea Derivatives—Comprehending the Proton Transfer. *Chemistry - A European Journal* 25, 4695–4706 (2019).

25. Battaglia, U., Long, J. E., Searle, M. S. & Moody, C. J. 7- Deazapurine biosynthesis: NMR study of toyocamycin biosynthesis in *Streptomyces rimosus* using 2-¹³C-7-¹⁵N-adenine. *Org Biomol Chem* 9, 2227–2232 (2011).