



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0812865-0 B1



(22) Data do Depósito: 02/07/2008

(45) Data de Concessão: 03/09/2019

(54) Título: DERIVADOS DE 6-ANILINOPURINA SUBSTITUÍDA

(51) Int.Cl.: A01N 43/713; A61K 31/52; A61P 35/00; C07D 473/16; C07D 473/34.

(30) Prioridade Unionista: 04/07/2007 CZ PV 2007-453.

(73) Titular(es): SYNGENTA PARTICIPATIONS AG.

(72) Inventor(es): LUKAS SPICHAL; MARKETA GEMROTOVA; MAREK ZATLOUKAL; JITKA FREBORTOVA; PETR GALUSZKA; TOMAS WERNER; THOMAS SCHMULLING; KAREL DOLEZAL; MIROSLAV STRNAD.

(86) Pedido PCT: PCT CZ2008000074 de 02/07/2008

(87) Publicação PCT: WO 2009/003428 de 08/01/2009

(85) Data do Início da Fase Nacional: 30/12/2009

(57) Resumo: "DERIVADOS DE 6-ANILINOPURINA SUBSTITUÍDA COMO INIBIDORES DE CITOQUININA OXIDASE/DESIDROGENASE PREPARAÇÕES CONTENDO ESSES DERIVADOS" A presente invenção refere-se anilíinopurina substituída da fórmula a derivados de geral I, onde E 6- R representa um a cinco substituintes independentemente selecionados do grupo que consiste em um grupo hidrogênio, halogênio, hidroxil, amino, alquilóxi e alquil, e R2 representa um grupo amino, halogênio, nitro, tio, alquiltio ou alquil para uso como inibidores de citoquinina oxidase/desidrogenase. A invenção também se refere a composições contendo esses derivados.

DERIVADOS DE 6-ANILINOPURINA SUBSTITUÍDACAMPO TÉCNICO

A invenção refere-se a derivados de 6-anilinopurina substituída, seu uso como inibidores de citoquinina oxidase/desidrogenase e preparações contendo esses derivados.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

Nos últimos anos, 6-aminopurinas substituídas ganharam considerável importância bioquímica. Alguns compostos deste tipo promovem o crescimento das plantas e pertencem aos grupos dos reguladores de crescimento chamados de citoquininas (Letham, Ann. Rev. Plant. Physiol. 18, 349, 1967). Quinetina (N6-furfuryladenine) foi a primeira molécula a ser descoberta com atividade de citoquinina. Ela foi originalmente isolada de DNA de esperma de arenque autoclavado (Miller et al. 1955, J. Am. Chem. Soc. 77:1392). Citoquininas bastante relacionadas à quinetina também como bases modificadas em RNA solúvel (Skoog et al., Science 154:1354, 1966). Nas serina e tirosina tRNAs de leveduras, plantas e animais a citoquinina fica adjante ao anticódon. O crescimento de culturas de células de mamíferos é inibido por determinadas adenosinas N6-susbtituídas com atividade de citoquinina (Grace et al., Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 8:23, 1967).

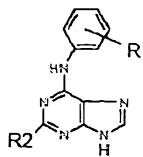
As citoquininas são hormônios de plantas importantes que regulam muitos aspectos do desenvolvimento da planta. Estudos recentes em plantas transgênicas com metabolismo ou sinalização da citoquinina alterados revelaram consequências interessantes da deficiência de citoquinina ou do rompimento da percepção de citoquinina

(Werner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:10487, 2001, Werner et al., Plant Cell 15:2532, 2003; Riefler et al., Plant Cell 18:40, 2006). A modulação dos níveis de citoquinina por aplicação exógena ou regulação de seus 5 níveis endógenos geneticamente através da citoquinina oxidase/desidrogenase (CKX, EC 1.5.99.12), uma enzima essencial envolvida na degradação da citoquinina, já apresentou aplicações possíveis na agricultura. Por exemplo, a aplicação exógena de citoquininas levou à 10 redução do tempo para antese no tomate (Sawhney & Shukla, Am J Bot 81:1640, 1994) ou reversão da esterilidade macho na cevada (Ahokas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:7605, 1992). Já foi mostrado que a expressão específica para antera e pólen de CKX no milho é uma ferramenta potencial 15 para gerar esterilidade macho para produção de variedades híbridas de culturas tradicionalmente não híbridas (Huang et al., 2003). Um trabalho recente relatou o envolvimento de CKX na regulação da produção de grãos de arroz (Ashikari et al., Science 309:741, 2005). Recentemente 20 descobrimos que poderiam ser feitas novas gerações de inibidores de CKX à base de 6-anilinopurinas 2-substituídas. Os substituintes mais promissores são grupos 2- cloro, 2-flúor e 2-amino para a preparação de inibidores de CKX específicos.

25 Constitui um objetivo desta invenção oferecer análogos de citoquinina com seletividade e índice de eficiência aumentados na inibição da citoquinina oxidase/desidrogenase, i.e., que são menos tóxicos e ainda mais eficazes que os análogos conhecidos até o momento.

30 DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

O objetivo desta invenção são derivados de 6-anilinopurina substituída da fórmula geral I



e os sais farmaceuticamente aceitáveis dos mesmos com metais alcalinos, amônio ou aminas, na forma de racematos ou isômeros opticamente ativos, assim como seus sais de adição com ácidos, onde

5 R representa um a cinco substituintes independentemente selecionados do grupo que compreende hidrogênio, halogênio, hidroxil, amino, alquilóxi e alquil,

 R2 é selecionado do grupo que compreende amino,
10 halogênio, nitro, tio, alquiltio e alquil, para uso como inibidores de citoquinina oxidase/desidrogenase.

Os grupos substituintes genéricos têm os mesmos significados dados nas definições dos grupos correspondentes definidos nesta legenda, onde

15 amino representa o grupo -NH₂, halogênio representa um átomo selecionado do grupo que compreende átomos de flúor, bromo, cloro e iodo, nitro representa o grupo -NO₂, tio representa o grupo -SH, alquil representa um grupo alquil ramificado ou não ramificado contendo 1 a 6
20 átomos de carbono, hidróxi representa o grupo -OH, alquilóxi representa o grupo -OR, onde R é alquil e os referidos grupos substituintes genéricos têm os mesmos significados dados nas definições dos grupos correspondentes definidos nesta legenda, alquiltio
25 representa o grupo -SR, onde R é alquil e os referidos grupos substituintes genéricos têm os mesmos significados dados nas definições dos grupos correspondentes definidos nesta legenda.

De acordo com a invenção, derivados de 6-
30 anilino-purina substituída da fórmula geral I preferidos

são: 2-(cloro, flúor, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-anilinopurina, 2-(cloro, flúor, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2-cloroanilino)purina, 2-(cloro, flúor, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-
 5 6-(3-cloroanilino)purina, 2-(cloro, flúor, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(4-cloroanilino)purina, 2-(cloro, flúor, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2-fluoranilino)purina, 2-(cloro, flúor, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(3-fluoranilino)purina, 2-
 10 (cloro, flúor, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(4-fluoranilino)purina, 2-(cloro, flúor, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2-bromoanilino)purina, 2-(cloro, flúor, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(3-bromoanilino)purina, 2-(cloro, flúor, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(4-bromoanilino)purina, 2-
 15 (cloro, flúor, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2-metoxianilino)purina, 2-(cloro, flúor, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(3-metoxianilino)purina, 2-(cloro, flúor, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(4-metoxianilino)purina, 2-(cloro, flúor, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2-etoxianilino)purina, 2-(cloro, flúor, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(3-etoxianilino)purina, 2-(cloro, flúor, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(4-etoxianilino)purina, 2-
 20 (cloro, flúor, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2-aminoanilino)purina, 2-(cloro, flúor, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(3-aminoanilino)purina, 2-(cloro, flúor, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(4-aminoanilino)purina, 2-(cloro, flúor, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2-metilanilino)purina, 2-(cloro, flúor, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(3-metilanilino)purina, 2-(cloro, flúor, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(4-metilanilino)purina, 2-(cloro, flúor, bromo, amino, nitro,

tio, metiltio, metil)-6-(2-hidroxianilino)purina, 2-
 (cloro, flúor, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-
 6-(3-hidroxianilino)purina, 2- (cloro, flúor, bromo,
 amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(4-
 5 hidroxianilino)purina, 2-(cloro, flúor, bromo, amino,
 nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2,3-difluoranilino)purina,
 2-(cloro, flúor, bromo, amino, nitro, tio, metiltio,
 metil)-6-(2,4-difluoranilino)purina, 2-(cloro, flúor,
 bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2,3,4-
 10 trifluoranilino)purina, 2-(cloro, flúor, bromo, amino,
 nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2,4,5-
 trifluoranilino)purina, 2- (cloro, flúor, bromo, amino,
 nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2,3-
 dicloroanilino)purina, 2-(cloro, flúor, bromo, amino,
 15 nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2,4-dicloroanilino)purina,
 2-(cloro, flúor, bromo, amino, nitro, tio, metiltio,
 metil)-6-(2,4-dimetoxianilino)purina, 2-(cloro, flúor,
 bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2,3-
 dimetoxianilino)purina, 2-(cloro, flúor, bromo, amino,
 20 nitro, tio, metiltio, metil)-6-(3,4-
 dimetoxianilino)purina, 2-(cloro, flúor, bromo, amino,
 nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2,5-
 dirnetoxianilino)purina, 2-(cloro, flúor, bromo, amino,
 nitro, tio, metiltio, metil)-6-(3,4,5-
 25 trimetoxianilino)purina, 2-(amino, cloro, flúor, bromo,
 amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2,4,6-
 trimetoxianilino)purina, 2-(cloro, flúor, bromo, amino,
 nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2,3-dimetilanilino)purina,
 2-(cloro, flúor, bromo, amino, nitro, tio, metiltio,
 30 metil)-6-(2,4-dimetilanilino)purina, 2-(cloro, flúor,
 bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(3,4-
 dimetilanilino)purina, 2-(cloro, flúor, bromo, amino,
 nitro, tio, metiltio, metil)-6-(3,5-dimetilanilino)purina,
 2- (cloro, flúor, bromo, amino, nitro, tio, metiltio,

metil)-6-(2,3- dihidroxianilino)purina, 2-(cloro, flúor,
 bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2,4-
 dihidroxianilino)purina, 2-(cloro, flúor, bromo, amino,
 nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2,5-
 5 dihidroxianilino)purina, 2-(amino, cloro, flúor, bromo,
 amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(3,5-
 dihidroxianilino)purina, 2- (cloro, flúor, bromo, amino,
 nitro, tio, metiltio, metil)-6-(3-hidroxi-2-
 metilanilino)purina, 2-(cloro, flúor, bromo, amino, nitro,
 10 tio, metiltio, metil)-6-(3-hidroxi-4-metilanilino)purina,
 2-(cloro, flúor, bromo, amino, nitro, tio, metiltio,
 metil)-6-(2-hidroxi-5-metilanilino)purina, 2-(cloro,
 flúor, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(3-
 hidroxi-2- metoxilanilino)purina, 2-(cloro, flúor, bromo,
 15 amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(3-hidroxi-4-
 metoxilanilino)purina, 2-(cloro, flúor, bromo, amino,
 nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2-hidroxi-3-
 metoxilanilino)purina, 2-(cloro, flúor, bromo, amino,
 nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2-hidroxi-5-
 20 metoxilanilino)purina, 2-(cloro, flúor, bromo, amino,
 nitro, tio, metiltio, metil)-6-(4-hidroxi-3,5-
 dimetoxilanilino)purina, 2-(amino, cloro, flúor, hidroxi,
 tio, metiltio, metil)-6-(2-cloro-4-metoxianilino)purina,
 2-(amino, cloro, flúor, bromo, nitro, tio, metiltio,
 25 metil)-6-(2-cloro-5- metoxianilino)purina, 2-(amino,
 cloro, flúor, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-
 6-(2-cloro-3-metoxianilino)purina, 2-(cloro, flúor, bromo,
 amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2-bromo-3-
 metoxianilino)purina, 2- (cloro, flúor, bromo, amino,
 30 nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2-metoxi-3-
 cloroanilino)purina, 2-(cloro, flúor, bromo, amino, nitro,
 tio, metiltio, metil)-6-(2-metoxi-4-cloroanilino)purina, e
 os sais dos mesmos com metais alcalinos, amônio ou aminas,
 nas formas de racematos ou isômeros oticamente ativos,

assim como seus sais de adição com ácidos, para uso como inibidores de citoquinina oxidase/desidrogenase.

Os derivados de 6-anilinopurina substituída a seguir são particularmente preferidos, a saber:

- 5 2-(cloro, flúor, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(3- metoxianilino)purina, 2-(cloro, flúor, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2-hidroxi-3- metoxianilino)purina, 2-(cloro, flúor, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2-cloro-3-
- 10 metoxianilino)purina, 2-(cloro, flúor, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2-bromo-3- metoxianilino)purina, 2-(cloro, flúor, bromo, amino, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(4-hidroxianilino)purina,
- e os sais dos mesmos com metais alcalinos, amônio ou
- 15 aminas, nas formas de racematos ou isômeros oticamente ativos, assim como seus sais de adição com ácidos, para uso como inibidores de citoquinina oxidase/desidrogenase.

Um outro aspecto da invenção são preparações farmacêuticas, cosméticas e reguladoras do crescimento

20 contendo pelo menos um composto de fórmula geral I ou um sal do mesmo com metal alcalino, amônia ou amina na forma de racemato ou isômero oticamente ativo, assim como seus sais de adição com ácidos, incluindo excipientes.

Um outro aspecto da invenção é o uso de derivados

25 de 6-anilinopurina substituída da fórmula geral I ou os sais dos mesmos com metais alcalinos, amônio ou aminas, na forma de racematos ou isômeros oticamente ativos, assim como seus sais de adição com ácidos, para a preparação de uma composição usada para inibir a citoquinina

30 oxidase/desidrogenase.

Um outro aspecto da invenção é o uso de derivados de 6-anilinopurina substituída da fórmula geral I como inibidores de citoquinina oxidase/desidrogenase, especialmente para aumentar o rendimento e a qualidade de

produtos agrícolas.

Um outro aspecto da invenção é o uso de derivados de 6-anilinopurina substituída da fórmula geral I como inibidores de citoquinina oxidase/desidrogenase nas
5 culturas de tecido para estimular a proliferação e a morfogênese.

Um outro aspecto da invenção é o uso de derivados de 6-anilinopurina substituída da fórmula geral I como inibidores de citoquinina oxidase/desidrogenase para
10 retardar a senescência das células de plantas, mamíferos, micro-organismos, leveduras e fungos.

Um outro aspecto da invenção é o uso de derivados de 6-anilinopurina substituída da fórmula geral I como inibidores de citoquinina oxidase/desidrogenase para
15 retardar a senescência das células dérmicas de mamíferos, por exemplo fibroblastos e queratinócitos.

Um outro aspecto da invenção é o uso de derivados de 6-anilinopurina substituída da fórmula geral I, para a preparação de uma composição destinada à clonagem de
20 células embrionárias e de embriões de plantas e mamíferos, de preferência à clonagem de oócitos.

Um outro aspecto da invenção é o uso de derivados de 6-anilinopurina substituída da fórmula geral I como inibidores de citoquinina oxidase/desidrogenase para
25 suprimir a imunoestimulação (por exemplo artrite) ou na supressão de rejeição de transplante em mamíferos.

Um outro aspecto da invenção é o uso de derivados de 6-anilinopurina substituída da fórmula geral I como inibidores de citoquinina oxidase/desidrogenase na
30 produção de culturas, em particular cereais (trigo, cevada, arroz, milho, centeio, aveia, sorgo, e espécies relacionadas), beterrabas (beterraba sacarina e forragem); pomos, drupas e frutas moles (maças, peras, ameixas, pêssegos, amêndoas, cerejas, morangos e amoras); plantas

leguminosas (feijões, lentilhas, ervilhas, soja); plantas oleaginosas (colza, mostarda, papoula, azeitona, girassol, coco, mamona, cacau, amendoim); plantas cucurbitáceas (abóbora, pepino, melão); plantas fibrosas (algodão, 5 linho, cânhamo, juta); frutas cítricas (laranja, limão, toronja, tangerina); vegetais (espinafre, cinamomo, cânfora) ou plantas tais como tabaco, nozes, beringela, cana-de-açúcar, chá, videiras, lúpulo, banana e borracha natural e plantas medicinais, assim como plantas 10 ornamentais. As culturas incluem aquelas que podem ser tornadas tolerantes a classes de fatores de crescimento por métodos de reprodução convencionais ou por métodos de engenharia genética. As ervas daninhas a serem controladas podem ser ervas daninhas monocotiledôneas e 15 dicotiledôneas, por exemplo *Stellaria*, *Nasturtium*, *Agrostis*, *Digitaria*, *Avena*, *Setaria*, *Sinapis*, *Lolium*, *Solanum*, *Echinochloa*, *Scirpus*, *Monochoria*, *Sagittaria*, *Bromus*, *Alopecurus*, *Sorghum halepense*, *Rottboellia*, *Cyperus*, *Abutilon*, *Sida*, *Xanthium*, *Amaranthus*, 20 *Chenopodium*, *Ipomoea*, *Chrysanthemum*, *Galium*, *Viola* e *Veronica*.

Os compostos da fórmula geral I são usados na forma não modificada ou, de preferência, junto com os excipientes convencionalmente empregados na técnica de 25 preparações. Para tanto eles são convenientemente formulados como concentrados de compostos ativos assim como suspensões e dispersões, de preferência soluções, suspensões e dispersões aquosas isotônicas, emulsões diluídas, pós solúveis, poeiras, granulados, cremes, géis, 30 suspensões oleosas e também encapsulações, por exemplo substâncias poliméricas. Assim como com o tipo de preparação, os métodos de aplicação, tais como aspersão, atomização, polvilhamento, espalhamento, revestimento ou despejamento, são escolhidos de acordo com os objetivos

pretendidos e com as circunstâncias predominantes. As preparações podem ser esterilizadas e/ou podem conter outros excipientes de natureza neutra tais como preservativos, estabilizantes, agentes umectantes ou emulgadores, agentes solubilizantes, assim como fertilizantes, doadores de micronutrientes ou outras formulações para obter efeitos especiais.

Os compostos de fórmula I podem ser misturados com outros reguladores do crescimento, resultando em atividades sinérgicas.

PREPARAÇÕES

As preparações compreendendo os compostos de fórmula geral I (ingredientes ativos) e, onde apropriado, um ou mais excipientes sólidos ou líquidos, são preparados de maneira conhecida per se, por exemplo por mistura e/ou trituração dos ingredientes ativos com excipientes, por exemplo solventes ou carreadores sólidos. Além disso, compostos tensoativos (tensoativos) também podem ser usados nas preparações.

Dependendo da natureza do composto de fórmula geral I a ser formulado, compostos tensoativos adequados são tensoativos não-iônicos, catiônicos e/ou aniônicos e misturas de tensoativos com boas propriedades emulsificantes, dispersantes e umectantes.

Exemplos de tensoativos aniônicos, não-iônicos e catiônicos adequados estão relacionados, por exemplo, no documento WO 97/34485.

Também adequados na preparação das composições contendo inibidores da citoquinina oxidase/desidrogenase derivados de derivados de 6-anilinopurina substituída de acordo com a invenção são os tensoativos convencionalmente usados na tecnologia de formulação, que estão descritos, inter alia, em "McCutcheon's Detergents and Emulsifiers Annual" MC Publishing Corp., Ridgewood New Jersey, 1981;

Stache, H., "Tensid-Taschenbuch", Carl Hanser Verlag, Munich, 1981; e M. & J.Ash, "Encyclopedia of Surfactants", Vol.1-3, Chemical Publishing Co., New York, 1980-81.

A formulação da preparação contendo inibidores da
5 citoquinina oxidase/desidrogenase geralmente contém de 0,1 a 95% em peso de ingrediente ativo, de 5 a 99,9% em peso de adjuvantes ou carreadores farmacêuticos sólidos ou líquidos, dependendo do método de aplicação, e de 0,1 a 25% em peso de um tensoativo.

10 Considerando que os produtos comerciais normalmente são formulados como concentrados, o usuário final normalmente vai empregar formulações diluídas. As composições também podem compreender outros ingredientes, tais como estabilizantes, por exemplo óleos vegetais ou
15 óleos vegetais epoxidados (óleo de coco epoxidado, óleo de semente de colza ou óleo de soja), antiespumantes, por exemplo óleo de silicone, preservativos, estabilizantes, agentes umectantes ou emulsificantes, fatores de viscosidade, aglutinantes, aderentes, e também
20 fertilizantes ou outros ingredientes ativos. As formulações preferidas têm especialmente as seguintes composições: (% = por cento em peso)

Concentrados emulsificáveis: mistura de ingredientes ativos: 1 a 90 %, de preferência 5 a 20 %;
25 tensoativo: 1 a 30 %, de preferência 10 a 20 %; carreador líquido: 5 a 94 %, de preferência 70 a 85 %

Poeiras: mistura de ingredientes ativos: 0,1 a 10 %, de preferência 0,1 a 5 %; carreador sólido: 99,9 a 90 %, de preferência 99,9 a 95 %

30 Concentrados de suspensão: mistura de ingredientes ativos: 5 a 75 %, de preferência 10 a 50 %; água: 94 a 24 %, de preferência 88 a 30 %; tensoativo: 1 a 40 %, de preferência 2 a 30 %

Pós umectáveis: mistura de ingredientes ativos: 0,5

a 90 %, de preferência 1 a 80 %; tensoativo: 0,5 a 20 %, de preferência 1 a 15 %; carreador sólido: 5 a 95 %, de preferência 15 a 90 %

Grânulos: mistura de ingredientes ativos: 0,1 a 30 %, de preferência 0,1 a 15 %; carreador sólido: 99,9 a 70 %, de preferência 99,9 a 85 %

As composições também podem compreender outros ingredientes, tais como estabilizantes, por exemplo óleos vegetais ou óleos vegetais epoxidados (óleo de coco epoxidado, óleo de semente de colza ou óleo de soja), antiespumantes, por exemplo óleo de silicone, preservativos, reguladores da viscosidade, aglutinantes, aderentes, e também fertilizantes ou outros ingredientes ativos. Para uso dos compostos de fórmula geral I, ou de composições compreendendo os mesmos, na proteção de culturas de plantas contra os efeitos nocivos dos reguladores de crescimento, são levados em consideração vários métodos e técnicas, tais como, por exemplo, os seguintes:

i) Revestimento de sementes

a) Revestimento das sementes com uma formulação em pó umectável de um composto de fórmula geral I por agitação em um recipiente até que esta esteja uniformemente distribuída em toda a superfície da semente (revestimento a seco). Neste procedimento são usados aproximadamente de 1 a 500 g de composto de fórmula geral I (4 g a 2 kg de pó umectável) por 100 kg de semente.

b) Revestimento das sementes com um concentrado emulsificável de um composto de fórmula I de acordo com o método a) (revestimento por via úmida).

c) Revestimento por imersão das sementes por um período de 1 a 72 horas em um licor compreende de 100 a 1000 ppm de um composto de fórmula geral I e de preferência subsequentemente secagem das sementes

(revestimento por imersão).

Revestimento das sementes ou tratamento das mudas germinadas são naturalmente os métodos de aplicação preferidos, porque o tratamento com os ingredientes ativos é totalmente direcionado à cultura alvo. Geralmente são usados de 1 a 1000 g de antídoto, de preferência de 5 a 250 g de antídoto, por 100 kg de semente, mas, dependendo da metodologia, que também permite a adição de outros ingredientes ativos ou micronutrientes, os limites da concentração podem variar para mais ou para menos (revestimento repetitivo).

ii) Aplicação como mistura de tanque

uma formulação líquida de uma mistura de antídoto e regulador do crescimento é usada (a proporção em peso de um para o outro sendo de 10:1 a 1 :100), a taxa de aplicação do regulador do crescimento sendo de 0,005 a 5,0 kg por hectare. Tais misturas de tanque são aplicadas antes ou depois da semeadura.

iii) Aplicação ao sulco das sementes

Os compostos de fórmula I são introduzidos nos sulcos das sementes semeadas a céu aberto na forma de um concentrado emulsificável, um pó umectável ou de grânulos. Depois de o sulco das sementes ser coberto, o regulador de crescimento é aplicado da maneira usual no processo de pré-emergência.

iv) Liberação controlada do ingrediente ativo

Os compostos de fórmula I são aplicados em solução a carreadores de grânulos minerais ou a grânulos polimerizados (ureia/formaldeído) e secados. Se desejado, também é possível aplicar um revestimento que permita que o ingrediente ativo seja liberado em quantidades reguladas durante um período de tempo específico (grânulos revestidos). As composições cosméticas compreendem de cerca de 0,05 % (p/p) a cerca de 10 % (p/p) do ingrediente

ativo, de preferência de cerca de 0,1 % (p/p) a cerca de 2 % (p/p). As composições cosméticas estão na forma de um creme, um aerossol, uma loção leitosa, uma loção, um emplastro, um cataplasma, um xampu, um batom, uma pasta, 5 uma pomada, uma pasta, uma tintura, um spray etc. Pomadas são emulsões de óleo em água, que compreendem no máximo 70 %, mas de preferência 20 - 50 % de água ou fase aquosa. A fase gordurosa consiste, em particular, em hidrocarbonetos, por exemplo vaselina, óleo de parafina ou 10 parafinas sólidas, que de preferência compreendem hidróxi compostos, tais como álcoois graxos ou ésteres dos mesmos, por exemplo álcool cetílico ou álcoois de lanolina, tais como lanolina, para melhorar a capacidade de ligação à água. Emulsificantes são substâncias lipofílicas, tais 15 como ésteres de ácidos graxos com sorbitan (Spans), de preferência oleato de sorbitan ou isoestearato de sorbitan. Aditivos para as fases aquosas são, por exemplo, umectantes, tais como poliálcoois, por exemplo glicerol, propileno glicol, sorbitol e polietileno glicol, ou 20 preservativos e substâncias aromatizantes.

Pomadas oleosas são anidras e compreendem como a base, em particular, hidrocarbonetos, por exemplo parafina, vaselina ou óleo de parafina, e ainda gorduras naturais ou semissintéticas, por exemplo triglicerídeos de 25 ácidos graxos de coco hidrogenados, ou óleos hidrogenados, por exemplo óleo de amendoim ou óleo de rícino hidrogenados, e ainda ésteres parciais de ácidos graxos de glicerol, por exemplo monoestearato e diestearato de glicerol. Elas também contêm por exemplo álcoois graxos, 30 emulsificantes e aditivos mencionados para pomadas que aumentam a absorção de água.

Cremes são emulsões de óleo em água, que compreendem mais de 50% de água. Bases oleosas são, em particular, álcoois graxos, por exemplo isopropil

miristato, lanolina, cera de abelha, ou hidrocarbonetos, por exemplo vaselina (petrolato) ou óleo de parafina. Emulsificantes substâncias tensoativas com propriedades predominantemente hidrófilas, tais como emulsificantes não-iônicos correspondentes, por exemplo ésteres de ácidos graxos com poliálcoois ou adutos de etilenoóxi dos mesmos, tais como ésteres de ácido graxo poliglicérico ou ésteres de ácido graxo com polietileno sorbitan ou ésteres de álcool graxo com polioxietileno ou ésteres de ácido graxo com polioxietileno, ou emulsificantes iônicos, tais como sais de metais alcalinos de sulfatos de álcoois graxos, de preferência lauril sulfato de sódio, cetil sulfato de sódio ou estearil sulfato de sódio, que são normalmente usados na presença de álcoois graxos, por exemplo álcool cetil estearílico ou álcool estearílico. Aditivos para a fase aquosa são, entre outros, agentes que impedem o creme de secar, por exemplo poliálcoois, tais como glicerol, sorbitol, propileno glicol e polietileno glicóis, e ainda preservativos e substâncias aromatizantes.

Pastas são cremes ou pomadas contendo constituintes em pó absorvedores de secreção, tais como óxidos metálicos, por exemplo óxido de titânio ou óxido de zinco, e ainda talco ou silicatos de alumínio, que têm a função de ligar a umidade ou as secreções presentes.

Suspensões em óleo compreendem, como o componente oleoso, óleos vegetais, sintéticos ou semissintéticos, comumente usados para injeção. Os óleos que podem ser mencionados são em particular, ésteres de ácidos graxos líquidos que contêm, como o componente ácido, um ácido graxo de cadeia longa tendo 8 - 22, em particular 12-22, átomos de carbono, por exemplo ácido láurico, ácido tridecílico, ácido mirístico, ácido pentadecílico, ácido palítico, ácido margárico, ácido esteárico, ácido

araquidônico, ácido beênico ou ácidos insaturados correspondentes, por exemplo ácido oleico, ácido elaídico, ácido eúrico, ácido brasídico e ácido linoleico, se apropriado com adição de antioxidantes, por exemplo
 5 vitamina E, β -caroteno ou 3,5-di-ter-butil-4-hidroxitolueno. O componente álcool desses ésteres de ácidos graxos possui no máximo 6 átomos de carbono e é monohídrico ou polihídrico, por exemplo álcool monohídrico, dihídrico ou trihídrico, por exemplo metanol,
 10 etanol, propanol, butanol, ou pentanol, ou isômeros dos mesmos, mas em particular glicol e glicerol. Ésteres de ácidos graxos são portanto, por exemplo: etil oleato, isopropil miristato, isopropil palmitato, "Labrafil M 2375" (polioxietileno glicerol trioleato da Gattefosc,
 15 Paris), "Labrafil M 1944 CS" (glicerídeos poliglicolados insaturados preparados por alcoólise de óleo de caroço de damasco e constituídos de glicerídeos e polietileno glicol ésteres; da Gattefosc, Paris), "Labrasol" (glicerídeos poliglicolados saturados preparados por alcoólise de TCM e
 20 constituídos de glicerídeos e polietileno glicol ésteres; da Gattefosc, Paris), "Miglyol 812" (triglicerídeo de ácidos graxos saturados de cadeia longa C_8 a C_{12} da Hills AG, Alemanha), e em particular óleos vegetais, tais como óleo de algodão, óleo de amêndoa, óleo de oliva, óleo de
 25 rícino, óleo de gergelim, óleo de soja e óleo de amendoim.

As espumas são administradas a partir de recipientes pressurizados e elas são emulsões de óleo em água líquidas presentes em espuma aerossol. Como gases propelentes são usados hidrocarbonetos halogenados, tais
 30 como alcanos polihalogenados, por exemplo diclorofluormetano e diclorotetrafluoretano, ou, de preferência, hidrocarbonetos gasos não halogenados, ar, N_2O , ou dióxido de carbono. As fases oleosas usadas são, entre outras, aquelas mencionadas acima para pomadas, e os

aditivos mencionados são igualmente usados. Tinturas e soluções usualmente compreendem uma base aquosa-etanólica à qual são misturados umectantes para reduzir a evaporação, tais como poliálcoois, por exemplo glicerol, glicóis e polietileno glicol, substâncias reoleantes, tais como ésteres de ácidos graxos com polietileno glicóis inferiores, i.e., substâncias lipofílicas solúveis na mistura aquosa para substituir as substâncias oleosas removidas da pele com o etanol, e, se necessários, outros excipientes e aditivos.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A Figura 1 mostra uma complementação do fenótipo do tipo selvagem depois de tratamento sistemática de plantas superprodutoras de CKX com o composto 12. + média tratada, - média não tratada.

A Figura 2 documenta o efeito da aplicação foliar do composto 12 na melhora das raízes de plantas de tabaco superprodutoras de CKX. - média não tratada, + média tratada.

A Figura 3 mostra uma comparação do efeito da aplicação de citoquinina e de inibidor da CKX na complementação do fenótipo do tipo selvagem de mudas de AtCKX1 Arabidopsis. (A) AtCKX1, (B) AtCKX1 cultivadas em 0,1 μ M do composto 12, (C) AtCKX1 cultivadas em 0,1 μ M de BAP, (D) planta de controle com fenótipo do tipo selvagem.

A Figura 4 ilustra o efeito do composto 12 na floração de plantas de Arabidopsis.

A Figura 5 mostra o efeito da 2-cloro-6-anilinopurina na frequência de ligação de fibroblastos humanos. Os valores estão mostrados em relação ao controle.

A Figura 6 ilustra o efeito da 2-cloro-6-anilinopurina na viabilidade das células depois de 3 dias. Os valores estão mostrados em relação ao controle.

A Figura 7 mostra a curva de crescimento de fibroblastos diploides humanos BJ tratados com 2-cloro-6-anilinopurina.

A Figura 8 mostra o número de células depois de 5 tratamento com 2-cloro-6-anilinopurina depois de 7 e 14 dias. Os valores estão mostrados em relação ao controle.

A Figura 9 mostra a fórmula geral I.

Exemplos de realização da invenção

O material de partida para os compostos de fórmula 10 I é a 2,6-dicloropurina. Um outro material de partida pode ser a 2-amino-6-cloropurina ou a 2-fluor-6-cloropurina, sintetizada a partir de 2-amino-6-cloropurina por reação com ácido tetrafluorbórico na presença de uma solução aquosa de nitrato de sódio (Beach et al., 1992).

15 Um outro composto de partida, a 2-bromo-6-cloropurina, pode ser preparado a partir de 2-amino-6-cloropurina por diazotização com nitrito de t-butil e subsequente bromação na presença de um doador de bromo adequado (Kim Hak Sung et al.; J.Med. Chem, 46; 23; 2003; 20 4974-4987). Ainda um outro material de partida pode ser a 2-metil-6-cloropurina, que pode ser preparada a partir de 6-cloro-2-iodopurina por acoplamento cruzado de Stille (Kim et al., 2003). Ainda um outro material de partida pode ser a 2-nitro-6-cloro-9-Boc-purina, que pode ser 25 preparada a partir de 6-cloropurina (Rodenko et al.; J .Am. Chem .Soc. 2005, 127, 5957-5963).

Fenilaminas substituídas de partida, não comercialmente disponíveis (outras adquiridas na Sigma Aldrich ou Fluorchem), foram preparadas a partir dos 30 aldeídos correspondentes na presença de um catalisador adequado. Estas, que podem ter mais grupos hidroxil, também podem ser preparadas por desmetilação de metoxiderivados apropriados usando 48% de HBr em um em uma atmosfera de N₂.

As análises elementais (C, H e N) foram efetuadas em um analisador EAl 108 CHN (Fissons Instruments). Os pontos de fusão foram determinados em um aparelho BUCHI Melting Point B-540. Cromatografia em camada fina (TLC) analítica foi feita usando placas 60 WF₂₅₄ de sílica gel (Merck), fase móvel CHCl₃ :MeOH: NH₄OH conc. (8:2:0,2, v/v/v). Os espectros de massa ES+ foram registrados usando uma sonda direta no espectrômetro de massas Waters ZMD 2000. O intervalo de monitoramento da massa foi de 10 - 1500 amu. Os espectros foram coletados usando imagens cíclicas a intervalos de 3,0 segundo e aplicando uma voltagem de cone de 25 V à amostra a uma temperatura de bloco da fonte de 150°C, temperatura de dessolvatação de 80°C e uma taxa de fluxo de gás de dessolvatação de 200 I/hora. O espectrômetro de massas foi acoplado diretamente a um sistema de dados MassLynx. Os espectros de RMN foram medidos em um espectrômetro Bruker Avance AV 300 operando a uma temperatura de 300°K e a uma frequência de 300,13 MHz (¹H) e 75,48 MHz (¹³C), respectivamente. As amostras foram preparadas por dissolução dos compostos em DMSO-d₆. Tetrametilsilano (TMS) foi usado como o padrão interno.

Exemplo 1

2-Cloro-6-arililopurina

Anilina (4,66 g; 0,05 mol) foi adicionada a uma suspensão de 2,6-dicloropurina (5,67 g; 0,03 mol) em n-propanol (60 ml) e N,N-etildiisopropilamina (6,44 g; 0,05 mol) foi adicionada. A mistura reacional foi agitada a 100 °C por 4 horas. Depois de esfriar para a temperatura ambiente o precipitado foi removido por filtração, lavado com n-propanol (2x10 ml) e água (3x10 ml) e secado no forno de secagem a 60°C até atingir um peso constante.

Rendimento: 6,26 g de uma substância amarelada (84,9 %). TLC (clorofórmio-metanol; 85:15): uma única mancha; livre do material de partida, pureza por HPLC:

98+%

Exemplo 2

2-Cloro-6-(3-cloroanilino)purina

2,6-Dicloropurina (3,78 g; 0,02 mol) foi reagida
5 com 3-cloroanilina (3,83 g; 0,03 mol) em n-butanol (40 ml)
na presença de trietilamina (7 ml; 0,05 mol) a 110 °C por
3 horas. Depois de esfriar para a temperatura ambiente a
mistura reacional foi agitada a 0 °C por 2 horas. O
precipitado amarelo foi removido por filtração, lavado com
10 n-butanol frio (2x10 ml), água (3x10 ml) e secado no forno
de secagem a 60 °C até atingir um peso constante.
Rendimento: 3,69 g de um pó cristalino amarelo (65,8 %). O
produto bruto foi cristalizado a partir de isopropanol
para dar 2,85 g de uma substância pura. TLC (clorofórmio-
15 metanol; 85:15): uma única mancha; livre do material de
partida. Pureza por HPLC: 98+ %

Exemplo 3

2-Cloro-6-(3-fluoranilino)purina

Este composto foi preparado de maneira similar
20 àquela descrita no exemplo 2, por reação de 2,6-
dicloropurina com 3-fluoranilina. A mistura reacional foi
então evaporada em um evaporador rotativo a vácuo e o
resíduo foi distribuído entre etil acetato e HCl 0,5 M. A
camada orgânica foi lavada com água, secada com MgSO₄, e
25 evaporada para dar um sólido amarelo (3,72 g). O produto
bruto foi purificado por cromatografia por flash.
Rendimento: 2,20 g de um pó cristalino amarelo. TLC
(clorofórmio-metanol; 85:15): homogêneo. pureza por HPLC:
98+ %

30 Exemplo 4

2-Cloro-6-(3-hidroxianilino)purina

Este composto foi preparado por reação de 2,6-
dicloropurina (3,78 g; 0,02 mol), 3-aminofenol (3,27 g;
0,03 mol), e N,N-etildiisopropilamina (6,44 g; 0,05 mol)

em n-butanol (40 ml) a 90°C por 4 horas. A mistura reacional foi então deixada esfriar para a temperatura ambiente e agitada. O precipitado cristalino formado foi recolhido, enxaguado com n-butanol frio (3x10 ml), água
5 (3x10 ml) e secado no forno até atingir um peso constante.

TLC (clorofórmio-metanol; 85:15): homogêneo. pureza por HPLC: 98+ %

Exemplo 5

2-Cloro-6-(3-metoxianilino)purina

10 A uma suspensão de 2,6-dicloropurina (3,78 g; 0,02 mol) e m-anisidina (3,69 g; 0,03 mol) em n-pentanol (40 ml), trietilamina (7 ml; 0,05 mol) foi adicionada. A mistura reacional foi agitada a 100 °C por 4 horas e em seguida foi deixada esfriar para a temperatura ambiente.
15 O precipitado branco foi recolhido, lavado com isopropanol (2x10 ml) e água (3x10 ml). O produto bruto foi purificado por cristalização a partir de metanol na presença de carvão vegetal ativo para dar cristais brancos. Rendimento: 4,36 g (77,8 %). TLC (clorofórmio-metanol;
20 85:15): uma única mancha, livre do material de partida, pureza por HPLC :98+ %

Tabela 1: Compostos preparados pelos métodos dos Exemplos 1-5

Purina Substituinte			Análises de CHN	Análises ZMD por MS	
	R6	R2	[%]	[M-H] ⁻ a)	[M+H] ⁺ b)
1	anilino	cloro	C=53,5;H=3,3;N=28,6	244	246
2	2-cloroanilino	cloro	C=46,8;H=2,9;N=24,7	278	280
3	3-cloroanilino	cloro	C=46,8;H=2,9;N=24,6	278	280
4	4-cloroanilino	cloro	C=46,9;H=3,0;N=24,7	278	280
5	2-fluoranolino	cloro	C=49,9;H=3,0;N=26,5	262	264
6	3-fluoranolino	cloro	C=49,7;H=3,0;N=26,7	262	264
7	4-fluoranolino	cloro	C=49,8;H=3,1;N=26,4	262	264
8	2-hidroxianilino	cloro	C=49,7;H=3,1;N=26,7	260	262
9	3-hidroxianilino	cloro	C=49,9;H=3,2;N=26,7	260	262
10	4-hidroxianilino	cloro	C=50,5;H=3,1;N=26,8	260	262
11	2-metoxianilino	cloro	C=51,4;H=3,8;N=25,5	274	276
12	3-	cloro	C=51,8;H=3,8;N=25,2	274	276

	metoxianilino				
13	4-metoxianilino	cloro	C=52,0;H=3,7;N=25,2	274	276
14	2-aminoanilino	cloro	C=50,5;H=3,2;N=32,8	259	261
15	3-aminoanilino	cloro	C=50,6;H=3,2;N=32,5	259	261
16	4-aminoanilino	cloro	C=50,4;H=3,3;N=32,3	259	261
17	3,4-dimetoxianilino	cloro	C=51,3;H=3,9;N=23,3	304	306
18	2,5-dimetoxianilino	cloro	C=51,3;H=4,0;N=23,2	304	306
19	3,4,5-trimetoxianilino	cloro	C=49,9;H=4,2;N=21,0	334	336
20	3,4-dihidroxianilino	cloro	C=47,2;H=2,8;N=25,5	276	278
21	2,5-dihidroxianilino	cloro	C=47,3;H=2,8;N=25,6	276	278
22	2-cloro-5-metoxianilino	cloro	C=46,3;H=2,9;N=22,7	308	310
23	2-cloro-3-metoxianilino	cloro	C=46,4;H=2,9;N=22,7	308	310
24	2-bromo-3-metoxianilino	cloro	C=40,8;H=2,5;N=19,4	353	355
25	2-metoxi-3-cloroanilino	cloro	C=46,4;H=3,0;N=22,6	308	310
26	3-etoxianilino	cloro	C=53,8;H=4,1;N=24,3	288	290
27	2-hidroxi-5-metilanilino	cloro	C=51,9;H=3,6;N=25,7	274	276
28	3-hidroxi-4-metilanilino	cloro	C=52,1;H=3,7;N=25,5	274	276
29	3-hidroxi-2-metilanilino	cloro	C=52,1;H=3,8;N=25,4	274	276
30	3,4-dimetilanilino	cloro	C=56,8;H=4,1;N=25,7	272	274
31	2-hidroxi-3-metoxianilino	cloro	C=49,3;H=3,6;N=24,3	290	292
32	2-hidroxi-4-metoxianilino	cloro	C=49,2;H=3,7;N=24,7	290	292
33	4-hidroxi-3,5-dimetoxianilino	cloro	C=48,2;H=3,6;N=21,9	320	322
34	2,3-difluoroanilino	cloro	C=46,6;H=2,0;N=25,1	280	282
35	2,4-difluoroanilino	cloro	C=46,7;H=2,0;N=25,1	280	282
36	2,3,4-trifluoroanilino	cloro	C=43,6;H=1,6;N=23,7	280	280
37	2,4,5-trifluoroanilino	cloro	C=43,8;H=1,6;N=23,6	280	282
38	2,3-dicloroanilino	cloro	C=42,3;H=2,0;N=22,0	312	314
39	2,4-dicloroanilino	cloro	C=42,0;H=2,0;N=22,2	312	314

Exemplo 6

2-Amino-6-(3-metoxianilino)purina

A uma suspensão de 2-amino-6-cloropurina (1,69 g; 0,01 mol) e m-anisidina (1,23 g; 0,01 mol) em n-butanol (20 ml), trietilamina (3,5 ml; 0,025 mol) foi adicionada. A suspensão grossa resultante foi agitada a 110 °C por 3 horas. A TLC mostrou ausência do material de partida e a presença do produto desejado. A mistura reacional foi então resfriada para a temperatura ambiente. O precipitado branco foi removido por filtração, enxaguado com n-butanol (3x10 ml) e água (3x10 ml) e secado no forno de secagem até atingir um peso constante. Rendimento: 2,19 g (85 %). O produto bruto foi purificado como o sal de cloridrato por cristalização a partir de cloreto de hidrogênio metanólico 2,5 M para dar 2,17 g de cristais quase brancos (como cloridrato). TLC (clorofórmio-metanol-NiLjOH; 4:1:0,05): uma única mancha, livre do material de partida. pureza por HPLC: 99+ %.

Tabela 2: Compostos preparados pelo método do Exemplo 6

	Purina Substituente		Análises de CHN	Análises ZMD por MS	
	R6	R2	[%]	[M-H] ⁻ a)	[M+H] ⁺ b)
40	Anilino	flúor	C=57,6;H=3,5;N=30,7	228	230
41	2-cloroanilino	flúor	C=49,7;H=2,7;N=26,8	262	264
42	3-cloroanilino	flúor	C=49,9;H=2,7;N=26,7	262	264
43	4-cloroanilino	flúor	C=50,0;H=2,7;N=26,7	262	264
44	2-fluoranolino	flúor	C=53,4;H=2,7;N=28,5	246	248
45	3-fluoranolino	flúor	C=53,3;H=2,7;N=28,5	246	248
46	4-fluoranolino	flúor	C=53,4;H=2,8;N=28,4	246	248
47	2-hidroxianilino	flúor	C=53,0;H=3,4;N=28,3	244	246
48	3-hidroxianilino	flúor	C=53,4;H=3,4;N=28,2	244	246
49	4-hidroxianilino	flúor	C=53,9;H=3,3;N=28,5	244	246
50	2-metoxianilino	flúor	C=54,7;H=4,1;N=27,0	258	260
51	3-metoxianilino	flúor	C=55,1;H=4,0;N=26,9	258	260
52	4-metoxianilino	flúor	C=55,0;H=4,0;N=27,4	258	260
53	3,4-dimetoxianilino	flúor	C=53,7;H=3,9;N=24,8	288	290
54	2,5-dimetoxianilino	flúor	C=53,6;H=4,0;N=24,5	288	290
55	3,4-dihidroxianilino	flúor	C=50,2;H=3,0;N=27,3	260	262

56	2,5-dihidroxianilino	flúor	C=50,2;H=3,0;N=27,2	260	262
57	2-cloro-5-metoxianilino	flúor	C=49,0;H=3,1;N=24,0	292	294
58	2-metoxi-3-cloroanilino	flúor	C=48,0;H=3,0;N=24,0	292	294
59	3-etoxianilino	flúor	C=56,8;H=4,2;N=26,0	272	274
60	2-hidroxi-5-metilanilino	flúor	C=55,2;H=3,8;N=27,2	258	260
61	3-hidroxi-4-metilanilino	flúor	C=55,3;H=3,8;N=27,2	258	260
62	3-hidroxi-2-metilanilino	flúor	C=55,3;H=3,9;N=27,0	258	260
63	3,4-dimetilanilino	flúor	C=60,4;H=4,6;N=27,4	256	258

Exemplo 7

2-Fluor-6-(3-metoxianilino)purina

Este composto foi preparado por reação de 2-fluor-6-cloropurina (1,7 g; 0,01 mol), m-anisidina (1,23 g; 0,01 mol) e trietilamina (3,5 ml; 0,025 mol) em n-butanol (20 ml) a 90 °C por 4 horas. A mistura reacional foi então resfriada para a temperatura ambiente. O precipitado branco foi removido por filtração, enxaguado com n-butanol (3x10 ml) e água (3x10 ml) e secado no forno de secagem até atingir um peso constante.

Rendimento: 5,55 g (61 %) de um pó cristalino amarelado. TLC (clorofórmio-metanol; 85:15): uma única mancha. pureza por HPLC: 99+ %.

Tabela 3: Compostos preparados pelo método do Exemplo 7

	Purina Substituinte		Análises de CHN	Análises ZMD por MS	
	R6	R2	[%]	[M-H] ⁻ a)	[M+H] ⁺ b)
64	Anilino	amino	C=58,2;H=4,4;N=37,5	225	227
65	2-cloroanilino	amino	C=50,2;H=3,3;N=32,9	259	261
66	3-cloroanilino	amino	C=50,5;H=3,4;N=32,6	259	261
67	4-cloroanilino	amino	C=50,5;H=3,4;N=32,5	259	261
68	2-fluoranilino	amino	C=53,8;H=3,7;N=34,7	243	245
69	3-fluoranilino	amino	C=53,9;H=3,6;N=34,8	243	245
70	4-fluoranilino	amino	C=54,0;H=3,7;N=34,5	243	245
71	2-hidroxianilino	amino	C=54,0;H=4,1;N=34,9	241	243
72	3-hidroxianilino	amino	C=54,1;H=4,2;N=34,8	241	243
73	4-hidroxianilino	amino	C=54,4;H=4,2;N=34,7	241	243
74	2-metoxianilino	amino	C=55,9;H=4,7;N=33,0	255	257
75	3-metoxianilino	amino	C=56,0;H=4,8;N=32,9	255	257
76	4-metoxianilino	amino	C=56,3;H=4,7;N=32,9	255	257

77	3,4-dimetoxianilino	amino	C=51,0;H=5,5;N=33,4	253	255
----	---------------------	-------	---------------------	-----	-----

Exemplo 8

2-Tioxantina

4,5-Diamino-6-hidroxi-2-tiopirimidina (PM 158, Aldrich 95 %, 100 g) foi refluxada com ácido fórmico a 90% (500 ml) por 2 horas com agitação mecânica. A mistura inicialmente solidificou e mais 100 ml de ácido fórmico foram adicionados. A mistura foi resfriada para 1°C em gelo e em seguida foi filtrada para dar a 4-amino-5-formamido-6-hidroxi-2-tiopirimidina bruta que foi secada a vácuo por 30 minutos. A torta de filtrado foi ressuspendida em formamida (225 ml) e aquecida até 175-185 °C em um banho de parafina líquida com agitação manual ocasional por 2 horas. Subsequentemente, a mistura reacional foi resfriada para a temperatura ambiente e filtrada. A mistura foi dissolvida em aproximadamente 2 l de NaOH 1 M, filtrada, e secada a vácuo a 95°C por 2 horas. Rendimento 103 g (97 %).

Exemplo 9

2-Benziltio-6-purinol

5,28 g 8-tioxantina foi suspendida em 78,5 ml de NaOH 1 M e a mistura foi diluída até aproximadamente 400 ml com água. (O material de partida não dissolveu completamente mesmo com um excesso 2,5 vezes maior de base.) 3,7 ml de cloreto de benzil foram então adicionados de uma só vez e a mistura foi vigorosamente agitada por aproximadamente 3 horas à temperatura ambiente, e em seguida o pH foi ajustado em 5 com AcOH glacial para formar um precipitado vermelho, que foi filtrado, lavado vigorosamente com água e secado a vácuo por uma noite a 80 °C para dar 7,33 g de um sólido rosa-salmão que foi usado sem purificação posterior.

Exemplo 10

2-Benziltio-6-cloropurina

2-Benziltioxantina (27,6 g, 0,107 mmol) foi coberta com POCl₃ (506 ml) e N,N-dietilanilina (40 ml) foi adicionada. A mistura foi refluxada por 1,5 hora. O excesso de oxicloreto foi removido a vácuo para dar um xarope que foi despejado em gelo (2 kg). Hidróxido de sódio foi adicionado, com resfriamento, para dissolver o sólido formado. A mistura foi acidificada até pH 1 com HCl concentrado para dar um sólido que foi removido por filtração, lavado com água e secado a vácuo a 70 °C por várias horas. O produto bruto, em pó, foi misturado com uma pequena quantidade de metanol e o sólido amarelo foi secado a vácuo a 70 °C por várias horas. Rendimento 17,5 g (59%). 2-benziltio-6-cloropurina bruta e 2-benziltioxantina dissolvem facilmente em DMSO. TLC (clorofórmio/ MeOH; v/v): sem material de partida. O produto bruto foi purificado por cromatografia sobre 125 g de sílica acondicionada e eluído com 2,5% MeOH/clorofórmio. Os eluatos 7 a 36 do produto foram secados até deixar um sólido amarelo e o produto purificado por cromatografia recristalizou a partir de MeOH aquoso a 50%. O produto foi um sólido branco que foi secado em cloreto de cálcio seguido de pentóxido de fósforo a 45°C por uma noite até atingir um peso constante. Rendimento: 3 g. P.f. 176-178°C, nítido, sem decomposição. TLC (SILICA-5% MeOH/clorofórmio). Mancha principal única e nítida (0,53). pureza por HPLC: 95+ %

Exemplo 11 2-Benziltio-6-anilinopurina

2-Benziltio-6-cloropurina (3,9 g) e anilina (3,42 g) em n-BuOH (100 ml) na presença de trietilamina (7,5 ml) foram refluxadas por 2 horas. A mistura reacional foi resfriada para a temperatura ambiente, secada em um evaporador rotativo a vácuo, resfriada com gelo e 400 ml de água foram adicionados com agitação vigorosa. Depois de repousar por uma noite a -16 °C formou-se um sólido

castanho escuro, que foi secado até atingir um peso constante e foi purificado por cromatografia sobre 100 g de sílica acondicionada em clorofórmio. A coluna foi eluída com 500 ml de clorofórmio a 100% seguidos de 500 ml 5 MeOH a 1,25%/clorofórmio e em seguida 1,5 l de MeOH a 2,5%/clorofórmio; as frações de 100 ml recolhidas e as frações 12 a 15 foram secadas para deixar um sólido castanho claro que foi recristalizado a partir de MeOH na presença de carvão ativo. Rendimento 1,18 g de um sólido 10 amorfo branco. TLC (2,5% MeOH/clorofórmio) mostra apenas uma única mancha sem contaminantes. pureza por HPLC: 98+%.

Exemplo 12 2-Tio-6-anilinopurina

2-Benziltio-6-anilinopurina (1,18 g) foi dissolvida em amônia líquida (125 ml). Sódio foi adicionado aos 15 poucos até surgir uma coloração azul persistente. Uma pequena quantidade de cloreto de amônio sólido foi cuidadosamente adicionada para remover o excesso de Na. A amônia foi evaporada até deixar um pequeno volume sobre uma placa quente e éter (125 ml) foi adicionado. A maior 20 parte da amônia remanescente foi extraída com água (2 x 65 ml). O pH do extrato aquoso foi ajustado em 5 com AcOH seguido de resfriamento para menos de -10°C em gelo seco. Um sólido cremoso precipitou-se. O sólido foi filtrado, lavado vigorosamente com água e secado por uma noite em 25 cloreto de cálcio para deixar um pó virtualmente branco. Rendimento 760 mg. TLC: sem contaminantes. pureza por HPLC: 95%.

Tabela 4: Compostos preparados pelo método do Exemplo 12

	Purina Substituinte		Análises de CHN	Análises ZMD por MS	
	R6	R2	[%]	[M-H] ⁻ a)	[M+H] ⁺ b)
78	anilino	tio	C=54,0;H=3,5;N=29,0	242	244
79	2-cloroanilino	tio	C=47,2;H=2,7;N=25,4	276	278
80	3-cloroanilino	tio	C=47,4;H=2,8;N=25,1	276	278
81	4-cloroanilino	tio	C=47,4;H=2,8;N=25,2	276	278
82	2-fluoranilino	tio	C=50,0;H=3,0;N=27,0	260	262
83	3-fluoranilino	tio	C=50,5;H=2,8;N=27,0	260	262
84	4-fluoranilino	tio	C=50,4;H=3,0;N=27,2	260	262

85	2-hidroxianilino	tio	C=50,6;H=3,4;N=27,2	258	260
86	3-hidroxianilino	tio	C=50,2;H=3,2;N=27,7	258	260
87	2-metoxianilino	tio	C=52,5;H=4,0;N=26,0	272	274
88	3-metoxianilino	tio	C=52,6;H=4,1;N=25,7	272	274
89	4-metoxianilino	tio	C=52,5;H=4,0;N=25,9	272	274
90	3,4-dimetoxianilino	tio	C=51,7;H=4,1;N=23,5	302	304
91	2,5-dimetoxianilino	tio	C=51,1;H=4,3;N=23,3	302	304
92	2-cloro-5-metoxianilino	tio	C=46,3;H=3,1;N=22,9	306	308
93	2-metoxi-3-cloroanilino	tio	C=46,4;H=3,2;N=22,9	306	308

Exemplo 13

2-Metiltioxantina

A uma solução recém-preparada de 2-tioxantina (103 g, 0,613 mol) foi dissolvida em NaOH 2 M (613 ml) e água 5 (245 ml), dimetil sulfato (77 g, 58 ml) foi adicionado em gotas, a temperatura sendo mantida entre 25 e 40°C. A mistura reacional foi agitada por 1 hora e deixada repousar à temperatura ambiente por uma noite. Em seguida o líquido vermelho escuro foi filtrado e o produto foi 10 precipitado com ácido acético glacial. Depois de filtração, o sólido foi recristalizado a partir de água fervente (1500 ml). O produto cristalizou a -10°C, foi filtrado e secado a vácuo a 95°C por 3 horas, e em seguida em pentóxido de fósforo até atingir um peso constante. 15 Rendimento: 48 g. pureza por HPLC: 80%.

Exemplo 14

2-Metiltio-6-cloropurina

2-Metiltioxantina (65 g) foi misturada com POCl₃ (975 ml) e N,N-dietilanilina (97,5 ml). A mistura foi 20 refluxada com agitação mecânica por 90 minutos. O excesso de POCl₃ foi removido a vácuo com um evaporador rotativo a vácuo a 55-60°C e o resíduo foi despejado em gelo (0°C, 1,75 kg). A mistura foi agitada por 10 minutos para terminar a hidrólise do POCl₃ e foi extraída com etil 25 acetato (4 x 2,5 l). Os extratos de etil acetato combinados foram lavados com água e secados para dar um

sólido escuro. O sólido bruto foi recristalizado com descoloração por carvão ativo a partir de etanol e secado em pentóxido de fósforo até atingir um peso constante. Rendimento 23,6 g (33%). pureza por HPLC: 99%. TLC
5 (clorofórmio/metanol, 9/1) sem impurezas.

Exemplo 15

2-Metiltio-6-anilinopurina

2-metiltio-6-cloropurina (10 g, 50 mmol), anilina (7,7 g, 63 mmol) e trietilamina (35 ml, 250 mmol) foram
10 refluxadas em butanol (400 ml) por 2 horas. O butanol foi removido a vácuo e água (290 ml) adicionada ao resíduo frio. O pH foi ajustado em 8,0, e a mistura foi deixada a -16 °C por uma noite. Filtração e secagem a vácuo em pentóxido de fósforo deu 10 g do produto bruto verde
15 amarelado. O produto foi purificado por cromatografia (250 g sílica, Fisons, clorofórmio); eluído com clorofórmio/metanol (97/3, v/v). As frações apropriadas foram secadas a vácuo, recristalizadas a partir de etanol com descoloração por carvão ativo. Depois de secar em P₂O₅
20 até atingir um peso constante, deu 5,76 g, (46%), pureza por HPLC >98%. TLC: clorofórmio/metanol (9/1, v/v), sem contaminantes.

Tabela 5: Compostos preparados pelo método do Exemplo 15

	Purina Substituinte		Análises de CHN	Análises ZMD por MS	
	R6	R2	[%]	[M-H] ⁻ a)	[M+H] ⁺ b)
94	anilino	metil tio	C=55,9;H=4,2;N=27,3	256	258
95	2-cloroanilino	metil tio	C=49,1;H=3,3;N=24,3	290	292
96	3-cloroanilino	metil tio	C=49,1;H=3,1;N=24,1	290	292
97	2-fluoranilino	metil tio	C=52,2;H=3,7;N=25,3	274	276
98	3-fluoranilino	metil tio	C=52,4;H=3,6;N=25,4	274	276
99	4-fluoranilino	metil tio	C=51,9;H=3,4;N=25,6	274	276
100	2-hidroxianilino	metil tio	C=52,5;H=4,0;N=25,8	272	274
101	3-hidroxianilino	metil tio	C=52,5;H=4,0;N=25,7	272	274

102	2-metoxianilino	metil tío	C=54,3;H=4,4;N=24,6	286	288
103	3-metoxianilino	metil tío	C=54,0;H=4,4;N=24,9	286	288
104	4-metoxianilino	metil tío	C=53,8;H=4,3;N=24,7	286	288
105	3,4-dimetoxianilino	metil tío	C=52,6;H=4,7;N=22,2	316	318
106	2,5-dimetoxianilino	metil tío	C=52,9;H=4,8;N=22,2	316	318
107	2-cloro-5-metoxianilino	metil tío	C=48,8;H=4,7;N=22,0	320	322
108	2-metoxi-3-cloroanilino	metil tío	C=48,1;H=5,3;N=21,3	320	322

Exemplo 16

2-Metil-6-(3-metoxianilino)purina

A uma suspensão de 2-metil-6-cloropurina (1,69 g; 0,01 mol) e m-anisidina (1,23 g; 0,01 mol) em n-butanol 5 (20 ml), trietilamina (3,5 ml; 0,025 mol) foi adicionada. A suspensão grossa resultante foi agitada a 110 °C por 3 horas, quando TLC mostrou ausência do material de partida e a presença do produto desejado. A mistura reacional foi então resfriada para a temperatura ambiente. O precipitado 10 branco foi removido por filtração, enxaguado com n-butanol (2x10 ml) e água (3x10 ml) e secado até atingir um peso constante. Rendimento: 1,92 g (75 %). O produto bruto foi purificado como o sal de cloridrato por cristalização a partir de ácido clorídrico metanólico 2,5 M. TLC 15 (clorofórmio-metanol-NH₄OH; 4:1:0,05): uma única mancha, livre do material de partida. pureza por HPLC: 99+ %.

Tabela 6: Compostos preparados pelo método do Exemplo 16

	Purina Substituinte		Análises de CHN	Análises ZMD por MS	
	R6	R2	[%]	[M-H] ⁻ a)	[M+H] ⁺ b)
109	anilino	metil	C=63,8;H=4,9;N=31,2	224	226
110	2-cloroanilino	metil	C=53,3;H=3,7;N=27,3	258	260
111	3-cloroanilino	metil	C=55,3;H=3,8;N=27,3	258	260
112	2-fluoranolino	metil	C=59,0;H=4,1;N=29,0	242	244
113	3-fluoranolino	metil	C=59,2;H=4,2;N=29,1	242	244
114	4-fluoranolino	metil	C=59,1;H=4,1;N=29,0	242	244
115	2-hidroxianilino	metil	C=60,0;H=4,6;N=29,2	240	242
116	3-hidroxianilino	metil	C=59,9;H=4,6;N=29,1	240	242
117	2-	metil	C=61,1;H=5,2;N=27,9	254	256

	metoxianilino				
118	3-metoxianilino	metil	C=60,8;H=5,1;N=27,5	254	256
119	4-metoxianilino	metil	C=61,0;H=5,1;N=27,5	254	256
120	3,4-dimetoxianilino	metil	C=58,5;H=5,1;N=24,9	284	286
121	2,5-dimetoxianilino	metil	C=58,8;H=5,1;N=24,6	284	286
122	2-cloro-5-metoxianilino	metil	C=53,7;H=4,1;N=24,3	288	290
123	2-metoxi-3-cloroanilino	metil	C=53,8;H=4,2;N=24,6	288	290

Exemplo 17

2-Bromo-6-(metoxianilino)purina

2-Bromo-6-(metoxianilino)purina foi preparada de maneira semelhante àquela do exemplo 5 por reação de 2-bromo-6-cloropurina e m-anisidina (proporção molar 1:1) na presença de trietilamina (2,5 eq.) em n-propanol a 100 °C por 4 horas. Depois de esfriar para a temperatura ambiente, o precipitado branco resultante foi removido por filtração, lavado com n-propanol frio e água e secado em uma secadora até atingir um peso constante. Rendimento: 69% (como bromidrato). O produto bruto foi purificado por cristalização a partir de metanol e a base livre foi obtida por tratamento do bromidrato com amônia aquosa a 10%. pureza por HPLC: 98+%.

Tabela 7: Compostos preparados pelo método do Exemplo 17

Purina Substituente			Análises de CHN	Análises ZMD por MS	
	R6	R2	[%]	[M-H] ⁻ a)	[M+H] ⁺ b)
124	anilino	bromo	C=45,4;H=2,7;N=24,3	289	291
125	2-cloroanilino	bromo	C=40,5;H=2,1;N=21,7	323	325
126	3-cloroanilino	bromo	C=40,5;H=2,1;N=21,6	323	325
127	2-fluoranilino	bromo	C=44,5;H=2,1;N=23,0	307	309
128	3-fluoranilino	bromo	C=44,7;H=2,1;N=22,9	307	309
129	3-metoxianilino	bromo	C=44,6;H=3,2;N=21,6	319	321
130	2-hidroxianilino	bromo	C=42,9;H=2,6;N=23,1	305	307
131	3-hidroxianilino	bromo	C=43,2;H=4,6;N=22,9	305	307

Exemplo 18

2-Nitro-6-(3-metoxifenil)amino-9-Boc-purina

A uma solução de 2-nitro-6-cloro-9-tetrahidropiraniipurina (3,00 g; 0,01 mol) em metanol (40 ml) a 0°C, uma solução de m-anisidina (1,48 g; 0,012 mol) e trietilamina (3,0 g = 4,2 ml; 0,03 mol) em metanol (10 ml) foi lentamente adicionada em gotas para que a temperatura da mistura reacional não excedesse +5°C. Depois da adição da m-anisidina, a mistura reacional foi deixada esquentar até a temperatura ambiente com agitação. O curso da reação foi monitorado por TLC - a ausência da mancha da 2-nitro-6-cloro-9-tetrahidropiraniipurina de partida mostrou que a reação havia terminado. O metanol foi evaporado em um evaporador a vácuo rotativo e o resíduo semissólido foi distribuído entre água (50 ml) e etil acetato (50 ml). A camada aquosa foi extraída com mais etil acetato (50 ml). As camadas orgânicas combinadas foram lavadas com água (20ml), secadas com MgSO₄ anidro, e evaporadas até a secura. O produto bruto foi cristalizado a partir de éter ciclohexano (1:1, v/v). Rendimento: 3,1g (80%) de um produto cristalino quase branco; pureza (HPLC): 98%+.

Exemplo 19

2-Nitro-6-(3-metoxifenil)aminopurina

2-Nitro-6-(3-metoxifenil)amino-9-Boc-purina (3,86 g; 0,01 mol) foi dissolvida em ácido trifluoracético a 50% (50ml) a 0 °C. A solução foi guardada na geladeira por uma noite. O ácido trifluoracético e a água foram evaporados em um evaporador a vácuo rotativo e o resíduo cristalino foi tratado com amônia aquosa a 5 % fria (100 ml). O produto bruto foi recolhido por filtração e recristalizado a partir de metanol a 50%. Rendimento: 1,97 g (69 %) de um produto cristalino amarelado; pureza (HPLC): 98%+.

Tabela 8: Compostos preparados pelo método dos Exemplos 18-19

Purina Substituinte			Análises de CHN	Análises ZMD por MS	
	R6	R2	[%]	[M-H] ⁻ a)	[M+H] ⁺ b)
124	anilino	nitro	C=55,1;H=3,4;N=35,1	239	241

125	2-cloroanilino	nitro	C=47,9;H=2,6;N=30,9	273	275
126	3-cloroanilino	nitro	C=48,0;H=2,6;N=30,7	273	275
127	2-fluoranilino	nitro	C=51,0;H=2,6;N=32,8	257	259
128	3-fluoranilino	nitro	C=51,1;H=2,7;N=32,8	257	259
129	3-metoxianilino	nitro	C=53,1;H=3,6;N=31,5	269	271
130	2-hidroxianilino	nitro	C=51,5;H=3,1;N=33,0	255	257
131	3-hidroxianilino	nitro	C=51,3;H=2,9;N=32,9	255	257

Exemplo 20

Inibição da atividade de citoquinina oxidase/desidrogenase

As determinações de IC₅₀ foram feitas usando-se o
 5 ensaio em placa de microtitulação. Cada compartimento continha 100 µL da mistura reacional PMS/MTT [metossulfato de fenazina/brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] (concentrações finais: 0,1 M de KH₂PO₄, pH 7,4, 1 mM de MTT, 0,2 mM de PMS) contendo o composto de
 10 teste (3×10^{-7} M - 3×10^{-4} M) e 30 µM N⁶-isopenteniladenina (iP) como substrato. 100 µL de meio de crescimento livre de células da cepa 23344c ura⁻ de *S. cerevisiae* ancorando o plasmídio pYES2-AtCKX2 foram diretamente usados como fonte de AtCKX2. As placas foram
 15 incubadas no escuro por 30 minutos a 37°C e a reação enzimática foi interrompida por 25 µL de ácido acético a 35%. A absorvência a 578 nm foi medida usando-se o espectrofotômetro Tecan. A absorvência da amostra sem iP foi subtraída.

20 O valor de IC₅₀, a concentração de composto que inibe a atividade enzimática em 50%, foi calculado a partir das curvas de dose-resposta obtidas. Os valores mostrados na Tabela 9 são a média de três réplicas e o teste inteiro foi repetido pelo menos duas vezes.
 25 Compostos mais potentes que o thidiazuron têm valores de IC₅₀ mais baixos que o thidiazuron.

Tabela 9: Efeito dos novos compostos na inibição de AtCKX2 recombinante

No.	Composto Testado		IC50 ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)
	R6	R2	
	thidiazuron		30
1	anilino	cloro	22.6
3	3-cloroanilino	cloro	6.3
4	4-cloroanilino	cloro	24.1
6	3-fluoranilino	cloro	12.2
9	3-hidroxianilino	cloro	3.5
12	3-metoxianilino	cloro	0.8
42	3-cloroanilino	flúor	15.3
43	4-cloroanilino	flúor	27
45	3-fluoranilino	flúor	22.1
48	3-hidroxianilino	flúor	11.8
51	3-metoxianilino	flúor	0.4
66	3-cloroanilino	amino	25.6
69	3-fluoranilino	amino	29.4
75	3-metoxianilino	amino	24.7
80	3-cloroanilino	tio	28.4
83	3-fluoranilino	tio	22.6
88	3-metoxianilino	tio	28.3
111	3-cloroanilino	metil	15.7
113	3-fluoranilino	metil	21.8
118	3-metoxianilino	metil	9.4
126	3-cloroanilino	nitro	5.8
128	3-fluoranilino	nitro	11.0
129	3-metoxianilino	nitro	0.6

Exemplo 21

Efeito in vivo da 2-cloro-6~(3-metoxianilino)aminopurina (composto 12)

5 Mudas de Arabidopsis 35S:AtCKX1 e de tabaco 35S:AtCKX1 e 35S:AtCKX2 transgênicas cultivadas em terra na estufa foram sistematicamente tratadas com 10 μM de composto 12. Partes aéreas das mudas selvagens e transgênicas foram pulverizadas em dias alternados durante 1 mês com uma solução aquosa do composto 12 contendo 0,01% do agente umectante Silwet L-77. A Figura 1 mostra nitidamente que a aplicação do inibidor de CKX 2-cloro-6-(3-metoxianilino)aminopurina (composto 12) liberou as plantas da inibição de crescimento causada pelo nível reduzido de citoquinina e levou à restauração do fenótipo do tipo selvagem. Interessante é o fato de que a aplicação foliar do composto 12 levou à melhora do sistema radicular das plantas de tabaco transgênicas (Fig. 2). Para demonstrar que o efeito de complementação do fenótipo não é um efeito geral da citoquinina aplicada exogenamente,

mas um efeito específico do inibidor de CKX, mudas de *Arabidopsis* superprodutoras de CKX1 foram cultivadas in vitro em meio MS contendo 0,1 μ M de citoquinina BAP (Fig. 3C) ou a mesma concentração de composto 12 (Fig. 3B). A reversão do fenótipo WT só apareceu quando o composto 12 estava presente no meio.

O tratamento prolongado das plantas de *Arabidopsis* WT levou ao desenvolvimento alterado de flores e à inibição da fertilização (Fig. 4). As flores atrofiaram os anteros e eram estéreis.

Exemplo 22

Ativação dos receptores da citoquinina

Escherichia coli cepas KMI001 ancorando o plasmídio pIN-III-AHK4 ou pSTV28-AHK3 foram cultivadas por uma noite a 25 °C no meio M9 enriquecido com 0,1% de casaminoácidos até atingir OD₆₀₀ ~1. A pré-cultura foi diluída 1:600 em 1 ml do meio M9 contendo 0,1% de casaminoácidos e 1 μ l de solução de estoque do composto de teste (10^{-7} M - 5×10^{-5} M) ou de solvente de controle (DMSO, etanol, metanol) foi adicionado. As culturas foram ainda cultivadas a 25°C em uma placa de microtitulação, 200 μ l por compartimento. Foi verificado que os tempo de incubação de 17 horas e 28 horas são ideais para CRE1/AHK4 e AHK3, respectivamente. As culturas foram centrifugadas e alíquotas de 50 μ l do sobrenadante foram transferidas para a placa de microtitulação contendo 2 μ l de 4-metil umbeliferil galactosídeo 50 mM que foi subsequentemente incubada por 1 hora a 37°C. A reação foi interrompida pela adição de 100 μ l de Na₂CO₃ 0,2 M. A fluorescência foi medida usando-se um Fluorscan Ascent (LabSystems, Finlândia) a comprimentos de onda de excitação e de emissão de 365 e 460 nm, respectivamente. A OD₆₀₀ da cultura restante foi determinada e a atividade de β -

galactosidase foi calculada como nmoles de 4-metilumbeliferona $\times OD_{600}^{-1} \times h^{-1}$.

O valor de EC_{50} , a concentração de composto que ativa o receptor em 50%, foi calculada a partir das curvas de dose-resposta obtidas. Os valores mostrados na Tabela 10 são a média de três réplicas e o teste inteiro foi repetido pelo menos duas vezes. Os compostos que ativam os receptores da citoquinina em um grau mais baixo que a trans-zeatina são úteis como inibidores de CKX. As novas 6-anilinopurinas substituídas têm afinidade muito mais baixa para os receptores da citoquinina da *A. thaliana* que a trans-zeatina.

Tabela 10: Efeito dos novos compostos na ativação dos receptores da citoquinina da *Arabidopsis thaliana* CRE1/AHK4 e AHK3.

No.	Composto testado		EC_{50} ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	
	R6	R3	CRE1/AHK4	AHK3
	trans-zeatin		0.9	2.1
	benzylamino		19.7	18.2
1	anilino	cloro	n.a.	>50
3	3-cloroanilino	cloro	7.5	20
7	4- fluoranilino	cloro	n.a.	50
8	2-hidroxianilino	cloro	>50	31.7
9	3-hidroxianilino	cloro	37.1	2.8
12	3-metoxianilino	cloro	31.3	9.5
13	4- metoxianilino	cloro	n.a.	33.1
30	3,4-dimetilanilino	cloro	33.3	>50
40	anilino	flúor	46.2	19
42	3-cloroanilino	flúor	21	31.6
43	4-cloroanilino	flúor	39.8	27
45	3-fluoranilino	flúor	>50	42.1
46	4-fluoranilino	flúor	n.a.	22.5
47	2-hidroxianilino	flúor	>50	45.8
48	3-hidroxianilino	flúor	49.6	15
49	4-hidroxianilino	flúor	37.1	>50
50	2-metoxianilino	flúor	>50	17.4
51	2-metoxianilino	flúor	43	22.7
52	4-metoxianilino	flúor	n.a.	18.9
64	anilino	amino	n.a.	25.3
66	3-cloroanilino	amino	n.a.	43
67	4-cloroanilino	amino	n.a.	8.1
69	3-fluoranilino	amino	n.a.	>50
70	4-fluoranilino	amino	n.a.	19.5
71	2-hidroxianilino	amino	>50	>50
72	3-hidroxianilino	amino	>50	7.7
73	4-hidroxianilino	amino	>50	>50
74	2-metoxianilino	amino	n.a.	29

75	3-metoxianilino	amino	n.a.	20.4
76	4-metoxianilino	amino	n.a.	26.3
80	3-cloroanilino	tio	n.a.	42
81	4-cloroanilino	tio	n.a.	10.2
83	3-fluoranolino	tio	n.a.	>50
88	3-metoxianilino	tio	n.a.	31.7
96	3-cloroanilino	metiltio	41	29
98	3-fluoranolino	metiltio	49	32
111	3-cloroanilino	metil	n.a.	>50
113	3-fluoranolino	metil	n.a.	n.a.
118	3-metoxianilino	metil	n.a.	>50

n.a. significa sem ativação

Exemplo 23

Efeito estimulante dos novos compostos na divisão celular de plantas

5 O efeito estimulante dos derivados recém-preparados foi testado no bioteste de calo usando-se calo de tabaco citoquinina-dependente. O calo de tabaco citoquinina-dependente *Nicotiana tabacum* L. cv. Wisconsin 38 foi mantido a 25°C no escuro em meio de Murashige-Skoog
10 modificado, contendo por 1 litro: 4 µmol de ácido nicotínico, 2,4 µmol de cloridrato de piridoxina, 1,2 µmol de tiamina, 26,6 µmol de glicina, 1,37 µmol de glutamina, 1,8 µmol de mio-inositol, 30 g de sacarose, 8 g de ágar, 5,37 µmol de NAA e 0,5 µmol de 6-benzilaminopurina. O
15 subcultivo era realizado a cada três semanas. Quatorze dias antes do bioensaio, o tecido caloso foi transferido para o meio sem 6-benzilaminopurina. A atividade biológica foi determinada a partir do aumento do peso do calo fresco depois de quatro semanas de cultivo. Cinco réplicas foram
20 preparadas para cada concentração do composto testado e o teste inteiro foi repetido duas vezes. Quinetina, que se sabe ser uma citoquinina altamente ativa, foi usada em cada experiência como controle. Os compostos a serem testados foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) e a
25 solução foi completada até 10^{-3} M com água destilada. Esta solução de estoque foi ainda diluída com o respectivo meio usado para o bioteste até uma concentração variando de 10^{-8} M a 10^{-4} M. A concentração final de DMSO não excedeu 0,2% e

portanto não afetou a atividade biológica no sistema de ensaio usado.

A partir dos dados obtidos, foi selecionada a concentração com a atividade mais alta para cada composto testado. A atividade relativa do composto a essa concentração foi calculada (Tabela 11). A atividade obtida para 10^{-5} M da substância de controle quinetina (K) foi postulada como 100 %.

Os resultados na Tabela 11 mostram que a substituição na posição 2 e 6 do anel purina levou a um aumento da atividade de citoquinina no bioensaio de calo em comparação com a citoquinina quinetina (K) clássica.

Tabela 11: Efeito dos novos compostos no crescimento do calo de tabaco citoquinina-dependente *Nicotiana tabacum* L. cv. Wisconsin 38

No.	Composto Testado		Concentração com atividade mais alta (10^{-5} mol.l ⁻¹)	Atividade (%) [10^{-5} mol.l ⁻¹ K= 100%]
	R6	R2		
C	furfurylamino	H	10^{-5}	100
3	3-cloroanilino	cloro	10^{-5}	110(±6)
4	4-cloroanilino	cloro	10^{-5}	102(±8)
6	3-fluoranilino	cloro	10^{-5}	119.7(±8)
7	4-fluoranilino	cloro	10^{-5}	112(±12)
9	3-hidroxianilino	cloro	10^{-5}	116.2(±13)
11	2-metoxianilino	cloro	10^{-5}	109(±5)
12	3-metoxianilino	cloro	10^{-5}	122(±3)
40	anilino	flúor	10^{-5}	108.1(±4)
42	3-cloroanilino	flúor	10^{-5}	121(±8)
43	4-cloroanilino	flúor	10^{-5}	130(±6)
45	3-fluoranilino	flúor	10^{-5}	127.9(±8)
46	4-fluoranilino	flúor	10^{-5}	110.7(±5)
48	3-hidroxianilino	flúor	10^{-5}	104.2(±3)
49	4-hidroxianilino	flúor	10^{-5}	106(±3)
50	2-metoxianilino	flúor	10^{-5}	117.6(±9)
51	3-metoxianilino	flúor	10^{-5}	120.5(±13)
52	4-metoxianilino	flúor	10^{-5}	105(±7)
80	3-cloroanilino	tio	10^{-5}	126(±5)
81	4-cloroanilino	tio	10^{-5}	115.7(±4)
83	3-fluoranilino	tio	10^{-5}	102.5(±10)
88	3-metoxianilino	tio	10^{-5}	103.4(±12)
96	3-cloroanilino	metiltio	10^{-5}	121.2(±18)
98	3-fluoranilino	metiltio	10^{-5}	130.3(±17)
103	3-metoxianilino	metiltio	10^{-5}	142.8(±21)
111	3-cloroanilino	metil	10^{-5}	128.3(±6)
113	3-fluoranilino	metil	10^{-5}	125.3(±7)
118	3-metoxianilino	metil	10^{-5}	105.7(±5)

Exemplo 24

Teste das novas citoquininas no bioensaio de *Amaranthus*

O bioensaio de *Amaranthus* tradicional foi realizado com as seguintes modificações. As sementes de *Amaranthus* 5 *caudatus* var. *atropurpurea* tiveram a superfície esterilizada em N-clorobenzenossulfonamida a 10% (p/v) por 10 minutos e foram lavadas 5 vezes com água desionizada. Elas foram colocadas em pratos de Petri de 15 cm contendo tecidos de papel saturados com água desionizada. Depois de 10 72 horas de cultivo a 25 °C no escuro, as raízes das mudas foram cortadas e retiradas. Os explantes, consistindo em dois cotilédones e hipocótilos, foram colocadas em pratos de Petri de sobre duas camadas de papel-filtro embebido com 1 ml do meio de incubação contendo 10 µmol de Na₂HPO₄- 15 KH₂PO₄, pH 6,8, 5 µmol de tirosina e o composto a ser testado. Havia 20 explantes por prato. O procedimento foi realizado sob luz de segurança verde em um quarto escuro. Depois de 48 horas de incubação a 25°C no escuro, a betacianina foi extraída congelando-se os explantes em 4 20 ml de ácido acético 3,33 µM. A concentração de betacianina foi determinada a partir das absorvências a 537 nm e 620 nm da seguinte maneira: $\Delta A = A_{537\text{nm}} - A_{620\text{nm}}$. Os valores ΔA foram plotados contra a concentração testada, são a média de cinco réplicas e o teste inteiro foi repetido pelo 25 menos duas vezes. Quinetina, que se sabe ser uma citoquinina altamente ativa, foi usada em cada experiência como controle. Os compostos a serem testados foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) e a solução foi completada até 10⁻³ M com água destilada. Esta solução de 30 estoque foi ainda diluída com o respectivo meio usado para o bioteste até uma concentração variando de 10⁻⁸ M a 10⁻⁴M. A concentração final de DMSO não excedeu 0,2% e portanto não afetou a atividade biológica no sistema de ensaio usado.

A partir dos dados obtidos, foi selecionada a concentração com a atividade mais alta para cada composto testado. A atividade relativa do composto a essa concentração foi calculada (Tabela 12). A atividade obtida para 10^{-5} M de quinetina (K) foi postulada como 100 %.

Os resultados mostram que a substituição na posição 2 e 6 do esqueleto da purina levou a um aumento do teor de betacianina (cor roxa) nos explantes de cotilédones/hipocótilos de *Amaranthus caudatus* em comparação com a quinetina (K).

Tabela 12: Efeito dos novos compostos no teor de betacianina nos explantes de cotilédones/hipocótilos de *Amaranthus caudatus*

No.	Composto Testado		Concentração com atividade mais alta (mol.l ⁻¹)	Atividade (%) [10 ⁻⁵ mol.l ⁻¹ K= 100%]
	R6	R2		
C	furfurylamino	H	10 ⁻⁵	100
3	3-cloroanilino	cloro	10 ⁻⁵	166(±4)
4	4-cloroanilino	cloro	10 ⁻⁵	107(±8)
6	3-fluoranilino	cloro	10 ⁻⁵	120(±15)
7	4-fluoranilino	cloro	10 ⁻⁵	104(±4)
9	3-hidroxianilino	cloro	10 ⁻⁵	115.4(±18)
11	2-metoxianilino	cloro	10 ⁻⁵	110.3(±15)
12	3-metoxianilino	cloro	10 ⁻⁵	132.3(±14)
40	anilino	flúor	10 ⁻⁵	107(±5)
42	3-cloroanilino	flúor	10 ⁻⁵	121(±6)
43	4-cloroanilino	flúor	10 ⁻⁵	102.6(±1)
45	3-fluoranilino	flúor	10 ⁻⁵	105.1(±13)
46	4-fluoranilino	flúor	10 ⁻⁵	109(±8)
48	3-hidroxianilino	flúor	10 ⁻⁵	100.3(±10)
50	2-metoxianilino	flúor	10 ⁻⁵	105.2(±9)
51	3-metoxianilino	flúor	10 ⁻⁵	117.2(±11)
64	anilino	amino	10 ⁻⁵	125.2(±14)
66	3-cloroanilino	amino	10 ⁻⁵	122(±5)
67	4-cloroanilino	amino	10 ⁻⁵	141.7(±6)
69	3-fluoranilino	amino	10 ⁻⁵	113.2(±10)
70	4-fluoranilino	amino	10 ⁻⁵	136(±7)
72	3-hidroxianilino	amino	10 ⁻⁵	119.8(±15)
74	2-metoxianilino	amino	10 ⁻⁵	108(±13)
75	3-metoxianilino	amino	10 ⁻⁵	123.6(±19)
80	3-cloroanilino	tio	10 ⁻⁵	106(±4)
81	4-cloroanilino	tio	10 ⁻⁵	122.9(±5)
83	3-fluoranilino	tio	10 ⁻⁵	133.5(±11)
88	3-metoxianilino	tio	10 ⁻⁵	113.4(±15)
96	3-cloroanilino	metiltio	10 ⁻⁵	145.8(±23)
98	3-fluoranilino	metiltio	10 ⁻⁵	142.5(±15)
103	3-metoxianilino	metiltio	10 ⁻⁵	156.4(±18)
111	3-cloroanilino	metil	10 ⁻⁵	121.7(±5)
113	3-fluoranilino	metil	10 ⁻⁵	120.2(±6)

118	3-metoxianilino	metil	10^{-5}	144.2(±8)
-----	-----------------	-------	-----------	-----------

Exemplo 25

Atividade citotóxica in vitro dos novos compostos

A ausência de efeitos tóxicos contra linhagens celulares de mamíferos (especialmente humanos) em uma
5 ampla faixa de concentrações é uma das exigências impostas aos compostos destinados ao uso na agricultura e medicina. Como compostos tóxicos influenciam negativamente os processos metabólicos nas células, muitos ensaios de citotoxicidade tradicionais baseiam-se na medição da taxa
10 de metabolização de vários substratos artificiais. O produto resultante é então quantificado por exemplo por meio de espectrometria. Os ensaios podem ser facilmente modificados para uso em placas de 96 compartimentos. Para avaliar o efeito citotóxico dos compostos desta invenção,
15 foi usado um ensaio de microtitulação baseado na quantificação da metabolização da calceína AM. O ensaio é bastante usado em programas de rastreamento de drogas e em testes de quimiossensibilidade. Nas células vivas, a calceína AM é enzimaticamente hidrolisada e a acumulação
20 da calceína resultante manifesta-se por fluorescência verde.

As seguintes células humanas foram usadas para rastreamento rotineiro dos compostos: linhagem celular de leucemia T-linfoblástica CEM, linhagem celular de leucemia
25 promielocítica HL-60, linhagem celular de leucemia eritroide K-562, linhagem celular de carcinoma de mama MCF-7, linhagem celular de osteossarcoma HOS e linhagem celular de melanoma G-361. Também foram usadas as linhagens celulares B16-F10 (melanoma) e NIH-3T3
30 (fibroblastos) de camundongo. As células foram mantidas em frascos plásticos de cultura de tecido Nunc/Corning de 80 cm² e cultivadas em meio de cultura de células (DMEM com 5 g/l de glicose, 2mM de glutamina, 100 U/ml de penicilina, 100 µ g/ml de estreptomicina, 10% de soro de

bezerro fetal e bicarbonato de sódio).

As suspensões de células foram preparadas e diluídas de acordo com o tipo particular de célula e a densidade esperada da célula alvo (2.500-30.000 células por compartimento com base nas características de crescimento da célula) e pipetadas (80 µl) em placas de 96 compartimentos. Os inoculados foram deixados pré-incubar por um período de 24 horas a 37°C e 5% CO₂ para estabilização. O composto testado foi adicionado em um volume total de 20 µl de água no tempo zero. Geralmente, o composto de teste é avaliado em seis diluições 1 para 3. No teste de rotina, a concentração mais alta testada foi de 166,6 µM. Todas as concentrações foram testadas em triplicata. As incubações das células com os compostos de teste duraram 72 horas a 37°C, em uma atmosfera de 5% CO₂ e 100% de umidade. No final do período de incubação calceína AM em PBS foi adicionada a uma concentração final de 1 µg/ml. Depois de mais 1 hora de incubação a fluorescência (FD) foi medida com o aparelho Labsystem FIA Reader Fluorscan Ascent (UK). A inibição de crescimento (GI) foi estimada através da seguinte equação: $GI = (FD_{\text{compartimentos expostos à droga}} \text{ médio} - FD_{\text{virgem}} \text{ médio}) / (\text{mean } FD_{\text{compartimentos de controle}} \text{ médio} - FD_{\text{virgem}} \text{ médio}) \times 100\%$. O valor de GI₅₀, a concentração de droga que causa 50% de redução da conversão de calceína AM, foi calculado a partir das curvas de dose-resposta obtidas.

A citotoxicidade dos novos compostos foi testado em um grupo de linhagens celulares de mamíferos de histogenética e origem de espécie diferentes (Tabela 14). Mostramos aqui que os compostos desta invenção não tem efeito tóxico significativo nas linhagens celulares de mamíferos usadas. O interessante é que "citoquininas clássicas" representadas purinas 6-substituídas quinetina, isopenteniladenina, benzil adenina, meta-topolina e orto-

topolina (que são conhecidas na técnica anterior) são em diversos casos mais tóxicas que os novos compostos desta invenção. Portanto os novos compostos podem ser mais adequados para aplicações agrícolas e médicas do que as

5 "citoquininas clássicas".

Tabela 14: Citotoxicidade dos novos compostos para diferentes linhagens celulares de mamíferos

Composto	Linhagem Celular Testada / GI ₅₀ (μmol/L)							
	HOS	K-562	MCF7	B16-F0	NIH-3T3	G-361	CEM	HL60
Quinetina	>166.7	164.1	>166.7		>166.7		155.1	
Isopenteniladenina	>166.7	146.9	>166.7		>166.7		92,2	>166.7
Benziladenina	>166.7	138.9	166.1		>166.7		>166.7	>166.7
Trans-zeatina			>166.7		>166.7		>166.7	>166.7
Meta-topolina	>166.7	128.4	>166.7	90.6	>166.7	>166.7	90.1	79.2
Orto-topolina	>166.7	>166.7	>166.7	150	>166.7	103.4	69.2	78
Adenina		>166.7	>166.7		>166.7		>166.7	>166.7
1	>166.7		>166.7		>166.7		>166.7	
3	>166.7		>166.7		>166.7		>166.7	
4	>166.7	>166.7	>166.7		>166.7		>166.7	
6	>166.7	>166.7	>166.7		>166.7			
9	>166.7		>166.7		>166.7			
12	>166.7		>166.7		>166.7			
40	>166.7		>166.7		>166.7		>166.7	
42	>166.7		>166.7		>166.7		>166.7	
48	>166.7	>166.7	>166.7		>166.7			
51	>166.7		>166.7		>166.7			
64	>166.7		>166.7		>166.7			
66	>166.7		>166.7		>166.7			
72	>166.7		>166.7		>166.7			
73	>166.7		>166.7		>166.7			
78	>166.7		>166.7		>166.7			
83	>166.7		>166.7		>166.7			
87	>166.7		>166.7		>166.7			
94	>166.7		>166.7		>166.7			
101	>166.7		>166.7		>166.7			
103	>166.7		>166.7		>166.7			
116	>166.7		>166.7		>166.7			
131	>166.7		>166.7		>166.7			

Exemplo 26

Atividade antienvhecimento em fibroblastos

10 humanos

Neste exemplo, foram estudados os efeitos dos

compostos desta invenção na atividade de uma β -galactosidase associada à senescência de um biomarcador de senescência. Fibroblastos diploides humanos HCA de vários níveis de passagem foram usados para este estudo. Os 5 compostos testados eram adicionados ao meio a cada passagem. Depois do período de incubação, as células foram lavadas com PBS e fixadas com 2% de formaldeído e 0,2% de glutaraldeído em PBS. Depois de mais uma lavagem com PBS, elas foram incubadas com a solução de coloração 10 compreendendo ferricianeto de potássio (5 mM), ferrocianeto de potássio (5 mM), $MgCl_2$ (2 mM), X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indóil- β -D-galactopiranosídeo) (1 mg/ml), em tampão de cítrico/fosfato (pH 6,0) a 37°C (sem CO_2) por pelo menos 1 hora. Depois do período de incubação, o 15 número de células expressando β -galactosidase associada à senescência (células azuis) foi contado usando-se um microscópio ótico.

Tabela 15: O efeito dos novos compostos no número de células senescentes em uma cultura de fibroblastos 20 humanos

Composto	Células Senescentes (%)		
	HCA passagem 25	HCA passagem 50	HCA passagem 80
Quinetina	3	5	38
2-cloro-6-(4-hidroxianilino)purina	4	6	22
2-cloro-6-(3-metoxianilino)purina	5	5	24
2-cloro-6-(4-metoxianilino)purina	4	3	26
2-cloro-6-(3-metoxi-4-hidroxianilino)purina	4	6	25
2-amino-(4-hidroanilino)purina	3	4	21
2-metiltio-6-(4-hidroxianilino)purina	4	6	34
2-flúor-6-(4-hidroxianilino)purina	3	4	18
2-flúor-6-(3-metoxianilino)purina	3	5	29
2-amino-6-(3metoxianilino)purina	4	4	22
2-cloro-6-(3-metoxi-4-hidroxianilino)purina	4	6	31
2-amino-(4-hidroxianilino)purina	4	4	18

Os derivados de 6-anilino purina substituída em geral foram mais eficazes que a quinetina em reter números mais baixos de células senescentes depois de 80 passagens.

Exemplo 27

Atividade anti-inflamatória das novas 6-anilinopurinas substituídas

A atividade anti-inflamatória de vários dos the
 5 derivados de 6-anilinopurina substituída desta invenção
 foi determinada; a quinetina também foi avaliada como
 controle. Glioma C6 de rato (ATCC No. CCL 107) foi
 cultivado em monocamada em meio quimicamente definido e
 livre de soro contendo Ham's F10/meio essencial mínimo
 10 (1:1 v/v), 2 mM de L-glutamina, 1 % (v/v) de vitaminas do
 meio essencial mínimo (100x), 1 % (v/v) de aminoácidos não
 essenciais do meio essencial mínimo (100x), 100 U/ml de
 penicilina, 100 mg/ml de estreptomicina, e 30 nM de
 selenito de sódio. A incubação foi efetuada a 37°C em uma
 15 atmosfera com 100% de umidade. Os ensaios foram realizados
 na fase de crescimento logarítmico a uma densidade de
 $2,5 \times 10^5$ células/cm². A síntese de cAMP intracelular foi
 induzida pela adição de 5 mM de (-)-isoproterenol; várias
 quantidades dos compostos de teste foram adicionados ao
 20 mesmo tempo que o (-)-isoproterenol. Depois de 30 minutos
 de incubação, a quantidade celular de cAMP foi determinada
 por meio de ELISA (kit de imunoensaio da enzima cAMP da
 Amersham). Os valores de I₅₀ foram determinados a partir da
 curva de dose-resposta em duplicata. Foram obtidos os
 25 seguintes resultados:

Composto	Atividade anti-inflamatória	
	I ₅₀ (μM)	Efeito
Quinetina (6-furfurilaminopurina)	0	não ativo
2-cloro-6-(2-hidroxianilino)purina	25	inibição
2-cloro-6-(4-hidroxianilino)purina	13	inibição
2-cloro-6-(3-metoxibenzilamino)purina	7	inibição
2-cloro-6-(3,5-dimetoxibenzilamino)purina		

Os derivados de 6-anilinopurina substituída demonstraram atividade anti-inflamatória. A quinetina foi

inativa no protocolo de teste.

Exemplo 28

Efeito dos novos compostos na aderência de fibroblastos

5 O teste de frequência de ligação é um dos métodos para avaliação da toxicidade aguda de compostos contra células aderentes. O composto testado é adicionado ao meio com um número definido de células tripsinizadas e depois de um certo tempo o número de células ligadas é contado.

10 Fibroblastos diploides humanos BJ (passagem 19) e meio de cultura padrão (DMEM com 5 g/l de glicose, 2 mM de glutamina, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina e 10% de soro de bezerro fetal) foram usados. As células ligadas foram contadas depois de 6

15 horas. A experiência foi feita com três repetições. Os resultados estão mostrados na Figura 5. A percentagem de ligação não foi significativamente influenciada pela 2-cloro-6-anilinopurina na faixa de 0-25 µM. Por conseguinte o composto não apresenta toxicidade aguda contra

20 fibroblastos.

Exemplo 29

Avaliação da viabilidade de fibroblasto diploide humano in vitro pelo ensaio MTT

MTT é um ensaio colorimétrico tradicional para

25 medir a proliferação e a sobrevivência das células. O MTT amarelo é reduzido para formazan violeta nas células metabolicamente ativas. A quantidade de formazan resultante é medida por espectrofotometria. Fibroblastos diploides humanos BJ (passagem 19) foram semeados em uma

30 placa de 96 compartimentos (5.000 células por compartimento). Depois de 6 horas, o meio de cultura (DMEM contendo 5 g/l de glicose, 2 mM de glutamina, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina e 10% de soro de bezerro fetal) foi removido e meio fresco contendo um

composto de teste em concentrações de 0-25 μ M foi adicionado. Cada concentração foi testada em 5 réplicas. MTT foi adicionado às células depois de 72 horas em uma concentração final de 0,5 mg/ml. O tempo de incubação foi de 3 horas. A Figura 6 mostra os resultados para 2-cloro-6-anilinopurina. Pelos resultados conclui-se que este composto não é tóxico para fibroblastos diploides humanos.

Exemplo 30

Toxicidade in vitro em fibroblastos diploides humanos por avaliação da curva de crescimento

Fibroblastos diploides humanos SNF25 (passagem 27) foram semeados em uma placa de 24 compartimentos (10.000 células/compartimento). O meio de cultura (DMEM contendo 5 g/l de glicose, 2 mM de glutamina, 100 U/ml de penicilina, 100 μ g/ml de estreptomicina e 10% de soro de bezerro fetal) foi removido e substituído pelo meio de cultura contendo o composto testado na faixa de concentração de 0 - 12,5 μ M. Cada concentração foi testada em triplicata. O número de células foi contado durante os 12 dias subsequentes. A Figura 7 mostra que o composto testado 2-cloro-6-anilinopurina não foi tóxico contra fibroblastos diploides humanos na faixa de concentração e no intervalo de tempo testado.

Exemplo 31

Efeito em fibroblastos diploides humanos senescentes

Fibroblastos diploides humanos SNF25 senescentes (passagem 53) foram semeados em uma placa de 24 compartimentos (10.000 células/compartimento). O meio de cultura (DMEM contendo 5 g/l de glicose, 2 mM de glutamina, 100 U/ml de penicilina, 100 μ g/ml de estreptomicina e 10% de soro de bezerro fetal) foi removido e substituído pelo meio de cultura contendo o composto de teste na faixa de concentração de 0 - 12,5 μ M.

Cada concentração foi testada em triplicata. O número de células foi determinado nos dias 7 e 14. A Figura 8 mostra que a 2-cloro-6-anilino-purina nas concentrações testadas não exerce efeito negativo significativo na sobrevivência das células no intervalo de tempo testado.

Exemplo 32

Teste de Ames

O teste de Ames foi usado para excluir o efeito mutagênico da 2-cloro-6-(4-hidroxianilino)purina. Os auxótrofos de histidina de *Salmonella typhimurium* TA98 e TA100 foram usados como cepas indicadoras e o teste foi realizado de acordo com protocolos tradicionais (Ames et al., Mutation Research, 31, 347-364 (1975); Maron et al., Mutation Research, 113, 173-215 (1983)). As concentrações testadas foram as seguintes: 2,5, 5,0, 15, 50, 500, 1500, e 5000 µg /placa. O composto não foi mutagênico mesmo nas concentrações que excediam seu tempo de solubilidade no meio de cultura.

Exemplo 33

Preparações

As preparações reguladoras do crescimento geralmente contêm de 0,1 a 99 % (p/p), de preferência 0,1 a 95 % (p/p), da mistura de ingredientes ativos compreendendo um composto de fórmula I, de 1 a 99,9% (p/p) de um adjuvante sólido ou líquido, e de 0,1 a 25 % (p/p) de um tensoativo. Considerando que os produtos comerciais normalmente são formulados como concentrados, o usuário final normalmente vai empregar formulações diluídas. As preparações também podem compreender outros ingredientes, tais como estabilizantes, por exemplo óleos vegetais ou óleos vegetais epoxidados (óleo de coco epoxidado, óleo de semente de colza ou óleo de soja), antiespumantes, por exemplo óleo de silicone, preservativos, reguladores da viscosidade, aglutinantes, aderentes, e também

fertilizantes ou outros ingredientes ativos. As preparações preferidas têm especialmente as seguintes composições: (% = por cento em peso)

A1. Concentrados emulsificáveis		a)	b)	c)	d)
5	mistura de ingredientes ativos	5%	10%	25%	50%
	dodecilbenzenossulfonato de cálcio	6%	8%	6%	8%
	éter poliglicólico de óleo de rícino (36 moles de óxido de etileno)	4%	-	4%	4%
	éter poliglicólico de octilfenol	-	4%	-	2%
10	(7-8 moles de óxido de etileno)				
	Ciclohexanona	-	-	10%	20%
	mistura de hidrocarbonetos aromáticos C ₉ -C ₁₂	85%	78%	55%	16%

Emulsões de qualquer concentração desejada podem ser obtidas a partir desses concentrados por diluição com água.

A2. Soluções		a)	b)	c)	d)
	mistura de ingredientes ativos	5%	10%	50%	90%
	1-metoxi-3-(3-metoxi-propoxi)-propano	-	20%	20%	-
20	polietileno glicol PM 400	20%	10%	-	-
	N-metil-2-pirrolidona	-	-	30%	10%
	mistura de hidrocarbonetos aromáticos C ₉ -C ₁₂	75%	60%	-	-

As soluções são adequadas para uso na forma de microgotas.

A3. Pós umectáveis		a)	b)	c)	d)
	mistura de ingredientes ativos	5%	25%	50%	80%
	lignossulfonato de sódio	4%	-	3%	-
	lauril sulfato de sódio	2%	3%	-	4%
30	diisobutilnaftalenossulfonato de sódio	-	6%	5%	6%
	éter poliglicólico de octilfenol (7-8 moles de óxido de etileno);	-	1%	2%	-
	ácido silícico altamente dispersado	1%	3%	5%	10%
	caulim	88%	62%	35%	-

O ingrediente ativo é completamente misturado com os adjuvantes e a mistura é completamente moída em um moinho adequado, produzindo pós umectáveis que podem ser diluídos com água para dar suspensões de qualquer
5 concentração desejada.

A4. Grânulos revestidos	a)	b)	c)
mistura de ingredientes ativos	0.1%	5%	15%
ácido silícico altamente dispersado	0.9%	2%	2%
carreador inorgânico (0,1 - 1 mm) por	99%	93%	83%
10 exemplo CaCO_3 ou SiO_2			

O ingrediente ativo é dissolvido em cloreto de metileno e aplicado ao carreador por aspersão, e o solvente é então removido por evaporação a vácuo.

A5. Grânulos revestidos	a)	b)	c)
15 mistura de ingredientes ativos	0.1%	5%	15%
polietileno glicol PM 200	1.0%	2%	2%
ácido silícico altamente dispersado	0.9%	1%	2%
carreador inorgânico (AE 0,1 - 1 mm)	98.0%	92%	80%
por exemplo CaCO_3 ou SiO_2			

20 O ingrediente ativo finamente moído é uniformemente aplicado ao carreador umedecido com polietileno glicol. Grânulos revestidos não poeirentos são obtidos desta maneira.

A6. Grânulos de extrusor	a)	b)	c)	d)
25 mistura de ingredientes ativos	0.1%	3%	5%	15%
lignossulfonato de sódio	1.5%	2%	3%	4%
Carboximetilcelulose	1.4%	2%	2%	2%
Caulim	97.0%	93%	90%	79%

O ingrediente ativo é misturado e moído com os
30 adjuvantes, e a mistura é umedecida com água. A mistura é extrusada e em seguida é secada em uma corrente de ar.

A7. Poeiras	a)	b)	c)
mistura de ingredientes ativos	0.1%	1%	5%
talco	39.9%	49%	35%

Caulim 60.0% 50% 60%

Poeiras prontas para uso são obtidas por misturação do ingrediente ativo com os carreadores e moagem da mistura em um moinho.

5	A8. Concentrados de suspensão	a)	b)	c)	d)
	mistura de ingredientes ativos	3%	10%	255%	50%
	etileno glicol	5%	5%	5%	5%
	éter poliglicólico de nonilfenol (15 moles de óxido de etileno)	-	1%	2%	-
10	lignossulfonato de sódio	3%	3%	4%	5%
	carboximetilcelulose	1%	1%	1%	1%
	solução aquosa de formaldeído a 37%	0.2%	0.2%	0.2%	0.2%
	emulsão de óleo de silicone	0.8%	0.8%	0.8%	0.8%
15	água	87%	79%	62%	38%

O ingrediente ativo finamente moído é intimamente misturado com os adjuvantes, dando um concentrado de suspensão a partir do qual suspensões de qualquer concentração desejada podem ser obtidas por diluição com
20 água.

Exemplo 34

Formulação de gel

Os nomes dos componentes da formulação são dados segundo a terminologia dos órgãos de registro e sua
25 quantidade está em gramas por 100 g.

	Gel	/100g
	composto ativo 2-cloro-6-(4-hidroxianilino)Purina	1.0g
	butil hidroxitolueno (Nipanox BHT)	0.2g
	butilparabeno (Nipabutil)	0.2g
30	éter monoetílico de dietileno glicol (Transcutol P)	10.0g
	sílica coloidal anidra (Zeopharm 177)	5.0g
	laurato de propileno glicol (Lauroglicol FCC)	83.6g

A consistência do gel pode ser adicionalmente modificada pela adição de sílica coloidal anidra. Espera-

se mais uma vez que o sistema transdérmico Transcutol P/Lauroglicol FCC aumente a eficiência do composto ativo. A sílica coloidal anidra provavelmente retarda a penetração da substância ativa.

5 Exemplo 35

Procedimento de preparação de uma forma para aplicação à pele (pomada)

Os nomes dos componentes da formulação são dados segundo a terminologia dos órgãos de registro e sua
10 quantidade está em gramas por 200 g.

		/200g
	composto ativo 2-cloro-6-(4-hidroxianilino)purina (2Cl4OHAP)	2.0g
	butil hidroxitolueno (Nipanox BHT)	0.4g
15	200018035611NP	
	butilparabeno (Nipabutil)	0.4g
	éter monoetílico de dietileno glicol (Transcutol P)	20.0g
	3260/02	
20	dibeenato de glicerol (Compritol 888 ATO)	44.0g
	3123/04	
	laurato de propileno glicol (Lauroglicol FCC)	133.2g

Procedimento recomendado

Fase A

25 2 gramas do ingrediente ativo foram dissolvidos em 20 g de Transcutol P enquanto com agitação contínua à temperatura ambiente em um recipiente de vidro ou de aço inoxidável separado. O processo de dissolução pode ser acelerado por aquecimento da solução até uma temperatura
30 máxima de 40°C.

Fase B

0,4 gramas de Nipanox BHT e 0,4 g de Nipabutil foram dissolvidos com agitação contínua em 133,2 g de Lauroglicol FCC a uma temperatura de aproximadamente 70°C

em um outro recipiente de vidro ou de aço inoxidável separado. A solução oleosa límpida foi aquecida até uma temperatura de aproximadamente 80 °C e 44 g de Compritol 888 ATO foram derretidos nessa solução com agitação
 5 contínua. A solução oleosa límpida foi resfriada para aproximadamente 60°C e durante a agitação contínua e o resfriamento ela foi misturada com a fase A. A substância esbranquiçada semelhante à pomada resultante foi dividida em porções de aproximadamente 15 gramas e introduzidas em
 10 recipientes plásticos pré-arranjados.

Exemplo 36

Formulação de uma composição para aplicação tópica à pele

Uma composição para aplicação tópica à pele contém
 15 os seguintes ingredientes em % em peso:

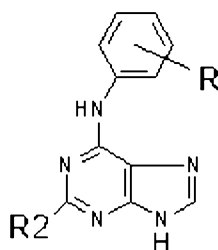
Composto ativo	2-cloro-6-(4-hidroxianilino)purina (2C140HAP)	0,1 %
Fase oleosa		
Álcool cetílico		5.0%
20 Gliceril monoestearato		15,0 %
Sorbitan monooleato		0,3 %
Polysorbate 80 USP		0,3 %
Fase aquosa		
Metilcelulose 100 cps		1,0 %
25 Metil parabeno		0,25 %
Propil parabeno		0,15 %
Água purificada		q.s.p. 100 %

A metilcelulose foi dispersada em água quente contendo metil parabeno e propil parabeno. A mistura foi
 30 então aquecida até 72°C e adicionada à fase oleosa que foi aquecida até 70°C com agitação contínua. O composto ativo foi adicionado depois de resfriamento da mistura para a temperatura de 35°C e a mistura resultante foi agitada continuamente até esfriar.

Esta composição foi aplicada à pele diariamente até ser obtido o efeito desejado de melhorar a pele (anti-idade).

REIVINDICAÇÕES

1. Derivados de 6-anilinopurina substituída da fórmula geral I



I

e os sais farmacologicamente aceitáveis dos mesmos com metais alcalinos, amônio ou amina, assim como seus sais de adição com ácidos **caracterizados** pelo fato de que

R representa um a cinco substituintes independentemente selecionados do grupo que compreende um hidrogênio, halogênio, hidroxil, amino, alquiloxi contendo 1 a 6 átomos de carbono e alquil contendo 1 a 6 átomos de carbono,

R2 representa flúor, bromo, iodo, nitro, tio, grupo alquiltio contendo 1 a 6 átomos de carbono ou alquil contendo 4 a 6 átomos de carbono.

2. Derivados de 6-anilinopurina substituída da fórmula geral I, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizados** por serem selecionados do grupo que consiste em 2-(flúor, bromo, nitro, tio, metiltio, metil)-6-anilinopurina, 2-(flúor , bromo, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2-cloroanilino)purina, 2-(flúor , bromo, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(3-cloroanilino)purina, 2-(flúor , bromo, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(4-cloroanilino)purina, 2-(flúor, bromo, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2-flúoranilino)purina, 2-(flúor, bromo, nitro, tio, metiltio,

metil)-6-(3-flúoranilino)purina, 2-(flúor, bromo, nitro,
 tio, metiltio, metil)-6-(4-flúoranilino)purina, 2-(flúor,
 bromo, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2-
 bromoanilino)purina, 2-(flúor, bromo, nitro, tio, metiltio,
 5 metil)-6-(3- bromoanilino)purina, 2-(flúor, bromo, nitro,
 tio, metiltio, metil)-6-(4-bromoanilino)purina, 2-(flúor,
 bromo, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2-
 metoxianilino)purina, 2-(flúor, bromo, nitro, tio, metiltio,
 metil)-6-(3-metoxianilino)purina, 2-(flúor, bromo, nitro,
 10 tio, metiltio, metil)-6-(4-metoxianilino)purina, 2-(flúor,
 bromo, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2-
 etoxianilino)purina, 2-(flúor, bromo, nitro, tio, metiltio,
 metil)-6-(3-etoxianilino) purina, 2-(flúor, bromo, nitro,
 tio, metiltio, metil)-6-(4-etoxianilino) purina, 2-(flúor,
 15 bromo, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2-aminoanilino)
 purina, 2-(flúor, bromo, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(3-
 aminoanilino)purina, 2-(flúor, bromo, nitro, tio, metiltio,
 metil)-6-(4-aminoanilino) purina, 2-(flúor, bromo, nitro,
 tio, metiltio, metil)-6-(2-metilanilino)purina, 2-(flúor,
 20 bromo, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(3-metilanilino)
 purina, 2-(flúor, bromo, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(4-
 metilanilino)purina, 2-(flúor, bromo, nitro, tio, metiltio,
 metil)-6-(2-hidroxianilino)purina, 2-(flúor, bromo, nitro,
 tio, metiltio, metil)-6-(3-hidroxianilino)purina, 2-(flúor,
 25 bromo, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(4-
 hidroxianilino)purina, 2-(flúor, bromo, nitro, tio,
 metiltio, metil)-6-(2,3-diflúoranilino) purina, 2-(flúor,
 bromo, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2,4-diflúoranilino)
 purina, 2-(flúor, bromo, nitro, tio, metiltio, metil)-6-
 30 (2,3,4- triflúoranilino)purina, 2-(flúor, bromo, nitro, tio,

metiltio, metil)-6-(2,4,5-triflúoranilino)purina, 2-
 (flúor, bromo, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2,3-
 dicloroanilino)purina, 2-(flúor, bromo, nitro, tio,
 metiltio, metil)-6-(2,4-dicloroanilino)purina, 2-(flúor,
 5 bromo, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2,4- dimetoxianilino)
 purina, 2-(flúor, bromo, nitro, tio, metiltio, metil)-6-
 (2,3-dimetoxianilino) purina, 2-(flúor, bromo, nitro, tio,
 metiltio, metil)-6-(3,4-dimetoxianilino)purina, 2-(flúor,
 bromo, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2,5-dimetoxianilino)
 10 purina, 2-(flúor, bromo, nitro, tio, metiltio, metil)-6- (3,
 4, 5-trimetoxianilino)purina, 2-(flúor, bromo, nitro, tio,
 metiltio, metil)-6-(2,4,6-trimetoxianilino) purina, 2-
 (flúor, bromo, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2,3-
 dimetilanilino)purina, 2-(flúor, bromo, nitro, tio,
 15 metiltio, metil)-6-(2,4-dimetilanilino)purina, 2-(flúor,
 bromo, nitro, tio, metiltio, metil -6-(3,4-dimetilanilino)
 purina, 2-(flúor, bromo, nitro, tio, metiltio, metil)-6-
 (3,5-dimetilanilino)purina, 2-(flúor, bromo, nitro, tio,
 metiltio, metil)-6-(2,3-di-hidroxianilino)purina, 2-(flúor,
 20 bromo, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2,4-di-
 hidroxianilino)purina, 2-(flúor, bromo, nitro, tio,
 metiltio, metil)-6-(2,5-di-hidroxianilino)purina, 2-(flúor,
 bromo, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(3,5-di-
 hidroxianilino)purina, 2-(flúor, bromo, nitro, tio,
 25 metiltio, metil)-6-(3-hidroxi-2-metilanilino)purina, 2-
 (flúor, bromo, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(3-hidroxi-4-
 metilanilino)purina, 2-(flúor, bromo, nitro, tio metiltio,
 metil)-6-(2-hidroxi-5-metilanilino)purina, 2-(flúor, bromo,
 nitro, tio, metiltio, metil)-6-(3-hidroxi-2-
 30 metoxilanilino)purina, 2-(flúor, bromo, nitro, tio,

metiltio, metil)-6-(3-hidroxi-4-metoxilanilino)purina, 2-(flúor, bromo, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2-hidroxi-3-metoxilanilino)purina, 2-(flúor, bromo, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2-hidroxi-5-metoxilanilino)purina, 2-(flúor, bromo, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(4-hidroxi-3,5-dimetoxilanilino)purina, 2-(flúor, hidroxi, tio, metiltio, metil)-6-(2-cloro-4-metoxianilino)purina, 2-(flúor, bromo, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2-cloro-5-metoxianilino)purina, 2-(flúor, bromo, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2-cloro-3-metoxianilino) purina, 2-(flúor, bromo, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2-bromo-3-metoxianilino)purina, 2-(flúor, bromo, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2-metoxi-3-cloroanilino)purina, 2-(flúor, bromo, nitro, tio, metiltio, metil)-6-(2-metoxi-4-cloroanilino)purina, e os sais farmacêuticamente aceitáveis dos mesmos com metais alcalinos, amônio ou aminas, assim como os seus sais de adição com ácidos.

3. Derivados de 6-anilinopurina substituída da fórmula geral I, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizados** por serem selecionados do grupo compreendendo preferencialmente 2-(flúor, bromo, nitro, metiltio, metil)-6-(3-metoxianilino)purina, 2-(flúor, bromo, nitro, metiltio, metil)-6-(2-hidroxi-3-metoxianilino)purina, 2-(flúor, bromo, nitro, metiltio, metil)-6-(2-cloro-3-metoxianilino) purina, 2-(flúor, bromo, nitro, metiltio, metil)-6-(2-bromo-3-metoxianilino)purina, 2-(flúor, bromo, nitro, metiltio, metil)-6-(4-hidroxianilino)purina, e os sais farmacêuticamente aceitáveis dos mesmos com metais alcalinos, amônio ou aminas, assim como os seus sais de adição com ácidos.

4. Derivados de 6-anilinopurina substituída da fórmula geral I, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizados** por serem aplicados à uma planta, mamífero, microrganismo, levedura ou célula fúngica, para retardar a senescência da referida planta, mamífero, microrganismo, levedura ou célula fúngica.

5. Derivados de 6-anilinopurina substituída da fórmula geral I, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizados** por serem aplicados à um fibroblasto ou queratinócito para atrasar a senescência do referido fibroblasto ou queratinócito.

6. Derivados de 6-anilinopurina substituída da fórmula geral I, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizados** por serem aplicados às culturas de tecidos para estimular a proliferação e a morfogênese das referidas culturas de tecidos.

7. Derivados de 6-anilinopurina substituída da fórmula geral I, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizados** por serem aplicados a produtos agrícolas para aumentar o rendimento e a qualidade dos referidos produtos agrícolas.

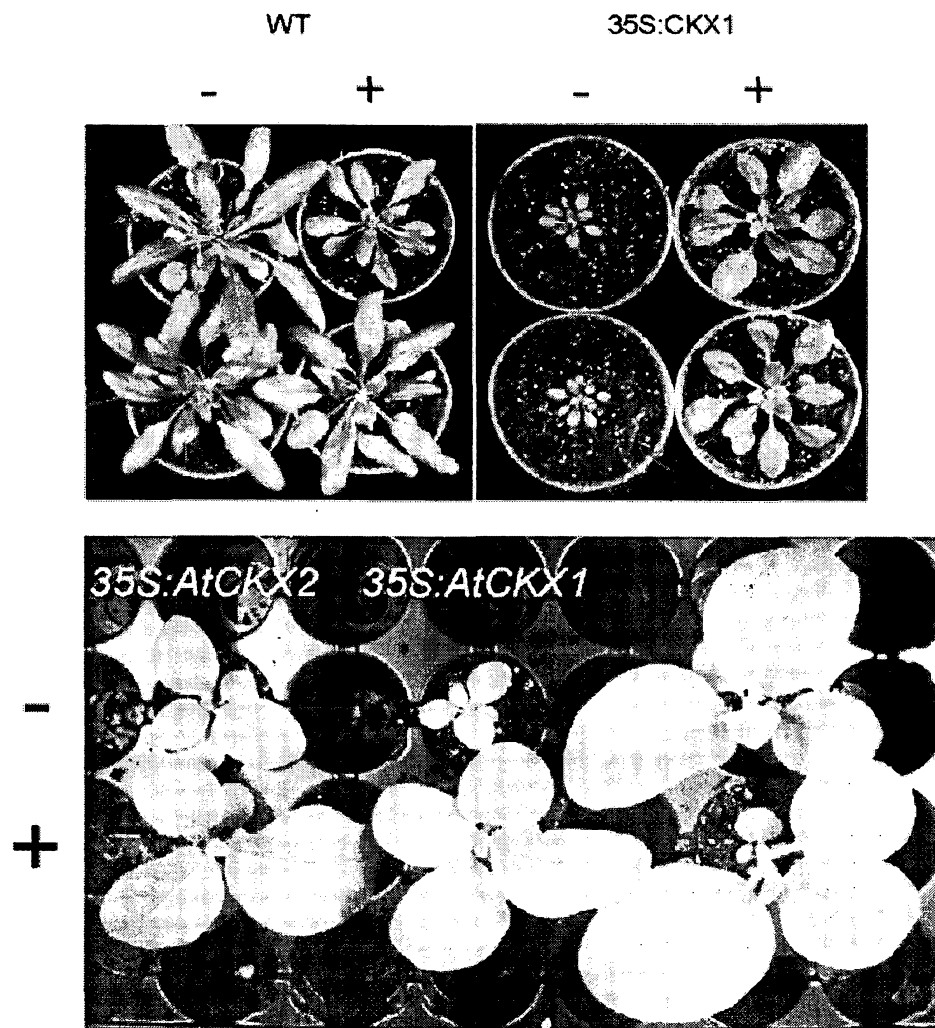


FIGURA 1

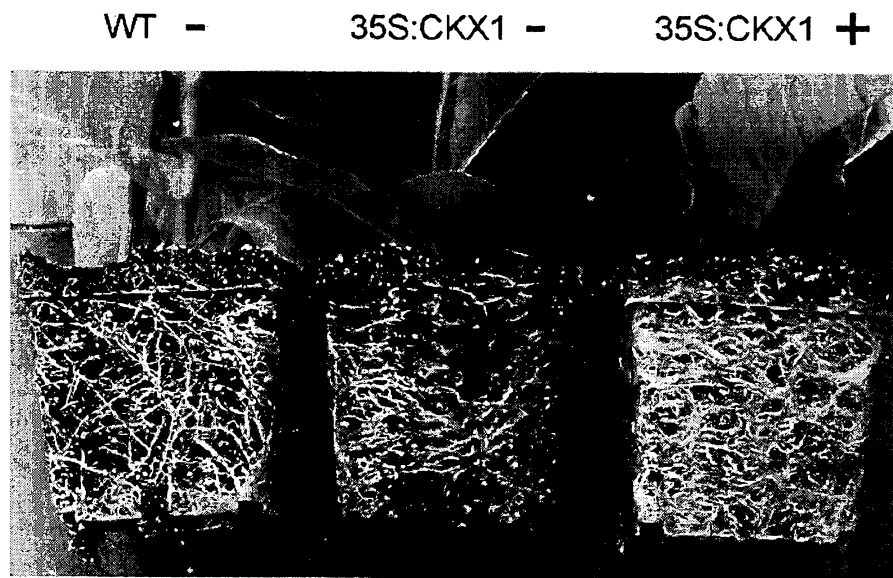


FIGURA 2

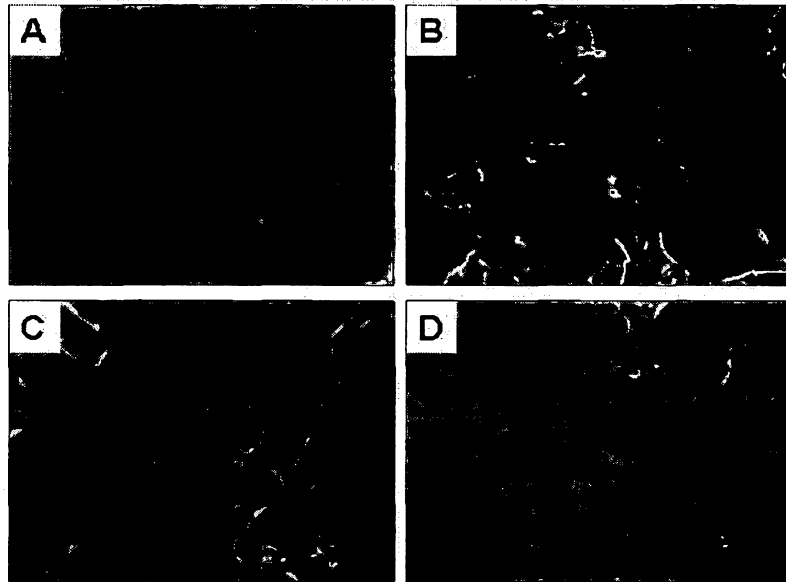


FIGURA 3

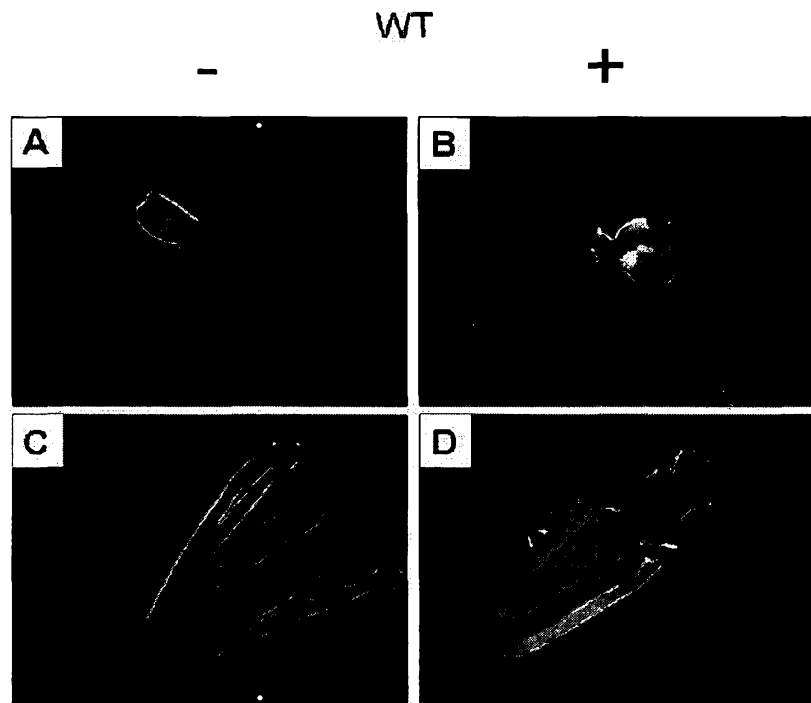


FIGURA 4

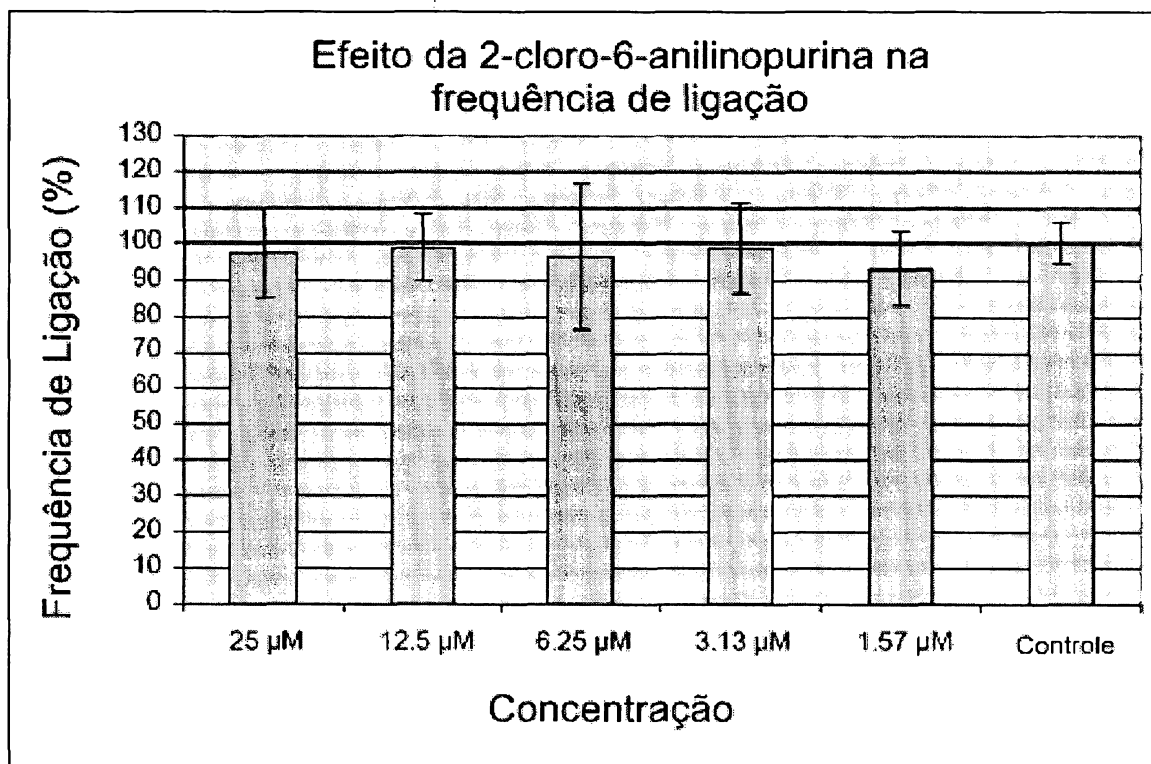


FIGURA 5

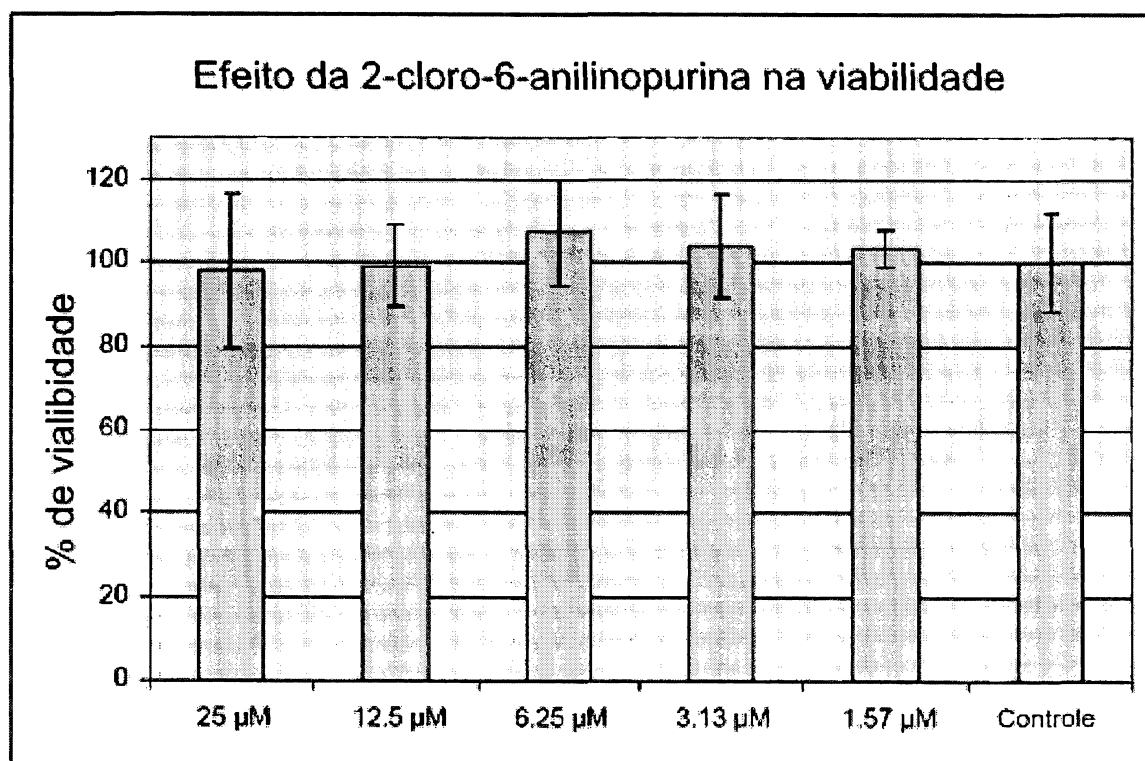


FIGURA 6

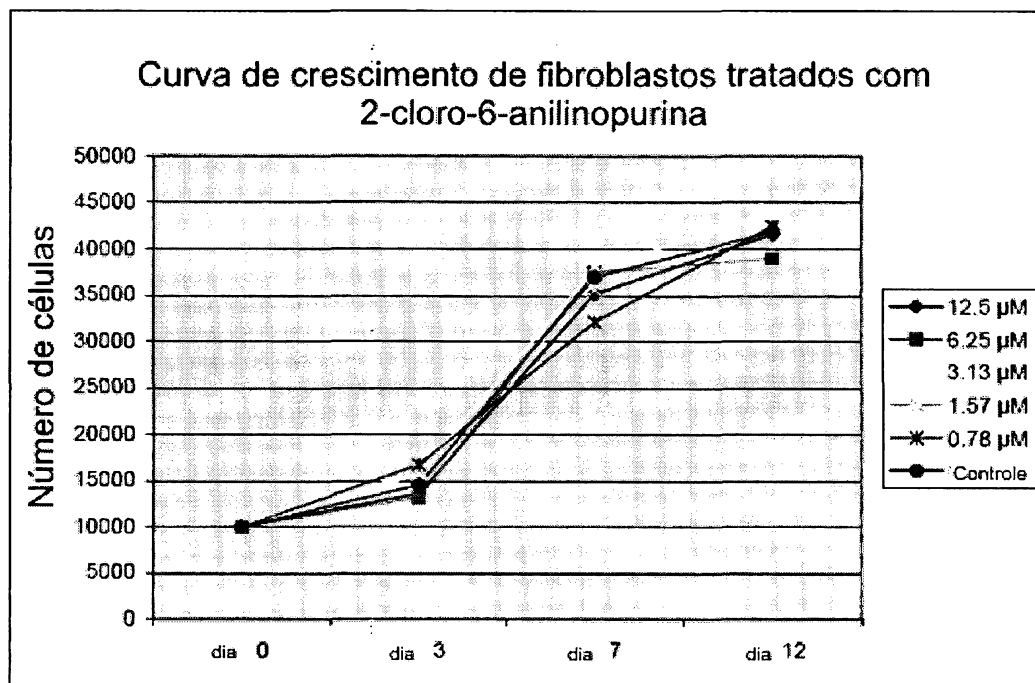


FIGURA 7

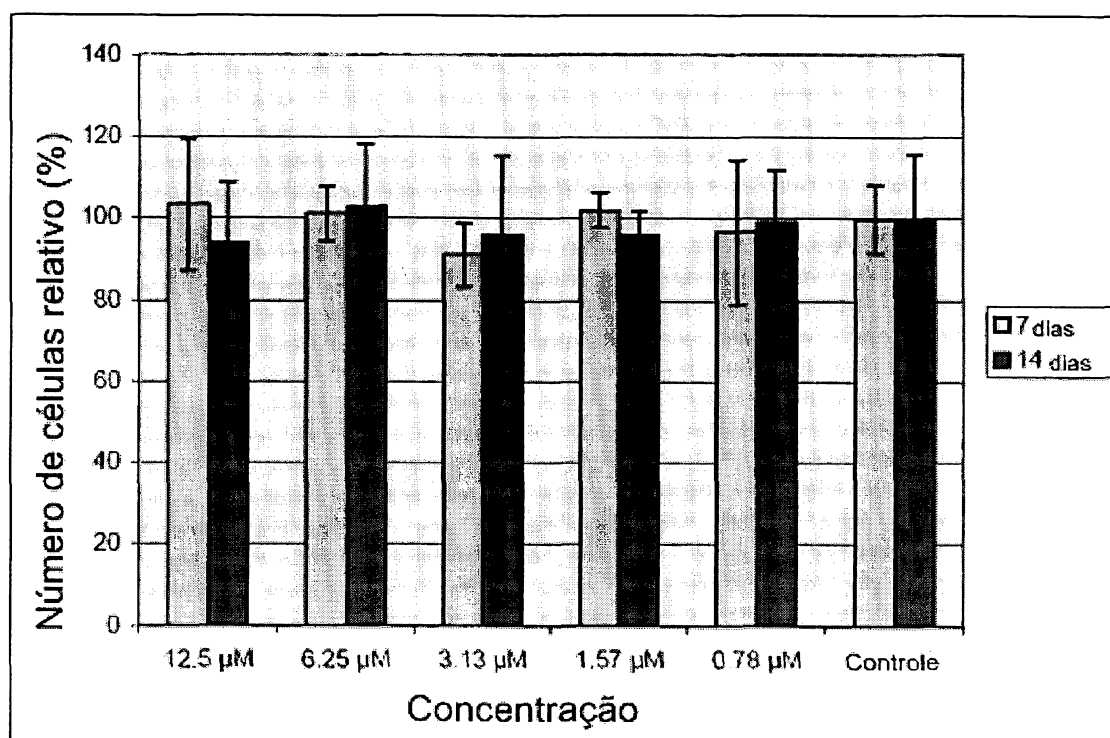


FIGURA 8

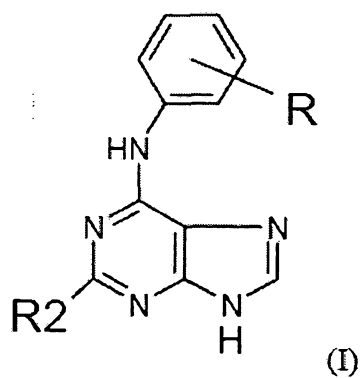


FIGURA 9