



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**5-TRIALOMETIL-4,5-DIIDRO-1H-1-(CARBONILPIRIDIL)PIRAZÓIS:
SÍNTESE E ATIVIDADE BIOLÓGICA
FRENTE AO *Mycobacterium tuberculosis***

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

JUSSARA NAVARINI

Santa Maria-RS, Brasil

2008

**5-TRIALOMETIL-4,5-DIIDRO-1H-1-(CARBONILPIRIDIL)PIRAZÓIS:
SÍNTESE E ATIVIDADE BIOLÓGICA
FRENTE AO *Mycobacterium tuberculosis***

ELABORADA POR

JUSSARA NAVARINI

Dissertação apresentada como requisito parcial à
obtenção do Grau de Mestre em Química ao
Curso de Mestrado do Programa de Pós-
Graduação em Química da Universidade Federal
de Santa Maria - RS.

Orientador: Prof. Dr. Helio Gauze Bonacorso

SANTA MARIA

2008

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, APROVA a Dissertação de Mestrado

**5-TRIALOMETIL-4,5-DIIDRO-1H-1-(CARBONILPIRIDIL)PIRAZÓIS:
SÍNTESE E ATIVIDADE BIOLÓGICA
FRENTE AO *Mycobacterium tuberculosis***

ELABORADA POR:
JUSSARA NAVARINI

como requisito parcial para a obtenção do Grau de
MESTRE em QUÍMICA.

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof. Dr. Helio Gauze Bonacorso – Orientador – UFSM

Prof. Dr. Alex F. C. Flores-UFSM

Prof. Dr. Sydney Hartz Alves-UFSM

Santa Maria-RS, agosto de 2008

*Dedico esta dissertação à minha família, pelo
carinho, incentivo, apoio e amor dedicados
sempre.*

*A vocês, eternos amores da minha vida, meu
muito obrigado.*

*A minha mãe Giacomina Navarini (“in memoriam”).
Ausente na matéria, mas presente no espírito.*

Ao professor Dr. Helio Gauze Bonacorso, os meus sinceros agradecimentos pela dedicação, incentivo, paciência e apoio durante todo o trabalho desenvolvido, através de sua competente orientação.

*Ao Fábio de Oliveira pelo carinho, apoio e paciência,
que tem dedicados.
Te adoro.*

AGRADECIMENTOS

Não importa a ordem da lembrança, o motivo, a relevância do auxílio prestado...

Todos foram importantes...

Aqueles que lembrei, deixo transcrito neste papel os meus sinceros agradecimentos....

Aqueles que por um lapso não fiz jus a esta seção, fica consignado em meu coração, o sentimento de gratidão...

A Deus, por estar sempre guiando meus passos, iluminando meu caminho.

Aos colegas de laboratório, Cleber, Liliane, Guilherme, Gisele e Michelle Budke os meus sinceros agradecimentos pelos ensinamentos, pela amizade, apoio e convivência durante estes anos.

A Liliane e aos seus pais, pela atenção e carinho que sempre tem dedicado nas horas difíceis.

Ao Cleber, pelos conselhos, pela amizade, pelos ensinamentos profissionais e pelo companheirismo.

Ao Guilherme, pela paciência e compreensão, por estar sempre pronto para ajudar.

A Fernanda, Laetícia, Juliana companheiras de apartamento, pela força e paciência.

A Fernanda pelo carinho e força que sempre tem dedicado desde a graduação, e por sempre estar pronta a ajudar.

Ao Cláudio, pelo incentivo e por fazer acreditar na minha capacidade.

A pequena Luíza, pela alegria e brincadeiras durante suas vindas ao laboratório.

Aos alunos de iniciação científica, Ronan, Fábio, Michele, Marcelo, Rosália e Everton, obrigado pela ajuda durante o trabalho desenvolvido.

Aos professores Alex Flores e Sydney H. Alves pela colaboração no processo de qualificação e defesa.

Aos Professores Dr. Pedro da Silva e Daniela Ramos e a aluna Tatiane Coelho, do Departamento de Microbiologia da FURG pela realização dos ensaios biológicos.

Aos funcionários do Departamento de Química, Valéria Velásquez e Ademir Sartori pela eficiência, presteza, educação e amizade.

À Coordenação do curso de Pós-Graduação em Química e o órgão fomentador CAPES.

A todos, muito obrigada...

*“De nada nos valerá o conhecimento de todas as ciências do mundo,
de tudo o que está fora de nós, se não conhecermos a nós mesmos.”*

*“Que a felicidade não dependa do tempo,
Nem da paisagem, nem da sorte,
Nem do dinheiro.
Que ela possa vir com toda a simplicidade,
De dentro para fora, de cada um para todos.
Que as pessoas saibam calar, falar,
E acima de tudo ouvir.
Que tenham amor, ou sintam a falta de não tê-lo.
Que tenham ideal e medo de perdê-lo.
Que amem o próximo e respeitem a sua dor,
Para que tenhamos a certeza
De que viver vale a pena!...
(autor desconhecido)*

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	xvi
LISTA DE TABELAS	xx
RESUMO	Xxi
ABSTRACT	xxii
1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	6
2.1. Síntese de 4-alkil[aril(heteroaril)]-4-alcoxi-1,1,1-trialo-3-alken-2-onas.....	6
2.2. Síntese de 4,5-diidro-1 <i>H</i> -pirazóis a partir de 1,3-dieletrófilos trialometil-substituídos e hidrazinas.....	10
2.3. Tuberculose.....	19
2.3.1. Agente etiológico.....	19
2.3.2. Agentes antimicobacterianos.....	20
2.3.2.1. Isoniazida (INH).....	20
2.3.2.2. Rifampicina.....	21
2.3.2.3. Pirazinamida (PZA).....	22
2.3.2.4. Etambutol (EMB).....	23

2.4.	Compostos Derivados da Isoniazida.....	24
3.	APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.....	27
3.1.	Numeração e Nomenclatura dos Compostos.....	28
3.2.	Síntese de Acetais.....	38
3.3.	Síntese de 1,1,1-trialo-4-alquil[aril(heroaril)]-4-alcoxi-3-alquen-2-onas substituídas (1a-i) e (2g-i).....	38
3.4.	Síntese de 5-hidroxi-3-alquil[aril(heteroaril)]-5-trifluor(cloro)metil-4,5-diidro-1 <i>H</i> -1-(isonicotinoil)pirazóis (3a-i) e (4g-i).....	39
3.5.	Síntese de 5-hidroxi-3-alquil(aril)-5-trifluormetil-4,5-diidro-1 <i>H</i> -1-(2-cloroisonicotinoil)pirazóis (7a, 7d-g).....	40
3.5.1.	Síntese de 2-cloro isonicotinoilhidrazina (6).....	40
3.5.2.	Identificação Espectroscópica dos Compostos (7d-g).....	43
3.5.2.1.	RMN ¹ H e ¹³ C {H}.....	44
3.5.2.2.	Espectrometria de Massas.....	47
3.6.	Síntese de 5-hidroxi-3-alquil(aril)-5-trifluormetil-4,5-diidro-1 <i>H</i> -1-(nicotinoil)pirazóis (8a, 8c-g).....	48
3.6.1.	Identificação Espectroscópica dos Compostos (8a, 8c-g).....	50
3.6.1.1.	RMN ¹ H e ¹³ C {H}.....	51
3.6.2.	Espectrometria de Massas.....	55
3.7.	Mecanismo Proposto para a obtenção de 3-aquil[(aril/heteroaril)]-5-trifluor(cloro)metil-4,5-diidro-1 <i>H</i> -1(carbonilpiridil)pirazóis(3, 4, 7 e 8)....	56

3.8.	Avaliação Biológica dos Compostos.....	58
3.8.2.	Triagem dos compostos frente ao <i>M. tuberculosis</i> ATCC 27294(H37Rv)..	58
3.8.3.	Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos compostos frente ao <i>M. tuberculosis</i> ATCC 27294(H37Rv).....	59
4.	MATERIAL E MÉTODOS.....	64
4.1.	Reagentes e Solventes Utilizados.....	64
4.1.1.	Reagentes.....	64
4.1.2.	Solventes.....	64
4.2.	Aparelhos Utilizados.....	65
4.2.1.	Espectroscopia de RMN.....	65
4.2.2.	Ponto de Fusão.....	65
4.2.3.	Cromatografia Gasosa-HP-CG/MS.....	66
4.2.4.	Análise Elementar.....	66
4.3.	Procedimentos Experimentais Sintéticos.....	66
4.3.1.	Síntese de Acetais.	66
4.3.2.	Síntese de 1,1,1-trialo-4-alquil[aril(heroaril)]-4-alcoxi-3-alquen-2-onas substituídas (1a-i) e (2g-i).....	66
4.3.3.	Síntese de metil 2-cloro isonicotinoato (5).....	67

4.3.4.	Síntese de 2-cloro isonicotinoil hidrazina (6).....	67
4.3.5.	Síntese de 5-hidróxi-5-trialo-3-alkuil[aril(heteroaril)]-4,5-diidro-1 <i>H</i> -pirazóis substituídos (3, 4, 7 e 8).....	67
4.4.	Procedimentos Experimentais para a avaliação da atividade biológica.....	68
4.4.1.	Microorganismos.....	68
4.4.2.	Manutenção dos microrganismos.....	68
4.4.3.	Preparo das soluções.....	68
4.4.3.1.	Compostos sintéticos.....	68
4.4.4.	Teste de suscetibilidade do <i>M. tuberculosis</i> ATCC 27294(H37Rv) aos compostos pirazolínicos trialometilados.....	68
4.4.4.1.	Suspensão bacteriana.....	68
4.4.4.2.	Preparação da placa para a triagem da atividade antimicobacteriana pelo método REMA frente ao <i>M. tuberculosis</i> ATCC 27294(H37Rv).....	69
4.4.4.3.	Preparação das placas de CIM com o <i>M. tuberculosis</i> ATCC 27294(H37Rv).	70
4.4.5.	Leitura dos ensaios de triagem e determinação das CIMs.	70
5.	CONCLUSÃO	71
6.	BIBLIOGRAFIA	72
7.	ANEXO I	79
8.	ANEXO II	92

9.	ANEXO III	99
-----------	------------------------	-----------

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura molecular da Isoniazida (INH).....	1
Figura 2	Estrutura molecular de 1-isonicotinoil-2-nonanoil hidrazina.....	2
Figura 3	Estrutura dos precursores 1,3-dieletrófilos trialometil substituídos.....	2
Figura 4	Exemplos de compostos derivados da piridina.....	3
Figura 5	Estrutura de 4,5-diidro-1 <i>H</i> -pirazol (2-ou Δ^2 -pirazolina) e 1 <i>H</i> -pirazol.....	10
Figura 6	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	19
Figura 7	Estrutura molecular da Rifampicina.....	22
Figura 8	Estrutura molecular da Pirazinamida (PZA).....	22
Figura 9	Estrutura molecular do etambutol (EMB).....	23
Figura 10	Estrutura de 5-aryl-1-isonicotinoil-3-(piridin-2-il)-4,5-diidro-1 <i>H</i> -pirazol.....	24
Figura 11	Estrutura de <i>N</i> ¹ -nicotinoil-3-(4'-hidroxi-3'-metilfenil)-5-[(aryl)-fenil]-2-pirazolinas.....	25
Figura 12	Estrutura de derivados do isonicotinoil hidrazida.....	26
Figura 13	Espectro de RMN ¹ H a 200,13 MHz de 5-hidroxi-3-(4-clorofenil)-5-trifluormetil-4,5-1 <i>H</i> -1-(2-cloroisonicotinoil)pirazol (7d), em DMSO- <i>d</i> ₆	44
Figura 14	Espectro de RMN ¹³ C {H} a 100,61 MHz 5-hidroxi-3-(4-clorofenil)-5-trifluormetil-4,5-1 <i>H</i> -1-(2-cloroisonicotinoil)pirazol (7d), em DMSO- <i>d</i> ₆	45

Figura 15	Espectro de massas de 5-hidroxi-3-(4-clorofenil)-5-trifluormetil-4,5-1H-1-(2-cloroisonicotinoil)pirazol (7d).....	48
Figura 16	Espectro de RMN ¹ H a 200,13 MHz de 5-hidroxi-3-(4-clorofenil)-5-trifluormetil-4,5-1H-1-(nicotinoil)pirazol (8d), em DMSO- <i>d</i> ₆	51
Figura 17	Espectro de RMN ¹³ C { ¹ H} a 100,61 MHz 5-hidroxi-3-(4-clorofenil)-5-trifluormetil-4,5-1H-1-(nicotinoil)pirazol (8d), em DMSO- <i>d</i> ₆	52
Figura 18	Espectro de massas de 5-hidroxi-3-(4-clorofenil)-5-trifluormetil-4,5-1H-1-(nicotinoil)pirazol (8d).....	56
Figura 19	Concentração Inibitória Mínima dos compostos trifluormetilados e triclorometilados.....	61
Figura 20	Variações das CIMs frente ao <i>M.tuberculosis</i> ATCC 27294(H37Rv) em função dos substituintes na posição 3 do anel pirazólico.....	62
Figura 21	Variações das CIMs frente ao <i>M.tuberculosis</i> ATCC 27294(H37Rv) em função da variação da posição do nitrogênio e presença de substituinte no anel da piridina.....	63
Figura 22	Distribuição dos compostos na microplaca para a triagem da atividade antimicobacteriana.....	69
Figura 23	Espectro de RMN ¹ H a 200,13 MHz de metil 2-cloro isonicotinoato (5), em clorofórmio- <i>d</i> ₁	80
Figura 24	Espectro de RMN ¹³ C { ¹ H} a 100,61 MHz de metil 2-cloro isonicotinoato (5), em DMSO- <i>d</i> ₆	80
Figura 25	Espectro de RMN ¹ H a 200,13 MHz e RMN ¹³ C { ¹ H} a 100,61 MHz de 2-cloro isonicotinoilhidrazida (6), em DMSO- <i>d</i> ₆	81
Figura 26	Espectro de RMN ¹ H a 200,13 MHz e RMN ¹³ C { ¹ H} a 100,61 MHz de 5-hidroxi-3-(4-clorofenil)-5-trifluormetil-4,5-diidro-1H-1-(2-cloro isonicotinoil)pirazol (7d), em DMSO- <i>d</i> ₆	82

Figura 27 –	Espectro de RMN ^1H a 200,13 MHz e RMN ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ a 100,61 MHz de 5-hidroxi-3-(4-bromofenil)-5-trifluormetil-4,5-diidro-1 <i>H</i> -1-(2-cloroisonicotinoil)pirazol (7e), em DMSO- <i>d</i> ₆	83
Figura 28 –	Espectro de RMN ^1H a 200,13 MHz e RMN ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ a 100,61 MHz de 5-hidroxi-3-(4-flúorfenil)-5-trifluormetil-4,5-diidro-1 <i>H</i> -1-(2-cloroisonicotinoil)pirazol (7f), em DMSO- <i>d</i> ₆	84
Figura 29 –	Espectro de RMN ^1H a 200,13 MHz e RMN ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ a 100,61 MHz de 5-hidroxi-3-(4-metilfenil)-5-trifluormetil-4,5-diidro-1 <i>H</i> -1-(2-cloroisonicotinoil)pirazol (7g), em DMSO- <i>d</i> ₆	85
Figura 30 –	Espectro de RMN ^1H a 200,13 MHz e RMN ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ a 100,61 MHz de 5-hidroxi-5-trifluormetil-4,5-diidro-1 <i>H</i> -1-(nicotinoil)pirazol (8a), em clorofórmio- <i>d</i> ₁	86
Figura 31 –	Espectro de RMN ^1H a 200,13 MHz e RMN ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ a 100,61 MHz de 5-hidroxi-3-(fenil)-5-trifluormetil-4,5-diidro-1 <i>H</i> -1-(nicotinoil)pirazol (8c), em DMSO- <i>d</i> ₆	87
Figura 32 –	Espectro de RMN ^1H a 200,13 MHz e RMN ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ a 100,61 MHz de 5-hidroxi-3-(4-clorofenil)-5-trifluormetil-4,5-diidro-1 <i>H</i> -1-(nicotinoil)pirazol (8d), em DMSO- <i>d</i> ₆	88
Figura 33 –	Espectro de RMN ^1H a 200,13 MHz e RMN ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ a 100,61 MHz de 5-hidroxi-3-(4-bromofenil)-5-trifluormetil-4,5-diidro-1 <i>H</i> -1-(nicotinoil)pirazol (8e), em DMSO- <i>d</i> ₆	89
Figura 34 –	Espectro de RMN ^1H a 200,13 MHz e RMN ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ a 100,61 MHz de 5-hidroxi-3-(4-flúorfenil)-5-trifluormetil-4,5-diidro-1 <i>H</i> -1-(nicotinoil)pirazol (8f), em DMSO- <i>d</i> ₆	90
Figura 35 –	Espectro de RMN ^1H a 200,13 MHz e RMN ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ a 100,61 MHz de 5-hidroxi-3-(4-metilfenil)-5-trifluormetil-4,5-diidro-1 <i>H</i> -1-(nicotinoil)pirazol (8g), em DMSO- <i>d</i> ₆	91
Figura 36 –	Espectro de Massas de metil 2-cloro isonicotinoato (5).....	93
Figura 37 –	Espectro de Massas de 2-cloroisonicotinoilhidrazida (6)	93
Figura 38 –	Espectro de Massas do composto 5-hidroxi-3-(4-clorofenil)-5-trifluormetil-4,5-diidro-1 <i>H</i> -1-(2-cloroisonicotinoil)pirazol (7d).....	94

Figura 39 –	Espectro de Massas do composto 5-hidroxi-3-(4-bromofenil)-5-trifluormetil-4,5-diidro-1 <i>H</i> -1-(2-cloroisonicotinoil)pirazol (7e)	94
Figura 40 –	Espectro de Massas do composto 5-hidroxi-3-(4-flúorfenil)-5-trifluormetil-4,5-diidro-1 <i>H</i> -1-(2-cloroisonicotinoil)pirazol (7f).....	95
Figura 41 –	Espectro de Massas do composto 5-hidroxi-3-(4-metilfenil)-5-trifluormetil-4,5-diidro-1 <i>H</i> -1-(2-cloroisonicotinoil)pirazol (7g)	95
Figura 42 –	Espectro de Massas do composto 5-hidroxi-5-trifluormetil-4,5-diidro-1 <i>H</i> -1-(nicotinoil)pirazol (8a)	96
Figura 43 –	Espectro de Massas do composto 5-hidroxi-3-(fenil)-5-trifluormetil-4,5-diidro-1 <i>H</i> -1-(nicotinoil)pirazol (8c)	96
Figura 44 –	Espectro de massas de 5-hidroxi-3-(4-clorofenil-5-trifluormetil-4,5-1 <i>H</i> -1-(nicotinoil)pirazol (8d)	97
Figura 45 –	Espectro de Massas do composto 5-hidroxi-3-(4-bromofenil)-5-trifluormetil-4,5-diidro-1 <i>H</i> -1-(nicotinoil)pirazol (8e)	97
Figura 46 –	Espectro de Massas do composto 5-hidroxi-3-(4-metilfenil)-5-trifluormetil-4,5-diidro-1 <i>H</i> -1-(nicotinoil)pirazol (8f).....	98
Figura 47 –	Espectro de Massas do composto 5-hidroxi-3-(4-metilfenil)-5-trifluormetil-4,5-diidro-1 <i>H</i> -1-(nicotinoil)pirazol (8g).....	98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Numeração e Nomenclatura dos Compostos 1- 8	28
Tabela 2	Propriedades Físicas dos Compostos 5 e 6	41
Tabela 3	Condições testadas para a obtenção do composto 7a	42
Tabela 4	Propriedades Físicas dos compostos 7d-g	43
Tabela 5	Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C { ¹ H} dos compostos 7d-f	45
Tabela 6	Otimização da síntese de 5-hidroxi-5-trifluormetil-4,5-diidro-1 <i>H</i> -1-(nicotinoil)pirazol 8a	49
Tabela 7	Propriedades Físicas dos compostos 8a, 8c-f	50
Tabela 8	Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C { ¹ H} dos compostos 8a, 8c-f	53
Tabela 9	Avaliação da atividade antimicrobiana de compostos pirazolínicos (100 µg/ml) conforme a variação nos radicais X, R¹, Z frente ao <i>M. tuberculosis</i> ATCC 27294(H37Rv).....	59
Tabela 10	Determinação da CIM dos compostos pirazolínicos conforme a variação nos radicais X, R¹, Z frente ao <i>M.tuberculosis</i> ATCC 27294(H37Rv).....	60

RESUMO

5-TRIALOMETIL-4,5-DIIDRO-1H-1-(CARBONILPIRIDIL)PIRAZÓIS: SÍNTESE E ATIVIDADE BIOLÓGICA FRENTE AO *Mycobacterium tuberculosis*

Autor: Jussara Navarini

Orientador: Dr. Helio Gauze Bonacorso

O presente trabalho descreve a síntese de séries de 5-hidroxi-3-alkuil(aril/heteroaril)-5-trifluor[cloro]metil-4,5-diidro-1H-1-(carbonilpiridil)pirazóis, obtidas a partir de reações de 1,1,1-trialo-4-alkuil(aril/heteroaril)-4-alcoxi-3-alkuen-2-onas [CX₃C(O)CH=CR¹OR, onde R = Me, Et; R¹ = H, Ph, 4-ClPh, 4-BrPh, 4-FPh, 4-MePh, 2-Furil e 2-tienil e X = F, Cl] com hidrazinas (NH₂NHC(O)Z, onde Z = 4-piridil, 2-cloro-4-piridil e 3-piridil), em bons rendimentos (50-89%).

Os compostos sintetizados foram avaliados quanto à atividade biológica *in vitro* frente ao de *Mycobacterium tuberculosis* ATCC 27294(H37Rv), onde verificou-se que compostos trifluormetilados são mais ativos que seus análogos triclorometilados. Além disso, a posição do átomo de nitrogênio e o substituinte cloro no anel piridínico influenciaram na atividade destes compostos. Os pirazóis sintetizados com substituintes R¹= H e X=F (**3a**) e R¹= 4-MePh e X=F (**3g**) apresentaram melhor atividade contra as cepas testadas, mencionadas acima.

Os compostos foram caracterizados a partir dos dados de RMN de ¹H, RMN de ¹³C {¹H} e por Espectrometria de Massas, e sua pureza comprovada por Análise Elementar.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM QUÍMICA
SANTA MARIA, AGOSTO-2008

ABSTRACT

5-TRIHALOMETHYL-4,5-DIHYDRO-1*H*-1-(CARBONYLPYRIDYL) PYRAZOLES: SYNTHESIS AND BIOLOGICAL ACTIVITY AGAINST *Mycobacterium tuberculosis*

Author: Jussara Navarini

Advisor: Dr. Helio Gauze Bonacorso

This work describes the synthesis of series of 5-hydroxy-3-[alkyl(aryl/heteroaryl)]-5-trifluoro[chloro]methyl-4,5-dihydro-1*H*-1(carboxylpyridyl)pyrazoles, obtained from the reactions of 1,1,1-trihalo-4-[alkyl(aryl/heteroaryl)]-4-alkoxy-3-alken-2-ones [CX₃C(O)CH=CR¹OR, where R = Me, Et; R¹ = H, Ph, 4-ClPh, 4-BrPh, 4-FPh, 4-MePh, 2-Furyl, 2-Thienyl and X= F, Cl] with hydrazines (NH₂NHC(O)Z), where Z = 4-pyridyl, 2-chloro-4-pyridyl and 3-pyridyl, in good yields (50-89%).

The obtained compounds were evaluated for their *in vitro* biological activities against *Mycobacterium tuberculosis* ATCC 27294 (H37Rv) strains, where it was found that trifluoromethylated compounds were more active than their trichloromethylated analogues. Moreover, the position of the atom of nitrogen and the chloro substituent in the ring of pyridine influences the activity of these compounds. The synthesised pyrazoles with substituents R¹= H and X=F (**3a**) and R¹=4-MePh and X=F (**3g**) showed the best activity against the tested strains above mentioned.

The compounds were characterized by analytical ¹H and ¹³C NMR and of Mass Spectrometry (GC-MS), and its purities they were determined by Elementary analysis.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
POST-GRADUATE COURSE IN CHEMISTRY
MASTER DISSERTATION IN CHEMISTRY
SANTA MARIA, AUGUST - 2008

1. INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) é uma doença causada pela bactéria *Mycobacterium tuberculosis*, e consiste em uma infecção crônica que tem afligido a humanidade durante muito tempo e continua sendo um grande problema de saúde pública¹. Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), estima-se uma incidência anual de 9 milhões de novos casos de TB e que ocorram 2 milhões de óbitos na população mundial, em decorrência desta patologia².

O surgimento de cepas de *M. tuberculosis* multirresistentes aos fármacos conhecidos tem aumentado em diversos lugares do mundo, devido ao declínio de condições sócio econômicas e a propagação do vírus HIV (Vírus da Imunodeficiência Humana). Estes fatores dificultam o controle desta doença e a cada ano 424 mil pessoas desenvolvem um tipo de TB multirresistente que não responde ao tratamento padrão^{3,4}.

Devido à falta de uma vacina eficaz contra TB, o tratamento constitu-se na principal ferramenta de controle desta doença. Entretanto, algumas características dos bacilos da TB devem ser consideradas, tais como: o crescimento lento, impermeabilidade do envelope celular, habilidade para entrar em estágio de latência e localização intracelular, a qual dificulta o tratamento. O tratamento padrão tem longo período, aproximadamente de 6 a 12 meses⁵.

Na busca por fármacos mais potentes, com poucos efeitos colaterais, baixa toxicidade e aos quais a *M. tuberculosis* não apresente resistência, pesquisadores têm desenvolvido novas rotas sintéticas baseadas em protótipos bioativos, destacando a Isoniazida (INH), sintetizada em 1952 e usada desde então, apresentando excelente atividade tuberculostática (MIC = 0,02-0,05 µg/mL)^{6,7}. Devido a sua importância farmacológica, a molécula de INH têm sido incorporada a diversos núcleos como, por exemplo, pirazolinás⁸ e hidrazonas⁹, apresentando atividades satisfatórias frente ao *M. tuberculosis* sensíveis e resistentes a INH (Figura 1).

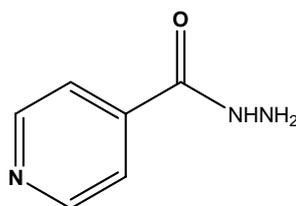


Figura 1: Estrutura molecular da Isoniazida (INH)

Alguns derivados hidrofóbicos da INH, como o 1-isonicotinil-2-nonanoil hidrazina (Figura 2) mostraram reforçada atividade antimicobacteriana contra *M. tuberculosis* H37Rv. Desta forma, pode se dizer que grupos químicos ligados a INH ajudam na penetração da mesma na célula bacteriana o que tornam cepas *M. tuberculosis* mais vulneráveis a esta droga^{10, 11}.

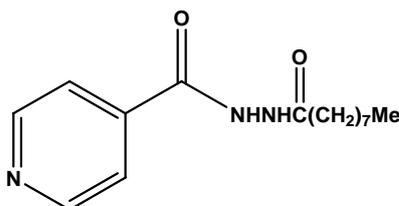


Figura 2: Estrutura molecular de 1-isonicotinoil-2-nonanoil hidrazina

Compostos heterocíclicos são amplamente usados em muitos campos da química moderna, pois apresentam uma grande variedade e complexidade estrutural. Sendo assim, uma série ilimitada de novas estruturas, com larga faixa de propriedades físicas, químicas e biológicas, com grande espectro de reatividade e estabilidade são desenvolvidas¹². Entre os heterociclos, aqueles que apresentam como substituintes grupos halogenados têm mostrado um papel importante, tanto do ponto de vista sintético atuando como intermediários químicos ou do ponto de vista biológico apresentando atividade farmacológica.

Pesquisadores do Núcleo de Química de Heterociclos (NUQUIMHE) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) têm possibilitado a introdução de átomos de flúor em compostos heterocíclicos, através do emprego de precursores 1,3-dieletrófilos trifluormetil substituídos originários de reação de haloacilação de enoléteres¹³⁻¹⁶ ou acetais¹⁷⁻²² com anidrido trifluoracético (Figura 3).

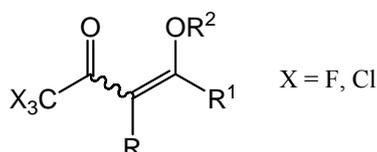


Figura 3: Estrutura do precursor 1,3-dieletrófilos trialometil substituídos

Dos inúmeros heterociclos conhecidos, podem-se destacar as piridinas e os pirazóis. Embora a piridina não seja encontrada livremente na natureza, seus derivados são encontrados

em abundância como produtos naturais (nicotinamida, vitamina B6 e a nicotina). Os derivados da piridina possuem várias aplicações químicas, destacando-se principalmente os polímeros e os corantes, e também são utilizados na área farmacêutica como analgésicos, anestésicos e medicamentos psicofarmacológicos²³ (Figura 4).

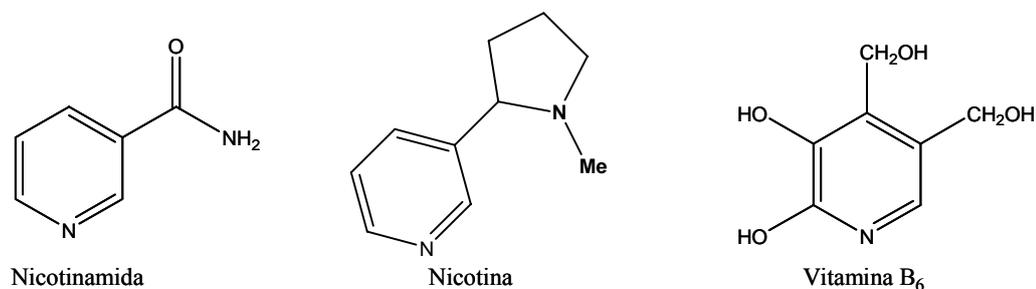


Figura 4: Exemplos de compostos derivados da piridina

Os pirazóis apresentam uma posição de destaque na química dos compostos heterocíclicos, devido a sua grande aplicabilidade. São compostos aromáticos de cinco membros com dois átomos de nitrogênio nas posições 1 e 2 do anel contendo ligações polarizadas em suas estrutura. Nesta classe de compostos, um dos principais representantes são as 2-pirazolinas com ampla aplicação farmacológica como antitumorais, bactericidas, antifúngicos, antivirais, antiparasíticos, antituberculares bem como agentes inseticidas²⁴⁻³². Entretanto, rotas sintéticas para obtenção de 1*H*-pirazóis parcialmente saturados (2-pirazolinas ou 4,5-diidropirazóis) são pouco pesquisadas³³⁻³⁴. A metodologia convencional para a obtenção de pirazóis consiste na reação direta de β -dicetonas e derivados com hidrazinas. Por outro lado, em muitos casos 5-hidroxi-4,5-diidro-1*H*-pirazóis tem sido isolados quando o anel pirazolínico é substituído com grupos fortemente retiradores de elétrons, impedindo assim, a eliminação de água e subsequente aromatização anelar³³. Em particular, o potencial sintético de vinil cetonas trialometiladas para obtenção de séries de novos 4,5 diidro-1*H*-pirazóis trialometilados tem sido explorado e descrito pelo nosso grupo.

Como substituinte de compostos heterocíclicos, o grupo trifluormetil tem levado a uma mudança acentuada na reatividade do anel. A alta eletronegatividade do flúor, por exemplo, capacita ao grupo trifluormetil diminuir a densidade de elétrons e a basicidade da molécula, como também acentuar a eletrofilicidade dos grupos vizinhos. Em muitos sistemas, a substituição do grupo metil por um grupo trifluormetil, resulta em um acréscimo

de lipofilicidade ($\pi_{CF_3}=1,07$ versus $\pi_{CH_3}= 0,5$). Esta lipofilicidade proporciona uma maior permeabilidade nas membranas celulares, o que pode levar uma maior e mais fácil absorção, e transporte dessas moléculas dentro do sistema biológico e, portanto, melhorar as propriedades farmacocinéticas das drogas. Estas propriedades têm feito com que compostos organo-fluorados, sejam muito utilizados na Química Medicinal³⁵⁻³⁷.

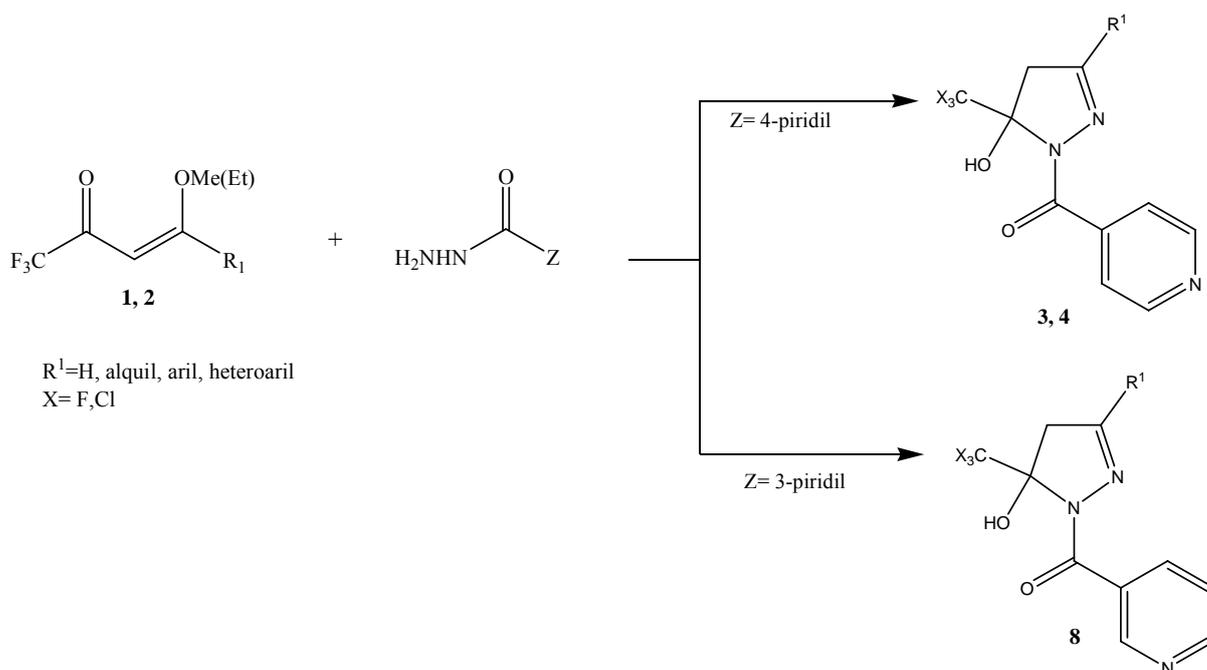
A inclusão de um átomo de flúor em uma droga pode influenciar a sua conformação e a sua interação com o alvo farmacológico. Por exemplo, o efeito da presença de átomos de flúor nas forças intermoleculares e intramoleculares afetam interações com ligantes e assim introduzem uma seletividade em subtipos de receptores colinérgicos e adrenérgicos e tem sido atualmente melhor compreendido³⁸⁻⁴⁰. A presença de átomos de flúor pode apresentar um efeito profundo na conformação de uma droga, em termos de distribuição e liberação nos tecidos⁴¹. O estudo de mudanças como estas podem ser usadas construtivamente por químicos sintéticos e medicinais para aperfeiçoar a segurança e a eficácia no uso de novas drogas fluoradas.

Considerando que 2-pirazolinas são compostos que possuem ampla aplicação, a presença de grupos triometilados e que a INH apesar dos efeitos adversos e limitado espectro tem reconhecida atividade contra o *M. tuberculosis*, compostos pirazolínicos contendo estes substituintes tornam-se objetos de interesse para testes biológicos frente à ao *M. tuberculosis*, uma vez que estes até então possuem atividades biológicas pouco exploradas. Portanto, diante da necessidade de novos fármacos para o combate aos bacilos responsáveis pela TB e da simplificação do tratamento que é longo e complexo, esse trabalho tem por objetivo:

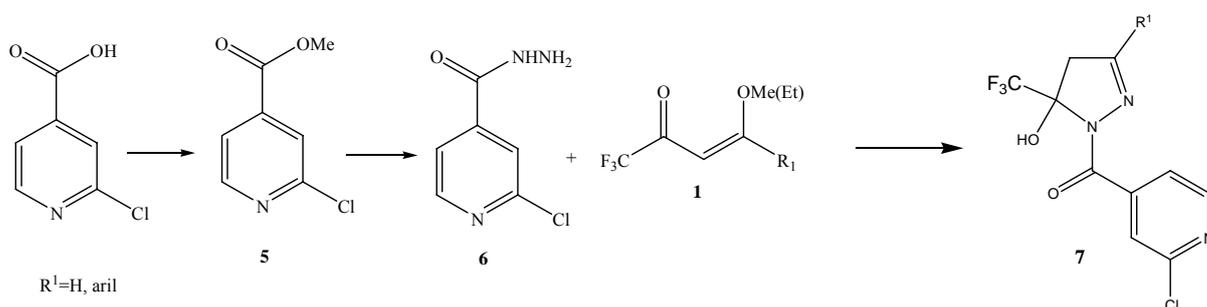
OBJETIVO:

1. Sintetizar o sistema poliheterociclos trifluor(cloro)metilpirazol-1-il-piridil-cetona, a partir de reação de ciclocondensação entre 4-alkil(aril/heteroaril)-1,1,1-trifluor(cloro)-3-alken-2-onas e piridilhidrazidas (Esquema 1 e 2).

Esquema 1



Esquema 2



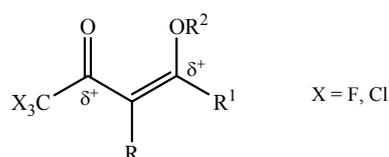
2. Avaliar a atividade biológica *in vitro* dos compostos sintetizados frente ao *Mycobacterium tuberculosis* ATCC 27294 (H37Rv).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Esta revisão da literatura tem por objetivo abordar as principais referências relacionadas à pesquisa desenvolvida. Inicialmente será discutida, resumidamente, a síntese de 4-alkuil[aril(heteroaril)]-4-alcoxi-1,1,1-trialo-3-alquen-2-onas a partir de acilação de acetais e enoléteres. Posteriormente, serão enfocados os principais métodos para a síntese de 2-pirazolinas trialometiladas, além de uma breve revisão sobre a tuberculose. Também serão discutidos alguns compostos que possuem em sua estrutura o grupo INH, relacionando-os à atividade biológica contra TB.

2.1 Síntese de 4-alkuil[aril(heteroaril)]-4-alcoxi-1,1,1-trialo-3-alquen-2-onas

O potencial sintético de 4-alkuil[aril(heteroaril)]-4-alcoxi-1,1,1-trialo-3-alquen-2-onas está relacionado à diferença de reatividade nos dois centros eletrofílicos destes compostos: o carbono carbonílico e o carbono- β . Esta diferença de reatividade tem conduzido, muitas vezes, a reações regioseletivas ou regioespecíficas de ciclocondensação com diferentes dinucleófilos.

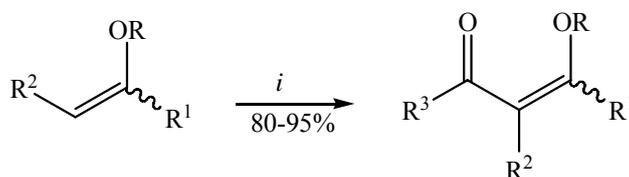


Desde a década de 70, pesquisas têm sido publicadas sobre a síntese de 4-alcóxi-1,1,1-trialo-3-alquen-2-onas. A reação de enoléteres e acetais com agentes acilantes derivados de ácidos haloacéticos foi inicialmente publicada por Effenberger *et al.*^{14, 15} e a seguir por e Hojo *et al.*^{17,18}.

A partir da década de 80, o Núcleo de Química de Heterociclos (NUQUIMHE) da Universidade Federal de Santa Maria e outros grupos internacionais têm aplicado de maneira sistemática o método de acilação de enoléteres via acilantes halogenados. Reações de acilação de enoléteres foram otimizadas para preparação de 4-alcoxi-1,1,1-trialo-3-alquen-2-onas com alto grau de pureza, em quantidades molares.

Assim, foram obtidas 4-alcoxi-1,1,1-trialo-3-alquen-2-onas com altos rendimentos, reagindo uma série de enoléteres com anidrido trifluoracético, cloreto de tricloroacetila ou cloreto de dicloroacetila. As reações de enoléteres com o cloreto de tricloroacetila ou de dicloroacetila, foram realizadas usando diclorometano como solvente; e nas reações de enoléteres com anidrido trifluoracético foi usado éter etílico como solvente^{13,42} (Esquema 2).

Esquema 2:

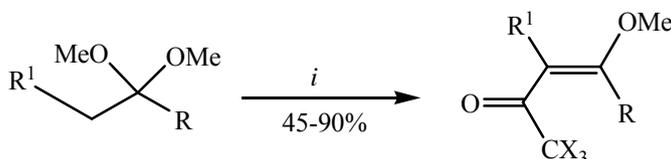


$i = R^3COZ$, piridina, 10-25°C, 16h

R ³	Z	R	R ²	R ¹
CHCl ₂	Cl	Et	H	H
CCl ₃	Cl	Me	H	Me
CF ₃	CF ₃ CO ₂	Et	Me	H
			-(CH ₂) ₂ -	H
			-(CH ₂) ₃ -	H
			-(CH ₂) ₂ -	Me

A metodologia desenvolvida por Hojo *et al.*^{17, 18} foi ampliada e sistematizada pelo NUQUIMHE a partir da acilação direta de acetais derivados de acetofenonas⁴³, propiofenonas *p*-substituídas⁴⁴ e alquilcetonas^{20, 45} com excelentes rendimentos (Esquema 3).

Esquema 3:

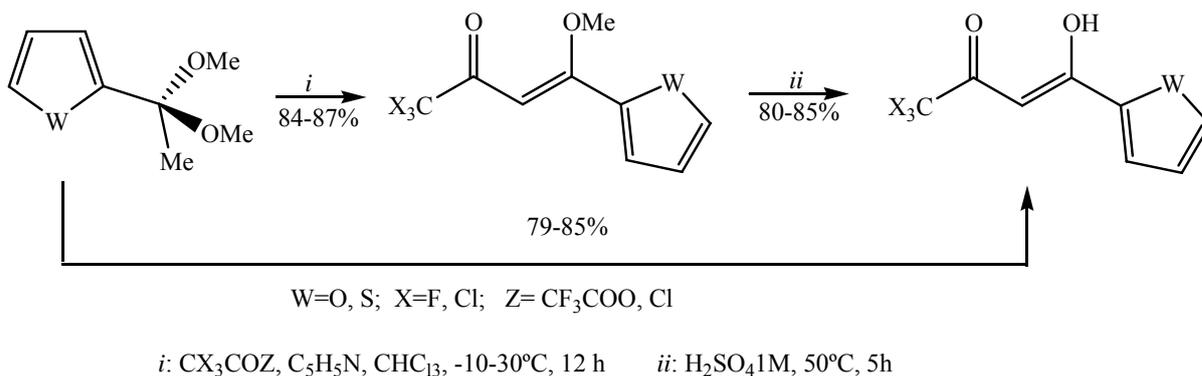


$i = CX_3COZ$, Piridina, CHCl₃, 0-70° C, 5-24 h.

X	Z	R	R ¹
Cl	Cl	Et	H
F	CF ₃ CO ₂	Pr	H
		<i>i</i> -Pr	H
		<i>i</i> -Bu	H
		<i>t</i> -Bu	H
		-(CH ₂) ₂ OMe	H
		Ph	H, Me
		4-MePh	H, Me
		4-MeOPh	H, Me
		4-FPh	H, Me
		4-ClPh	H, Me
		4-BrPh	H, Me
		4-NO ₂ Ph	H, Me

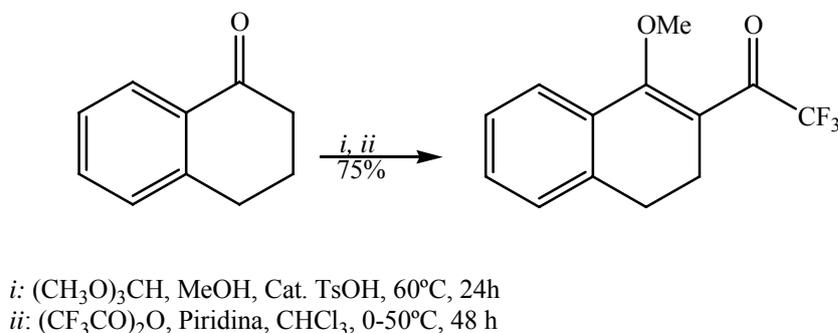
Em 2002, foram realizadas acilações regioespecíficas de acetais derivados de heteroaril cetonas (Esquema 4) para obtenção de 4-heteroaril-4-metoxi-1,1,1-trialo-3-buten-2-onas, derivadas do tiofeno e furano⁴⁶.

Esquema 4:

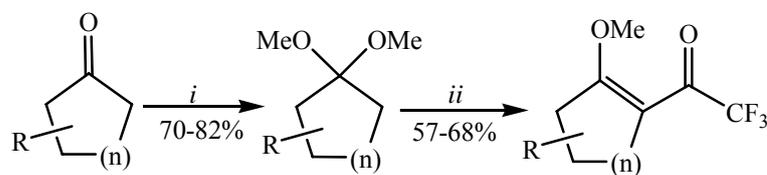


Bonacorso *et al.*⁴⁷ em 2005, obtiveram o 1-metoxi-2-trifluoracetil-3,4-diidro-naftaleno, através da acilação da α -tetralona, sem isolar o acetal, com rendimento de 75 % (Esquema 5). Neste mesmo ano, mais dois trabalhos do grupo envolvendo acilação de novos acetais foram publicados, um demonstra a acilação de uma série de cicloalcanonas (Esquema 6) e outro a acilação de 4-acetilbifenil e 1-acetilnaftaleno (Esquema 7), com anidrido trifluoracético⁴⁸. Para uma revisão detalhada sobre metodologias de síntese e reatividade das 4-alcoxi-1,1,1-trialo-3-alquen-2-onas consultar também os reviews publicados por Martins *et al.*^{49a} e por Balenkova *et al.*^{49b}.

Esquema 5:



Esquema 6:

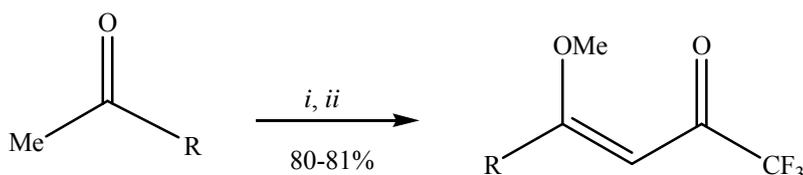


i = (MeO)₃CH, MeOH, Cat. TsOH, t.a., 24 h.

ii = (CF₃CO)₂O, Piridina, CHCl₃, 0-45° C, 16 h.

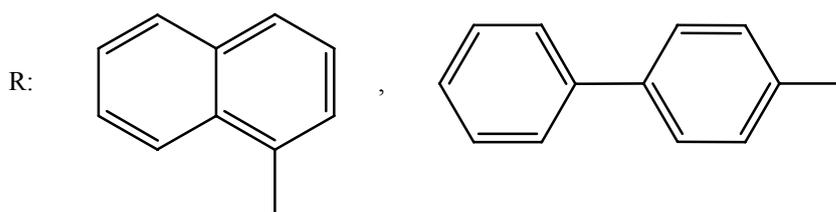
R	H	H	6-Me	4-Me	4- <i>t</i> -Bu	H	H	H
n	1	2	2	2	2	3	4	8

Esquema 7:



i: (CH₃O)₃CH, MeOH, Cat. TsOH, t. a., 24h

ii: (CF₃CO)₂O, Piridina, CHCl₃, 0-45°C, 16h.



Nos últimos anos, os pesquisadores do NUQUIMHE têm desenvolvido diversas rotas sintéticas para a obtenção de heterociclos de cinco, seis e sete membros, contendo grupos trialometila a partir de vinil cetonas trialometiladas de forma regioespecífica⁴⁴, como por exemplo, isoxazóis^{13, 20, 50-55}, pirazóis,⁵⁶⁻⁶⁴ pirimidinas⁶⁵⁻⁶⁸, pirimidinonas⁶⁹, piridinas^{70, 71}, benzodiazepinos^{72, 73} entre outros. Além disso, o NUQUIMHE em parceria com outros grupos de pesquisa vem desenvolvendo estudos sobre atividade biológica para algumas classes de compostos.

2.2 Síntese de 4,5-diidro-1H-pirazóis a partir de 1,3-dieletrófilos trialometil-substituídos e hidrazinas

Os pirazóis são compostos heterocíclicos com anéis de cinco membros, que contêm apenas átomos de nitrogênio e carbono em sua estrutura, e que denominam-se 4,5-diidro-1H-pirazóis quando possuem uma ligação saturada entre os carbonos C4-C5 do anel. Estes compostos também são conhecidos como 2-pirazolinas ou Δ^2 -pirazolinas (Figura 5).

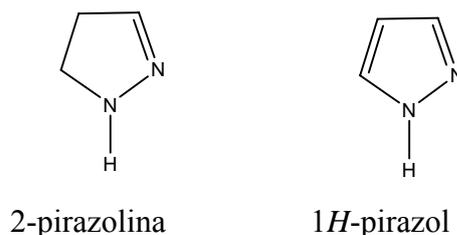


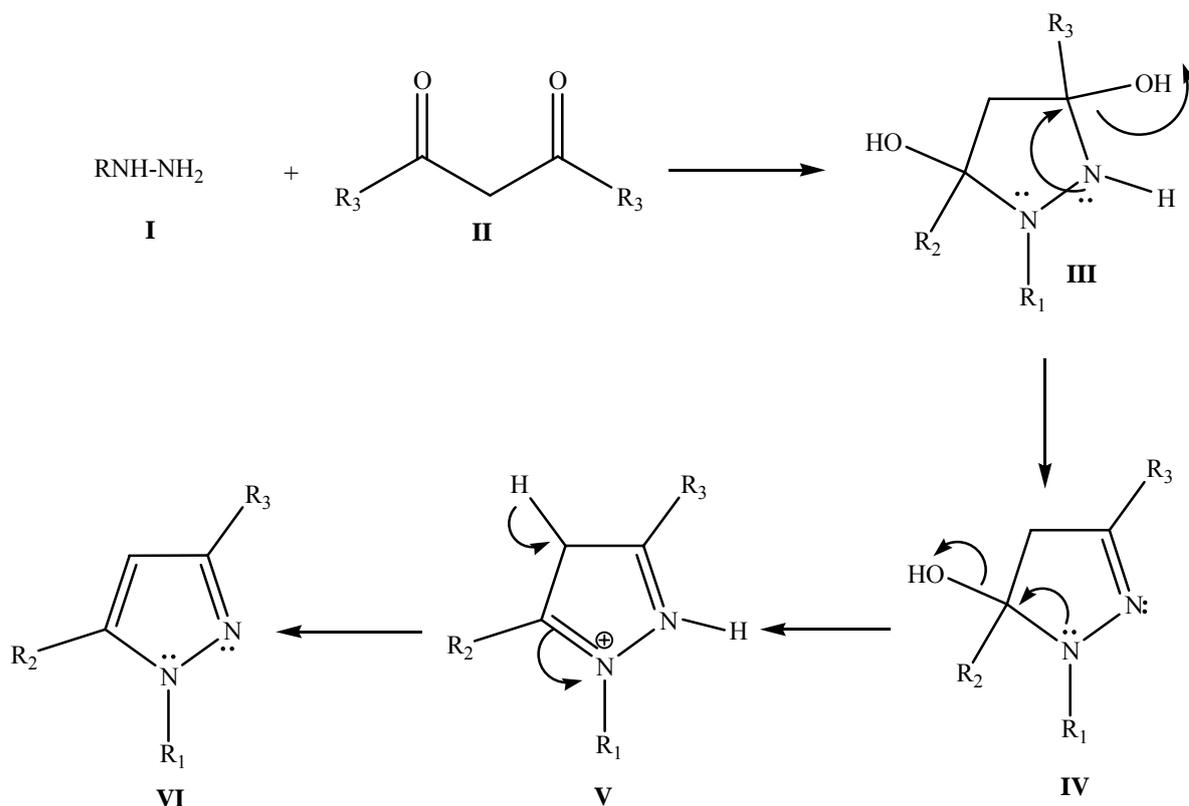
Figura 5: Estrutura de 4,5-diidro-1H-pirazol (2-ou Δ^2 -pirazolina) e 1H-pirazol.

As rotas sintéticas de compostos heterocíclicos podem ser classificadas a partir das características dos reagentes utilizados. A grande maioria dos compostos pirazolínicos têm sido sintetizadas a partir de ciclocondensações de dois conjuntos de átomos, sendo um dieletrófilo, geralmente 1,3-dieletrófilo e um outro 1,2-dinucleófilo.

A síntese de pirazóis a partir da condensação de 1,3-dicarbonílicos trifluormetil substituídos com hidrazinas tem sido estudada por vários grupos de pesquisa⁷⁴. Selivanov e Ershov⁷⁵ foram os primeiros a caracterizar os intermediários 3,5-diidroxipirazolidinas e 5-hidroxi-4,5-pirazóis usando experimentos de RMN. Elguero e Yranzo^{74j} foram os primeiros a isolar uma 3,5-diidroxipirazolidina a partir da 1,1,1,5,5,5-hexafluorpentan-2,4-diona e hidrazina. Já em 2002, Singh, Elguero *et al.*⁷⁶ propuseram que o passo de desidratação do 5-hidroxi-4,5-diidropirazol até o pirazol aromático envolve um intermediário catiônico do tipo V (Esquema 8). Isso explica o fato de que quando R₁ é um grupo retirador de elétrons o passo de desidratação é dificultado e algumas vezes não ocorre. O mecanismo descrito (Esquema 8) tem sido proposto tendo em vista experimentos com RMN a baixas temperaturas e alguns resultados qualitativos, geralmente ele é aceito para a síntese de pirazóis⁷⁶.

Bonacorso *et al.*⁵⁷, também comprovam que a presença de grupos retiradores de elétrons na posição 1 do anel dificulta a desidratação de 2-pirazolinas aos pirazóis correspondentes, devido ao efeito de grupos retiradores de elétrons que estabilizam o intermediário formado, o qual possui uma carga parcial positiva.

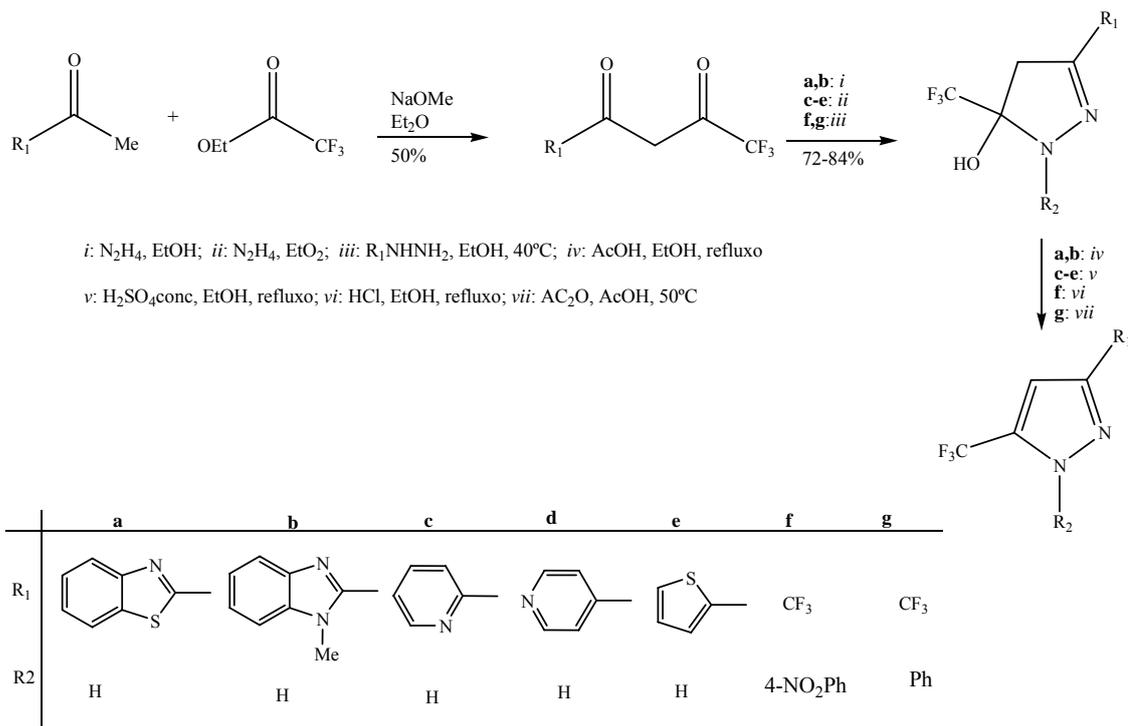
Esquema 8:



Os resultados obtidos nas condensações de β -dicetonas perfluoralquil substituídas com hidrazinas demonstram que essas reações são regioseletivas, formando principalmente os produtos com o grupo perfluoralquil na posição 5 do pirazol, conforme demonstrado por Singh *et al.*^{74a} (Esquema 9). Além disso, o substituinte perfluoralquil na posição 5 e um substituinte retirador de elétrons na posição 1 são fatores que estabilizam os respectivos 5-hidroxi-4,5-diidropirazóis (Esquema 8).

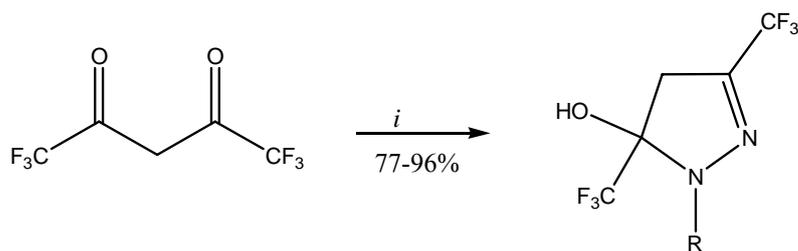
Entretanto, alguns autores, nos estudos sobre a regioseletividade das condensações entre β -dicetonas trifluormetil substituídas e hidrazinas monosubstituídas tem afirmado que é difícil racionalizar a razão entre os isômeros 3-trifluormetil - ou 5-trifluormetil-substituídos^{76, 77}. Analisando o esquema abaixo, observa-se que a regioseletividade está relacionada ao isolamento da pirazolina, pois sempre que a mesma é isolada o isômero 5-trialometil substituído é obtido.

Esquema 9:



Em 1993, Threadgil *et al.*⁷⁸ estudaram a reação do composto 1,3-bis-trifluorometil-1,3-dicarbonílico com hidrazinas e isolaram os 5-hidroxi-3,5-trifluorometil 4,5-diidro-1*H*-pirazóis com bons rendimentos (Esquema 10).

Esquema 10:

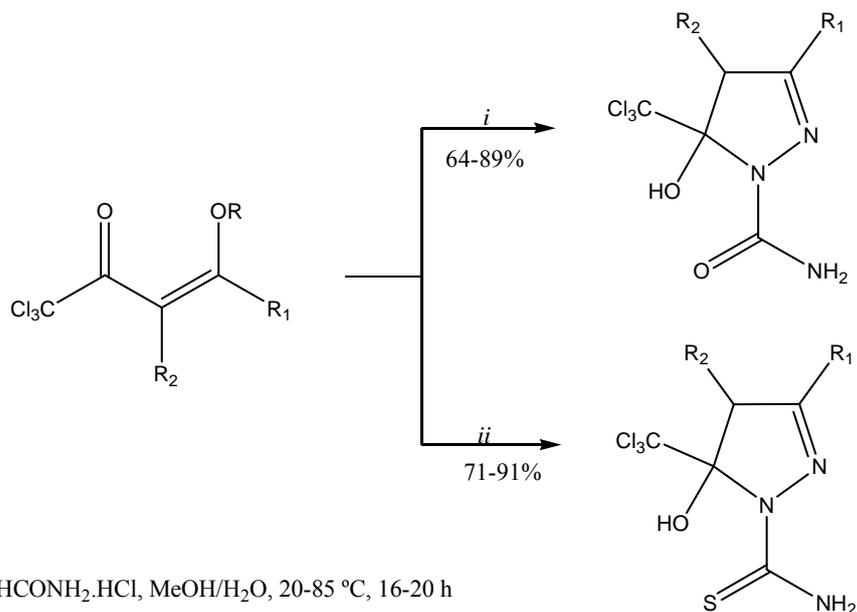


i: NH₂NH-R, EtOH, refluxo, 5h.

R: CPh, Ph, 4-NO₂Ph, 2,4-(NO₂)₂Ph

Em 1999, Bonacorso *et al.*⁵⁷ sintetizaram duas séries de de 3-alkil(aril)-5-hidroxi-4,5-diidro-1*H*-pirazóis a partir da reação de 4-alcoxi-1,1,1-tricloro-3-alquen-2-onas com cloridrato de semicarbazida e tiosemicarbazida, em metanol(3:1) (Esquema 11).

Esquema 11:



i: $\text{NH}_2\text{NHCONH}_2 \cdot \text{HCl}$, MeOH/ H_2O , 20-85 °C, 16-20 h

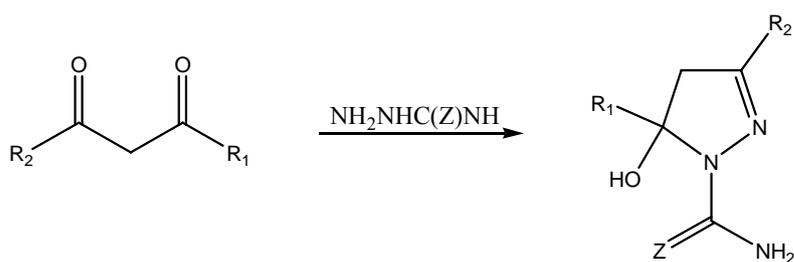
ii: $\text{NH}_2\text{NHCSNH}_2$, MeOH, 20-45 °C, 24 h.

R: H, Me, Ph, 4-MePh, 4-BrPh, 4- NO_2 Ph,

R_1 : H, Me, R_2 : Me, Et

Em 2000, Pashkevich *et al.*⁷⁹ também sintetizaram séries de 4,5-diidro-1*H*-carboxamida(tiocarboxamida)pirazóis a partir da reação de compostos polifluoralquil-1,3-dicarbonílicos com cloridrato de semicarbazida e tiosemicarbazida (Esquema 12).

Esquema 12:



Z: O, S

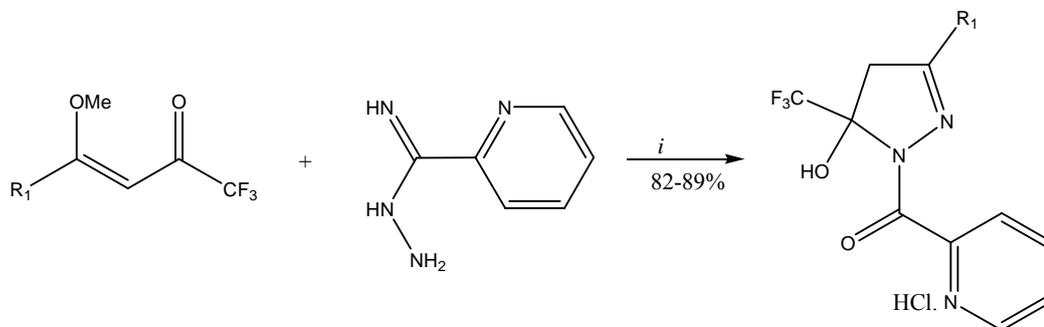
R_2 : Ph, Me, Et, t-Bu, 4-BrPh, CF_3 , C_2HF_4 , 2-tienil

R_1 : CF_3 , C_2HF_4 , C_2F_5 , C_3F_7 , C_2HF_4 , C_4F_6

Em 2003, Bonacorso *et al.*⁷⁶ sintetizaram uma série de cloretos de 3-aryl-5-trifluormetil-5-hidróxi-4,5-diidro-1*H*-1-piconoilpirazóis em passo reacional único e com bons rendimentos, a partir da reação entre 4-metóxi-1,1,1-trifluór-3-buten-2-onas e 2-

piridinocarboxiamida, utilizando uma solução de etanol e ácido clorídrico como solvente (Esquema 13).

Esquema 13:

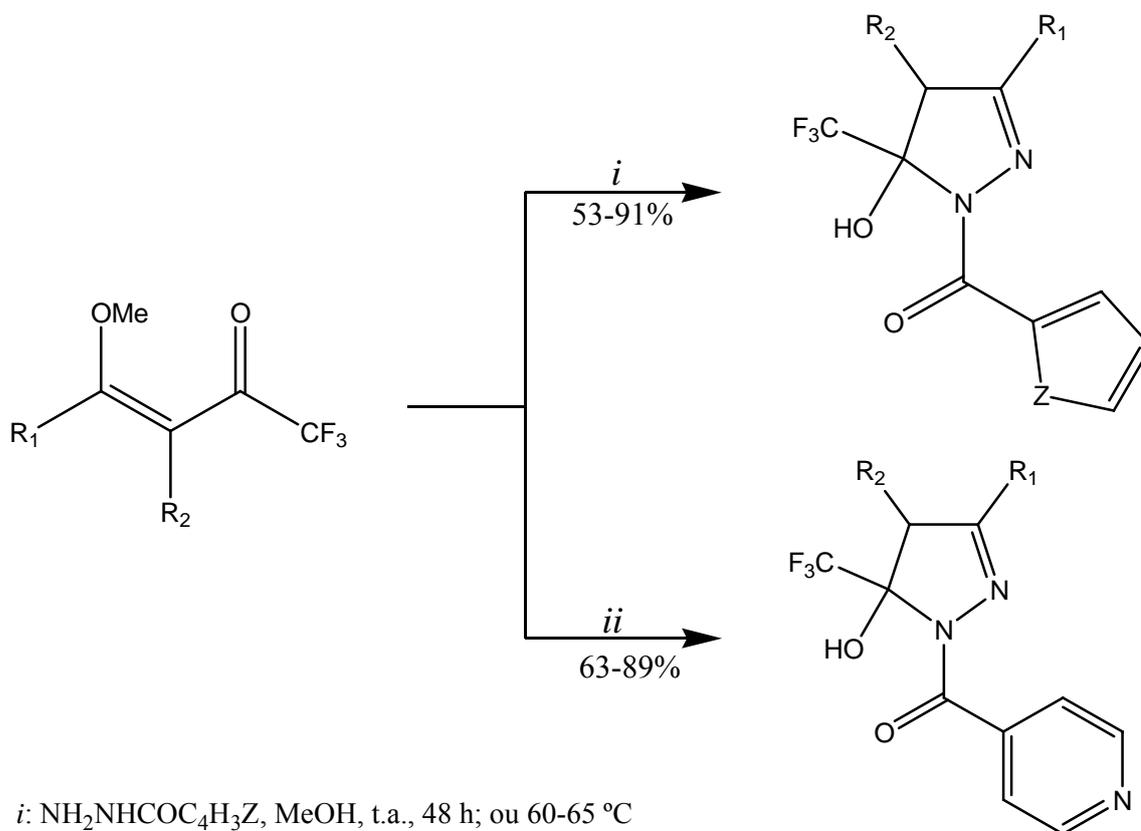


i: EtOH/HCl, 78 °C, 2,5 h.

R₁: Ph, 4-MePh, 4-FPh, 4-ClPh, 4-BrPh

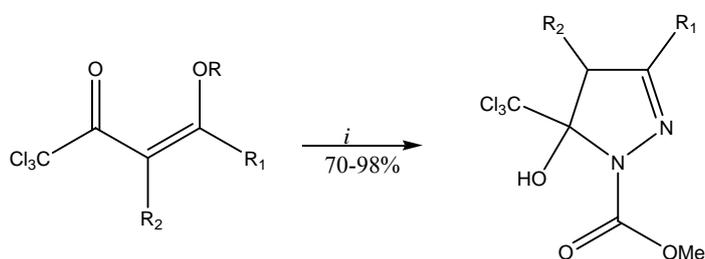
Em 2005, Bonacorso *et al.*^{64b} propuseram a síntese de 1-(2-tenoil)-, 1-(2-furil)- e 1-(2-isonicotinoil)-3-alkil(aril)-5-hidroxi-5-trifluormetil-4,5-diidro-1*H*-pirazóis a partir da reação de ciclocondensação de 4-alcoxi-1,1,1-trifluormetil-3-buten-2-onas com tenoilhidrazina, furanoilhidrazina e isonicotinoilhidrazina, respectivamente. As três séries de compostos foram obtidas utilizando uma relação molar de 1:1 entre hidrazinas e enonas, usando como solvente metanol, levando a obtenção dos produtos de maneira regioespecífica, em passo reacional único com rendimentos moderados a bons (Esquema 14).

Esquema 14:



Em 2006, Martins *et al.*⁶³ publicaram recentemente trabalho demonstrando a utilização de energia proveniente da irradiação de microondas na síntese de uma série de 5-hidroxi-5-triclorometil-4,5-diidro-1*H*-carboximetilpirazóis. A reação entre as 4-alcoxi-1,1,1-tricloro-3-buten-2-onas e carboximetilhidrazina foi realizada em forno de microondas doméstico sem a necessidade do uso de solvente. A mistura foi aquecida por 6 minutos fornecendo 4,5-diidro-1*H*-1carboximetilpirazóis com bons rendimentos. O uso desta metodologia reduziu drasticamente o tempo reacional, de 24h em refluxo de metanol no método tradicional, além disso, aumentou os rendimentos em aproximadamente 10% (Esquema 15).

Esquema 15:



i: NH₂NHCO₂Me, 45 W, 50-55°C, 6 min

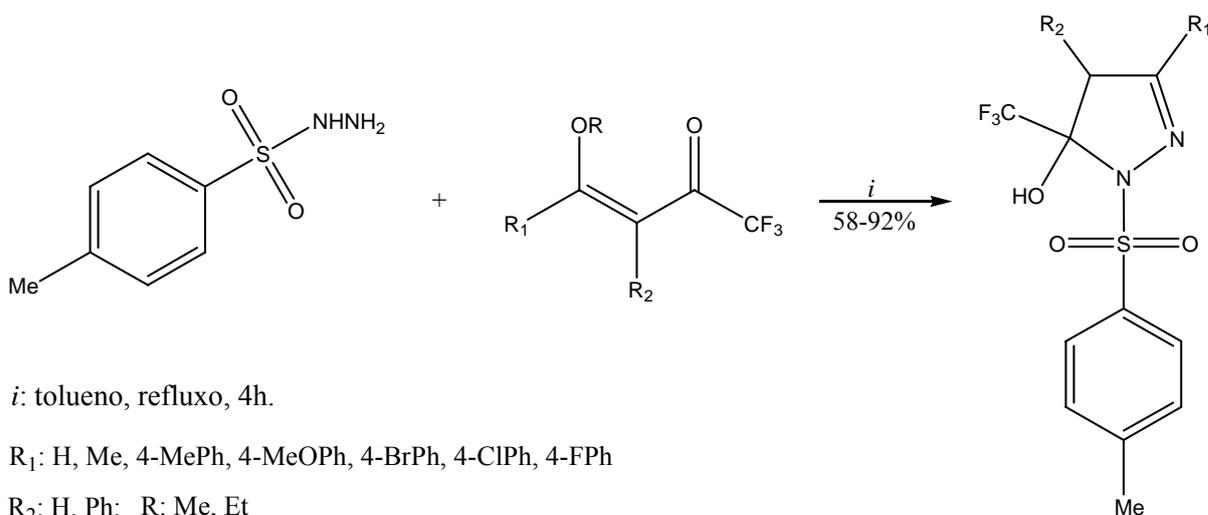
R₁: H, Me, Et, Pr, *i*-Pr, *i*-Bu, *t*-Bu, 4-NO₂, 4-NO₂Ph

R₂: H, Me

R: Me, Et

Em 2006, Bonacorso *et al.*^{64b} sintetizaram uma série de 4-fenil-3-alkil(aril)-5-hidroxi-4,5-diidro-1*H*-1-tosilpirazóis a partir da ciclocondensação das 4-alcoxi-1,1,1-trifluor-3-buten-2-onas com *p*-tosilhidrazina, em tolueno como solvente. Os compostos sintetizados tiveram suas atividades avaliadas *in vitro* contra fungos e bactérias, os quais evidenciaram alta atividade frente a bactérias gram-positivas. O composto 3-(4-flúorfenil)-5-trifluormetil-5-hidroxi-4,5-diidro-1*H*-tosilpirazol apresentou uma atividade promissora nos ensaios realizados, por conferir alta sensibilidade das bactérias ao composto em estudo (Esquema 16).

Esquema 16:



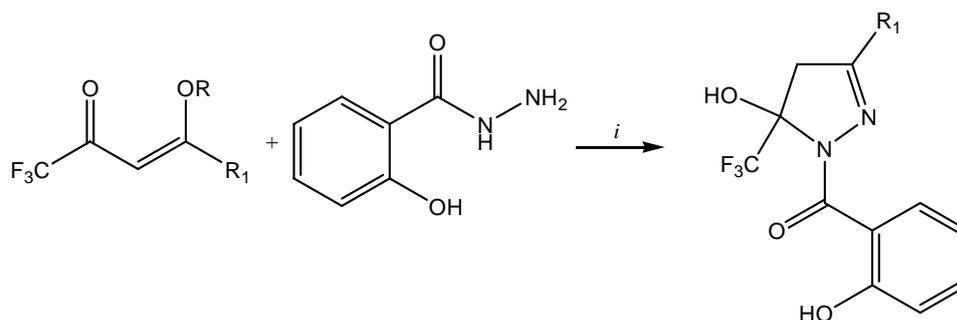
i: tolueno, refluxo, 4h.

R₁: H, Me, 4-MePh, 4-MeOPh, 4-BrPh, 4-ClPh, 4-FPh

R₂: H, Ph; R: Me, Et

Em 2007, Martins *et al.*⁸⁰ sintetizaram 5-hidroxi-3-alkil/aril-5-trifluormetil-4,5-diidro-1*H*-1-(2-hidroxibenzoil)pirazol, utilizando 4-alcoxi-4-alkil(aril)-1,1,1-trifluor-3-buten-2-ona e salicil hidrazina. Os compostos obtidos apresentaram rendimentos bons a ótimos (Esquema 17).

Esquema 17:

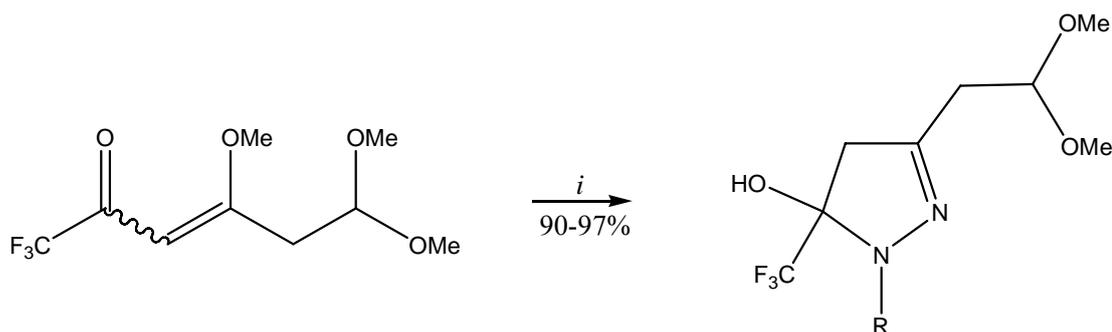


i: MeOH(EtOH), refluxo, 16h.

R: Me, Et; R₁: H, Me, Ph, 4-MePh, 4-BrPh, 4-FPh

Em 2008, na dissertação de Porte⁸¹, foi sintetizada uma série de 4,5-diidro-1*H*-pirazóis contendo uma função aldeído protegida sob a forma de acetal, a partir da 4,6,6-trimetoxi-1,1,1-trifluorhex-3-en-2-ona com diferentes hidrazinas, em ótimos rendimentos (Esquema 18).

Esquema 18:



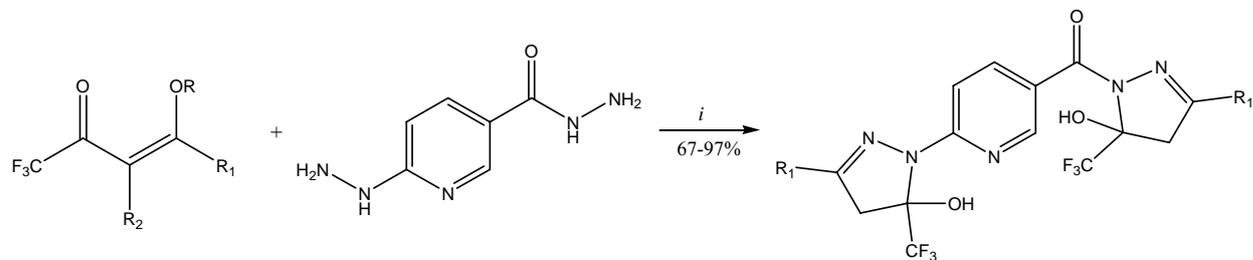
i: NH₂NHR, EtOH, 4-20 h, refluxo

R: 2-furanoil, C₆F₅, COOMe, COMe, Nicotinoil

Também em 2008, na dissertação de Paim⁸², foi sintetizada uma série de novas 2-[3-alkil(aril/heteroaril)-5-hidroxi-5-trialometil-4,5-diidro-1*H*-pirazol-1-il]-5-[3-alkil(aril/heteroaril)-5-hidroxi-5-trialometil-4,5-diidro-1*H*-pirazol-1-il-1-carbonil]piridinas,

obtidas a partir da reação de ciclocondensação de 1,1,1-trialo-4-[alquil(aril/heteroaril)]-4-alcoxi-3-alquen-2-onas com hidazida 6-hidrazino nicotínica em bons rendimentos (Esquema 19).

Esquema 19:



i: EtOH, refluxo, 4h

R: H, Me, Ph, 4-OMePh, 4-NO₂Ph, 4,4'-BiPh, naft-1-il, fur-2-il, tien-2-il

2.3 Tuberculose

2.3.1 Agente etiológico

Micobactérias são bacilos de forma alongada, aeróbicas, não esporuladas e imóveis, com um revestimento céreo que lhes confere a propriedade de resistir à descoloração quando tratadas com álcool-ácido resistente (BAAR). Evolutivamente, encontram-se entre as bactérias e os fungos, por isso o nome dado à família a qual pertence, *Mycobacteriaceae*. O gênero de maior importância, *Mycobacterium*, engloba bacilos patogênicos de interesse clínico, como *M. tuberculosis*, *M. leprae* e *M. bovis*, além do complexo *M. avium-intracellulare*, patógenos oportunistas principalmente em pessoas imunodeprimidas como indivíduos portadores do vírus HIV⁸⁴.

O *M. tuberculosis*, principal agente causador da tuberculose, foi descoberto por Robert Koch em 1882 (Figura 6). Em homenagem ao cientista alemão, o bacilo ficou conhecido como bacilo de Koch⁸⁵.



Figura 6: *Mycobacterium tuberculosis*

Duas espécies de bactérias causam tuberculose: o complexo *M. tuberculosis* e *M. bovis*. O complexo *M. tuberculosis* é transmitido, principalmente, por perdigotos produzidos durante a tosse, espirro ou fala do indivíduo infectado pelo bacilo. As pequenas gotículas espalhadas são suficientes para alcançar os alvéolos pulmonares, onde o bacilo inicia sua multiplicação no macrófago alveolar. Já o *M. Bovis* é transmitido através do leite de vacas infectadas que, quando ingerido, produz primeiramente lesões intestinais e amigdalianas^{85, 86}.

O complexo *M. avium-intracellulare* constitui-se de duas espécies de micobactérias intimamente ligadas, com virulência muito baixa em hospedeiros normais, mas que causam infecções disseminadas em pacientes com vírus HIV⁸⁷. Podem também infectar pessoas com o pulmão debilitado pelo tabagismo prolongado, por tuberculose pulmonar, bronquite, efisema ou outras doenças. Contrariamente à tuberculose causada pelo *M. tuberculosis*, a infecção por *M. avium-intracellulare* não é transmitida de uma pessoa para outra⁸⁸.

2.3.2 Agentes Antimicobacterianos

Na década de 40 a quimioterapia da TB foi baseada em um número limitado de antibióticos (estreptomicina) e drogas sintéticas (ácido *p*-amino benzóico). Após a descoberta da estreptomicina, novos fármacos foram utilizados com sucesso, destacando-se a isoniazida (INH) em 1952; a Rifampicina (RMP) em 1956; Etambutol (EMB) sintetizado em 1960, e empregado somente em 1968; e a Pirazinamida (PZA) sintetizada em 1936, e usada apenas em 1970⁸⁵.

Estes fármacos são chamados de primeira escolha, pois é a primeira opção no tratamento podendo ser empregados com sucesso na grande maioria dos pacientes. Os fármacos ditos como de segunda escolha são utilizados em casos de falência aos fármacos de primeira escolha, tais como, cicloserina, canamicina, ácido *p*-aminosalicílico (PAS), amicacina, etionamida, tiocetazona, clorofazimina e terizidona, além da potente classe de fluorquinolonas⁸⁵.

2.3.2.1 Isoniazida (INH)

A INH é o principal e mais potente antimicobacteriano no tratamento da tuberculose (Figura 1). Este fármaco foi descoberto em 1952 por Fox e Gibas (1952), durante a síntese de tiosemicarbazona, quando estes notaram que as reações eram afetadas por uma modificação no percurso da síntese e se depararam com um intermediário isonicotinoilidrazínico. A partir deste intermediário foram realizados ensaios, sendo que os resultados apresentados foram superiores aos da estreptomicina, melhor antimicrobiano até então⁸⁹.

A INH é ativada dentro da célula bacteriana pela enzima catalase-peroxidase (KatG). Da reação da INH com a enzima resulta uma variedade de radicais orgânicos tóxicos que atacam múltiplos alvos da célula bacteriana⁹⁰.

A INH é uma pró-droga que possui atividade bactericida principalmente contra o microorganismo em replicação, e parece ser apenas bacteriostática contra aqueles em fase de latência¹. Como o *M. tuberculosis* em presença de INH mostra diminuição de seus ácidos graxos presentes na parede celular, pode-se deduzir que o mecanismo de ação da INH ocorre através da inibição destes ácidos graxos que são componentes da parede celular.

A resistência a INH pode estar associada a mutações que afetam um ou mais genes, como os que codificam a catalase-peroxidase(KatG)-enzima ativadora do fármaco, as enzimas enoil-ACP-redutase (inhA) e β -cetoacil ACP sintase (KasA) envolvidas na biossíntese do ácido micólico, e a alquil hidroperóxido redutase (ahpC) envolvida na resposta celular ao estresse oxidativo^{90,91}.

A INH é absorvida rapidamente pela administração oral, que pode ser alterada pela alimentação concomitante ou uso de antiácidos sendo, portanto, recomendada a administração em jejum. O fármaco é amplamente distribuído pelos tecidos. O uso contínuo de INH mostra alta hepatotoxicidade, sendo que, portadores de hepatopatias devem ser clinicamente monitorados¹.

2.3.2.2 Rifampicina

A Rifampicina é um antibiótico semi-sintético produzido pelo *Streptomyces mediterranei*¹. É um fármaco lipofílico altamente ativo que se difunde rapidamente através do envelope hidrofóbico das micobactérias (Figura 7). Foi introduzida para uso na terapia contra a tuberculose no início de 1970 e é, atualmente, um dos mais importantes componentes da terapêutica, sendo capaz de diminuir o tempo de tratamento⁹¹.

O mecanismo de ação envolve a inibição da atividade da enzima RNA polimerase DNA dependente (RPDD), uma metaloprotease, ligando-se a uma subunidade β da enzima, tornando-se altamente ativo contra bacilos em divisão, tanto intra como extracelular. A inibição da RPDD leva ao bloqueio da formação da cadeia do RNA⁹¹.

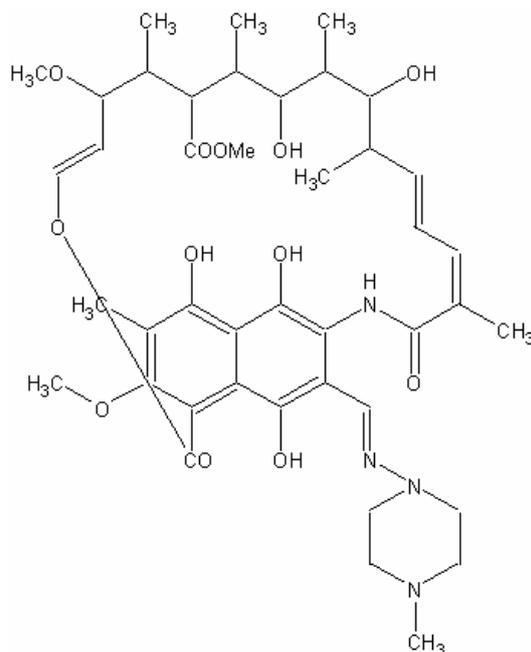


Figura 7: Estrutura molecular da Rifampicina

A administração de Rifampicina é via oral, sendo absorvida rapidamente pelo intestino, deve ser administrada sem o uso concomitante de outros antimicrobianos e em jejum, devido a interferência na atividade¹.

2.3.2.3 Pirazinamida (PZA)

A atividade antituberculosa da PZA foi descoberta em 1970 e, atualmente, é a terceira droga mais importante no combate à tuberculose⁹¹ (Figura 8).

A PZA é bactericida para micobactérias latentes, reduz o tempo total de tratamento destruindo os bacilos que permanecem em pH baixo e que, normalmente, não seriam afetados por outras drogas antituberculosas¹.

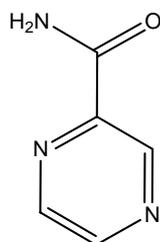


Figura 8: Estrutura molecular da Pirazinamida (PZA)

Possui atividade antimicobacteriana contra *M. tuberculosis*, mas desenvolve a resistência rapidamente sendo recomendada, portanto, a terapia combinada, uma vez que esse

tipo de terapia reduz essa possibilidade. A atividade da PZA parece ser inativa em pH neutro⁹¹.

É utilizada na primeira fase do tratamento quando a infecção encontra-se ainda como granulomatosa, pelo fato deste fármaco atravessar facilmente a membrana do macrófago e atuar muito bem em pH ácido. A importância da PZA reside, então, na sua capacidade de destruir bacilos no interior dos macrófagos, complementando a ação da INH e da RIF⁹¹.

O mecanismo de ação deste fármaco é desconhecido. Uma hipótese proposta por Cynamom *et al.* em 1992, é que a PZA pode ser parcialmente ou totalmente ativada como um fármaco. A PZA é ativada apenas no pH ácido do ambiente intramacrofágico, mas não é ativada simplesmente pelo pH. Este ambiente pode induzir componentes bacterianos que ativam PZA, provavelmente uma amidase específica à pirazinamidase. Organismos suscetíveis produzem pirazinamidase, que é responsável pela conversão a ácido pirazinóico. Cepas resistentes não produzem esta amidase, devido a mutase no gene associado (*pncA*), sugerindo que a forma ácida do fármaco é a forma ativa. A PZA seria um pró-fármaco do ácido pirazinóico ativo contra *M. tuberculosis*^{92a, b}.

2.3.2.4 Etambutol (EMB)

O EMB (Figura 9) é um composto sintético, que possui atividade bacteriostática. Possui baixa solubilidade em água e é absorvido rapidamente após a administração oral¹.

Apesar da modesta atividade antitubercular, o EMB é usado em combinação com outros fármacos contra a TB devido ao seu sinergismo com estes e sua baixa toxicidade. É amplamente utilizado no esquema primário de tratamento da tuberculose, pois atua diretamente sobre a síntese de arabinose em *M. tuberculosis* e outras micobactérias. Seu mecanismo de ação está relacionado à inibição da incorporação do ácido micólico, essencial para a formação da parede celular da micobactéria⁹³.

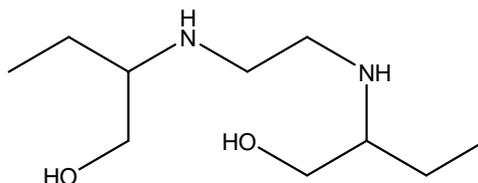


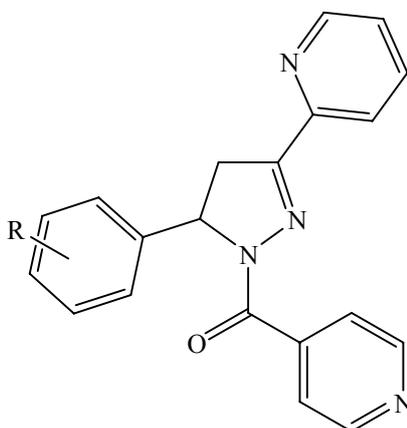
Figura 9: Estrutura molecular do etambutol (EMB)

2.4 Compostos Derivados da Isoniazida

A INH (Figura 1) apresenta uma estrutura bastante simples e interessante, na qual está contido um anel de piridina e a função hidrazida que são essenciais para atividade contra *M. tuberculosis*⁹⁰. Devido a isso a sua importância farmacológica, muitos compostos foram sintetizados tendo como um dos precursores a INH ou derivados da mesma.

Em 2001 Mamolo *et al.*^{94a} descreveram a síntese e atividade antimicobacteriana de uma série de 5-aryl-1-isonicotinoil-3-(piridin-2-il)-4,5-diidro-1*H*-pirazol. Os compostos sintetizados foram testados contra cepas de *M. tuberculosis* H37Rv e H4. Os resultados demonstraram atividades antimicobacteriana *in vitro* e seus valores de CIM estão entre 8 e 16 µg/ml.

Neste estudo, os autores demonstraram que a atividade dos compostos depende da liberação de INH no meio biológico. Esta liberação de INH é favorecida devido à presença do substituinte 2-piridil na posição C-3 da pirazolina, quando comparada com compostos descrito na literatura^{94b}, nos quais estes apresentam como substituinte *orto* hidróxi fenila nesta posição. Estes autores atribuem que a falta de atividade destes compostos é devido à ligação de hidrogênio que ocorre entre a hidroxila e o nitrogênio da posição C-2 da pirazolina que impede a liberação da INH.



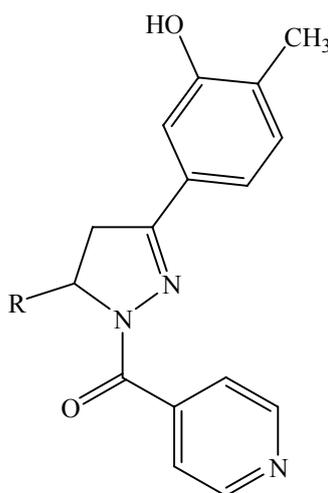
R: H, 2-Cl, 3-Cl, 4-Cl, 2-Br, 3-Br, 4-Br, 2-F, 3-F, 4-F, 2-CH₃, 3-CH₃, 4-CH₃

Figura 10: Estrutura de 5-aryl-1-isonicotinoil-3-(piridin-2-il)-4,5-diidro-1*H*-pirazol

Já em 2006, Shaharyar *et al.*⁸ sintetizaram uma série de *N*^l-nicotinoil-3-(4'-hidroxi-3'-metilfenil)-5-[(aryl)-fenil]-2-pirazolininas pela reação entre chalconas e isonicotinoil hidrazina. Estes compostos foram testados frente *M. tuberculosis* H37Rv e *M. tuberculosis* INH-

resistentes. Os valores de CIM variaram entre 0,26 a 16,13 μM para cepas *M. tuberculosis* H37Rv e a 0,23 a 8,05 μM para cepas INH-resistentes.

Entre os compostos testados, os autores descrevem que compostos que possuem grupo fenila substituídos com átomos de halogênio e furil são ativos que a INH para cepas de *M. tuberculosis* H37Rv. Já para cepas *M. tuberculosis* INH-resistentes, todos os compostos demonstram melhores valores CIM quando comparadas a INH.



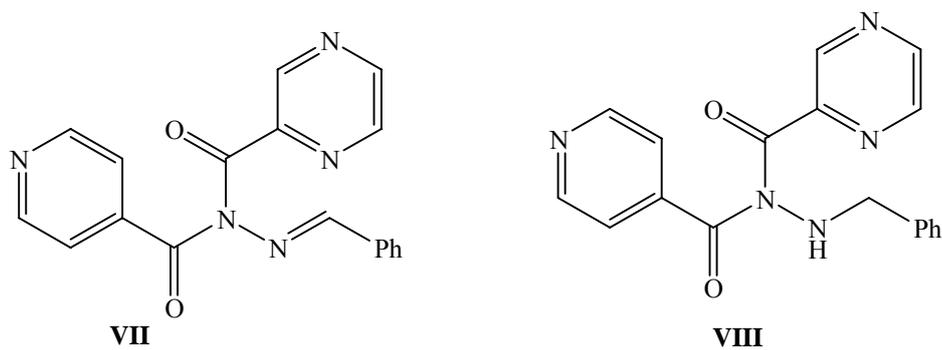
R: 4-MeOPh, 4-ClPh, Ph, 3,4-MeOPh, 2,3,4-MeOPh, Furil, 4-FPh, 2-ClPh, 2,6-ClPh, 3-NO₂Ph

Figura 11: Estrutura de *N*¹-nicotinoil-3-(4'-hidroxi-3'-metilfenil)-5-[(aril)-fenil]-2-pirazolinas

Sinha *et al.*⁹⁵ em 2005 realizaram a síntese e atividade antimicobacteriana de uma série de derivados da isonicotinoil hidrazina **VII**, as hidrazonas. A atividade foi testada frente a cepas de *M. tuberculosis*.

Segundo os autores, observou-se que quando o anel fenila é substituído por cloro com variação nas posições *orto*, *para* e *meta*, os compostos exibiram atividade semelhantes à INH. Porém quando ocorre substituição do átomo de cloro pelos substituintes nitro e metoxila ocorreu uma redução na atividade. Além disso, sugere-se que grupos volumosos ou dissubstituição no anel da fenila não são favoráveis.

Alguns destes compostos foram submetidos à reação de redução, resultando em uma nova série de compostos **VIII** que foram avaliadas as atividades antimicobacterianas. Estes compostos demonstraram aumento na atividade. Isto ocorre devido ao grau de liberdade da ligação dos substituintes fenila, permitindo melhor interação a um receptor levando a atividade inibitória (Figura 12).



Ar: 3-ClPh, 4-ClPh, 3-NO₂Ph, 4-MeOPh, 2-ClPh, 2,3-Cl₂Ph, 2-furil, 3-MeO-4-OHPh, 2-OH-MeOPh, 3-PhOPh

Figura 12: Estrutura de derivados da isonicotinoil hidrazida

3. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Neste capítulo será apresentada a numeração e a nomenclatura dos compostos sintetizados os quais foram submetidos a testes de atividade biológica contra o *M.tuberculosis*.

A identificação dos compostos foi feita por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectroscopia de Massas (CG-MS) e Ressonância Magnética Nuclear (RMN) ^1H , ^{13}C {H} e suas purezas foram comprovadas por análise elementar.

Na primeira etapa, será descrita a síntese dos precursores 4-alcoxi-1,1,1-trialo-3-alquen-2-onas **1a-i** e **2g-i** a partir da reação de acilação de enoléteres e acetais, conforme metodologia desenvolvida por Hojo *et al.*^{17, 18} e sistematizada por Martins *et al.*¹⁹.

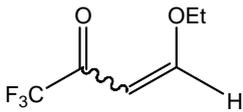
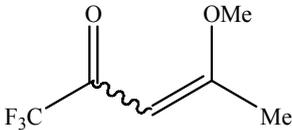
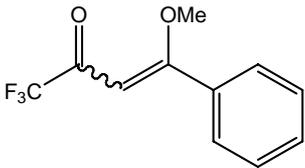
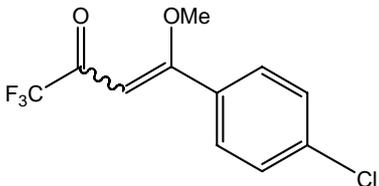
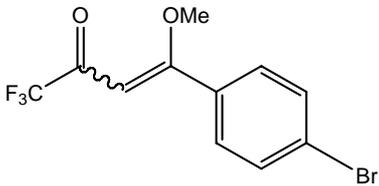
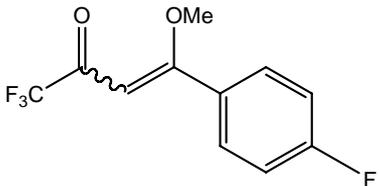
Na sequência, serão discutidas as reações de 4-alcóxi-1,1,1-trialo-3-alquen-2-ona **1a-i** e **2g-i** com isonicotinoil, 2-cloro isonicotinoil e nicotinoil hidrazinas.

Por fim, serão discutidos os testes destes compostos contra o *M.tuberculosis*, através da realização de ensaios *in vitro*.

3.1 Numeração e Nomenclatura dos compostos

A numeração dos compostos adotada neste trabalho e a nomenclatura segundo o *Chemical Abstract*, estão representadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Numeração dos compostos **1-8**

Compostos	Nomenclatura
1a 	4-etoxi-1,1,1-trifluor-3-buten-2-ona
1b 	4-metoxi-1,1,1-trifluor-3-penten-2-ona
1c 	4-fenil-4-metóxi-1,1,1-trifluor-3-buten-2ona
1d 	4-(4-clorofenil)-4-metóxi-1,1,1-trifluor-3-buten-2-ona
1e 	4-(4-bromofenil)-4-metóxi-1,1,1-trifluor-3-buten-2-ona
1f 	4-(4-fluorfenil)-4-metóxi-1,1,1-trifluor-3-buten-2-ona

3. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Tabela 1 - Numeração dos compostos **1- 8**

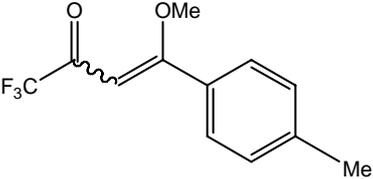
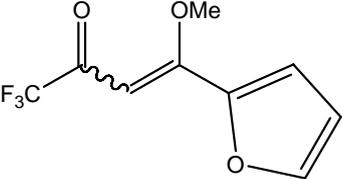
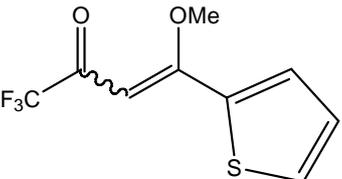
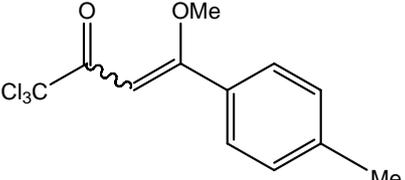
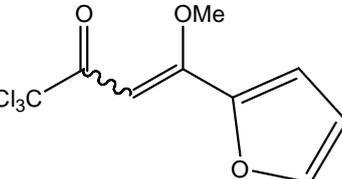
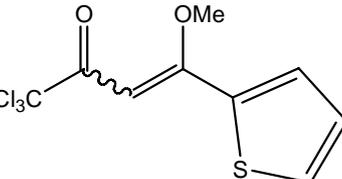
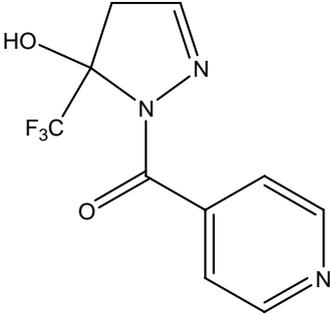
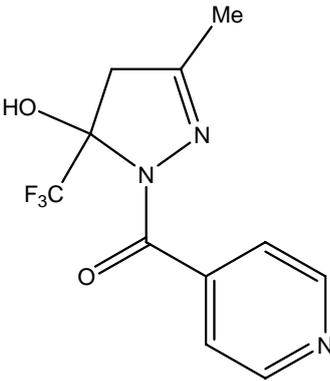
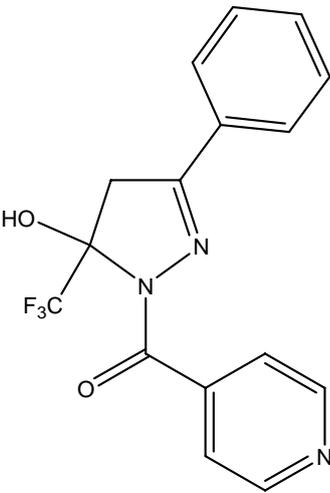
Compostos	Nomenclatura
1g 	4-(4-metilfenil)-4-metóxi-1,1,1-trifluor-3-buten-2-ona
1h 	4-(2-furil)-4-metóxi-1,1,1-trifluor-3-buten-2-ona
1i 	4-(2-tienil)-4-metóxi-1,1,1-trifluor-3-buten-2-ona
2g 	4-(4-metilfenil)-4-metóxi-1,1,1-tricloro-3-buten-2-ona
2h 	4-(2-furil)-4-metóxi-1,1,1-tricloro-3-buten-2-ona
2i 	4-(2-tienil)-4-metóxi-1,1,1-tricloro-3-buten-2-ona

Tabela 1 - Numeração dos compostos 1- 8

Compostos	Nomenclatura	
3a		<p>5-hidroxi-5-trifluormetil-4,5-diidro -1H-1-(isonicotinoil)pirazol</p>
3b		<p>5-hidroxi-3-metil-5-trifluormetil-4,5-diidro -1H-1-(isonicotinoil)pirazol</p>
3c		<p>5-hidroxi-3-fenil-5-trifluormetil-4,5-diidro-1H-1-(isonicotinoil)pirazol</p>

3. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Tabela 1 - Numeração dos compostos 1- 8

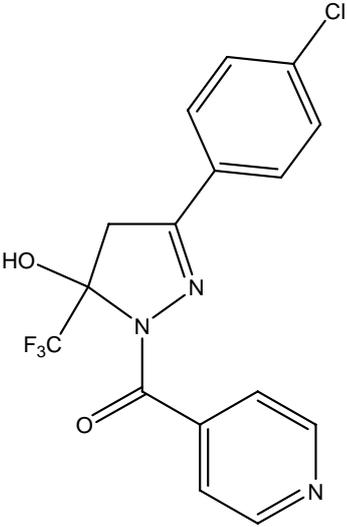
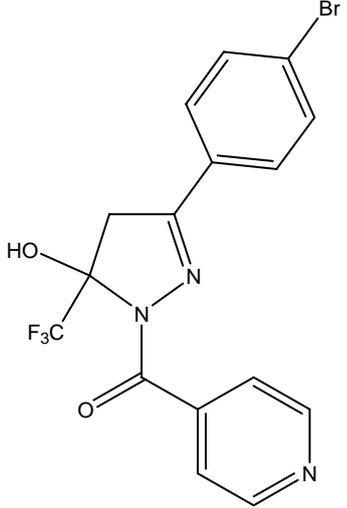
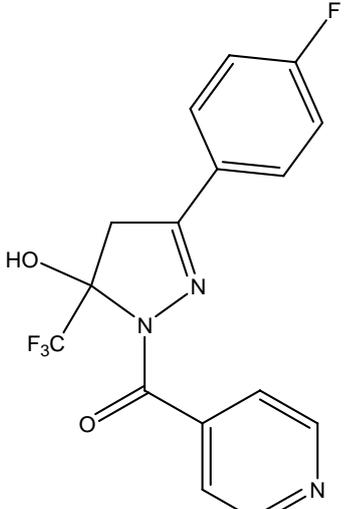
Compostos	Nomenclatura
3d 	5-hidroxi-3-(4-clorofenil)-5-trifluormetil-4,5-diidro-1 <i>H</i> -1-(isonicotinoil)pirazol
3e 	5-hidroxi-3-(4-bromofenil)-5-trifluormetil-4,5-diidro 1 <i>H</i> -1-(isonicotinoil)pirazol
3f 	5-hidroxi-3-(4-fluorfenil)-5-trifluormetil-4,5-diidro 1 <i>H</i> -1-(isonicotinoil)pirazol

Tabela 1 - Numeração dos compostos 1- 8

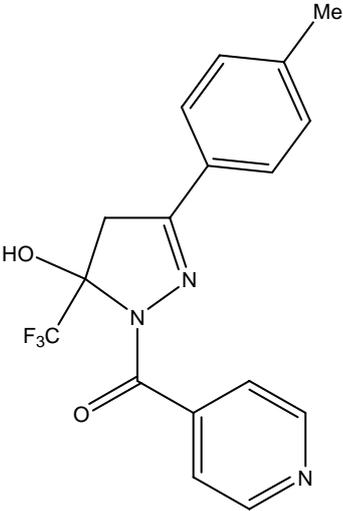
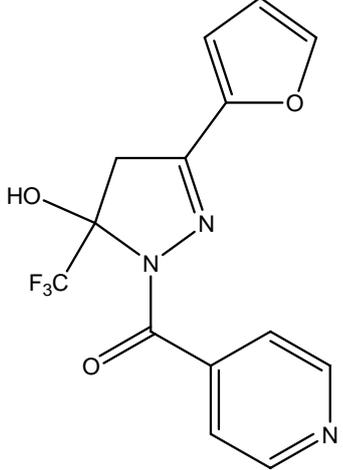
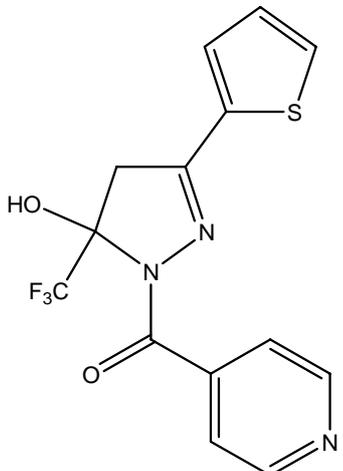
Compostos	Nomenclatura	
3g		5-hidroxi-3-(4-metilfenil)-5-trifluormetil-4,5-dihidro- 1 <i>H</i> -1-(isonicotinoil)pirazol
3h		5-hidroxi-3-(2-furil)-5-trifluorometil-4,5- diidro- 1 <i>H</i> -1-(isonicotinoil)pirazol
3i		5-hidroxi-3-(2-tienil)-5-trifluormetil-4,5- diidro- 1 <i>H</i> -1-(isonicotinoil)pirazol

Tabela 1 - Numeração dos compostos 1- 8

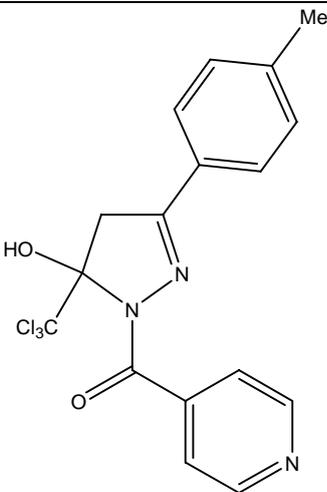
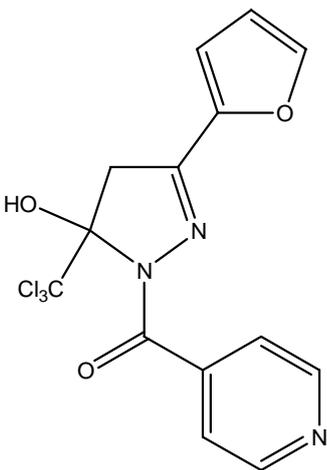
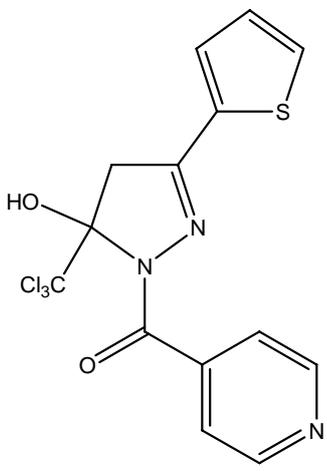
Compostos	Nomenclatura
<p>4g</p> 	<p>5-hidroxi-3-(4-metilfenil)-5-triclorometil-4,5-diidro-1<i>H</i>-1-(isonicotinoil)pirazol</p>
<p>4h</p> 	<p>5-hidroxi-3-(2-furil)-5-triclorometil-4,5- diidro-1<i>H</i>-1-(isonicotinoil)pirazol</p>
<p>4i</p> 	<p>5-hidroxi-3-(2-tienil)-5-triclorometil-4,5- diidro-1<i>H</i>-1-(isonicotinoil)pirazol</p>

Tabela 1 - Numeração dos compostos 1- 8

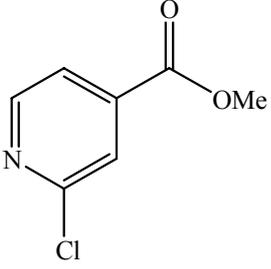
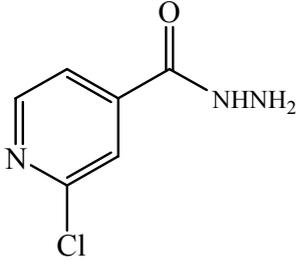
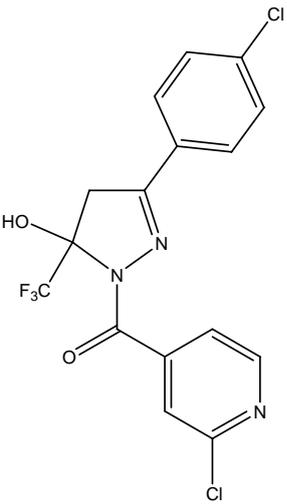
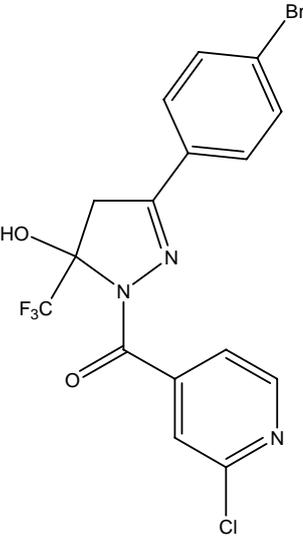
Compostos	Nomenclatura
<p>5</p> 	<p>metil 2-cloroisonicotinato</p>
<p>6</p> 	<p>2-cloro isonicotinoilhidrazina</p>
<p>7d</p> 	<p>5-hidroxi-3-(4-clorofenil)-5-trifluormetil-4,5-diidro-1<i>H</i>-1-(2-cloroisonicotinoil)pirazol</p>
<p>7e</p> 	<p>5-hidroxi-3-(4-bromofenil)-5-trifluormetil-4,5diidro-1<i>H</i>-1-(2-cloroisonicotinoil)pirazol</p>

Tabela 1 - Numeração dos compostos 1- 8

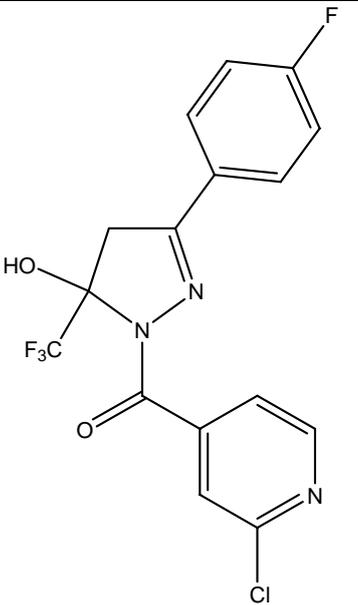
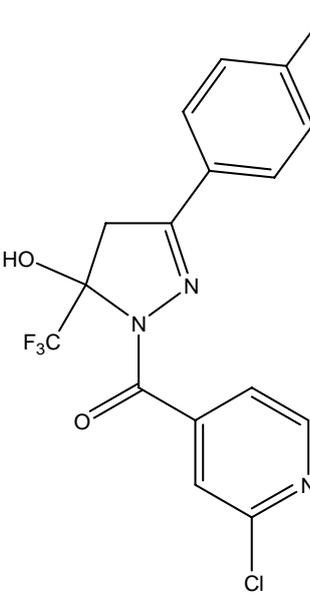
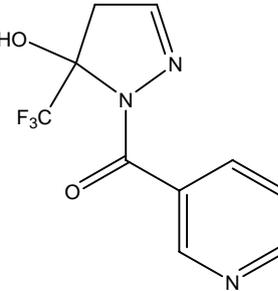
Compostos	Nomenclatura
<p>7f</p> 	<p>5-hidroxi-3-(4-fluorfenil)-5-trifluormetil-4,5-diidro- 1<i>H</i>-1-(2-cloroisonicotinoil)pirazol</p>
<p>7g</p> 	<p>5-hidroxi-3-(4-metilfenil)-5-trifluormetil-4,5-diidro- 1<i>H</i>-1-(2-cloroisonicotinoil)pirazol</p>
<p>8a</p> 	<p>5-hidroxi-5-trifluormetil-4,5-diidro-1<i>H</i>-1- (nicotinoil)pirazol</p>

Tabela 1 - Numeração dos compostos 1- 8

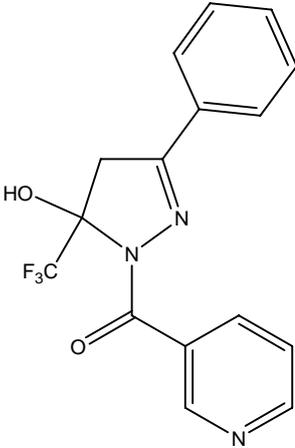
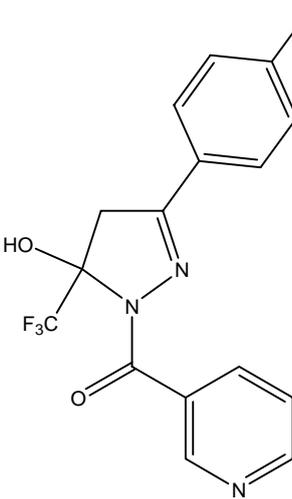
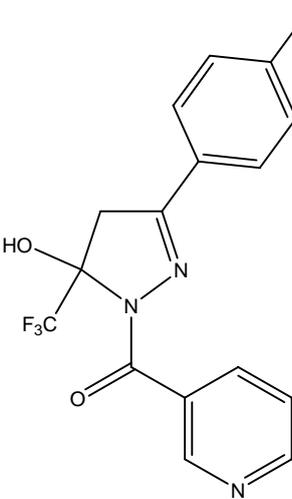
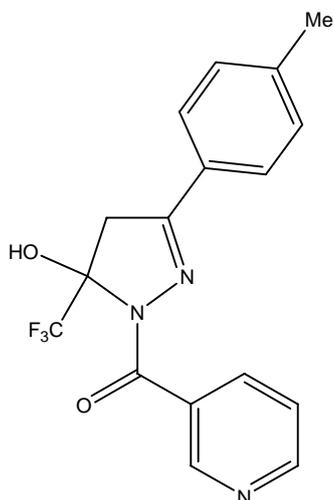
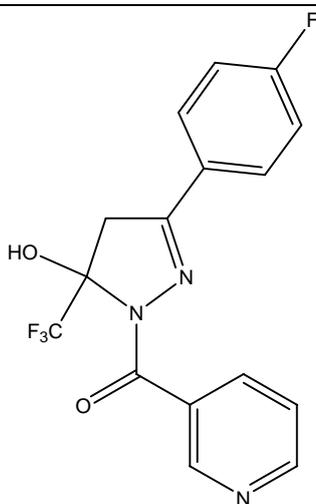
Compostos	Nomenclatura
<p>8c</p> 	<p>5-hidroxi-3-fenil-5-trifluormetil-4,5-diidro-1<i>H</i>-1-(nicotinoil)pirazol</p>
<p>8d</p> 	<p>5-hidroxi-3-(4-clorofenil)-5-trifluormetil-4,5-diidro-1<i>H</i>-1-(nicotinoil)pirazol</p>
<p>8e</p> 	<p>5-hidroxi-3-(4-bromofenil)-5-trifluormetil-4,5-diidro-1<i>H</i>-1-(nicotinoil)pirazol</p>

Tabela 1 - Numeração dos compostos 1- 8

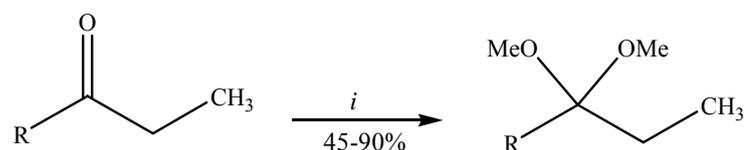
Compostos	Nomenclatura
8f	5-hidroxi-3-(4-fluorfenil)-5-trifluormetil-4,5-diidro-1H-1-(nicotinoil)pirazol
8g	5-hidroxi-3-(4-metilfenil)-5-trifluormetil-4,5-diidro-1H-1-(nicotinoil)pirazol



3.2 Síntese de Acetais

A reação de obtenção dos acetais (Esquema 20) foi realizada de acordo com técnica descrita por Martins *et al.*⁵⁶, a partir de acetofenonas com ortoformiato de trimetila e quantidades catalíticas de ácido *p*-tolueno sulfônico, em metanol anidro. O tempo reacional é de 24 horas em repouso, à temperatura ambiente (25 °C). Após neutralização com carbonato de sódio anidro, filtrado e solvente removido por rota evaporação. Os acetais foram obtidos na sua forma pura através de destilação a pressão reduzida. Os pontos de ebulição, bem como os rendimentos estão de acordo com a literatura^{17-19, 48}.

Esquema 20:



i = TsOH, HC(OMe)₃, t.a., 24h

	c	d	e	f	g	h	i
R	Ph	4-CIPh	4-BrPh	4-FPh	4-MePh	2-furil	2-tienil

3.3 Síntese de 1,1,1-Trieto-4-alkil[aril(heroaril)]-4-alcoxi-3-alken-2-onas Substituídas (1a-i) e (2g-i)^{17-19,42,48}

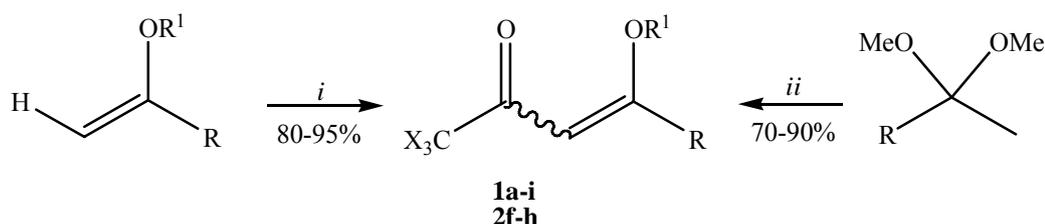
A síntese dos compostos **1a-i** e **2g-i** foi baseada na metodologia desenvolvida pelos pesquisadores do NUQUIMHE.

A reação de acilação foi realizada adicionando-se anidrido trifluoroacético ou cloreto de tricloroacetoila a mistura de acetal ou enoléter, piridina e clorofórmio anidro em banho de gelo e sob agitação magnética. A mistura foi deixada durante 16 horas, a 45 °C para os acetais derivados das acetofenonas e 16 horas a temperatura ambiente para os enoléteres adquiridos comercialmente. Os produtos foram purificados por meio de destilação à pressão reduzida. A literatura cita rendimentos, na faixa de 80-90%, nossos trabalhos levaram a rendimentos similares aos descritos (70-90%) (Esquema 21).

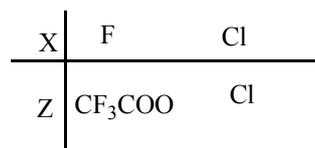
3. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Para que ocorra acilação de acetais são necessários dois equivalentes do acilante e da piridina. Isto porque o mecanismo da reação envolve primeiro a utilização de uma molécula do acilante na formação do enóleter, *in situ*, com conseqüente saída do trifluoracetato de metila. A seguir, uma segunda molécula do acilante reage com o enóleter para formar a vinil cetona desejada. A piridina no meio reacional funciona como base para a neutralização do ácido trifluoroacético resultante das duas etapas reacionais.

Esquema 21:



i = CX₃COZ, piridina, CHCl₃, 0-25°C, 24h
ii = CX₃COZ, piridina, CHCl₃, 25-70°C, 5-16h

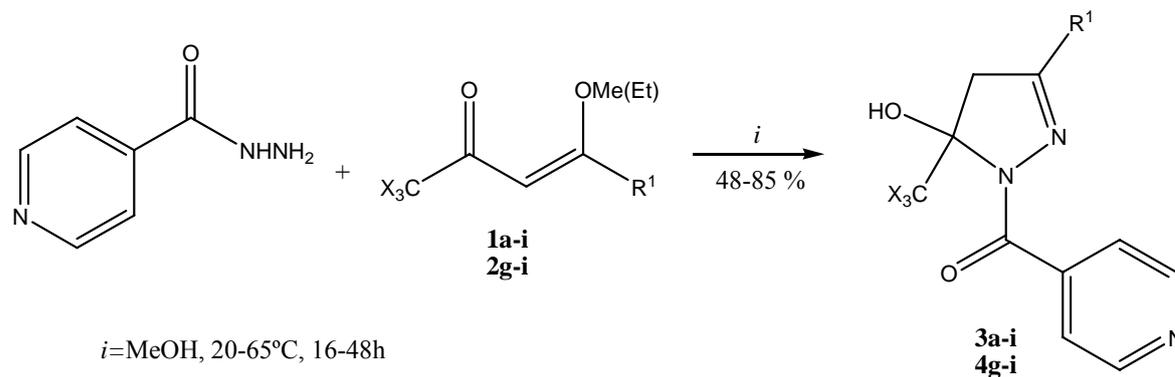


	a	b	c	d	e	f	g	h	i
R	H	Me	Ph	4-ClPh	4-BrPh	4-FPh	4-MePh	2-furil	2-tienil
R ¹	Et	Me	Me	Me	Me	Me	Me	Me	Me

3.4 Síntese de 5-Hidroxi-3-alkuil[aril(heteroaril)]-5-trifluor(cloro)metil-4,5-diidro-1H-1-(isonicotinoil)pirazóis (3a-i e 4g-i)

Neste tópico serão relatadas as reações de 1,1,1-trialo-4-alkuil[aril(heteroaril)]-4-alcoxi-3-alkuen-2-onas com isonicotinoilhidrazina segundo metodologia descrita por Bonacorso *et al.*^{62a,b} (Esquema 22). Todas as reações foram realizadas em metanol com tempo reacional variando de 16 à 48h e temperatura de 20-65°C. Após do término do tempo reacional, todos os compostos apresentaram-se na forma de sólidos e foram recristalizados em metanol ou acetona.

Esquema 22:



X	F	Cl
	1,3	2,4

1-4	a	b	c	d	e	f	g	h	i
R ¹	H	Me	Ph	4-ClPh	4-BrPh	4-FPh	4-MePh	2-Furil	2-Tienil

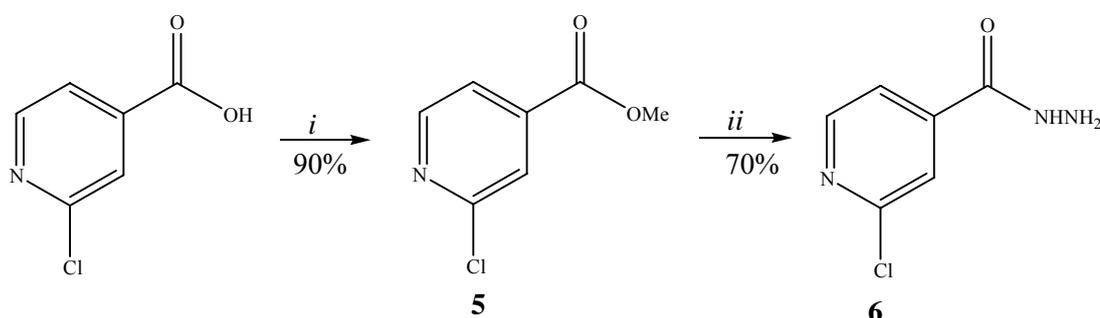
A identificação dos compostos **3a-i** e **4g-i** foi realizada por RMN ¹H, espectrometria de massas e ponto de fusão. Os espectros foram registrados em DMSO-*d*₆, utilizando tetrametilsilano (TMS) como referência interna. Os dados encontrados experimentalmente concordaram com os dados descritos na literatura^{62a, b}.

3.5 Síntese de 5-Hidroxi-3-alkil(aril)-5-trifluormetil-4,5-diidro-1H-1-(2-cloroisonicotinoil)pirazóis (7a, 7d-g)

3.5.1 Síntese de 2-cloro isonicotinoilhidrazina (6)

Considerando o fato de que nem todas as hidrazinas derivadas do ácido isonicotínico são disponíveis comercialmente, foi necessário realizar a síntese do composto **6** através de metodologias previamente descritas na literatura⁹⁶. Neste trabalho foi obtida a 2-cloro isonicotinoilhidrazina em dois passos reacionais, onde primeiramente foi realizada a reação de esterificação do ácido 2-cloro isonicotínico e em seguida a síntese da hidrazina utilizando a metodologia de Khan⁹⁶ (Esquema 23).

Esquema 23:



i = CH_2N_2 , éter, t.a

ii = $\text{NH}_2\text{NH}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, EtOH, refluxo, 12h

A Tabela 2 mostra os dados de rendimento e ponto de fusão dos compostos isolados **5** e **6**.

Tabela 2: Propriedades Físicas dos Compostos **5** e **6**.

Composto	Rend. (%)	P.F. (°C)	Fórmula Molecular (g/mol)
	90	Óleo (52-56) ^[a]	$\text{C}_7\text{H}_6\text{ClNO}_2$ (171,01)
	70	168-170	$\text{C}_6\text{H}_6\text{ClN}_3\text{O}$ (171,02)

[a] Ref. 97

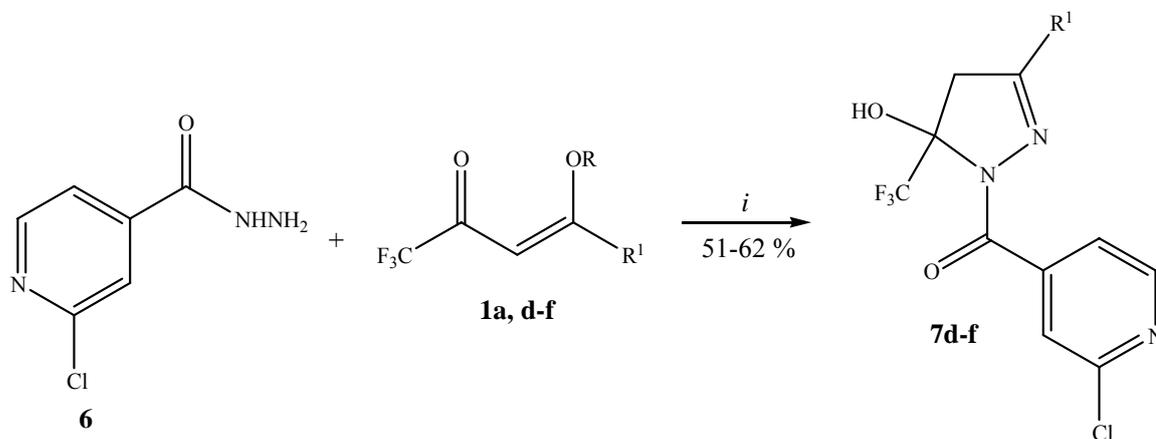
A identificação dos compostos **5** e **6** foi realizada por RMN ^1H e ^{13}C {H} e espectrometria de massas. Os espectros foram registrados em clorofórmio- d_1 para o composto **5** e DMSO- d_6 para o composto **6** utilizando tetrametilsilano (TMS) como referência interna (espectros estão no anexo I e II desta dissertação).

No Esquema 24 serão relatadas as reações de 1,1,1-trifluor-4-alkil(aril)-4-alcoxi-3-alken-2-onas substituídas com 2-cloroisonicotinoilhidrazina, a qual permitiu o isolamento de

3. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

uma nova série de 5-hidroxi-3-(aril)-5-trifluormetil-4,5-dihidro-1*H*-1-(2-cloroisonicotinoil)pirazóis (**7d-g**).

Esquema 24:



i = MeOH, 60-65°C, 20 h

1,7	a	d	e	f	g
R	Et	Me	Me	Me	Me
R ¹	H	4-ClPh	4-BrPh	4-FPh	4-MePh

Para realizar a ciclocondensação [3+2] foram testadas várias condições reacionais a partir de dados experimentais já publicados^{62b}. A melhor condição foi em metanol, e tempo reacional de 20 horas, sob temperatura de refluxo, com rendimentos de 51-62%.

Na tentativa de obter o composto **7a**, foram realizadas várias condições reacionais (Tabela 3), porém não foi possível isolar este composto, obtendo como produto final mistura complexa de produtos de partida e impurezas que dificultaram até mesmo a identificação. Vale salientar que todas as condições reacionais testadas foram acompanhadas por Cromatografia em Camada Delgada (CCD).

Tabela 3: Condições testadas para a obtenção do composto **7a**.

Reação	solvente	T (°C)	Tempo (h)	Rendimento (%)
1	MeOH	t.a	24	a
2	MeOH	t.a	48	a
3	MeOH	40	16	a
4	MeOH	50	24	a

[a]mistura complexa de material de partida e impurezas

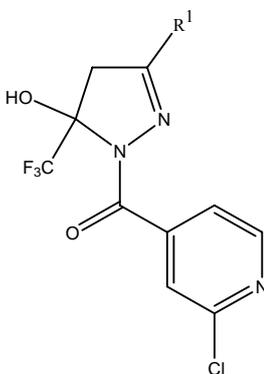
3. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Os compostos **7d-g** foram isolados do meio reacional como sólidos brancos, estáveis e de alta pureza e foram recristalizados em metanol ou acetona a temperatura de 0 -10°C.

A identificação destes compostos foi feita através de RMN de ^1H e ^{13}C {H}, Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrômetro de Massas, análise elementar e pontos de fusão.

A Tabela 4 mostra os dados de rendimento, ponto de fusão análise elementar dos compostos isolados **7d-g**.

Tabela 4- Propriedades Físicas dos compostos **7d-g**.



Composto	R ¹	Rend.(%) [a]	P.F (°C) [b]	Fórmula Molecular (g/mol)	Análise Elementar Cal./Exp		
					C	H	N
7d	4-ClPh	53	174-176	C ₁₆ H ₁₁ Cl ₂ F ₃ N ₃ O ₂ (404,17)	47,75	2,59	10,30
					47,67	2,46	10,33
7e	4-BrPh	58	162-164	C ₁₆ H ₁₁ ClBrF ₃ N ₃ O ₂ (448,62)	42,13	2,30	9,19
					42,08	2,22	9,37
7f	4-FPh	62	145-147	C ₁₆ H ₁₁ BrF ₄ N ₃ O ₂ (387,72)	49,67	2,57	10,88
					49,78	2,48	10,67
7g	4-MePh	51	152-154	C ₁₇ H ₁₄ ClF ₃ N ₃ O ₂ (383,75)	53,21	3,41	10,95
					52,81	3,11	10,72

[a] Rendimentos dos compostos recristalizados. [b] Pontos de fusão não corrigidos

3.5.2 Identificação Espectroscópica dos Compostos **7d-g**

A identificação dos compostos (**7d-g**) foi realizada por RMN ^1H e ^{13}C {H}. Os espectros foram registrados em DMSO-*d*₆, utilizando tetrametilsilano (TMS) como referência

interna. A atribuição de sinais para os compostos, citados na Tabela 4, foram baseados a partir da interpretação dos dados do composto (**7d**), e em dados contidos na literatura para compostos similares.

3.5.2.1 RMN ^1H e ^{13}C {H}

O espectro de RMN de ^1H em DMSO- d_6 , para o composto **7d** (Figura 13) mostrou um sinal em 8,59 ppm referente a um hidrogênio do anel piridínico; na região de 7,66-7,52 ppm multipletos referentes a 2 hidrogênios piridínicos e 4 hidrogênios do anel fenila; um singlete em 8,5 ppm, referente ao deslocamento do hidrogênio da hidroxila ligada ao C-5 do anel pirazolínico; dubletos em 4,04 e 3,67 ppm, referente aos hidrogênios diasterotópicos ligados ao C-4 do anel pirazolínico com constante de acoplamento $J=19\text{Hz}$.

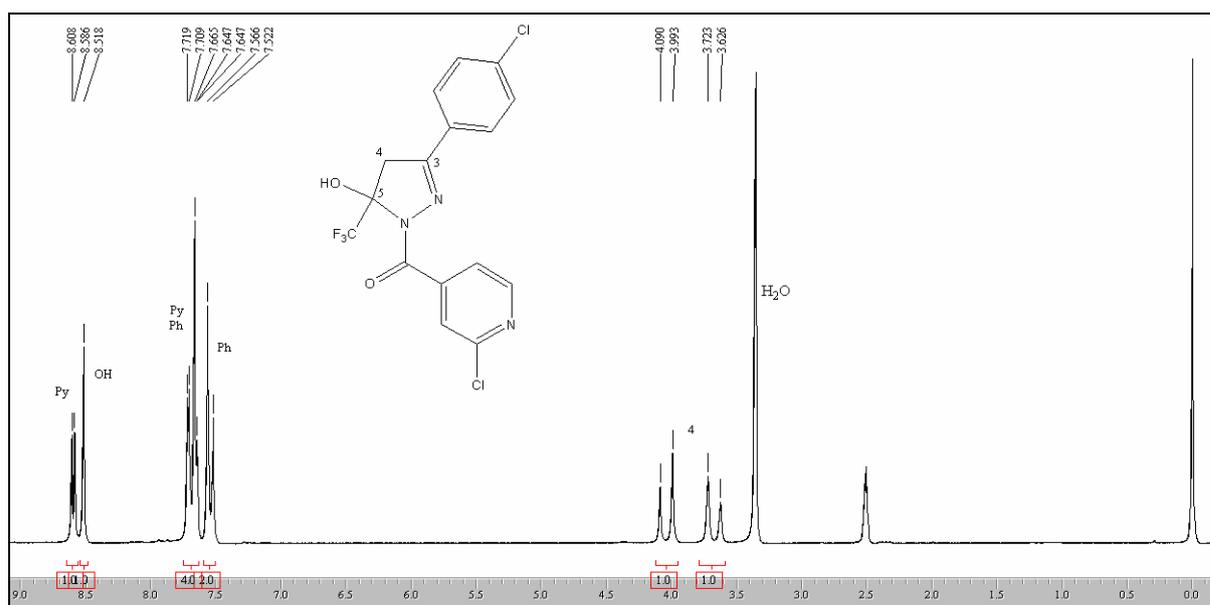


Figura 13: Espectro de RMN ^1H a 200,13 MHz de 5-hidroxi-3-(4-clorofenil)-5-trifluormetil-4,5-diidro-1*H*-1-(2-cloroisonicotinóil)pirazol (**7d**), em DMSO- d_6 .

O espectro de RMN de ^{13}C {H} do composto **7d** (Figura 14), em DMSO- d_6 , mostrou um sinal em 163,4 ppm, referente ao carbono carbonílico; C-3 em 150 ppm; 5 sinais em 152,6; 150,1; 145,9; 122,8 e 121,8 ppm referentes aos 5 carbonos piridínicos. Os sinais observados em 135,6 e na região de 128-127 ppm são referentes aos seis carbonos da fenila; o sinal do CF_3 aparece na forma de um quarteto com $^1J_{\text{C-F}}=285\text{ Hz}$ na região de 122,5 ppm. O

3. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

sinal em 92,1 ppm foi atribuído a um quarteto com $^2J=34$ Hz para o C-5 e o sinal da metilena em 44,1 ppm foi atribuído ao C-4 do 4,5-diidro pirazol.

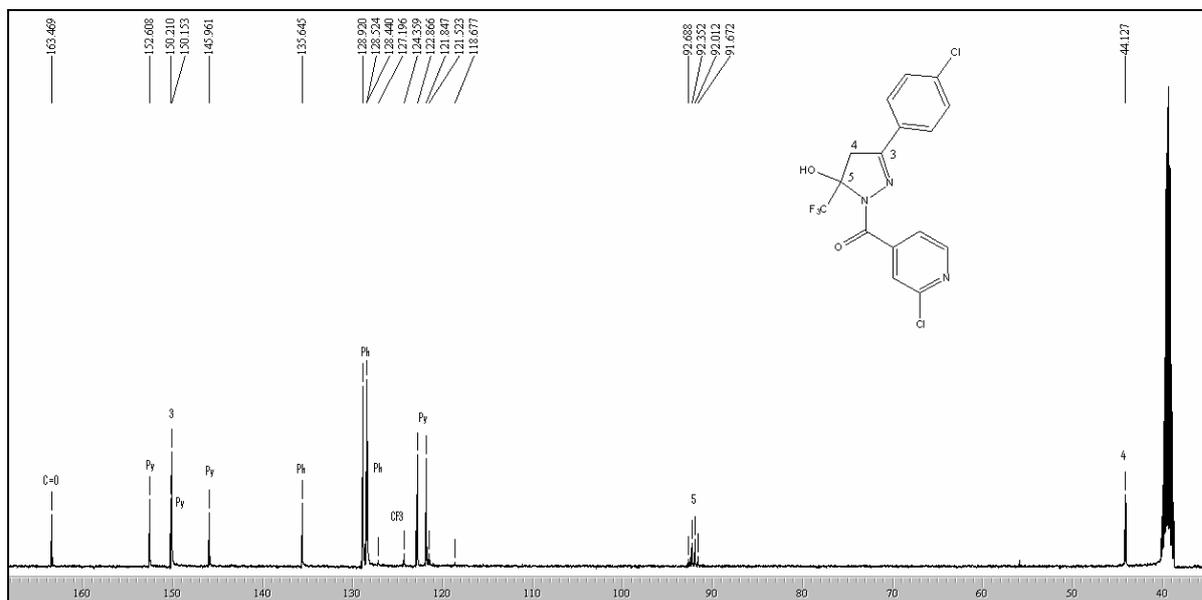


Figura 14: Espectro de RMN ^{13}C {H} a 100,61 MHz 5-hidroxi-3-(4-clorofenil)-5-trifluorometil-4,5-diidro-1*H*-1-(2-cloroisonicotinóil)pirazol (**7d**), em $\text{DMSO-}d_6$.

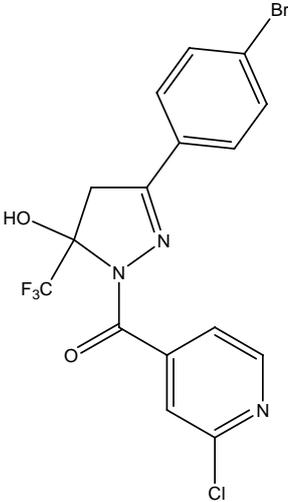
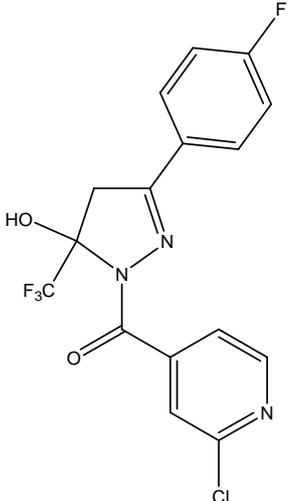
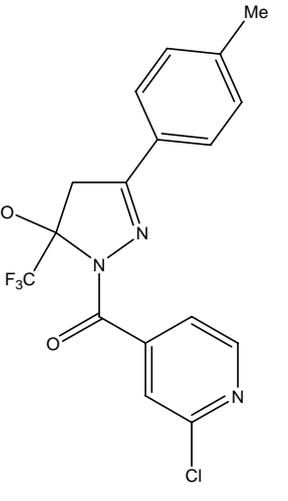
Os dados de RMN ^1H e ^{13}C {H} dos compostos **7d-g** estão descritos na Tabela 5. Os demais espectros destes compostos encontram-se no Anexo I desta dissertação.

Tabela 5: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C { ^1H } dos compostos **7d-g**.

Composto	RMN ^1H		RMN ^{13}C	
	δ	J_{HH} (Hz)	δ	J_{CF} (Hz)
	8,59 (d, $J=5$ Hz, 1H, Py); 8,5 (s, OH); 7,71-7,64 (m, 2H, Py; 2H, Ph); 7,54 (m, 2H, Ph); 4,04 (d, 1H, $J=19$, 1H); 3,66 (d, 1H, $J=19$, 1H)	163,4 (C=O); 152,6; 150,1; 145,9 (3C, Py); 150,2 (C-3); 135,6 (1C, Ph); 128,9; 128,5; 128,40 (5C, Ph); 122,9 (q, CF_3 , $J=285$); 122,8; 121,8 (2C, Py); 92,1 (q, $^2J=34$, C-5); 44,1 (C-4)		

3. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

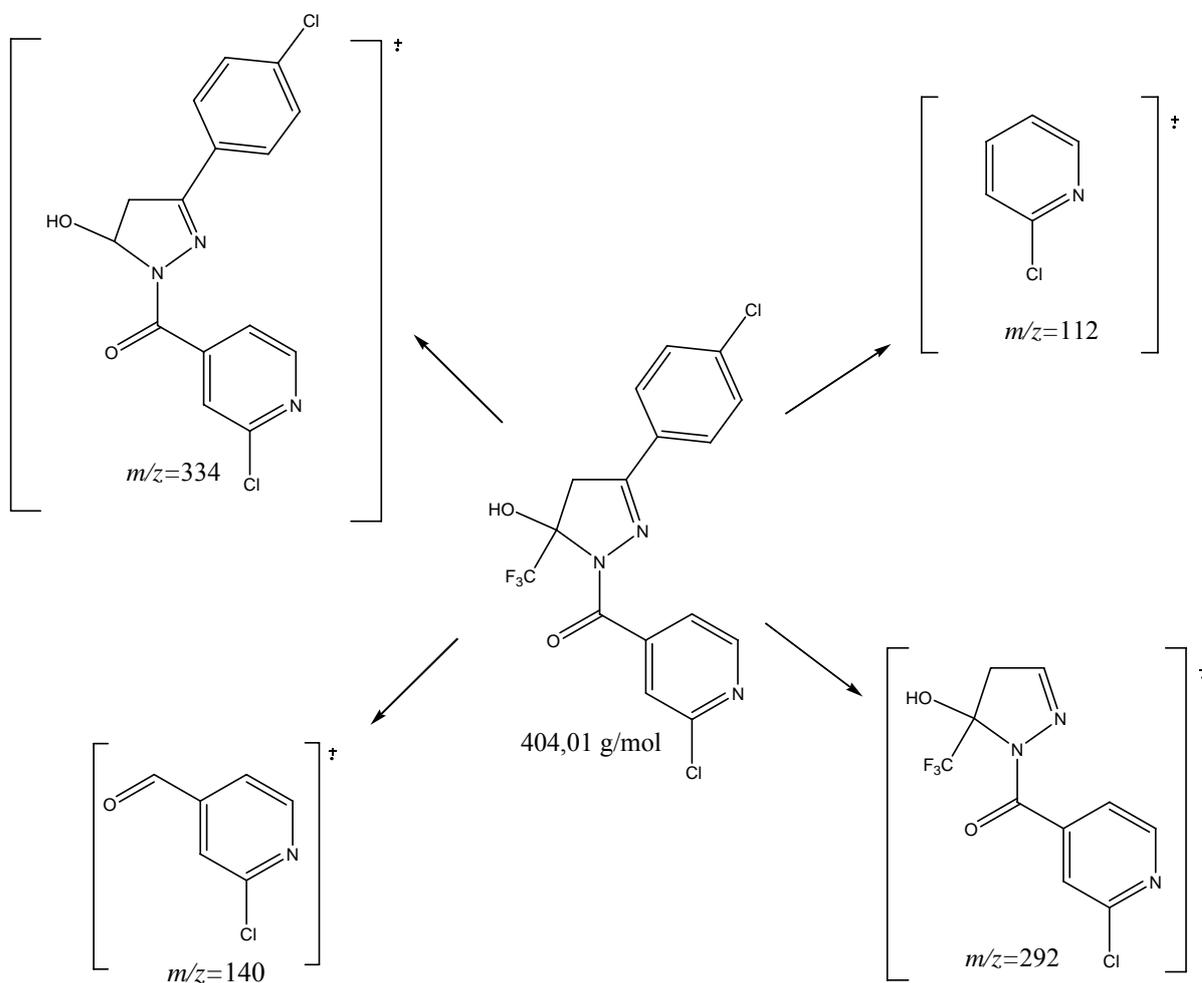
Tabela 5: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ dos compostos **7d-g**. Continuação.

Composto	RMN ^1H		RMN ^{13}C	
	δ	J_{HH} (Hz)	δ	J_{CF} (Hz)
<p>7e</p> 	8,58 (d, 1H, Py); 8,51 (s, 1H, OH); 7,71-7,54 (m, 2H, Py; 4H, Ph); 4,03 (d, 1H, $J=19$, 1H); 3,65 (d, 1H, $J=19$, 1H)	163,4 (C=O); 152,7; 150,1 (2C, Py); 150,2 (C-3); 145,9 (1C, Py); 131,8; 128,8; 128,6 (5C, Ph); 124,5 (1C, Ph); 122,8; 121,8 (2C, Py); 125,1 (q, CF_3 , $J=285$); 92,3 (q, $^2J=34$, C-5); 44,0 (C-4)		
<p>7f</p> 	8,59 (d, 1H, Py); 8,50 (s, 1H, OH); 7,72-7,64 (m, 2H, Py; 2H, Ph); 7,28-7,37 (m, 2H, Ph); 4,09 (d, 1H, $J=19$, 1H); 3,67 (d, 1H, $J=19$, 1H)	163,4 (C=O); 163,5; (d, Ph, $J_{\text{CF}}=249$); 152,6; 150,1 (2C, Py); 150,1 (C-3); 146,0 (1C, Py); 129,2 (d, Ph, $J_{\text{CF}}=9$); 126,3 (d, Ph, $J_{\text{CF}}=2,3$); 115,9 (d, Ph, $J_{\text{CF}}=22$); 122,9; 121,8 (2C, Py); 122,9 (q, CF_3 , $J=285$); 92,1 (q, $^2J_{\text{CF}}=34$); 44,2 (C-4)		
<p>7g</p> 	8,54 (d, 1H, Py); 8,50 (s, 1H, OH); 7,67 (m, 2H, Py); 7,56; 7,27 (m, 4H, Ph); 4,0 (d, 1H, $J=19$, 1H); 3,60 (d, 1H, $J=19$, 1H); 2,33 (s, Me)	163,3 (C=O); 153,4; 150,1; 146,0 (3C, Py); 141,0 (1C, Ph); 129,3; 126,5; 126,6 (3C, Ph); 122,9; 121,9 (2C, Py); 123,0 (q, CF_3 , $J=285$); 91,95 (q, $J=34$, C-5); 44,2 (C-4); 20,9 (Me)		

3.5.2.2 Espectrometria de Massas

O espectro de massa do composto **7d** apresenta uma série de fragmentos ionizados, utilizando uma energia de 70eV, nos quais podemos identificar o íon molecular (M^+). O provável mecanismo de fragmentação está representado no Esquema 25 e Figura 15. Os principais fragmentos são (Esquema 25): o íon relativo a perda do anel pirazolínico com substituinte fenila ($m/z=140$), fragmento relativo ao anel da piridina ($m/z=112$), o íon relativo a perda do CF_3 ($m/z= 334$) e o íon relativo a perda do substituinte do anel pirazolínico ($m/z=292$).

Esquema 25:



3. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

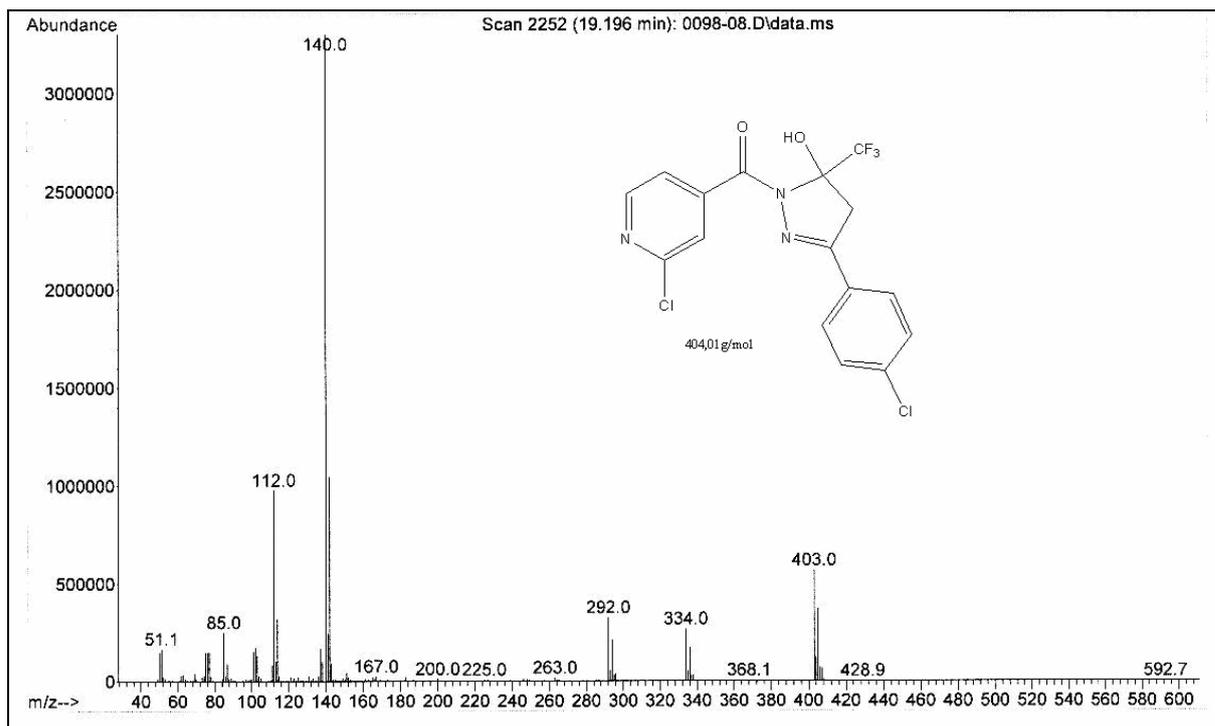
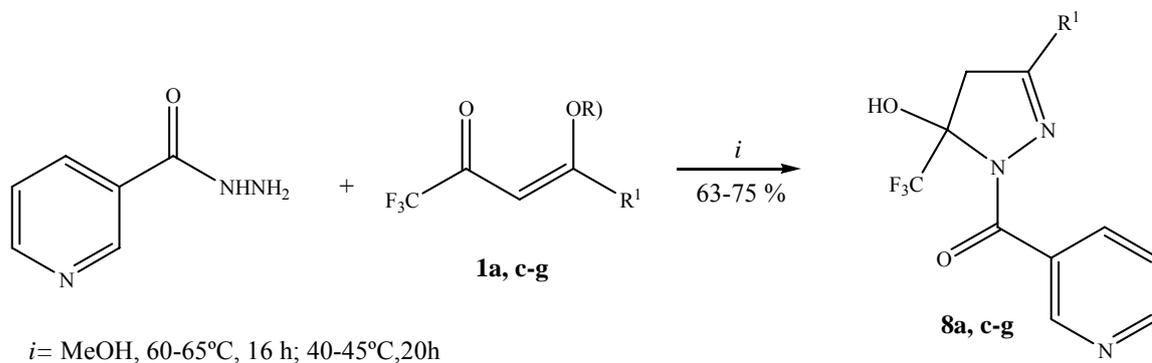


Figura 15: Espectro de massas de 5-hidroxi-3-(4-clorofenil)-5-trifluormetil-4,5-diidro-1H-1-(2-cloroisonicotinoil)pirazol (**7d**).

3.6 Síntese de 5-Hidroxi-3-alkuil(aril)-5-trifluormetil-4,5-diidro-1H-1-(nicotinoil)pirazóis (**8a, 8c-g**)

O Esquema 26 apresenta a reação de ciclocondensação entre as 1,1,1-trifluor-3-alkuil(aril)-4-alcoxi -3-buten-2-onas com nicotinoilhidrazina para a síntese dos compostos (**8a, 8c-g**)

Esquema 26:



1,8	a	c	d	e	f	g
R	Et	Me	Me	Me	Me	Me
R ₁	H	Ph	4-ClPh	4-BrPh	4-FPh	4-MePh

3. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Inicialmente foram determinadas as condições envolvendo o composto **1d** e nicotinoilhidrazida conduzindo à formação e isolamento do composto 5-hidróxi-3-(4-clorofenil)-5-trifluormetil-4,5-diidro-1*H*-(nicotinoil)pirazol (**8d**)

As condições reacionais utilizadas para os compostos **8d-g** foram metanol à temperatura de 60-65 °C por 16 horas.

Para o composto **8a** foi necessário testar algumas condições reacionais, visto que ao término da reação ainda havia material de partida. Então foram testadas 3 condições reacionais (Tabela 6), partindo de condições já conhecidas e descritas^{62b}. A reação 3, a qual foi executada em metanol à temperatura de 40-45 °C por 20 horas, foi a melhor uma vez que todo material de partida foi consumido e obtendo o produto desejado em bom rendimento (63%).

Tabela 6: Otimização da síntese de 5-hidroxi-5-trifluormetil-4,5-diidro-1*H*-1-(nicotinoil)pirazol (**8a**).

Reação	solvente	T (°C)	Tempo (h)	Rendimento (%)
1	MeOH	t.a	24	a
2	MeOH	t.a	48	a
3	MeOH	40-45	20	63

[a] mistura de material de partida e produto

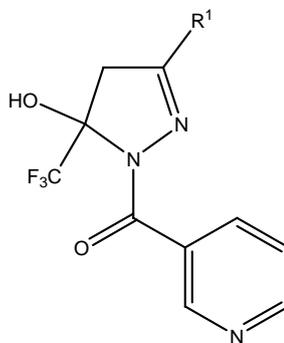
Todas as reações, logo após a adição dos reagentes, apresentavam-se como soluções límpidas que em seguida começavam a precipitar um sólido branco, com exceção do composto **8a** que apresentou-se como um óleo após a retirada do solvente por rota evaporação.

A identificação destes compostos foi feita através de RMN ¹H e e ¹³C {H}, Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrômetro de Massas, análise elementar e pontos de fusão.

3. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

A Tabela 7 mostra os dados de rendimento, ponto de fusão e análise elementar dos compostos.

Tabela 7: Propriedades Físicas dos compostos **8a** e **8c-g**.



Composto	R ¹	Rend. (%) [a]	P.F (°C) [b]	Fórmula Molecular (g/mol)	Análise Elementar		
					Cal.	Exp	N
8a	H	63	óleo	C ₁₀ H ₈ F ₃ N ₃ O ₂ (259,18)	46,43	3,11	16,21
					46,98	3,22	15,93
8c	Ph	75	137-139	C ₁₆ H ₁₂ F ₃ N ₃ O ₂ (335,00)	57,41	3,69	12,68
					57,30	3,61	12,74
8d	4-ClPh	67	170-172	C ₁₆ H ₁₁ ClF ₃ N ₃ O ₂ (369,95)	52,23	3,26	11,36
					51,98	3,13	11,45
8e	4-BrPh	72	154-156	C ₁₆ H ₁₁ BrF ₃ N ₃ O ₂ (414,18)	46,94	2,84	10,42
					46,85	2,91	10,38
8f	4-FPh	65	186-188	C ₁₆ H ₁₁ F ₄ N ₃ O ₂ (353,27)	54,38	3,26	11,98
					54,42	3,09	12,01
8g	4-MePh	71	142-144	C ₁₇ H ₁₄ F ₃ N ₃ O ₂ (349,31)	58,62	4,13	12,15
					58,41	4,20	12,01

[a] Rendimentos dos compostos recristalizados. [b] Pontos de fusão não corrigidos

3.6.1 Identificação Espectroscópica do Composto **8a** e **8c-g**

Os compostos **8a** e **8d-g** apresentaram em seus espectros de RMN ¹H e ¹³C {H} sinais característicos, visto que apenas o substituinte na posição 3 do anel pirazolinico foi modificado no decorrer da série. Para interpretação destes sinais foi utilizado como base o composto **8d**.

3.6.1.1 RMN ^1H e ^{13}C {H}

O espectro de RMN de ^1H do composto **8d** (Figura 16), mostrou um sinal em 8,92 ppm referente a um hidrogênio do anel piridínico; um dubleto em 8,72 ppm de $J = 3$ Hz referente a um hidrogênio do anel piridínico; multipletto em 8,15 ppm referente ao hidrogênio piridínico; multipletto em 7,73-7,69 ppm referente a dois hidrogênios do anel da fenila; multipletto na região 7,55 ppm referente a 2 hidrogênios da fenila e um hidrogênio piridínico; um singletto em 8,40 ppm, referente ao deslocamento do hidrogênio da hidroxila ligada ao C-5 do anel; dubletos em 4,02 e 3,65 ppm, referente aos hidrogênios diasterotópicos ligados ao C-4 do anel pirazolinico, os quais apresentam constantes de acoplamento $J=19,0$ Hz .

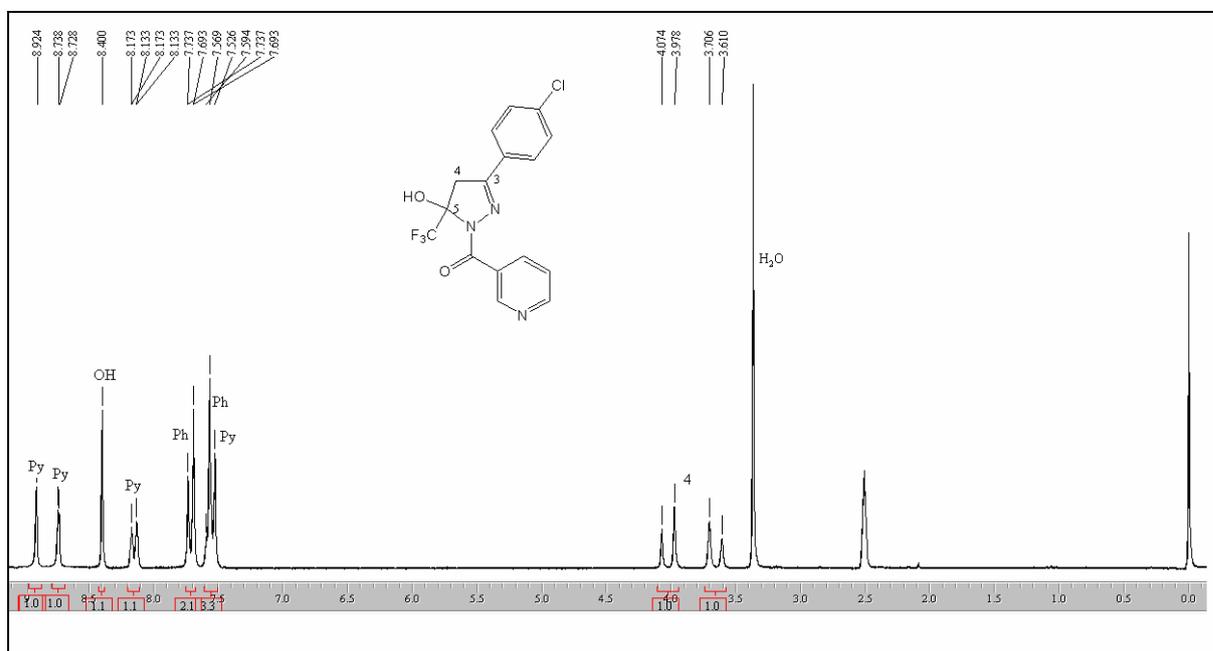


Figura 16: Espectro de RMN ^1H a 200,13 MHz de 5-hidroxi-3-(4-clorofenil)-5-trifluormetil-4,5-diidro-1*H*-1-(nicotinoil)pirazol (**8d**), em $\text{DMSO-}d_6$.

O espectro de RMN de e ^{13}C {H} do composto **8d** (Figura 17), em $\text{DMSO-}d_6$, mostrou um sinal em 164,9 ppm, referente ao carbono carbonílico; em 151,9; 149,5 ppm referentes a dois carbonos da piridina; em 151,5 ppm um sinal referente ao C-3; em 136,8 ppm um sinal referente a um carbono da piridina. Os sinais observados em 135,8 e na região de 128 ppm são referentes aos seis carbonos da fenila; o CF_3 aparece na forma de um quarteto com $^1J_{\text{C-F}} = 285$ Hz em 123,0 ppm. Em 92,0 ppm observou-se um quarteto com $^2J = 34$ Hz para o C-5 e em 44,12 ppm um sinal referente ao C-4.

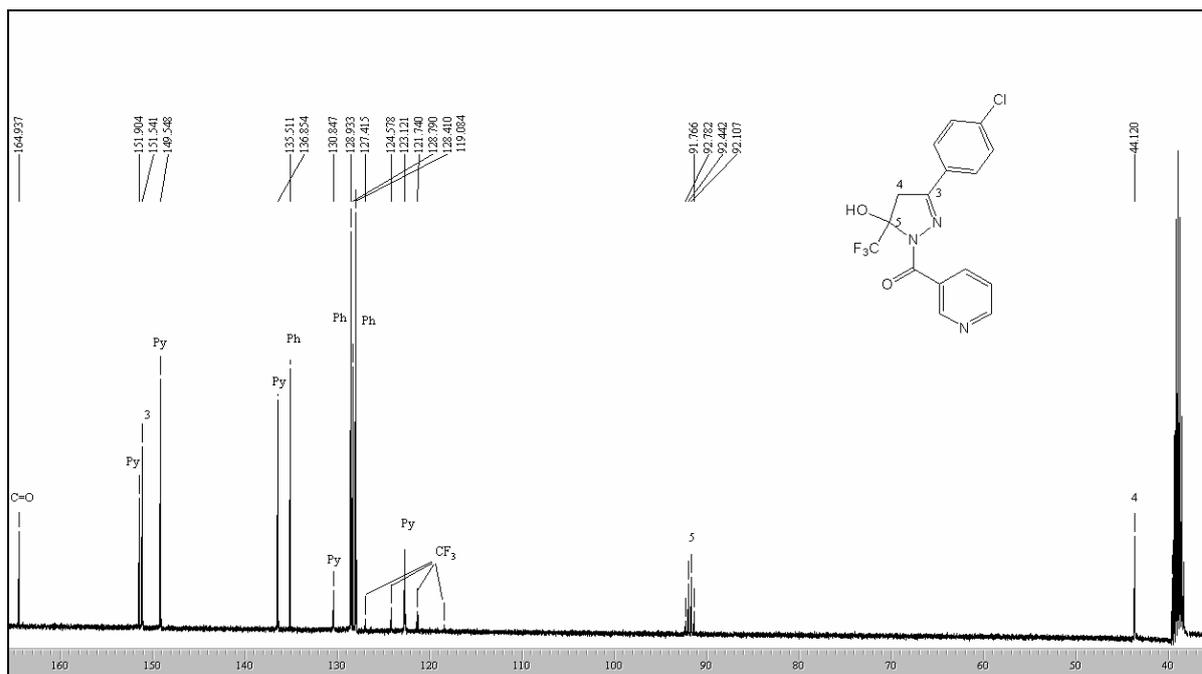
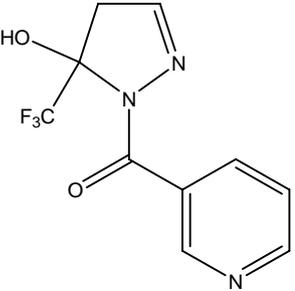
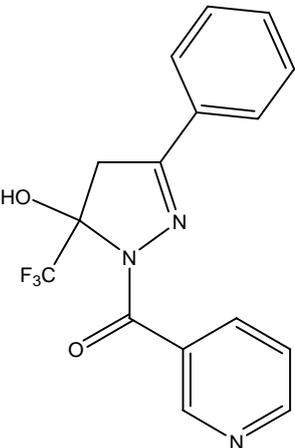
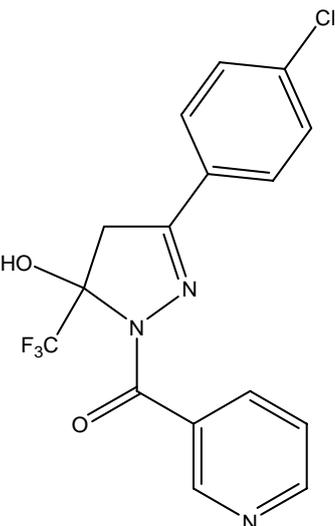


Figura 17: Espectro de RMN ^{13}C {H} a 100,61 MHz 5-hidroxi-3-(4-clorofenil)-5-trifluormetil-4,5-diidro-1H-1-(nicotinoil)pirazol (**8d**), em DMSO- d_6 .

Os dados de RMN ^1H e ^{13}C {H} dos compostos **8a** e **8c-g** estão descritos na Tabela 8. Os demais espectros destes compostos encontram-se no Anexo I desta dissertação.

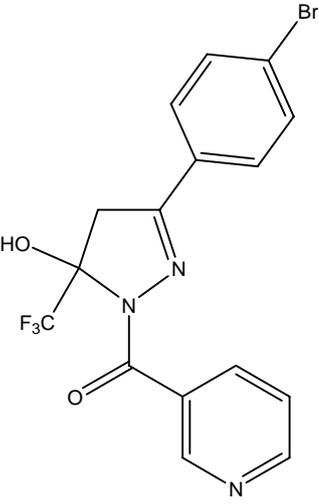
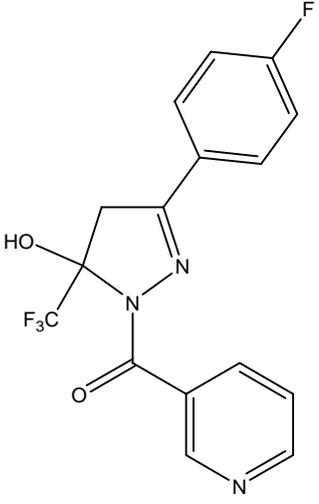
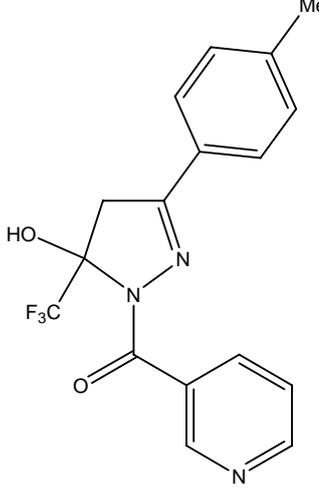
3. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Tabela 8: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ dos compostos dos compostos **8a** e **8c-g**.

Composto	RMN ^1H		RMN ^{13}C	
	δ	J_{HH} (Hz)	δ	J_{CF} (Hz)
<p>8a</p> 	9,09 (s, 1H, Py); 8,74 (d, 1H, Py); 8,18 (d, 1H, Py); 7,38 (t, 1H, Py); 7,03 (s, OH); 3,45 (d, 1H, $J=19$); 3,23 (d, 1H, $J=19$).	168,5 (C=O); 152,1; 150,68 (2C, Py); 145,5 (C-3); 137,5; 129,0; 124,5 (3C, Py); 123,1 (q, CF_3 , $J=285$); 90,9 (q, $^2J=34$); 44,4 (C-4).		
<p>8c</p> 	8,93 (s, 1H, Py); 8,73 (d, 1H, Py); 8,34 (s, OH); 8,16 (m, 1H, Py); 7,70 (m, 2H, Ph); 7,56 (m, 1H, Py); 7,50-7,44 (m, 3H, Ph); 4,00 (d, 1H, $J=19$, H); 3,66 (d, $J=19$, H)	164,9 (C=O); 152,8; 145,5 (2C, Py); 151,4 (C-3); 136,8; 130,9 (2C, Py); 130,8; 129,8 (2C, Ph); 128,8; 126,6 (4C, Ph); 123,2 (q, CF_3 , $J=285$); 92,12 (q, $^2J=33,6$); 44,1 (C-4)		
<p>8d</p> 	8,92 (s, 1H, Py); 8,72 (d, 1H, Py); 8,34 (s, OH); 8,15 (m, 1H, Py); 7,71 (m, 2H, Py); 7,55 (m, 2H, 1H, Ph); 4,09 (d, 1H, $J=19$, H); 3,65 (d, $J=19$, H)	164,9 (C=O); 151,9; 149,5 (2C, Py); 151,5 (C-3); 136,8 (1C, Py); 135,8 (1C, Ph); 130,8 (1C, Py); 128,9; 128,7; 128,4 (5C, Ph); 123,1 (1C, Py); 123,0 (q, CF_3 , $J=285$); 92,2 (q, $^2J=34$); 44,1(C-4)		

3. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

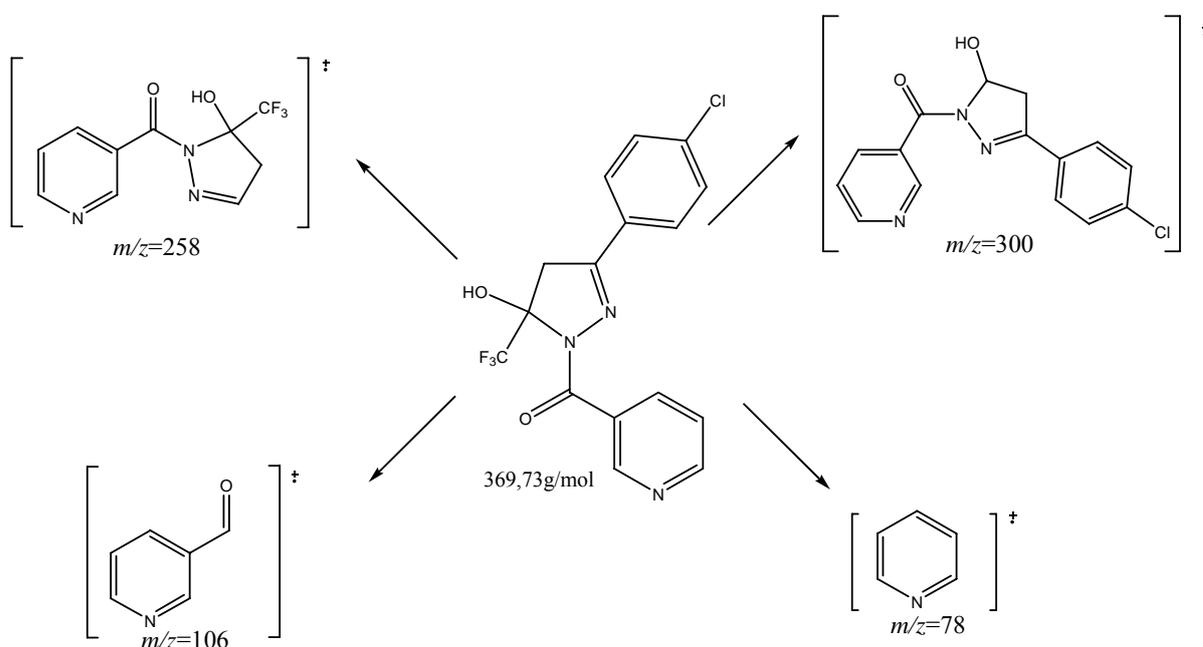
Tabela 8: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ dos compostos dos compostos **8a** e **8c-g**.
Continuação.

Composto	RMN ^1H		RMN ^{13}C	
	δ	J_{HH} (Hz)	δ	J_{CF} (Hz)
<p>8e</p> 	8,92 (s, 1H, Py); 8,72 (d, 1H, Py); 8,40 (s, OH); 8,15 (m, 1H, Py); 7,67-7,53 (m, 4H, Ph; 1H, Py); 4,02 (d, $J=19$, H); 3,65 (d, $J=19$, H)	164,9 (C=O); 152; 151 (2C, Py); 149,5 (C-3); 136,8 (1C, Ph); 131,8 (2C, Ph); 130,8; 129,1 (2C, Py); 128 (2C, Ph); 124,3 (1C, Py); 123,1 (1C, Ph); 123,4 (q, CF_3 , $J=285$); 92,2 (q, $^2J=34$, C-5); 44,0 (C-4).		
<p>8f</p> 	8,92 (s, 1H, Py); 8,72 (d, 1H, Py); 8,34 (s, OH); 8,15 (m, 1H, Py); 7,77-7,74 (m, 2H, Ph); 7,57-7,54 (m, 1H, Py); 7,34-7,29 (m, 2H, Ph); 3,99 (d, $J=19$, H); 3,68 (d, $J=19$, H)	164,8 (C=O); 163,4 (d, Ph, $J=249$); 151,9; 149,5 (2C, Py); 151,4 (C-3); 136,8; 130,8 (2C, Py); 129,0; (d, Ph, $J=8$); 126,5 (d, Ph, $J=3$ Ph); 123,0 (1C, Py); 115,9 (d, Ph, $J=22$); 123,1 (q, CF_3 , $J=285$); 92,2 (q, $^2J=34$, C-5); 44,2 (C-4).		
<p>8g</p> 	8,92 (s, 1H, Py); 8,73 (d, 1H, Py); 8,30 (1H, OH); 8,14 (m, 1H, Py); 7,59-7,54 (m, 2H, Ph; 1H, Py); 7,26 (d, 2H, Ph); 3,96 (d, $J=19$, 1H); 3,61 (d, $J=19$, 1H); 2,34 (s, 3H, Me).	164,8 (C=O); 152,7; 149,5 (2C, Py); 151,4 (C-3); 140,7 (1C, Ph); 136,8 (1C, Py); 130,7; 128,7; 126,6 (5C, Ph); 123,0 (1C, Py); 123,2 (q, CF_3 , $J=285$); 92,0 (q, $^2J=34$, C-5); 44,1 (C-4); 20,9 (Me)		

3.6.2 Espectrometria de Massas

O espectro de massa do composto **8d** apresenta uma série de fragmentos ionizados, utilizando uma energia de 70eV, nos quais podemos identificar o íon molecular (M^+). O provável mecanismo de fragmentação está representado no Esquema 27 e Figura 18. Os principais fragmentos (Esquema 27) são: íon relativo perda do anel pirazolínico com substituinte ($m/z=106$), o fragmento relativo do anel de piridina ($m/z=78$), o íon relativo a perda do CF_3 ($m/z= 300$) e o íon relativo a perda do substituinte do anel pirazolínico ($m/z=258$)

Esquema 27:



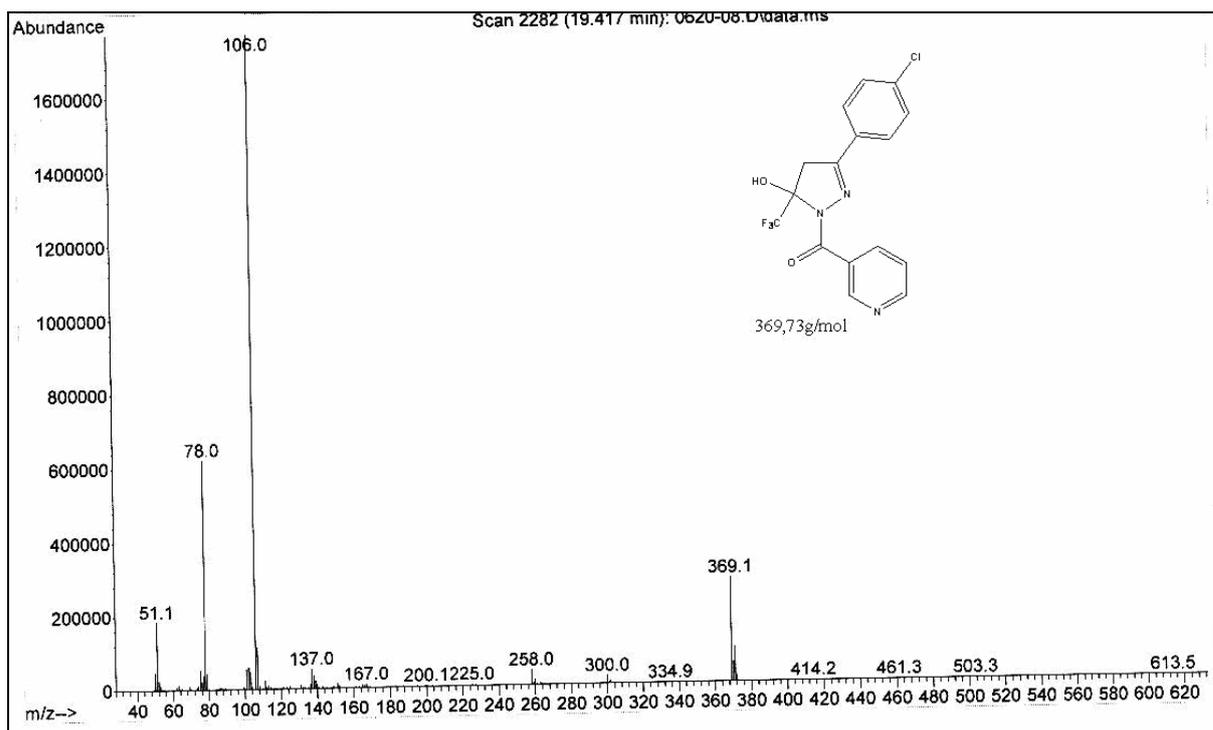


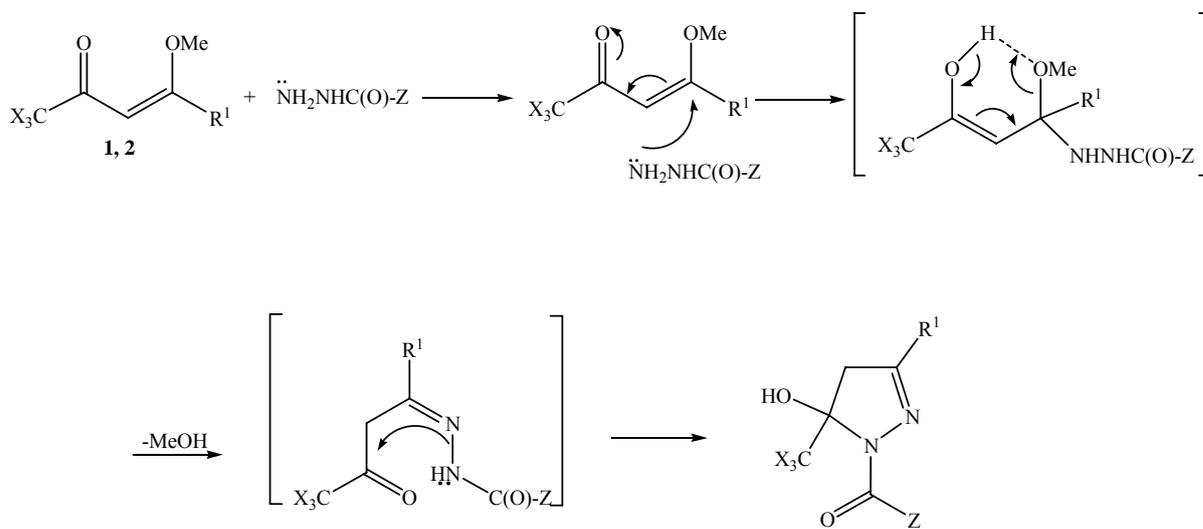
Figura 18: Espectro de massas de 5-hidroxi-3-(4-clorofenil)-5-trifluormetil-4,5-diidro-1*H*-1-(nicotinoil)pirazol (**8d**)

3.7 Mecanismo Proposto Para a Obtenção de 3-Aquil(aril/heteroaril)-5-trifluor(cloro)metil-4,5-diidro-1*H*-1-(carbonilpiridil)pirazóis (**3**, **4**, **7** e **8**)

Considerando que as 1,1,1-trialo-4-(aril)-4-alcoxi-3-alquen-2-onas substituídas (**1** e **2**) possuem dois centros eletrofílicos com reatividade diferenciada e o carbono olefínico C-4 é um centro eletrofílico mais reativo que o carbono carbonílico, e que, por sua vez, as hidrazinas possuem dois centros nucleofílicos diferenciados devido aos N-substituintes, que demonstram alta reatividade em presença de carbonos eletrofílicos, concluiu-se que o primeiro passo da reação foi o ataque nucleofílico do nitrogênio ao carbono olefínico (C-4) com posterior saída do grupo metoxila. A seguir, ocorre o ataque nucleofílico do segundo nitrogênio da hidrazina ao carbono carbonílico, formando o anel de cinco membros.

A partir das considerações anteriores, podemos propor o mecanismo para as ciclocondensações que levam a obtenção de 5-hidroxi-4,5-diidro-1*H*-1-pirazóis (Esquema 28).

Esquema 28:



Z: 4-piridil, 2-cloro-4-piridil, 3-piridil

X: F, Cl

3.8 Avaliação Biológica dos Compostos

Os compostos sintetizados neste trabalho foram submetidos a avaliação biológica frente ao *M. tuberculosis* ATCC 27294(H37Rv). Os testes foram realizados no Departamento de Microbiologia da FURG.

A metodologia utilizada foi baseada nos estudos de Palomino *et al.*⁹⁹ com pequenas modificações. Os compostos foram solubilizados em DMSO 99,5% e utilizando resazurina como indicador de viabilidade celular. Os compostos **3**, **4**, **7** e **8** foram testados a fim de avaliar o efeito dos substituintes e do grupo INH ligados ao anel pirazolínico na atividade frente ao *M. tuberculosis* ATCC 27294(H37Rv).

Primeiramente foram testados compostos pirazolínicos trialometilados isonicotinoil substituídos (**3** e **4**) frente ao *M. tuberculosis* ATCC 27294(H37Rv). Os resultados obtidos demonstraram que compostos trifluormetilados não substituídos e substituídos por alquil e aril na posição 3 do anel pirazolínico apresentavam melhor atividade, compostos estes já sintetizados e publicados^{62b}.

A partir destes resultados foram sintetizados novos compostos trifluormetilados **7** e **8** com variação da posição do nitrogênio no anel da piridínico e diferentes substituintes na posição 3 do anel pirazolínico.

3.8.2 Triagem dos compostos frente ao *M. tuberculosis* ATCC 27294(H37Rv)

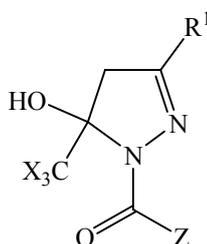
Dos vinte e dois compostos citados neste trabalho, dezenove destes tiveram suas atividades testadas frente ao *M. tuberculosis* ATCC 27294(H37Rv). Através de uma triagem, foi avaliada a sensibilidade ou a resistência do *M. tuberculosis* ATCC 27294(H37Rv), utilizando uma concentração fixa de 100 µg/ml. Com isso, foram obtidos os resultados abaixo (Tabela 9).

Neste estudo, observou-se que apenas quatro compostos (**3d**, **3h**, **8c** e **8e**) não apresentaram atividade a 100 µg/ml, o que demonstra que estes não foram eficazes frente ao *M. tuberculosis* ATCC 27294(H37Rv).

Os demais compostos (**3a-c**, **3e-g**, **3i**, **4g-i**, **7d-g** e **8d**) que demonstraram atividade neste teste foram submetidos a uma nova avaliação antimicrobiana.

3. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Tabela 9: Avaliação da atividade antimicrobiana de compostos pirazolínicos (100 µg/ml) conforme a variação nos radicais **X**, **R¹**, **Z** frente ao *M. tuberculosis* ATCC 27294(H37Rv).



Composto	X	R ¹	Z	Suscetibilidade
3a	F	H	4-piridil	sensível
3b	F	Me	4-piridil	sensível
3c	F	Ph	4-piridil	sensível
3d	F	4-ClPh	4-piridil	resistente
3e	F	4-BrPh	4-piridil	sensível
3f	F	4-FPh	4-piridil	sensível
3g	F	4-MePh	4-piridil	sensível
3h	F	2-furil	4-piridil	sensível
3i	F	2-tienil	4-piridil	resistente
4g	Cl	4-MePh	4-piridil	sensível
4h	Cl	2-furil	4-piridil	sensível
4i	Cl	2-tienil	4-piridil	sensível
7d	F	4-ClPh	2-cloro-4-piridil	sensível
7e	F	4-BrPh	2-cloro-4-piridil	sensível
7f	F	4-FPh	2-cloro-4-piridil	sensível
7g	F	4-MePh	2-cloro-4-piridil	sensível
8c	F	Ph	3-piridil	resistente
8d	F	4-ClPh	3-piridil	sensível
8e	F	4-BrPh	3-piridil	resistente

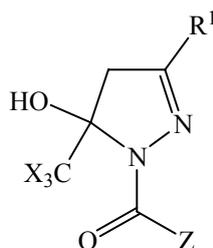
3.8.3 Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos compostos frente ao H37Rv

De acordo com a triagem, os quinze compostos selecionados (**3a-c**, **3e-g**, **3i**, **4g-i**, **7d-g** e **8d**) com atividade a 100 µg/ml, foram avaliados quanto a Concentração Inibitória Mínima (CIM) frente ao *M. tuberculosis* ATCC 27294(H37Rv). As concentrações analisadas foram

3. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

entre 100 e 0,20 $\mu\text{g/ml}$. Foi determinada também a CIM da INH sendo como 0,20 $\mu\text{g/ml}$ (Tabela 10).

Tabela 10: Determinação das CIMs dos compostos pirazolínicos conforme a variação nos radicais **X**, **R¹**, **Z** frente ao *M.tuberculosis* ATCC 27294(H37Rv).



Composto	X	R ¹	Z	CIM
3a	F	H	4-piridil	0,39 $\mu\text{g/ml}$
3b	F	Me	4-piridil	1,56 $\mu\text{g/ml}$
3c	F	Ph	4-piridil	3,12 $\mu\text{g/ml}$
3e	F	4-BrPh	4-piridil	6,25 $\mu\text{g/ml}$
3f	F	4-FPh	4-piridil	1,56 $\mu\text{g/ml}$
3g	F	4-MePh	4-piridil	0,39 $\mu\text{g/ml}$
3h	F	2-furil	4-piridil	6,25 $\mu\text{g/ml}$
4g	Cl	4-MePh	4-piridil	25 $\mu\text{g/ml}$
4h	Cl	2-furil	4-piridil	25 $\mu\text{g/ml}$
4i	Cl	2-tienil	4-piridil	25 $\mu\text{g/ml}$
7d	F	4-ClPh	2-cloro-4-piridil	6,25 $\mu\text{g/ml}$
7e	F	4-BrPh	2-cloro-4-piridil	3,12 $\mu\text{g/ml}$
7f	F	4-FPh	2-cloro-4-piridil	6,25 $\mu\text{g/ml}$
7g	F	4-MePh	2-cloro-4-piridil	1,56 $\mu\text{g/ml}$
8d	F	4-ClPh	3-piridil	12,5 $\mu\text{g/ml}$
INH				0,20 $\mu\text{g/ml}$

3. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Foi observado que compostos pirazolínicos trifluormetilados apresentaram melhor atividade que os respectivos compostos triclorometilados. Por exemplo, o composto **3g** (CIM =0,39 µg/ml) é cerca de 60 vezes mais ativo que o análogo triclorometilado **4g** (CIM =25 µg/ml). A mesma tendência pode ser observada para o composto **3h** (trifluormetil substituído CIM =6,25 µg/ml) e seu análogo triclorometilado **4h** (CIM= 25 µg/ml) (Figura 19).

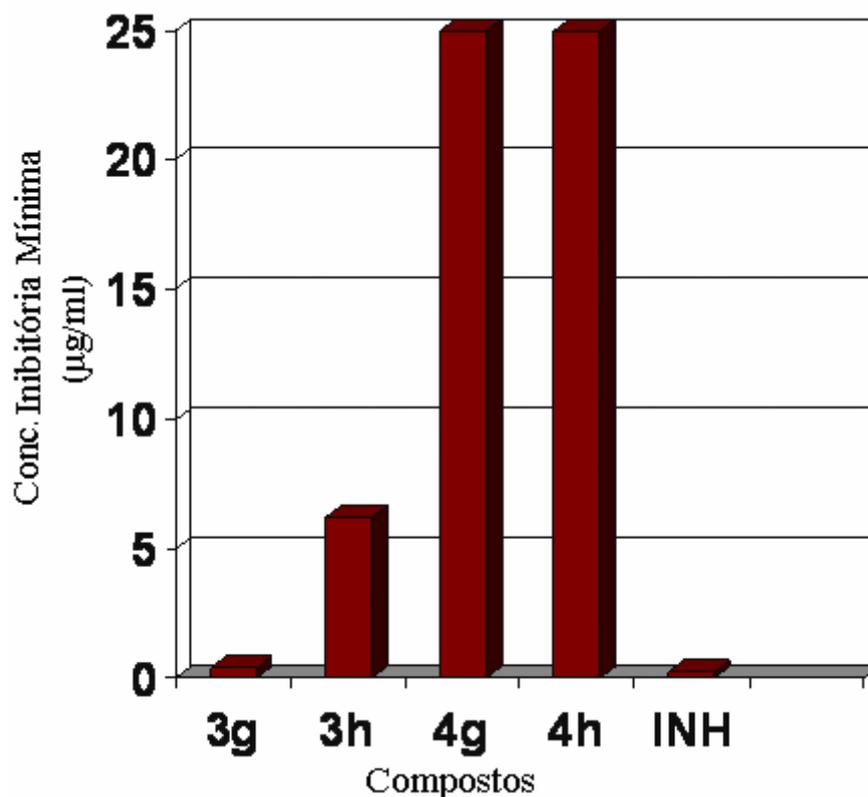


Figura 19: Concentração Inibitória Mínima dos compostos trifluormetilados e triclorometilados.

3. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Outro resultado importante foi demonstrado para os compostos com diferentes substituintes na posição C3 do anel pirazolínico. Os compostos com esta posição não substituída ou substituída por alquil e aril demonstram significativa atividade frente ao *M. tuberculosis* H37Rv (Figura 20). Esses resultados mostraram que mudanças na estrutura dos compostos induz a diferenças significativas na atividade.

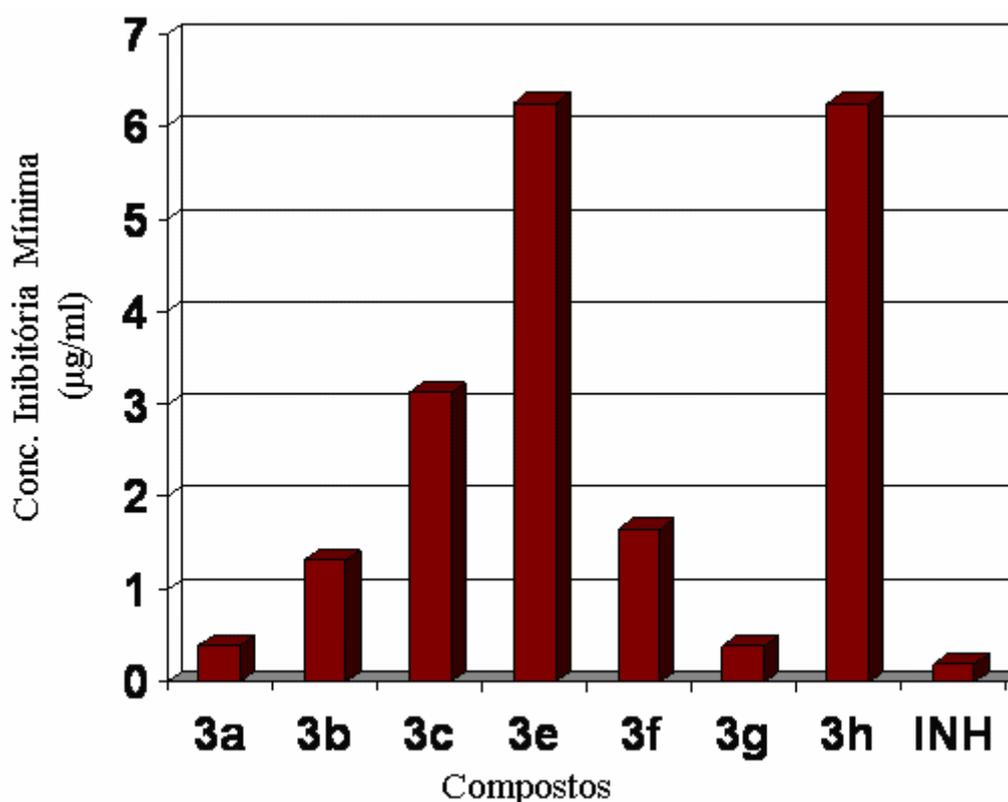


Figura 20: Variações das CIMs frente ao *M.tuberculosis* ATCC 27294(H37Rv) em função dos substituintes na posição 3 do anel pirazolínico.

Nos compostos **3a** e **3g**, a atividade foi mantida na mesma concentração (CIM =0,39µg/ml), indicando que a presença de um substituinte tolueno na posição 3 do anel pirazolínico do composto **3g** não aumenta sua atividade em relação ao **3a**, o qual é constituído apenas por INH e pirazol.

3. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Também observou-se que a presença de substituinte na posição 2 do anel da piridínico e a variação da posição do átomo de nitrogênio neste anel influenciam na atividade avaliada. Os compostos **3** e **4** que possuem o nitrogênio na posição 4 do anel piridínico demonstraram ser mais ativos que os compostos **7** cloro substituídos na posição 2 e nitrogênio na posição 4, e estes por sua vez foram mais ativos que compostos **8** que apresentam nitrogênio na posição 3 (Figura 21).

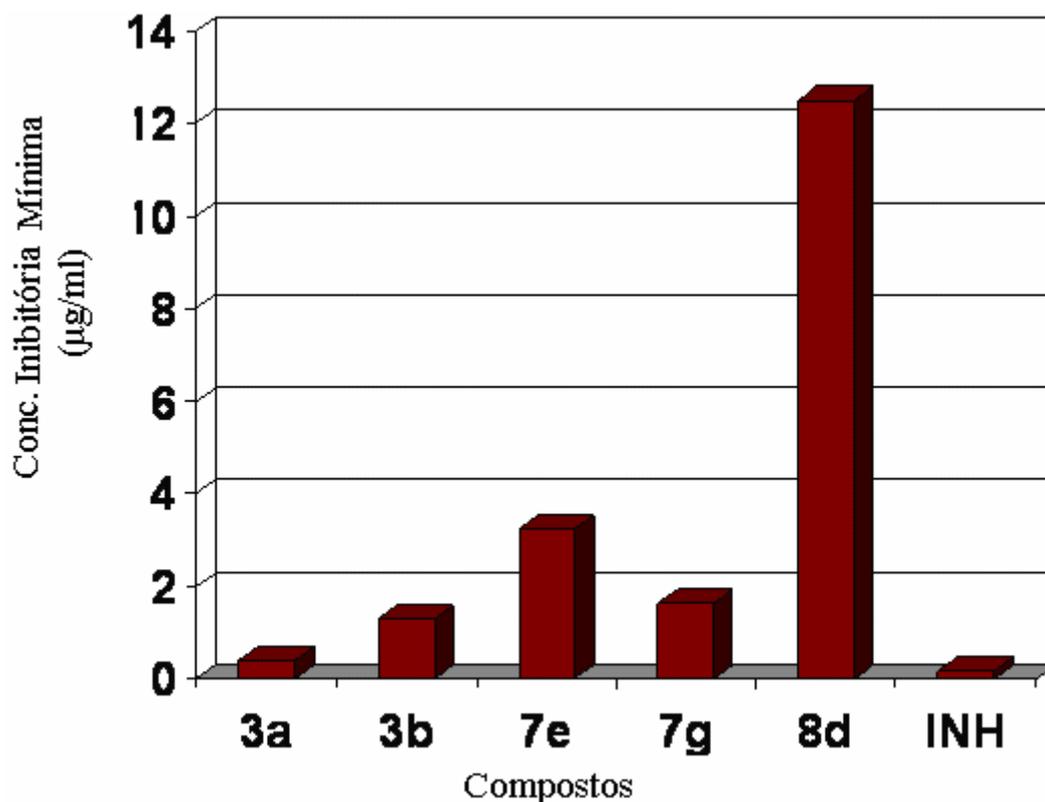


Figura 21: Variações das CIMs frente ao *M.tuberculosis* ATCC 27294(H37Rv) em função da variação da posição do nitrogênio e presença de substituinte no anel da piridina.

Sabe-se que a CIM da INH é de 0,20 µg/ml frente ao *M. tuberculosis* H37Rv, o que corresponde a uma concentração molar de 1,45 µM. No entanto, foi observado que a CIM do composto **3a**(0,39 µg/ml) apresenta uma concentração semelhante à INH, com 1,50 µM. Por outro lado, apesar da CIM do composto **3g** ser igual ao **3a**, e também maior que da INH, é necessária uma concentração menor (1,12 µM) para inibir o crescimento bacteriano em relação à INH. As demais moléculas apresentaram concentração molar significativamente superior a esse fármaco.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Reagentes e Solventes Utilizados

Os reagentes e solventes utilizados para a síntese dos compostos em estudo apresentaram qualidade técnica ou P.A., e/ou foram purificados segundo procedimentos usuais de laboratório⁹⁸. Os reagentes e solventes utilizados, estão descritos abaixo:

4.1.1 Reagentes

- Isonicotinoilhidrazina (Sigma)
- Ácido 2-cloro isonicotinoil (Aldrich)
- Cloreto de tionila
- Trimetil ortoformiato (Aldrich)
- Ácido *p*-toluenosulfônico dihidratado (Aldrich)
- Acetais sintetizados e purificados conforme técnicas descritas
- Anidrido trifluoroacético (Vetec)
- Cetonas
- Etil viniléter
- Piridina (Merck): destilada sob KOH
- Carbonato de sódio anidro
- Diazometano

4.1.2 Solventes

- Álcool etílico P.A.(Vetec): destilado sob magnésio e iodo
- Álcool metílico P.A.(Vetec): destilado sob magnésio e iodo
- Clorofórmio P.A. (Vetec): destilado sobre P₂O₅
- Éter dietílico: seco com sódio metálico

4.2 Aparelhos Utilizados

4.2.1 Espectroscopia de RMN

Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C foram registrados em dois Espectrômetros: BRUKER DPX-200, que opera a 200,13 MHz para ^1H e 50,32 MHz para ^{13}C e BRUKER DPX-400, que opera a 400,13 MHz para ^1H e 100,61 MHz para ^{13}C .

Os dados de ^1H e ^{13}C , obtidos no aparelho BRUKER DPX-200, foram realizados em tubos de 5 mm na temperatura de 300K, em Dimetilsulfóxido deuterado ($\text{DMSO-}d_6$) utilizando tetrametilsilano (TMS) como referência interna. As condições usadas no espectrômetro BRUKER DPX-200 foram: SF 200,13MHz para ^1H e 50,32MHz para ^{13}C ; *lock* interno pelo ^2D ; largura de pulso 9,9 μs para (^1H) e 19,5 μs para (^{13}C), tempo de aquisição 3,9s para (^1H) e 2,8s para (^{13}C); janela espectral 2400Hz para (^1H) e 11500Hz para (^{13}C); número de varreduras de 8 a 32 para (^1H) e 2000 a 20000 para (^{13}C); dependendo do composto, número de pontos 65536 com resolução digital Hz/ponto igual a 0,128875 para (^1H) e 0,17994 para (^{13}C). A reprodutibilidade dos dados de deslocamento químico é estimada ser de mais ou menos 0,01ppm.

Os dados de ^1H e ^{13}C , obtidos no aparelho BRUKER DPX-400, foram realizados em tubos de 5mm na temperatura de 300K, em Dimetilsulfóxido deuterado ($\text{DMSO-}d_6$) utilizando tetrametilsilano (TMS) como referência interna. As condições usadas no espectrômetro BRUKER DPX-400 foram: SF 400,13MHz para ^1H e 100,61MHz para ^{13}C ; *lock* interno pelo ^2D ; largura de pulso 8,0 μs para (^1H) e 13,7 μs para (^{13}C); tempo de aquisição 6,5s para (^1H) e 7,6s para (^{13}C); janela espectral 2400Hz para (^1H) e 11500Hz para (^{13}C); número de varreduras de 8 a 32 para (^1H) e 2000 a 20000 para (^{13}C); dependendo do composto, número de pontos 65536 com resolução digital Hz/ponto igual a 0,677065 para (^1H) e 0,371260 para (^{13}C). A reprodutibilidade dos dados de deslocamento químico é estimada ser de mais ou menos 0,01ppm.

4.2.2 Ponto de Fusão

Os pontos de fusão foram determinados em aparelhos KOFLER REICHERT-THERMOVAR e Electrothermal Mel-Temp 3.0. (Pontos de fusão não corrigidos).

4.2.3 Cromatografia Gasosa – Espectrometria de Massas (CG/MS)

As análises por cromatografia gasosa foram efetuadas em um Cromatógrafo gasoso da HP 6890 acoplado a um espectrômetro de Massas HP 5973 (CG/MS), com Injetor automático HP 6890. Coluna HP-5MS (Crosslinked 5% de PH ME Siloxane)- Temperatura máxima de 325°C - (30mx0.32mm., 0.25µm). Fluxo de gás Hélio de 2mL/min, pressão de 5.05psi. Temperatura do injetor 250°C; Seringa de 10µL, com injeção de 1µL; Temperatura inicial do forno de 70 °C por 1 min e após aquecimento de 12°C por min até 280°C. Para a fragmentação dos compostos foi utilizado impacto de elétrons de 70ev no espectrômetro de Massas.

4.2.4 Análise Elementar

As análises elementares foram realizadas em um analisador Perkin Elmer 2400 CHN, no Instituto de Química, USP, São Paulo.

4.3 Procedimentos Experimentais Sintéticos

4.3.1 Síntese de acetais

A uma solução da cetona respectiva (667 mmol) e ortoformiato de trimetila (84,8g, 800 mmol) em metanol anidro (50 mL), adicionou-se ácido *p*-tolueno sulfônico (0,19g, 1 mmol). Após ter ficado em repouso por 24h à temperatura ambiente, o meio reacional foi neutralizada com carbonato de sódio anidro (30g), e filtrada a pressão ambiente. O metanol e o ortoformiato de trimetila (excesso) foram retirados em rota-evaporador e o respectivo acetal foi então destilado a pressão reduzida.

4.3.2 Síntese 1,1,1-trialo-4-alkuil[aril(heteroaril)]-4-alcoxi-3-alkuen-2-onas (1a-i e 2g-i)

Método A: A partir de Enoléteres

A uma solução do enoléter (30 mmol) e piridina (30 mmol) em clorofórmio (30 ml), em banho de gelo à 0°C e sob agitação magnética, foi adicionado anidrido trifluoracético (30 mmol). A mistura foi deixada sob agitação durante 24 horas à temperatura ambiente. A mistura foi lavada com uma solução de ácido clorídrico 0,1M (3× 15 ml) e água (1×, 15mL).

A fase orgânica foi desidratada com sulfato de magnésio anidro. O solvente foi removido por rota-evaporação e os produtos **1a-b** purificados através de destilação sob pressão reduzida.

Método B: A partir de Acetais

A uma solução de acetal (30 mmol) e piridina (60 mmol) em clorofórmio (30 ml), em banho de gelo à 0°C e sob agitação magnética, foi adicionado anidrido trifluoracético ou cloreto de tricloacetila (60 mmol). A mistura foi deixada durante 16 horas, a 45° C. A seguir, a mistura foi lavada com uma solução de ácido clorídrico 0,1M (3×, 15mL) e água (1×, 15mL). A fase orgânica foi desidratada com sulfato de magnésio anidro e o solvente removido por rota-evaporação. Os produtos **1c-i** e **2g-i** purificados através de destilação sob pressão reduzida.

4.3.3 Síntese metil 2-cloro isonicotinoato (5)

Em um balão de 100mL contendo éter etílico (20mL) foi adicionado ácido 2-cloro isonicotinoil (3mmol) e agitou-se vigorosamente. Depois de dissolvido, adicionou-se diazometano (9ml) gota à gota. A mistura reacional foi deixada por 2h em repouso e o solvente retirado por rota evaporação obtendo-se o produto desejado.

4.3.4 Síntese de 2-cloro isonicotinoil hidrazina (6)

Em um balão reacional munido de agitação magnética e condensador de refluxo, contendo metil 2-cloro isonicotinoato (2 mmol) em etanol (10 ml), foi adicionado hidrato de hidrazina (4 mmol). A mistura reacional foi aquecida a 78 °C por 12 horas. Após o tempo reacional o solvente orgânico foi evaporado obtendo-se um sólido branco com alta pureza.

4.3.5 Síntese de 5-hidróxi-5-trialo-3-alkuil[aril(heteroaril)]-4,5-diidro-1H-pirazóis substituídos (3, 4, 7 e 8)

Em um balão reacional munido de agitação magnética e condensador de refluxo, contendo 1,1,1-trialo-4-alcoxi-3-alkuen-2-onas (2 mmol) diluído em metanol (10 mL) sob agitação magnética e temperatura ambiente, foi adicionada isonicotinoilhidrazida, 2-cloro isonicotinoilhidrazida ou nicotinoilhidrazida (2 mmol). A mistura reacional ficou sob

agitação magnética por 20h à 60-65 °C (**7d-g**); 16h à 60-65 °C (**8c-g** e **3c-g**); 20h à 40-45 °C **8a**; 48h à 20-25°C (**3a-b**) e 24h à 20-25°C (**3g-i** e **4g-i**). Após o tempo reacional houve a precipitação de um sólido, o qual foi filtrado e recristalizado em metanol ou acetona. O composto **8a** apresentou-se na forma de óleo.

4.4 Procedimentos Experimentais para a avaliação da Atividade Biológica

4.4.1 Microorganismos

Foi utilizada a cepa de *M. tuberculosis* ATCC 27294(H37Rv), virulenta e que apresenta sensibilidade às principais drogas administradas no tratamento da tuberculose.

4.4.2 Manutenção dos microrganismos⁹⁹

As cepas foram mantidas em meio sólido de Ogawa-Kudoh em estufa bacteriológica a 37 °C. Essas eram utilizadas no experimento com até 14 dias de crescimento.

4.4.3 Preparo das soluções

4.4.3.1 Compostos sintéticos

Foram testados dezenove compostos pirazolínicos. Todos os compostos foram estocados na geladeira, solubilizados em DMSO 99,5% (Sigma), numa concentração de 10 mg/ml. Para o experimento, estes foram diluídos em água destilada estéril até obter-se a concentração de 400µg/ml, para que, dessa forma, a concentração nos testes de suscetibilidade bacteriana fosse de 100 µg/ml no primeiro poço.

4.4.4 Teste de suscetibilidade do *M. tuberculosis* ATCC 27294(H37Rv) aos compostos pirazolínicos trialometilados

4.4.4.1 Suspensão bacteriana

Foram utilizados tubos de ensaio com tampa de rosca, estéreis contendo pérolas de vidro e pesados, individualmente, em balança de precisão. A seguir, com o auxílio de alças descartáveis, porções da colônia de microrganismos eram transferidas para tubos previamente pesados. Realizava-se outra pesagem para a determinação da massa bacteriana incluída em cada tubo. A seguir, adicionavam-se volumes de 1ml para cada 0,001g de massa bacteriana, tendo-se o cuidado de fracionar este volume em 2 alíquotas de 500ml, para a obtenção de uma

suspensão bacteriana bem homogênea. A suspensão final era padronizada pela turvação equivalente ao tubo 1,0 da escala de Mac Farland.

O inóculo bacteriano foi preparado a partir dessa suspensão, em uma proporção de 1:20 em meio 7H9 líquido .

4.4.4.2 Preparação da placa para a triagem da atividade antimicobacteriana pelo método REMA frente ao *M. tuberculosis* ATCC 27294(H37Rv)

A metodologia foi baseada nos estudos de Palomino *et al.*¹⁰⁰, com pequenas modificações. Os dezenove compostos sintéticos foram testados frente ao *M. tuberculosis* ATCC 27294(H37Rv), onde foi avaliada a sensibilidade ou a resistência do microrganismo utilizando uma concentração fixa de 100µg/ml. Foi utilizada uma microplaca de 96 cavidades em fundo U (figura 22). Nas cavidades periféricas eram adicionados 200µl de água destilada estéril, para evitar a evaporação do meio líquido quando incubado na estufa. Nos poços de teste, eram adicionados 100µl de meio 7H9 enriquecido com OADC (ácido oléico albumina dextrose catalase), 100µl do composto e 100 µl do inóculo. Assim, a concentração do composto em cada poço era de 100µg/ml, devido a sua diluição no meio e no inóculo. Posteriormente, a placa era incubada na estufa a 37°C, sob atmosfera de aerobiose e sem agitação durante sete dias.

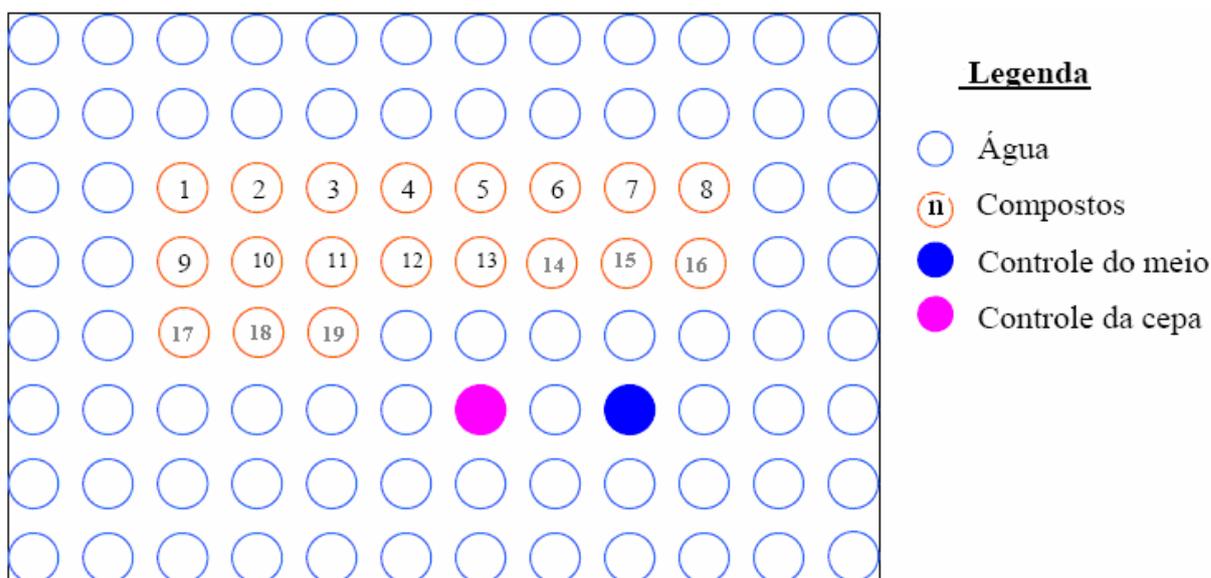


Figura 22: Distribuição dos compostos na microplaca para a triagem da atividade antimicobacteriana.

4.4.4.3 Preparação das placas de CIM com o *M. tuberculosis* ATCC 27294(H37Rv).

Volumes de 200 µl de água destilada estéril eram depositados nos poços da periferia com o propósito de evitar a evaporação do meio líquido 7H9. Em seguida, em todos os poços, eram adicionados 100 µl do meio 7H9 enriquecido com 10% de OADC, 100 µl do composto partindo-se de uma concentração de 100µg/ml no primeiro poço (microdiluição 1:2) e 100µl do inóculo bacteriano em todos os poços. A seguir, a placa era incubada em estufa a 37°C por sete dias.

4.4.5 Leitura dos ensaios de triagem e determinação das CIMs.

Decorrido o tempo de incubação (sete dias), eram adicionados 30µl de resazurina a 0,02% a cada poço, incubando-se por mais dois dias na estufa a 37°C. O corante age como um indicador da viabilidade celular. A leitura é baseada na mudança de cor do azul para o rosa, devido a oxi-redução do corante; esta mudança de cor do corante indica o crescimento bacteriano, os poços que mantinham a cor azul eram interpretados como inibição do crescimento bacteriano.

5. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos nesta pesquisa as seguintes conclusões podem ser apresentadas:

- a) A ciclocondensação entre 1,1,1-trialo-4-alkil[(aril/heteroaril)]-4-alcoxi-3-alken-2-onas e piridil hidrazinas ocorre de forma regioespecífica, levando a formação de 4,5-diidro-1*H*-pirazol (**3** e **4**) conforme metodologia descrita na literatura, e também a formação de 4,5-diidro-1*H*-pirazol(**7** e **8**) inéditos na literatura em bons rendimentos.
- b) Os resultados dos ensaios *in vitro* para determinação da atividade dos compostos frente ao *Mycobacterium tuberculosis* ATCC 27294(H37Rv) demonstraram que:
 - Com base nas CIMs os compostos pirazolínicos trifluormetilados foram mais ativos do que os triclorometilados.
 - As posições do átomo de nitrogênio bem como o substituinte cloro influenciam na atividade antimicobacteriana dos compostos em estudo.
 - Os compostos **3a** e **3g** demonstram excelente atividade antimicobacteriana (CIM= 0,39 µg/ml), porém nenhum composto mostrou atividade superior a INH.
 - Compostos pirazolínico com posição C-3 do anel não substituída ou substituída por alkil, aril e hetroaril apresentam atividade inibitória frente às cepas testadas. Todavia alguns compostos com substituinte aril e heteroaril nesta posição evidenciaram perda da atividade antimicobacteriana.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Silva, P. *Farmacologia*, 7ª Ed., Guanabara koogan, Rio de Janeiro, **2006**, 1050.
2. World Health Organization WHO Report 2007- global Tuberculosis control - Surveillance, Planing, financing, Geneva. Disponível em <http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/> Acessado em 22/05/2007.
3. World Health Organization. The global MDR-TB & XDR-TB response plan, 2007-2008. Disponível em <http://libdoc.who.int/hq/2007/>> Acessado em 20/06/2008.
4. Wolfart, M.; Brth, A. L.; Willers, D.; Zavaski, A.P. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **2008**, *102*, 421.
5. Silva, P.A.; Aínsa, J.A. Drugs and drug interaction. Tuberculosis 2007. Disponível em: <<http://www.amedeochallenge.org/ac/tb.htm>> Acessado em 18/06/2008.
6. Vilchèse, C.; Jacobs, W. R. *Annu. Rev. Microbiol.* **2007**, *61*, 35.
7. Janin, J.Y. *Bioorg & Med. Chem.* **2007**, *15*, 2479.
8. Shaharyar, M.; Siddiqui, A. A.; Ali, M. A.; Sriram, D.; Yogeewari, P. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 3947.
9. Cocco, M.; Congui, C.; Onnis, V.; Pusceddu, M.; Schivo, M.; De Logu, A. *Eur. J. Med. Chem.* **1999**, *34*, 1071.
10. Maccari, R, Ottana, R.; Vigorita, M. G. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 2509.
11. Mohamad, S.; Ibrahim, P.; Sadikun, A. *Tuberculosis*, **2004**, *84*, 56.
12. Lednecer, D. and Mitcher, L. A. *Organic Chemistry of Drugs Synthesis*, A Wiley-Interscience Publication, John Wiley & Sons, N Y, **1997**, Vol. 1-3. b) Arriba, A. F.; Gómez-Casajús, L. A.; Cavalcante, F.; Almansa, C.; García-Rafanell, J. *Eur. J. Pharmacol.* **1996**, *318*, 341.
13. Martins, M. A. P.; Zoch, A. N.; Flores, A. F. C.; Clar, G.; Zanatta, N.; Bonacorso, H. G. *J. Heterocycl. Chem.* **1995**, *32*, 739.
14. Effenberger, F.; Maier, R.; Schonwalder, K. H.; Ziegler, T. *Chem. Ber.* **1982**, *115*, 2766.
15. Effenberger, F.; Schonwalder, K. H. *chem. Ber.* **1984**, *117*, 3270.
16. Kamiori, Y.; Hojo, M.; Masuda, R.; Fujitani, T.; Kosbuschi, T. *Synthesis*, **1986**, *4*, 340.
17. Hojo, M. Masuda, R.; Okada, E. *Synthesis*, **1986**, *12*, 1013.
18. Hojo, M.; Masuda, R.; Kokuryo, Y.; Shioda, H.; Matsuo, S. *Chem. Lett.* **1976**, 499.
19. Siqueira, G. M.; Flores, A. F. C.; Clar, G.; Zanatta, N.; Martins, M. A. P. *Quim. Nova* **1994**, *17*, 24.

20. Martins, M. A. P.; Bastos, G. P.; Bonacorso, H. G.; Zanatta, N.; Flores, A. F. C.; Siqueira, G. M. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 4309.
21. Bonacorso, H. G.; Martins, M. A. P.; Bittencourt, S. R. T.; Lourega, R. V.; Zanatta, N.; Flores, A. F. C. *J. Fluorine Chem.* **1999**, *99*, 177.
22. Flores, A. F. C.; Siqueira, G. M.; Freitag, A. R.; Zanatta, N.; Martins, M. A. P. *Quim. Nova*, **1994**, *17*, 298.
23. Park, P. Y.; Lee, M. J.; Kim, J. N. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 8799.
24. Taylor, E. C.; Patel, H.; Kumar, H. *Tetrahedron*, **1992**, *48*, 8089.
25. Roelfvan, S. G.; Arnold, C.; Wellnga, K. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *13*, 143.
26. Kedar, R. M.; Vidhale, N. N.; Chincholkar, M. M. *Orient. J. Chem.* **1997**, *84*, 143.
27. Singh, A.; Rathod, S.; Berad, B. N.; Patil, S. D.; Dosh, A.G. *Orient. J. Chem.* **2000**, *16*, 315.
28. Katri, H. Z. Vunii, S. A. *J. Ind. Chem. Soc.* **1981**, *58*, 1968.
29. Das, N. B.; Mitra, A. S. *Ind.J. Chem.* **1978**, *58*, 638.
30. Azarifar, D.; Shaebanzadeh, M.; *Molecules*, **2002**, *7*, 885.
31. Holla, B. S.; Akaberali, P. M.; Shivanada, M. K. *Farmaco*, **2000**, *55*, 256.
32. Palaska, E.; Aytimir, M.; Tayfun, I.; Erol, K.; Dilek, E. *Eur. J. Med. Chem. Chim. Ther.* **2001**, *36*, 539.
33. Katritzky, A. R, Rees C.W.; Scriven E. F. *In Comprehensive Heterocyclic Chemistry II*, eds. Pergamon Press, Oxford, **1996**, Vol. 3.
34. Singh, S. P, Kumar D.; Batra H.; Naithani, R.; Rozas, I.; Elguero, J. *Can. J. Chem.* **2000**; *78*,1109.
35. Lin, P.; Jiang, J. *Tetrahedron*, **2000**, *56*, 3635.
36. Arnone, A.; Barbardi, R.; Blasco, F.; Cardillo, R.; Resnati, G.; Gerus, I.I.; Kukhar, V.P. *Tetrahedron*, **1998**, *54*, 2809.
37. Filler, R. *Organofluorine Chemicals and Their Industrial Applications*, Banks, R.E. (ed), Ellis Horwood, London, **1979**.
38. Bravo, P.; Resnati, G.; Angeli, P.; Frigerio, M.; Viani, F.; et al. *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 3102.
39. Lu, S. F.; Herbert, B.; Haufe, G.; Laue, K. W.; Padgett, W. L.; et al. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 1611.
40. Tewson, T. J.; Stekhova, S.; Kinsey, B.; Chen, L; Wiens, L.; et al. *Nucl. Med. Biol.* **1999**, *26*, 891.

41. Park, B. K.; Kitteringham, N. R. *Drug Metab. Rev.* **1994**, *26*, 605.
42. Martins, M. A. P.; Colla, A.; Clar, G.; Fischer, P.; Krimmer, S. *Synthesis*, **1991**, 483
43. Siqueira, G.M.; Flores, A.F.C.; Clar, G.; Zanatta, N.; Martins, M. A. P. *Quím. Nova* **1994**, *17*, 24.
44. Bonacorso, H.G.; Lopes, I. S.; Wastowski, A.D.; Zanatta, N.; Martins, M.A.P. *J. Fluorine Chem.* **2003**, *120*, 29.
45. Bonacorso, H. G.; Martins, M. A. P.; Bittencourt, S. R. T.; Lourega, R. V.; Zanatta, N.; Flores, A. F. C. *J. Fluorine Chem.* **1999**, *99*, 177
46. Flores, A. F. C.; Brondani, S.; Zanatta, N.; Rosa, Adriano; Martins, M. A. P. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 8701.
47. Bonacorso, H. G.; Drekenner, R. L.; Rodríguez, I. R.; Vezzosi, R. P.; Costa, M. B.; Martins, M. A. P., Zanatta, N. *J. Fluorine Chem.* **2005**, *126*, 1384.
48. (a) Bonacorso, H. G.; Costa, M. B.; Moura, S.; Pizzuti, L.; Martins, M. A. P.; Zanatta, N.; Flores, A. F. C. *J. Fluorine Chem.* **2005**, *126*, 1396. (b) Bonacorso, H. G.; Cechinel, C. A.; Costa, M. B.; Oliveira, M. R.; Martins, M. A. P.; Zanatta, N.; Flores, A. F. C. *J. Heterocycl. Chem.* **2005**, *42*, 1055.
49. (a) Martins, M. A. P.; Cunico, W.; Pereira, C.M.P.; Sinhorin, A.P.; Flores, A. F. C.; Bonacorso, H. G.; Zanatta, N. *Curr. Org. Synth.* **2004**, *1*, 391. (b) Druzhinin, S.V.; Balenkova, E.S.; Nenajdenko, V.G. *Tetrahedron*, **2007**, *63*, 7753.
50. Colla, A.; Martins, M.A.P.; Clar, G.; Krimmer, S.; Fischer, P. *Synthesis*, **1991**, 483
51. Martins, M.A.P., Siqueira, G. M.; Bastos, G.P.; Bonacorso, H.B.; Zanatta, N. *J. Heterocycl. Chem.* **1996**, *33*, 1619.
52. Martins, M.A.P.; Flores, A.F.C.; Bastos, G.P.; Bonacorso, H.G.; Zanatta, N. *Heterocycl. Chem.* **1999**, *41*, 293.
53. Martins, M.A.P.; Freitag, R.; Flores, A.F.C.; Zanatta, N. *J. Heterocycl. Chem.* **1996**, *33*, 1223.
54. Grünanger, P.; Vita-Finzi, P. in Weissenberger and Taylor. *The Chemistry of Heterocyclic compounds, Isoxazoles, Part I*, Willey-Interscience, New York, **1991**.
55. (a) Martins, M.A.P.; Flores, A.F.C.; Bastos, G.P.; Bonacorso, H.G.; Zanatta, N.; Sinhorin, A. P. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 293. (b) Martins, M.A.P.; Beck, P.; Cunico, W.; Pereira, M.P.P.; Sinhorin, A. P.; Blanco, R.F.; Peres R.; Bonacorso, H.G.; Zanatta, N. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 7005. (c) Martins, M. A. P.; Sinhorin, A. P.; Zimmermann, N.E.K.; Zanatta, N.; Bonacorso, H.G.; Bastos, G. *Synthesis*, **2001**, *13*, 1959.

56. Martins, M.A.P.; Freitag, R.; Flores, A. F. C.; Zanatta, N. *Synthesis*, **1995**, *12*, 1491.
57. Bonacorso, H.G.; Oliveira, M. R.; Wastowski, A.D.; Wentz, A.P.; Oliveira, A. B.; Hörner, M.; Zanatta, N.; Martins, M.A.P. *Tetrahedron*, **1999**, *55*, 345.
58. Braibante, M.E.F.; Clar, G.; Martins, M.A.P. *J. Heterocycl. Chem.* **1993**, *30*, 1159.
59. Gerus, I. I.; Gorbunova, M. G.; Vdovenko, S. I.; Vagupolskii, Y. I.; Kukhour, V. P. *Zh. Organicheskoi Khimii*, **1990**, *26*, 1877. (versão em inglês **1991**, 1623).
60. Martins, M.A.P.; Freitag, R.A.; Rosa, A.; Flores, A.F.C.; Zanatta, N.; Bonacorso, H.G. *J. Heterocycl. Chem.* **1999**, *36*, 217.
61. (a) Flores, A.F.C.; Martins, M.A.P.; Rosa, A.; Flores, D.C.; Zanatta, N.; Bonacorso, H. G. *J. Synth. Commun.* **2002**, *32*, 1585. (b) Martins, M.A.P.; Pereira, M.P.P.; Beck, P.; Machado, P.; Moura, S.; Teixeira, M.V.M.; Bonacorso, H.G.; Zanatta, N. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 6669. (c) Bonacorso, H.G. ; Lang, E.S.; Lewandowski, H.; Martins, M.A.P.; Peppe, C.; Zanatta, N. *Inorg. Chem. Commun.* **2003**, *6*, 646.
62. (a) Bonacorso, H.G.; Oliveira, M.R.; Costa, M.B.; Silva, L.B.; Zanatta, N.; Martins, M.A.P.; Flores, A.F.C. *J. Braz. Chem. Soc.* **2005**, *16*, 868. (b) Bonacorso, H.G. ; Oliveira, M.R.; Costa, M.B.; Silva, L.B.; Wastowski, A.D.; Zanatta, N.; Martins, M.A.P. *J. Heterocycl. Chem.* **2005**, *42*, 631.
63. Martins, M.A.P.; Beck, P.; Machado, P.; Brondani, S.; Moura, S.; Zanatta, N.; Bonacorso, H.G.; Flores, A.F.C. *J. Braz. Chem. Soc.* **2006**, *17*, 408.
64. (a) Bonacorso, H.G. ; Oliveira, M.R.; Costa, M.B.; Drekenner, R.L.; Silva, L.B.; Zanatta, N.; Martins, M.A.P. *Heteroatom Chem.* **2006**, *17*, 685. (b) Bonacorso, H.G. ; Wentz, A.P.; Lourega, R.V.; Cechinel, C.A.; Moraes, T.S.; Coelho, H.S.; Zanatta, N.; Martins, M.A.P.; Höerner, M.; Alves, S.H. *J. Fluorine Chem.* **2006**, *127*, 1066.
65. Zanatta, N.; Pachoski, I, L.; Faoro, D.; Bonacorso, H.G.; Martins, M.A.P. *Synth. Commun.* **1991**, *31*, 8, 355.
66. Zanatta, N.; Madruga, C.C.; Clereci, E.; Martins, M.A.P. *J. Heterocycl. Chem.* **1995**, *32*, 735. (b) Zanatta, N.; Cortelini, M.F.M.; Carpes, M.J.S.; Bonacorso, H.G.; Martins, M.A.P. *J. Heterocycl. Chem.* **1997**, *34*, 509.
67. (a) Zanatta, N.; Madruga, C.C.; Marisco, P.C.; Flores, D.C.; Bonacorso, H.G.; Martins, M.A.P. *J. Heterocycl. Chem.* **2000**, *37*, 1213. (b) Zanatta, N.; Pacholski, I.L.; Faoro, D.; Bonacorso, H.G.; Martins, M.A.P. *J. Synth. Commun.* **2001**, *31*, 2855. (c) Bonacorso, H. G. ; Wentz, A. P. ; Zanatta, N. ; Martins, M. A. P. *Synthesis*, **2001**, *10*, 1505.

68. Zanatta, N.; Flores, D.C.; Madruga, C.C.; Flores, A.F.C.; Bonacorso, H. G.; Martins, M.A.P. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 573.
69. (a) Pascholski, I.L.; Blanco, I.S.; Zanatta, N.; Martins, M.A.P. *J. Braz. Chem. Soc.* **1991**, *2*, 118. (b) Bonacorso, H. G.; Lourega, R. V.; Wastowski, A. D. ; Flores, A. F. C. ; Zanatta, N. ; Martins, M. A. P. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 9315. (c) Bonacorso, H. G. ; Lopes, I.S.; Wastowski, A.D.; Zanatta, N.; Martins, M. A. P. *J. Fluorine Chem.* **2003**, *120*, 29. (d) Bonacorso, H. G. ; Costa, M.B.; Lopes, I.S.; Oliveira, M.R.; Drekenner, R.L.; Martins, M.A.P.; Zanatta, N.; Flores, A.F.C. *Synth. Commun.* **2005**, *35*, 3055.
70. Fagundes, M. B.; Ellenshon, R.;Marques, M.; Zanatta, N.; Martins, M.A.P. *J. Heterocycl. Chem.* **1998**, *35*, 451.
71. Zanatta, N.; Barichello, R.; Bonacorso, H.G.; Martins, M.A.P. *Synthesis*, **1999**, 765.
72. Bonacorso, H.G.; Bittencourt, S.T.; Wastowski, A.D.; Wentz, A.P.; Zanatta, N.; Martins, M.A.P. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 9155.
- 73.(a) Bonacorso, H.G.; Bittencourt, S.T.; Wastowski, A.D.; Wentz, A.P.; Zanatta, N.; Martins, M.A.P. *J. Heterocycl. Chem.* **1999**, *36*, 45. (b) Bonacorso, H.G.; Marques, L.M.L.; Zanatta, N.; Martins, M.A.P. *Synth. Commun.* **2002**, *32*, 3225.
74. a) Singh, S. P.; Kumar, D.; Jones, B. G.; Threadgill *J. Fluorine Chem.* **1999**, *94*, 199. b) Karp, G. M.; Samant, D.; Mukhopadhyay, S.; Condon, M. E.; Kleemann, A. *Synthesis*, **2000**, *8*, 1078. c) Sloop, J. C.; Bumgardner, C. L.; Loehle, W. D. *J. Fluorine Chem.* **2002**, *118*, 135. d) Bravo, P.; Diliddo, D.; Resnati, G. *Tetrahedron*, **1994**, *50* (29), 8827. e) Burgart, Y. V.; Fokin, A. S.; Kuzueva, O. G.; Chupakhin, O. N.; Saloutin, V. I. *J. Fluorine Chem.* **1998**, *92*, 101. f) Bumgardner, C. L.; Sloop, J. C. *J. Fluorine Chem.* **1992**, *56*, 141. g) Foces-Foces, C.; Trofimenko, S.; López, C.; Santa María, M. D.; Claramunt, R. M.; Elguero, J. *J. Mol. Structure* **2000**, *526*, 59. h) Denisova, A. B.; Sosnovskikh, V. Y.; Dehaen, W.; Toppet, S.; Van Meervelt, L.; Bakulev, V. A. *J. Fluorine Chem.* **2002**, *115*, 183. i) Röschenthaler, G.V.; Sevenard, D. V.; Khomutov, O. G.; Kodess, M. I.; Pashkevich, K. I.; Loop, I.; Lork, E.; *Can. J. Chem.* **2001**, *79*, 183. j) Elguero, J.; Yranzo, G. I. *J. Chem. Res. Synop.* **1990**, 120.
75. Zefirov, N. S.; Kozhushkov, S. I.; Kuznetsova, T. S.; Ershov, B. A.; Selivanov, S. I. *Tetrahedron*, **1986**, *42*, 709
76. Singh, S. P.; Kumar, D.; Batra, H.; Naithani, R.; Rozas, I.; Elguero J.; *Can. J. Chem.* **2000**, *78*, 1109.
77. Threadgill, M. D.; Sing, S. P.; Kapoor, J. K.; Kumar, D. *J. Fluorine Chem.* **1997**, *83*, 73.
78. Threadgill, M.D.; Herr, A.K.; Jones, B.G. *J. Fluorine Chem.* **1993**, *65*, 21.

79. Pashkevic, K.I.; Khomutov, O.G.; Sevenard, D. V.; *Russ. J. Org. Chem.* **2000**, *36*, 1144.
80. Bonacorso, H.G.; Lewandowski, H.; Drekenner, R.L.; Costa, M.B.; Pereira, C.P.P.; Wastowski, A.D.; Peppe, C.; Martins, M.A.P.; Zanatta, N. *J. Fluorine chem.* **2003**, *122*, 159
81. Machado, P.; Rosa, F.A.; Rossato, M.; Sant'Anna, G.; Sauzem, P.D.; Silva, M.S.; Rubin, M.A.; Ferreira, J.; Bonacorso, H.G.; Zanatta, N.; Martins, M.A.P. *ARKIVOC*, 2007, (XVi), 281.
82. Liliane Medianeira Favero Porte, *Dissertação de Mestrado*, UFSM, **2008**, resultados não publicados.
83. Gisele Rocha Paim, *Dissertação de Mestrado*, **2008**, resultados não publicados.
84. Jawetz, E.; Melnick, J.L.; Aldeberg, E.A. *Microbiologia Médica*, 10 ed., Guanabara Koogon, Rio de Janeiro, **1974**, 190.
85. Souza, M.V.N.; Vasconcelos, T. R.A.; *Quím. Nova*, **2005**, *28*, 4, 678.
86. Murray, P.; Rosenthal, K.; Kobayashi, G.; Pfaller, M. *Microbiologia médica*, 4 ed., Guanabara Koogon, Rio de Janeiro, **2004**, 345.
87. Watanabe, K.; Fujimura, M.; Kashara, K.; Yasui, M.; Myou, S.; Watanabe, A.; Nakao, S. *Respiratory Medicine*, **2003**, *43*, 654.
88. Merck. The Manual – second Home Edition. Infection tuberculosis. Disponível em :<<http://www.merck.com/mmhe/sec17/ch193a.html>> Acessado em: 21/06/2008.
89. Fox, H.H.; Gibas, J.T.; *Journal of Organic Chemistry*, **1952**, *20*, 1952.
90. Cardoso, F.R.; Cooksey, R.C.; Morlock, G.P.; Barco, P.; Cecon, I.; Forestiero, F.; Leite, C.Q.F.; Sato, D.; Shikama, M.L.; Mamizuka, E.; Kirota, R.; Kirota, M. *Antimicrob. Agents and Chemother.* **2004**, *48*, 9, 3378.
91. Cunha, F.A.; Frota, C.C. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, **2005**, *37*, 3, 157.
- 92.a) Cynamom, N.H.; Gimi, R.; Gyenes, F.; Sharpe, C.A.; Bergman, K.E.; Han, H.J.; Gregor, L.B.; Rapow, R.; Luciano, G.; Welch, J.T. *Journal of Medicinal Chemistry*, **1995**, *38*, 3902. b) Cynamom, M.H.; Klemes, S.P.; *Journal of Medicinal Chemistry*, **1992**, *35*, 1221.
93. Sreevatsan, S.; Stockbauer, K.; Pan, X.; Kreiswirth, B.N.; Moghazeh, S. L.; Jacobs R.W.JR.; Telenti, A.; Musser J. *Antimicrob. Agents and Chemother.*, **1997**, *41*, 8, 1677.
- 94.a) Mamolo, G.M.; Zampieri, D.; Falagiani, V.; Vio, L.; Banfi, E. *Il Farmaco*, **2002**, *56*, 593. b) Srivastava, Y. K.; Sukhwai, S.; Ashawa, A.; Verma, B. L. *J. Indian Chem. Soc.* **1997**, *74*, 573
95. Sinha, N.; Jain, S.; Tilekar, A.; Upadhyaya, R.S.; Kishore, N.; Sinha, R.K.; Arora S.K. *ARKIVOC*, **2005**, (ii) 9.

96. Khan, K. M.; Rasheed, M.; Ullah.-Z.; Hayat, S.; Kaukab, F.; Stewart, J.J.P. *J. Am Chem. Soc.* **1990**, *107*, 3902.
97. Adger, B. M; Bannister, R; Lewis, N. J; and O'Farrell, C. *J. Chem. Soc. Perkin. Trans I*, **1988**, 2785.
98. Perrin, D.D.; Armarego, L.F. *Purification of Laboratory Chemicals*, 2rd Edition, Pergamon Press, São Paulo, SP. **1980**.
99. Takao, E. K. H.; Nocchi S. R.; Siqueira, V. L. D.; Cardoso, M. A.; Perón, M. L. D.; Callefi, K. R.; Cardoso, R. F. *Acta Sci. Health Sci* .**2005**, *27*, 2, 183.
100. Palomino, J. C.; Martin, A.; Camacho, M.; Guerra, H.; Swings, J.; Portaels, F. *Antimicrob. Agents and Chemother.* **2002**, *46*, 8, 2720.

7. ANEXO I

Espectros de RMN de ^1H e $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ dos compostos obtidos e citados na dissertação

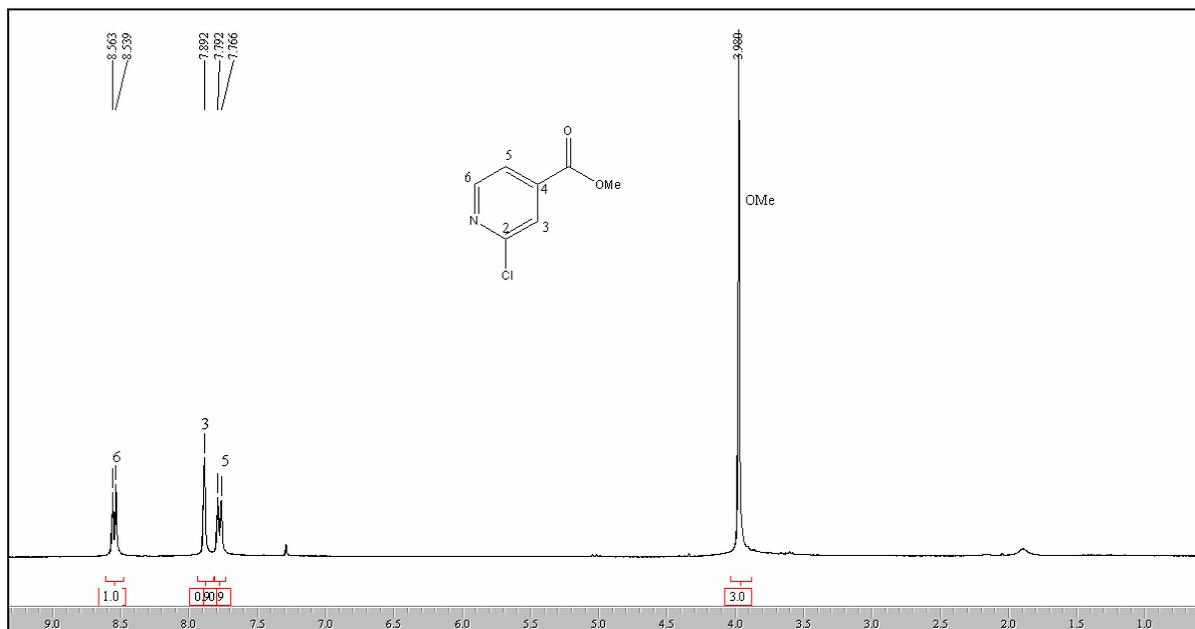


Figura 23: Espectro de RMN ¹H a 200,13 MHz de metil 2-cloro isonicotinoato (**5**), em clorofórmio-*d*₁.

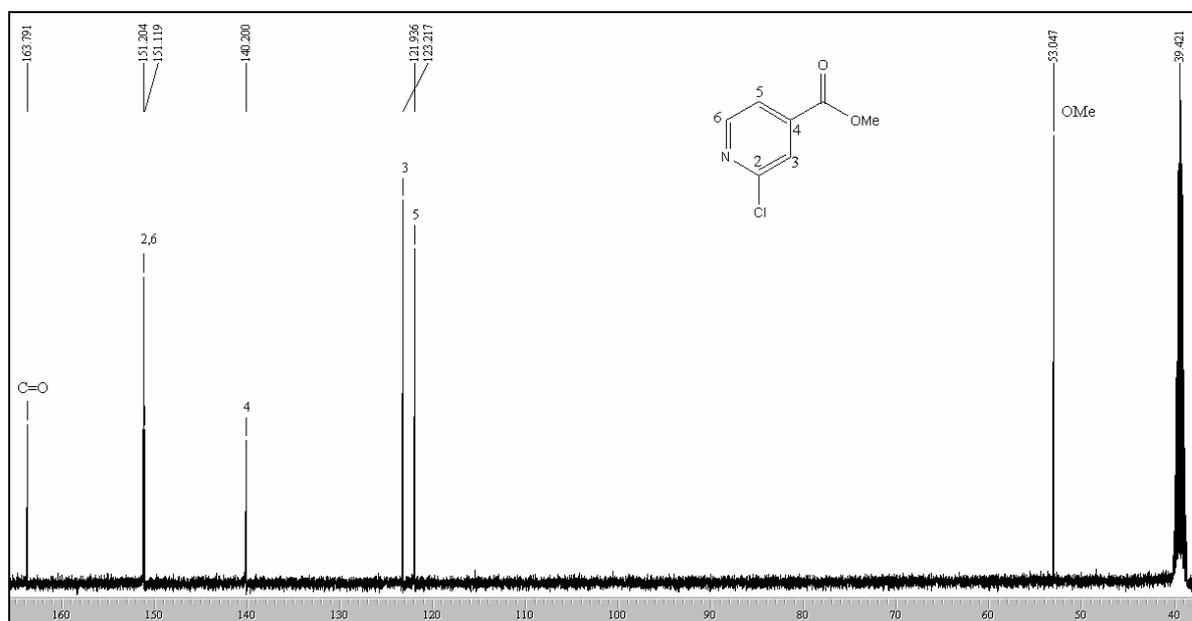


Figura 24: Espectro de RMN ¹³C {¹H} a 100,61 MHz de metil 2-cloro isonicotinoato (**5**), em DMSO-*d*₆.

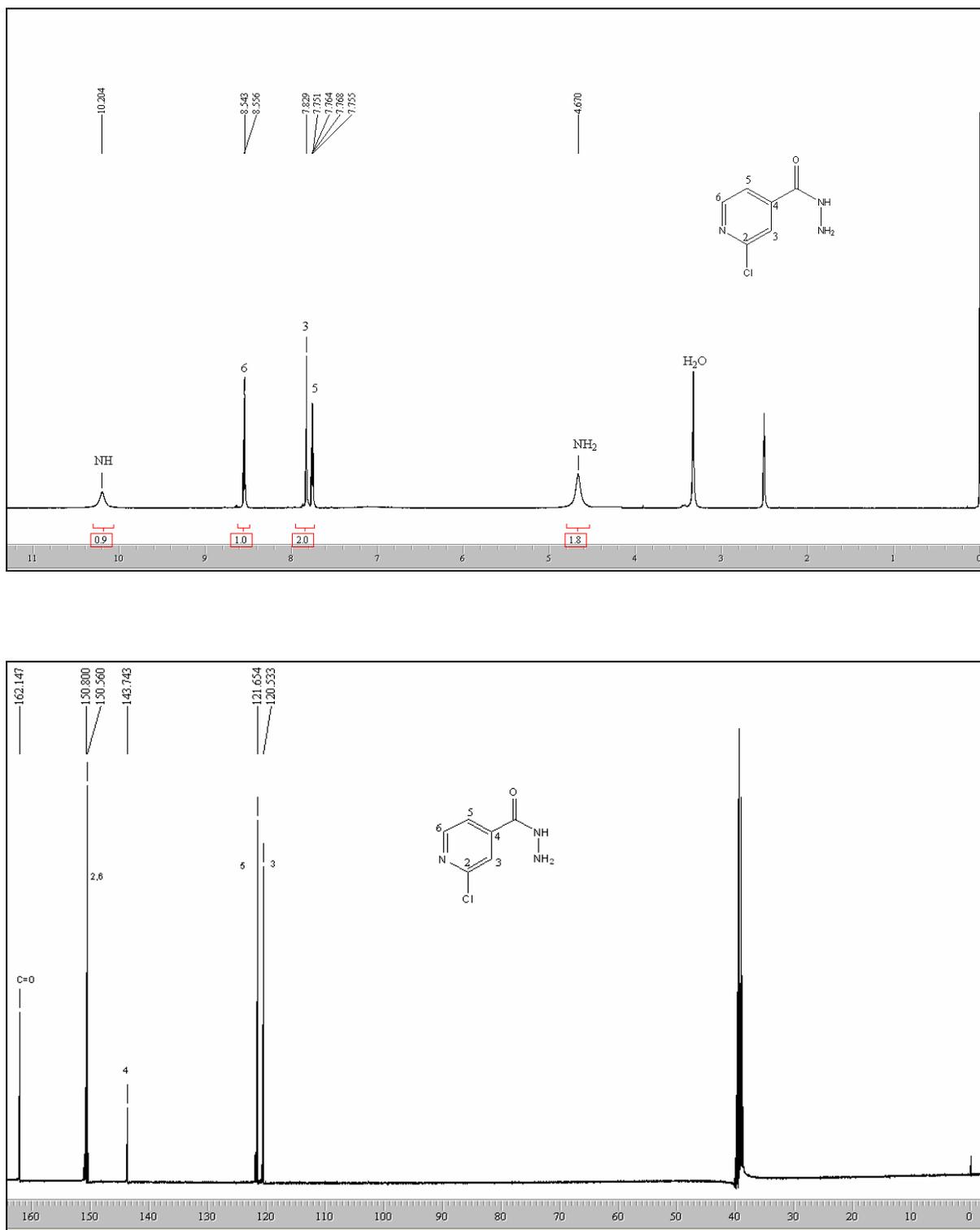


Figura 25: Espectro de RMN ^1H a 200,13 MHz e RMN ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ a 100,61 MHz de 2-cloroisonicotinoilhidrazida (**6**), em $\text{DMSO}-d_6$.

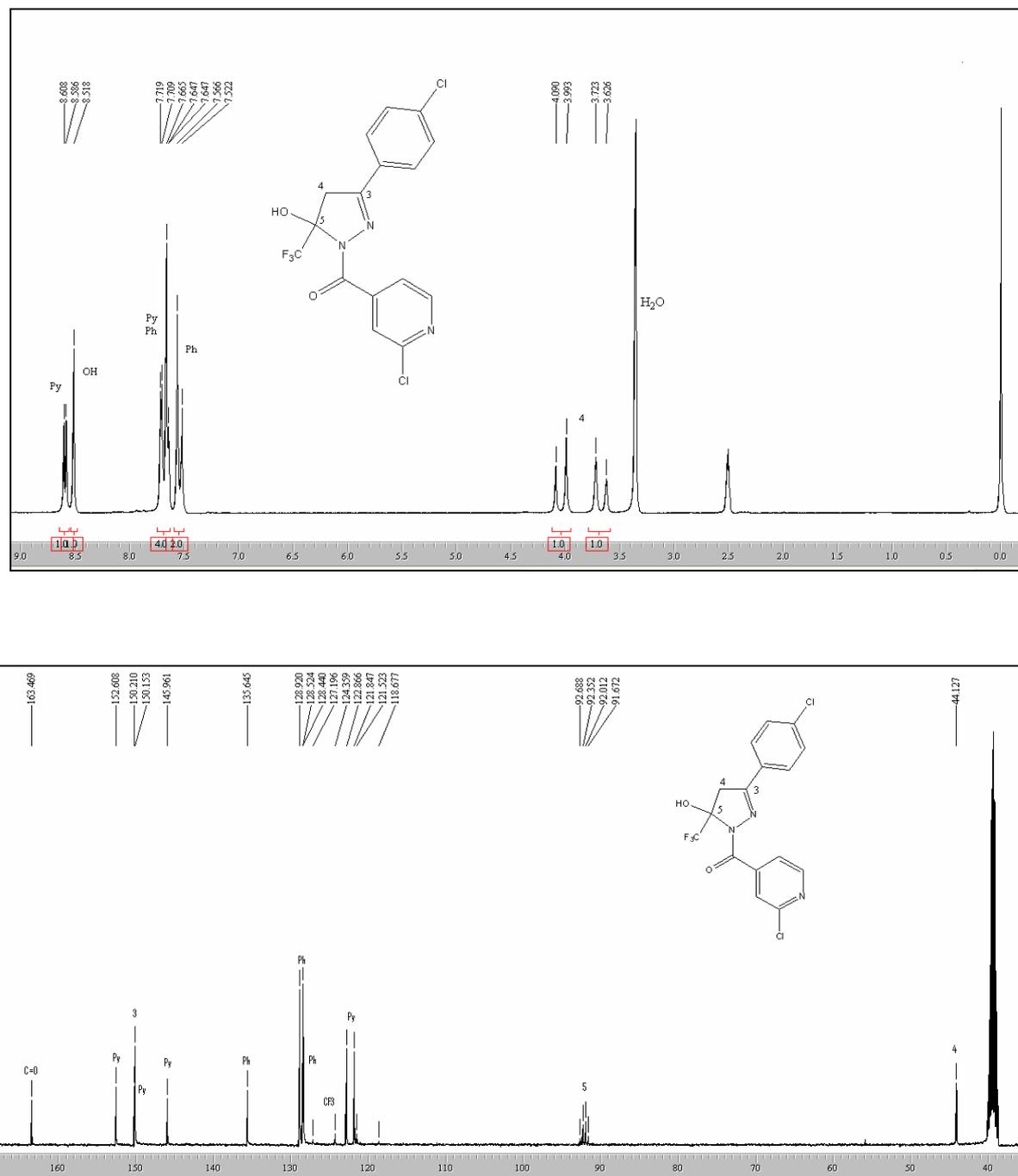


Figura 26: Espectro de RMN ^1H a 200,13 MHz e RMN ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ a 100,61 MHz de 5-hidroxi-3-(4-clorofenil)-5-trifluorometil-4,5-diidro-1H-1-(2-cloroisonicotinoyl)pirazol (**7d**), em $\text{DMSO-}d_6$.

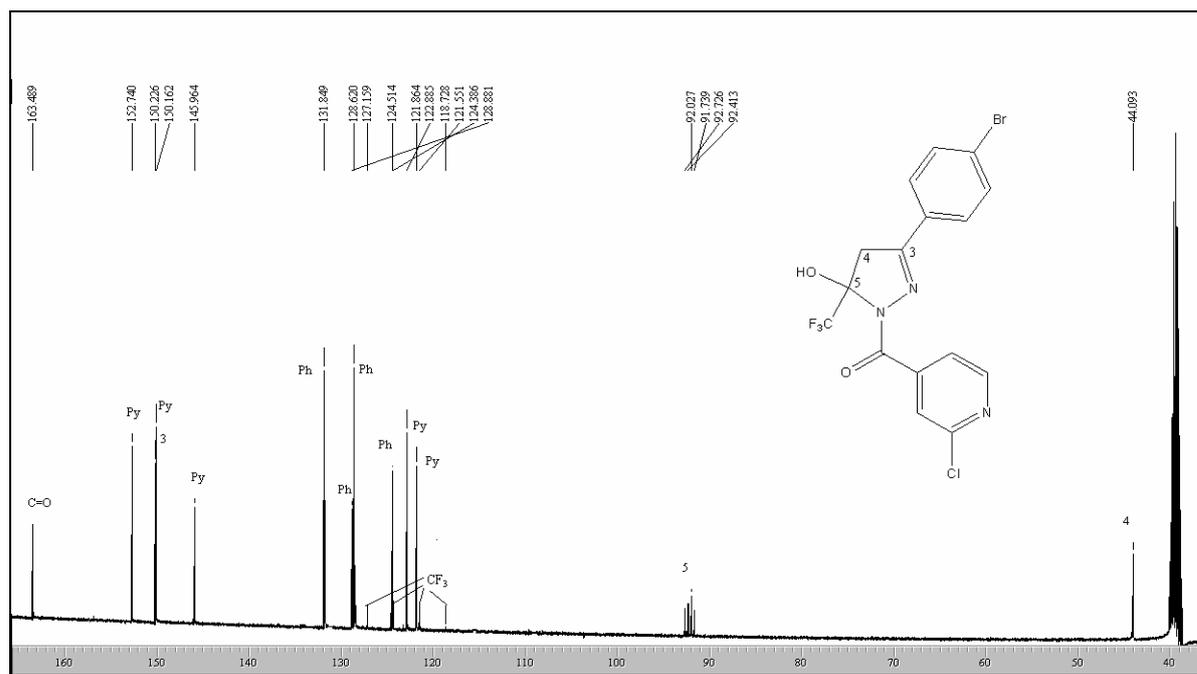
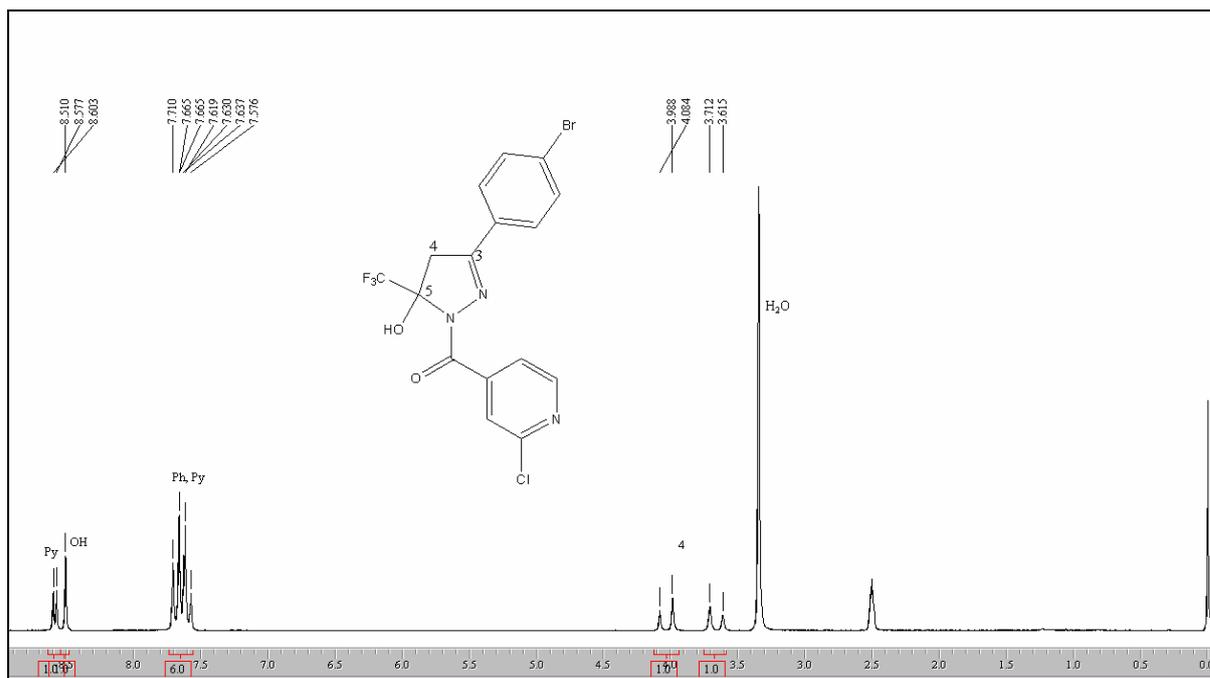


Figura 27: Espectro de RMN ^1H a 200,13 MHz e RMN ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ a 100,61 MHz de 5-hidroxi-3-(4-bromofenil)-5-trifluormetil-4,5-diidro-1H-1-(2-cloroisonicotinil)pirazol (7e), em DMSO- d_6 .

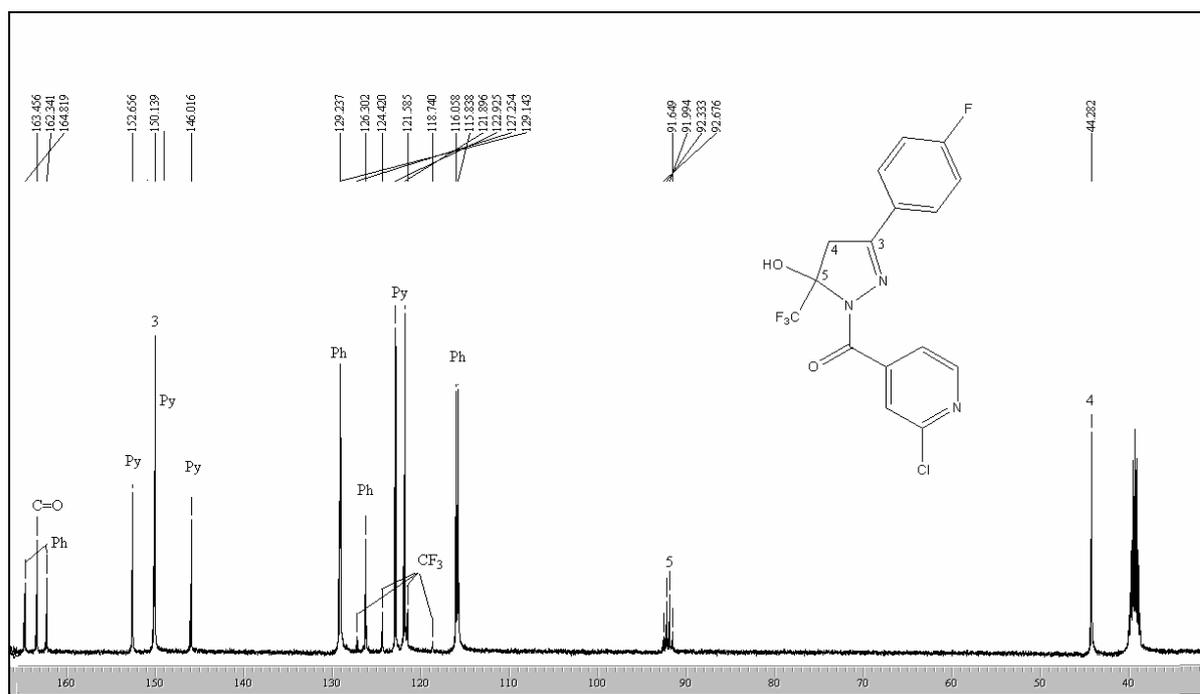
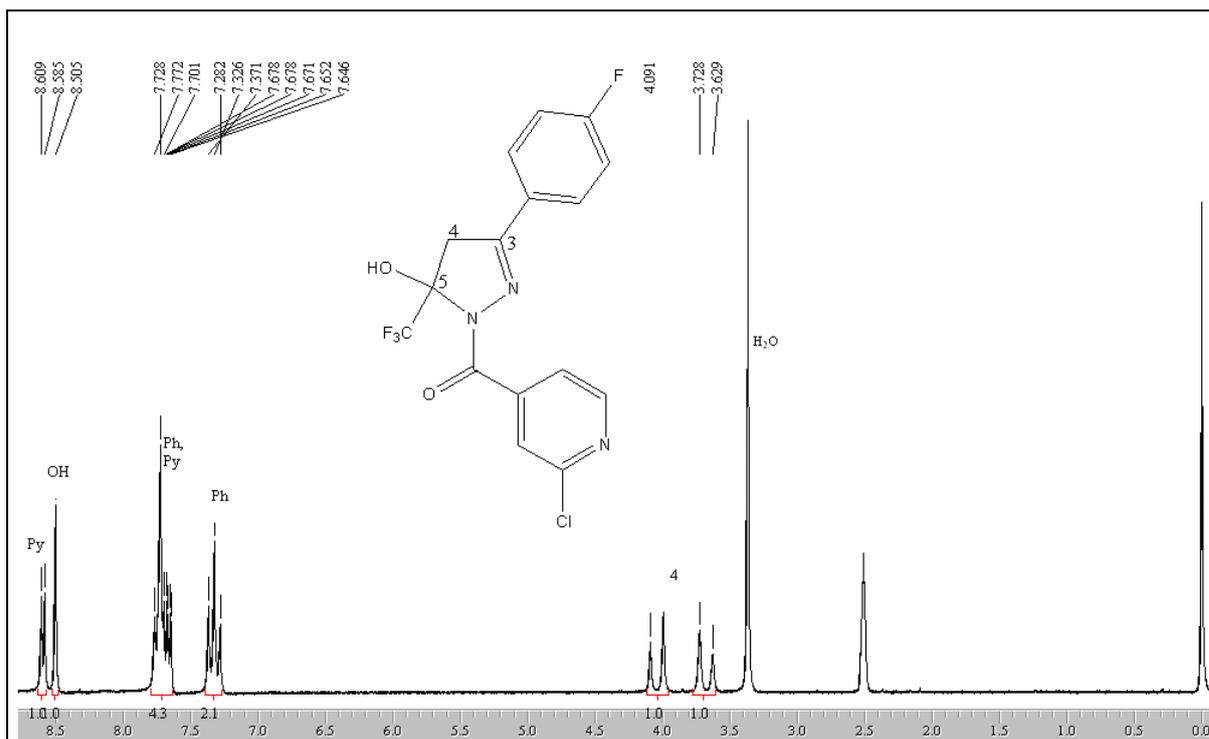


Figura 28: Espectro de RMN ^1H a 200,13 MHz e RMN ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ a 100,61 MHz de 5-hidroxi-3-(4-fluorfenil)-5-trifluormetil-4,5-diidro-1H-1-(2-cloroisonicotinóil)pirazol (**7f**), em $\text{DMSO-}d_6$.

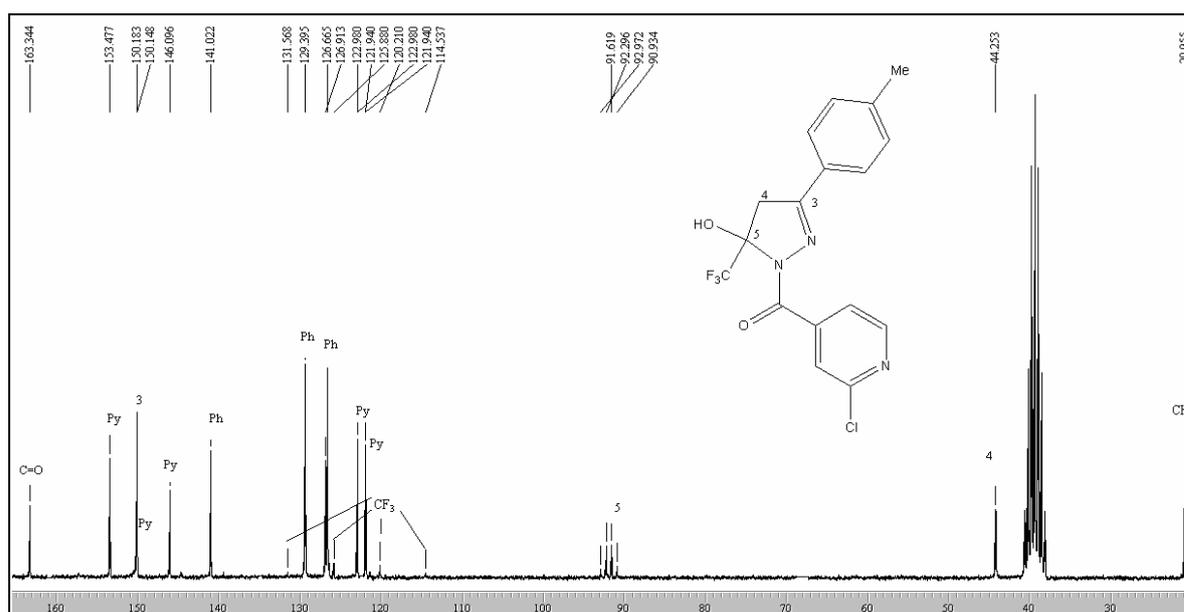
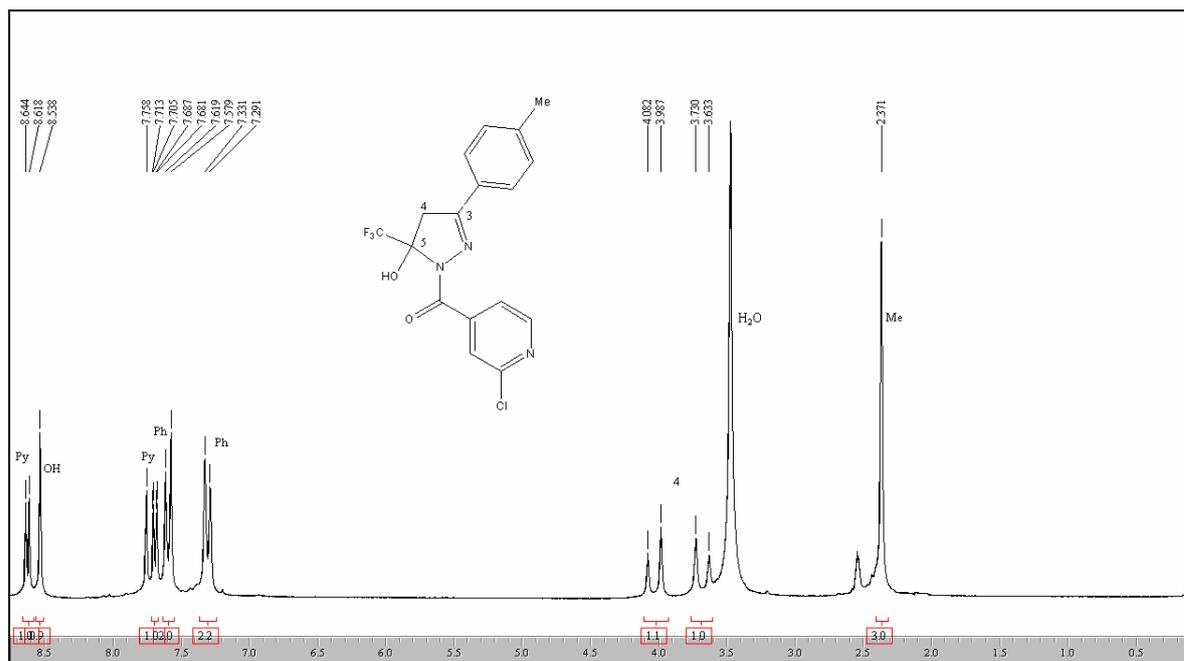


Figura 29: Espectro de RMN ¹H a 200,13 MHz e RMN ¹³C {¹H} a 100,61 MHz de 5-hidroxi-3-(4-metilfenil)-5-trifluormetil-4,5-diidro-1*H*-1-(2-cloroisonicotinoil)pirazol (**7g**), em DMSO-*d*₆.

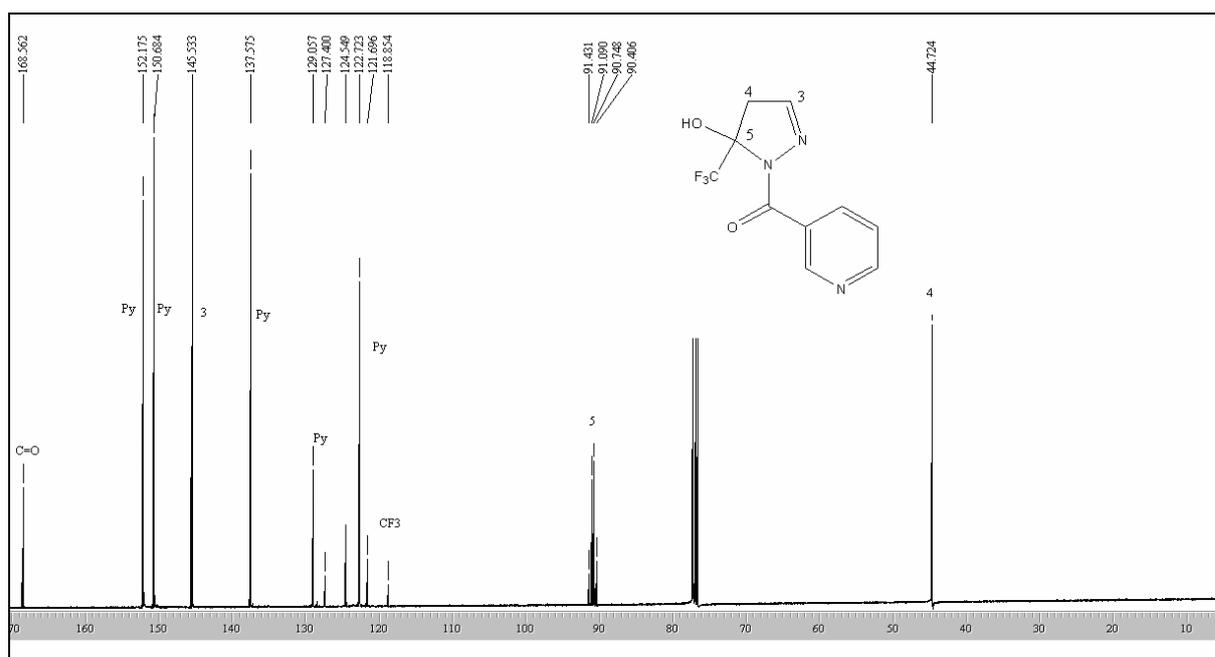
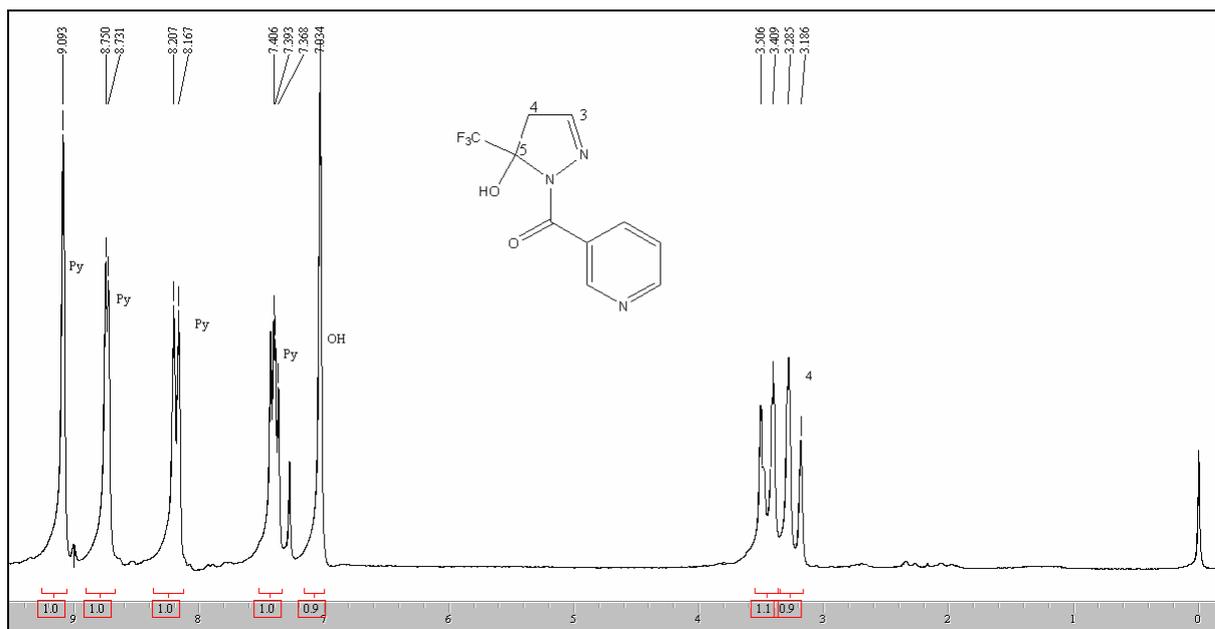


Figura 30: Espectro de RMN ¹H a 200,13 MHz e RMN ¹³C {¹H} a 100,61 MHz de 5-hidroxi-5-trifluormetil-4,5-diidro-1H-1-(nicotinoil)pirazol (**8a**), em clorofórmio-*d*₁.

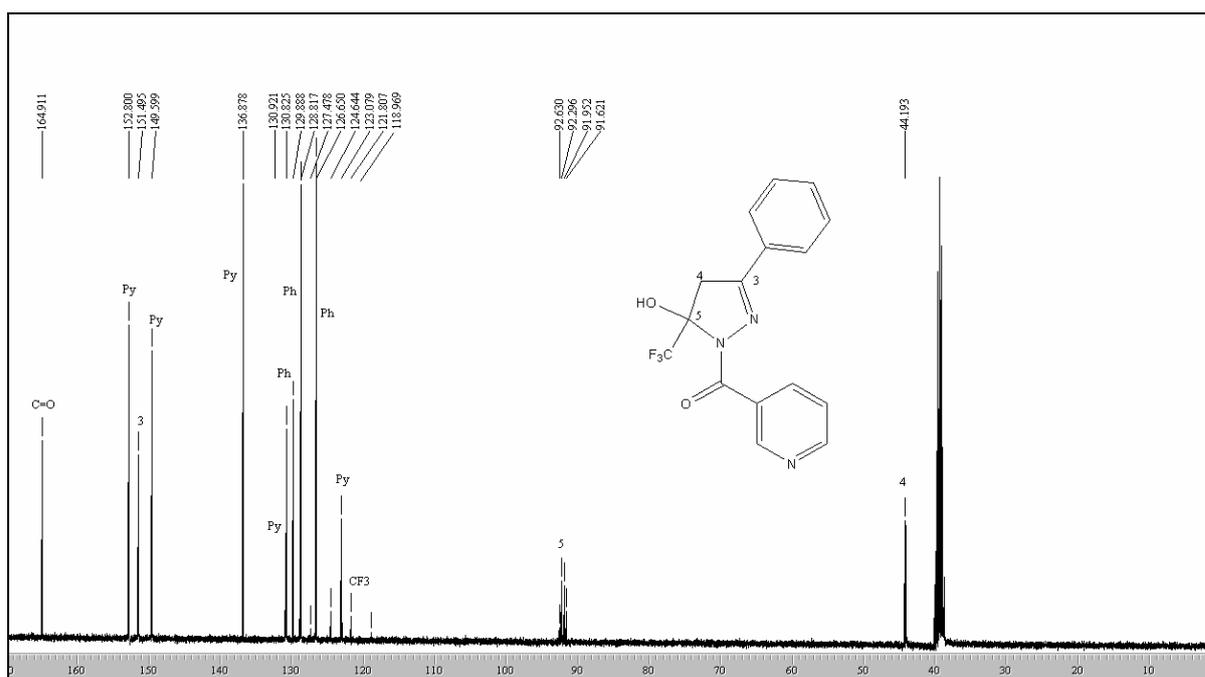
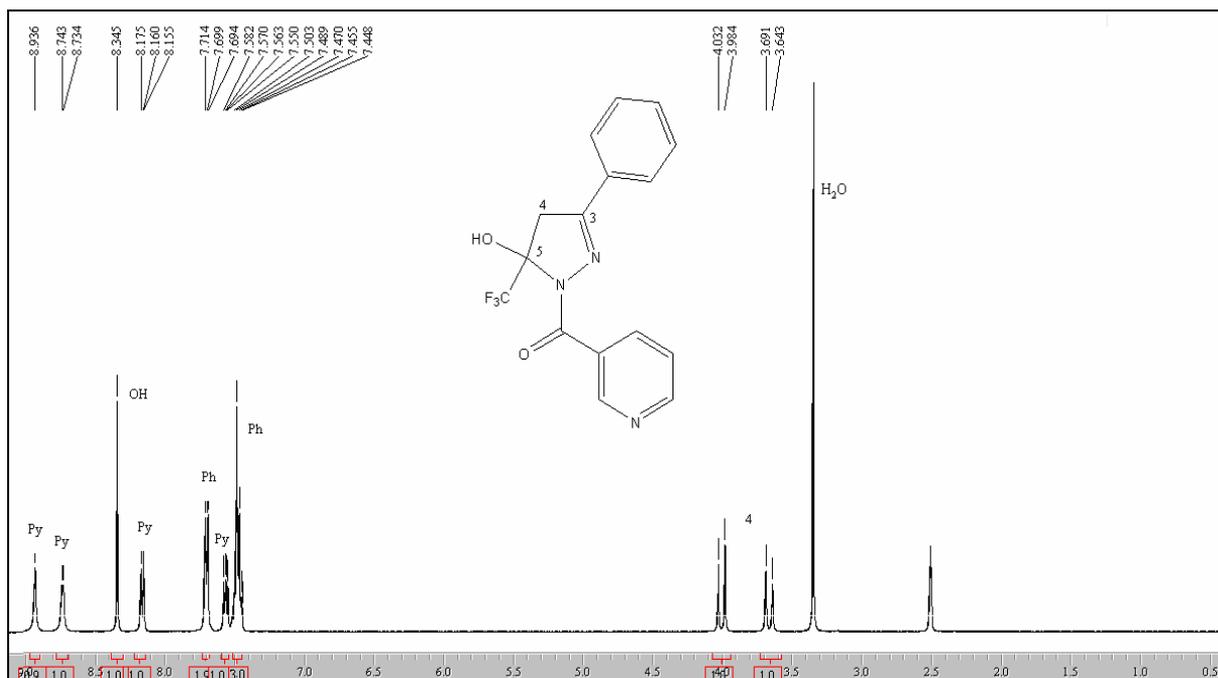


Figura 31: Espectro de RMN ^1H a 200,13 MHz e RMN ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ a 100,61 MHz de 5-hidroxi-3-(fenil)-5-trifluormetil-4,5-diidro-1H-1-(nicotinoil)pirazol (**8c**), em $\text{DMSO-}d_6$.

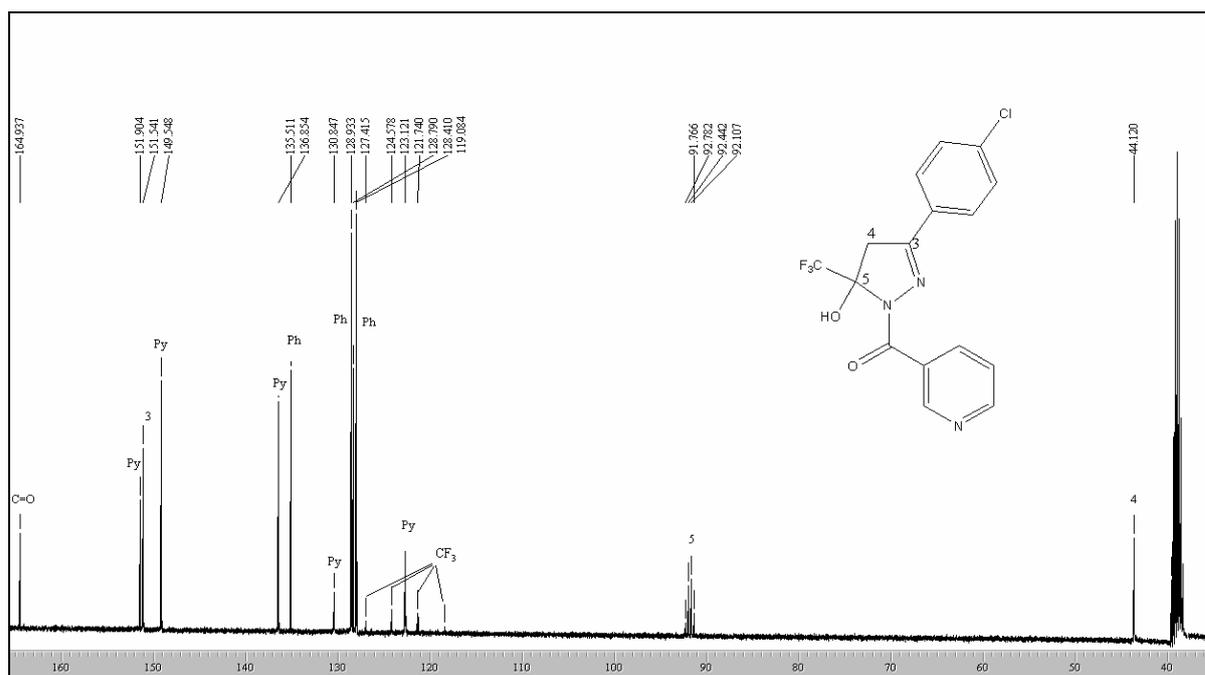
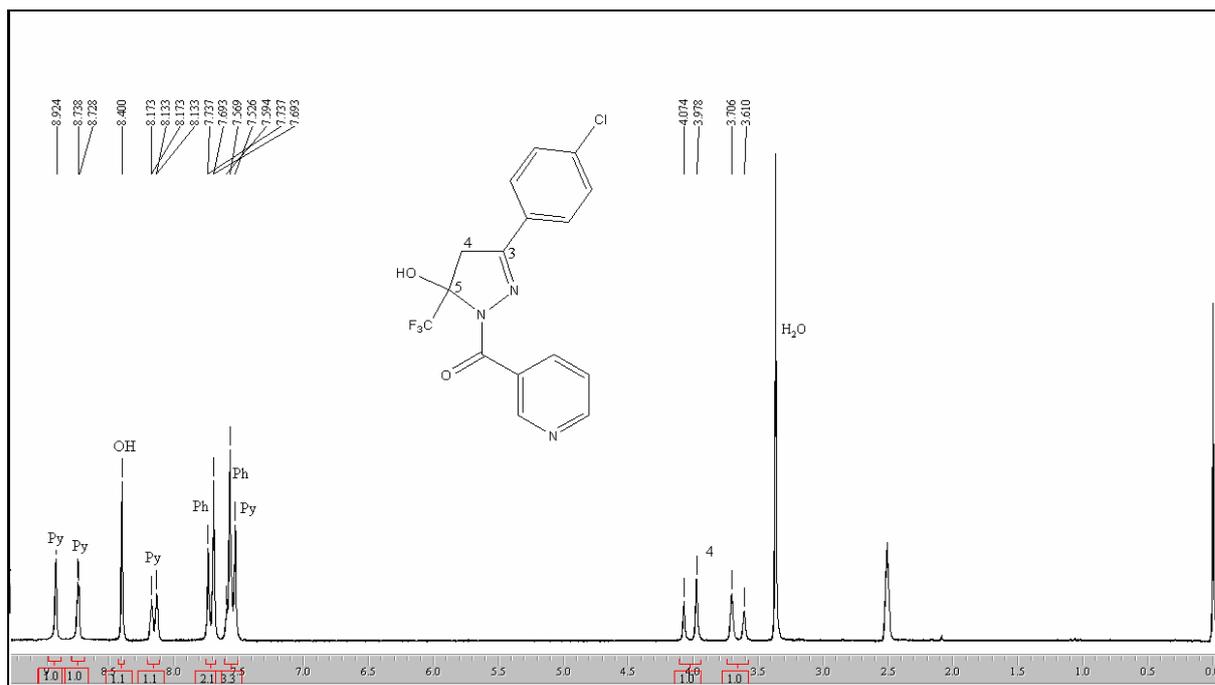


Figura 32: Espectro de RMN ^1H a 200,13 MHz e RMN ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ a 100,61 MHz de 5-hidroxi-3-(4-clorofenil)-5-trifluormetil-4,5-diidro-1H-1-(nicotinoil)pirazol (**8d**), em $\text{DMSO-}d_6$.

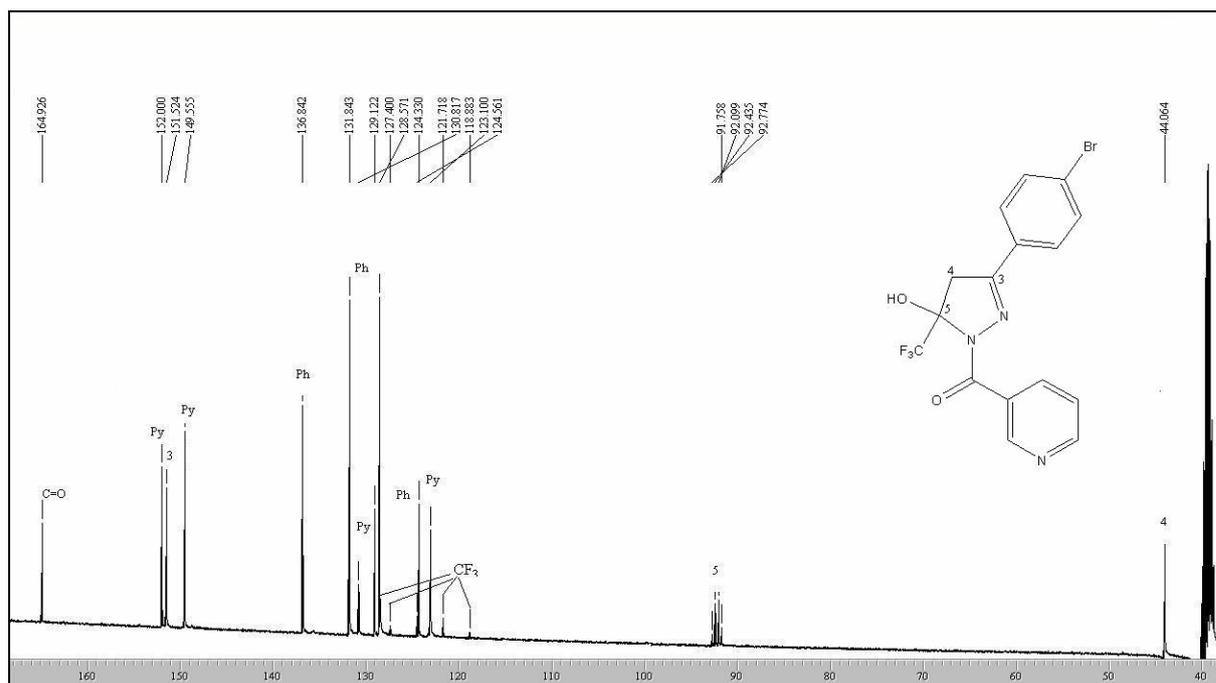
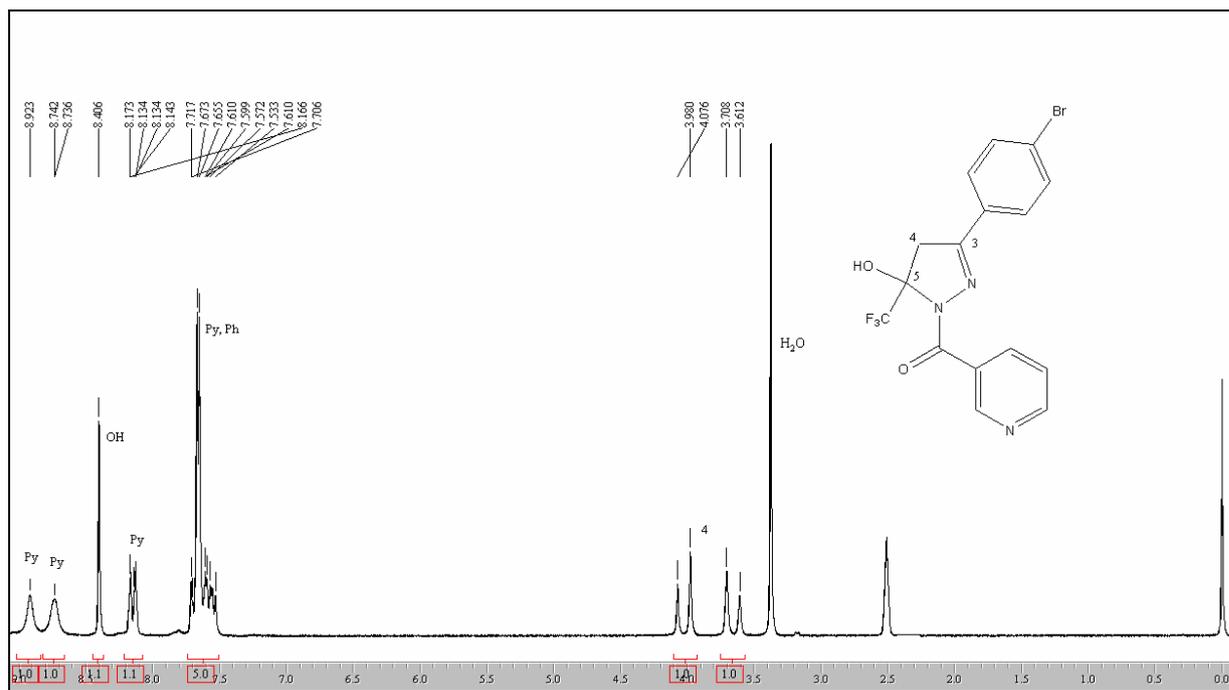


Figura 33: Espectro de RMN ^1H a 200,13 MHz e RMN ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ a 100,61 MHz de 5-hidroxi-3-(4-bromofenil)-5-trifluormetil-4,5-diidro-1*H*-1-(nicotinoil)pirazol (**8e**), em $\text{DMSO-}d_6$.

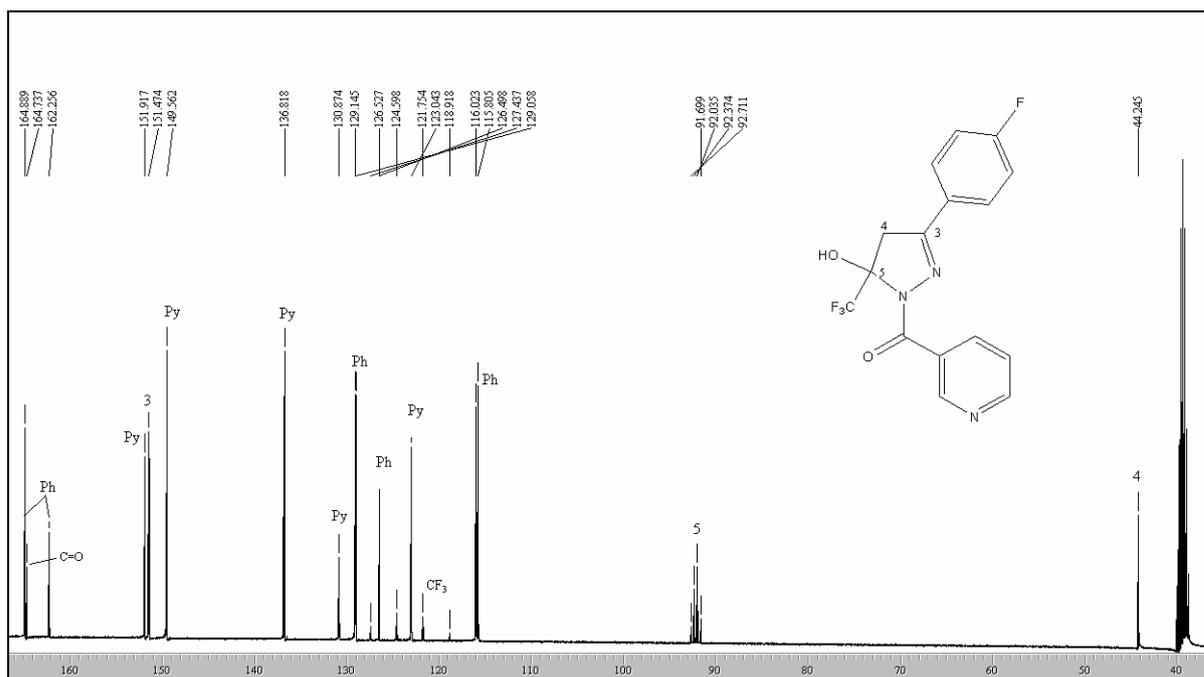
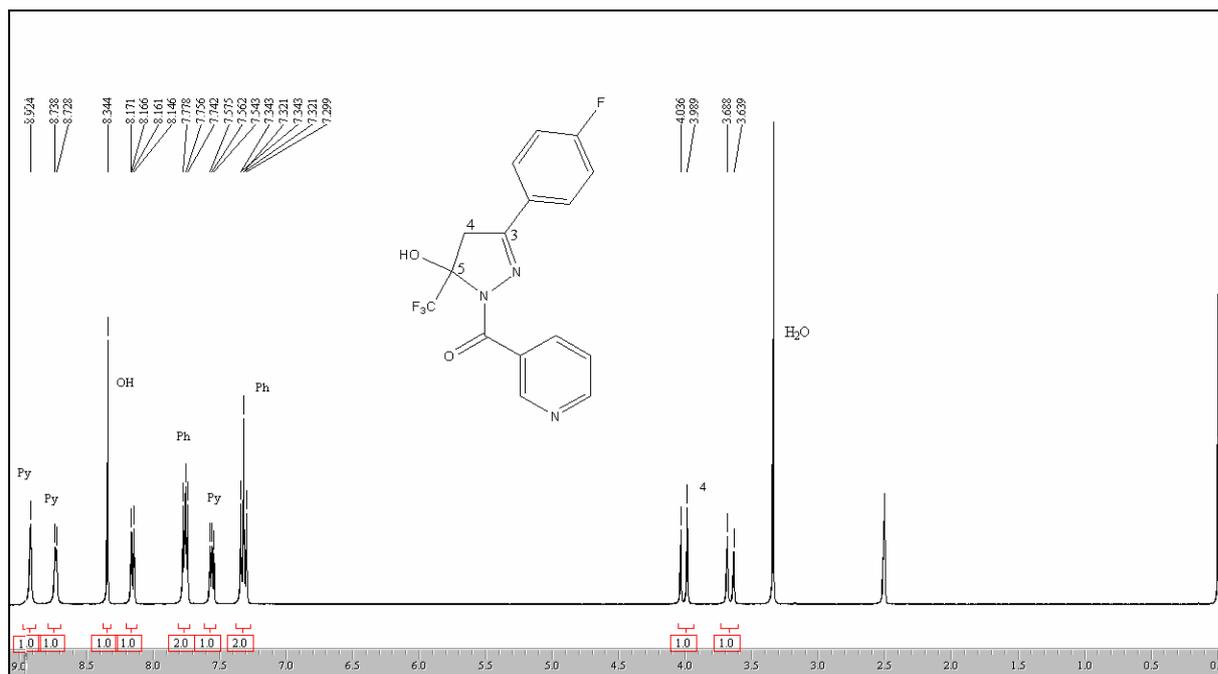


Figura 34: Espectro de RMN ^1H a 200,13 MHz e RMN ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ a 100,61 MHz de 5-hidroxi-3-(4-fluórfenil)-5-trifluormetil-4,5-diidro-1H-1-(nicotinoil)pirazol (8f), em $\text{DMSO}-d_6$.

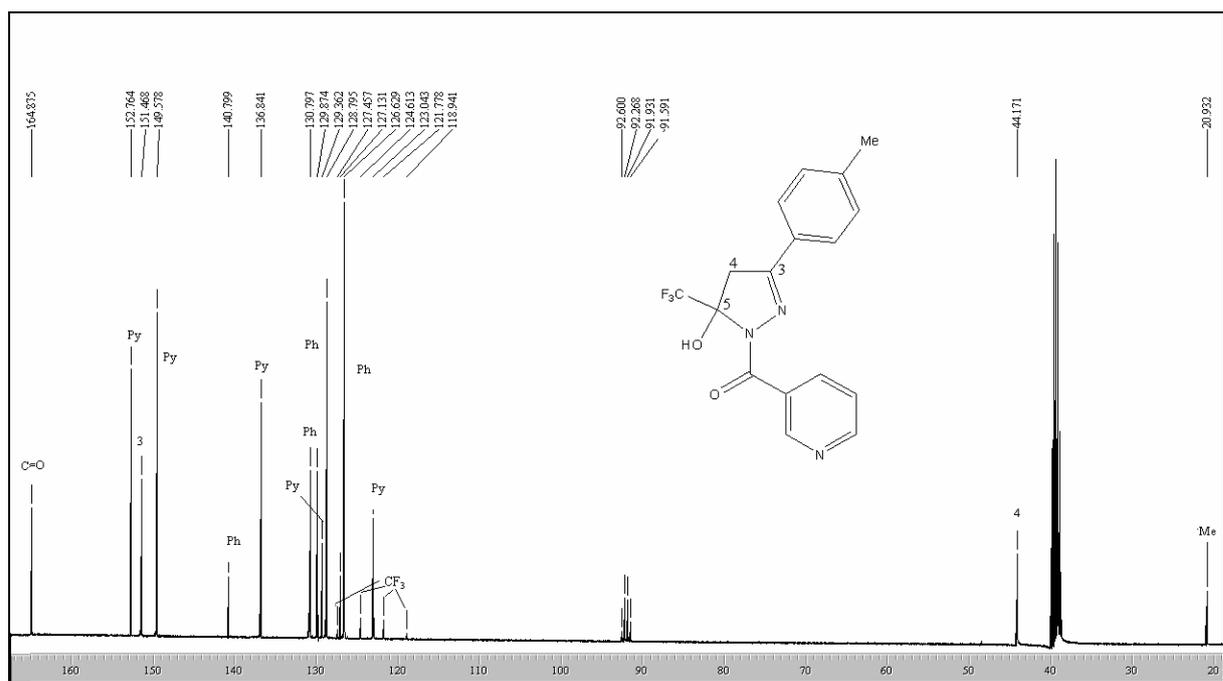
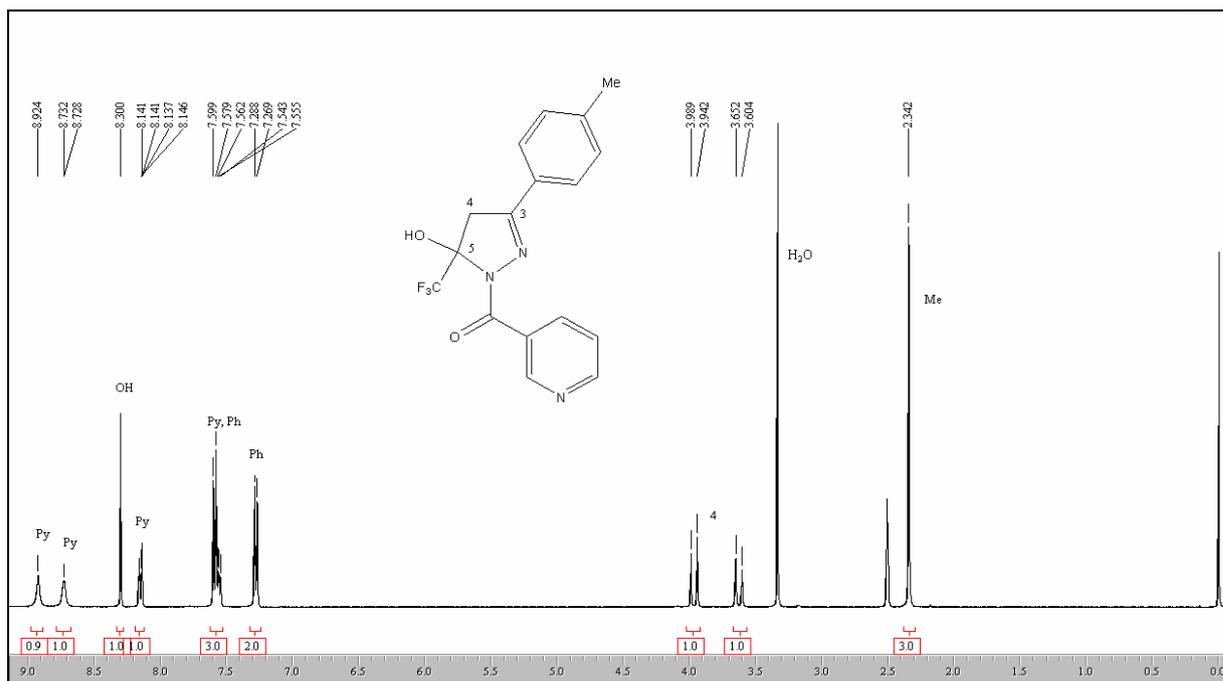


Figura 35: Espectro de RMN ¹H a 200,13 MHz e RMN ¹³C {¹H} a 100,61 MHz de 5-hidroxi-3-(4-metilfenil)-5-trifluormetil-4,5-diidro-1*H*-1-(nicotinoil)pirazol (**8g**), em DMSO-*d*₆.

8. ANEXO II

Espectros de MASSAS dos compostos obtidos e citados na dissertação

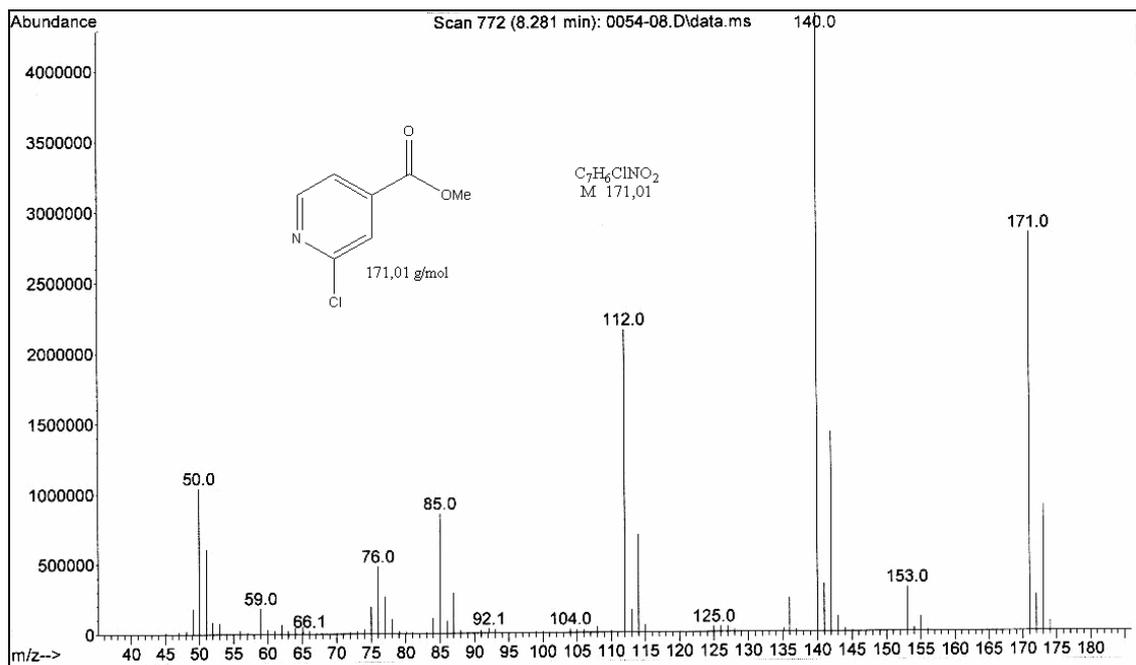


Figura 36: Espectro de Massas de metil 2-cloro isonicotinoato (5).

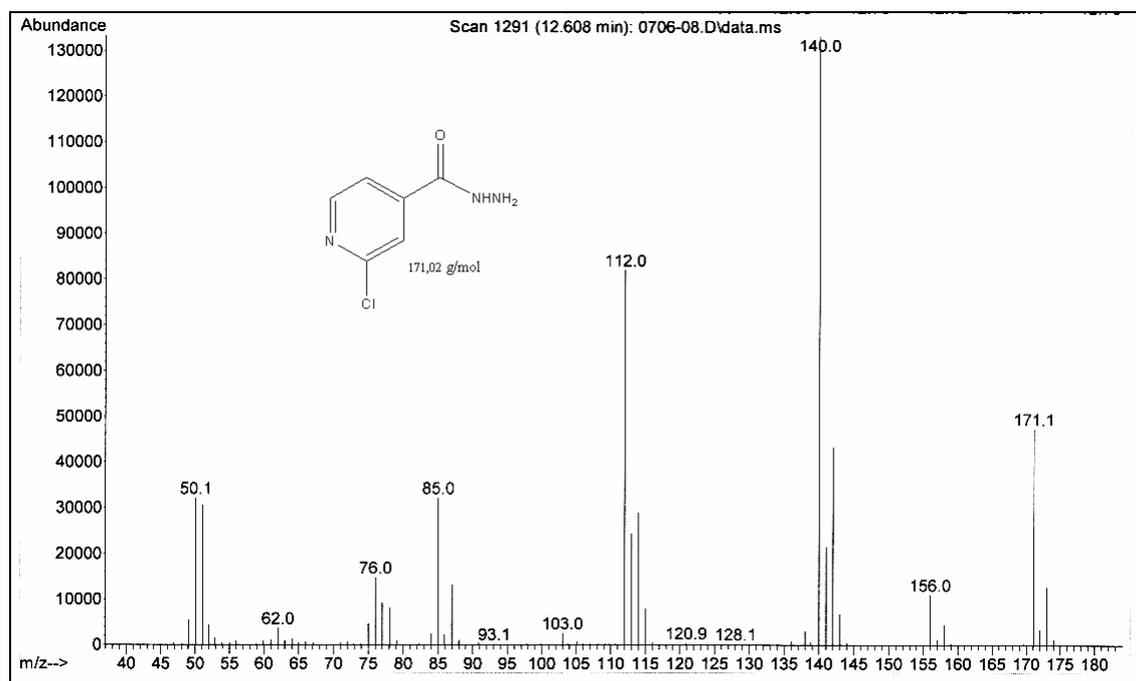


Figura 37: Espectro de Massas de 2-cloroisonicotinohidrazina (6).

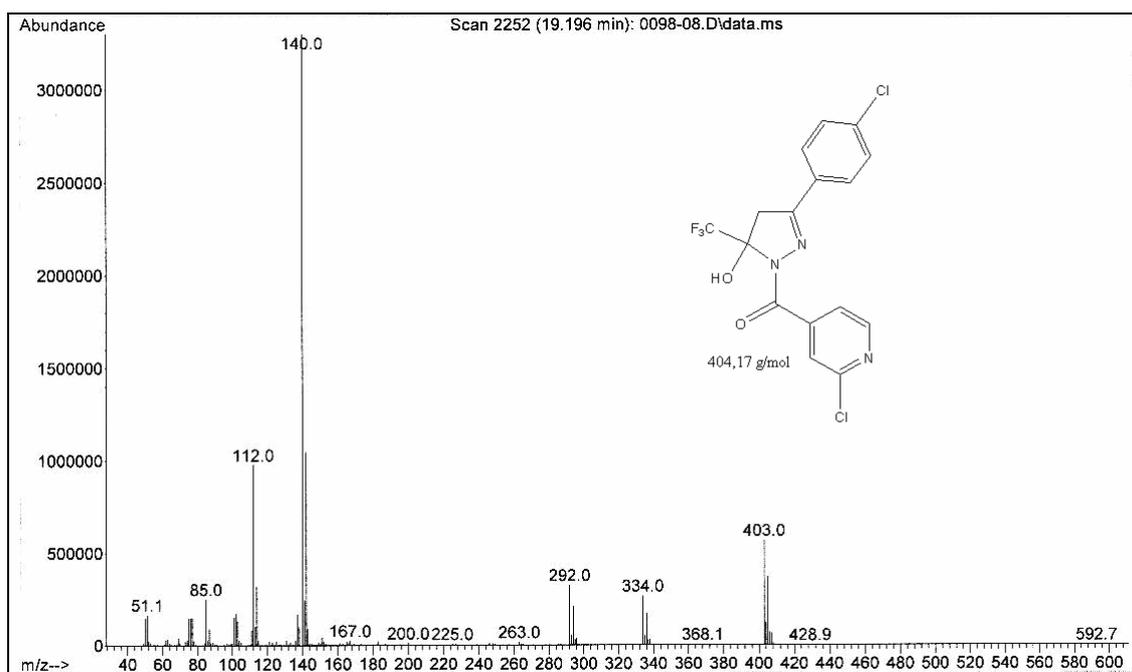


Figura 38: Espectro de Massas do composto 5-hidroxi-3-(4-clorofenil)-5-trifluormetil-4,5-diidro-1H-1-(2-cloroisonicotinoil)pirazol (**7d**).

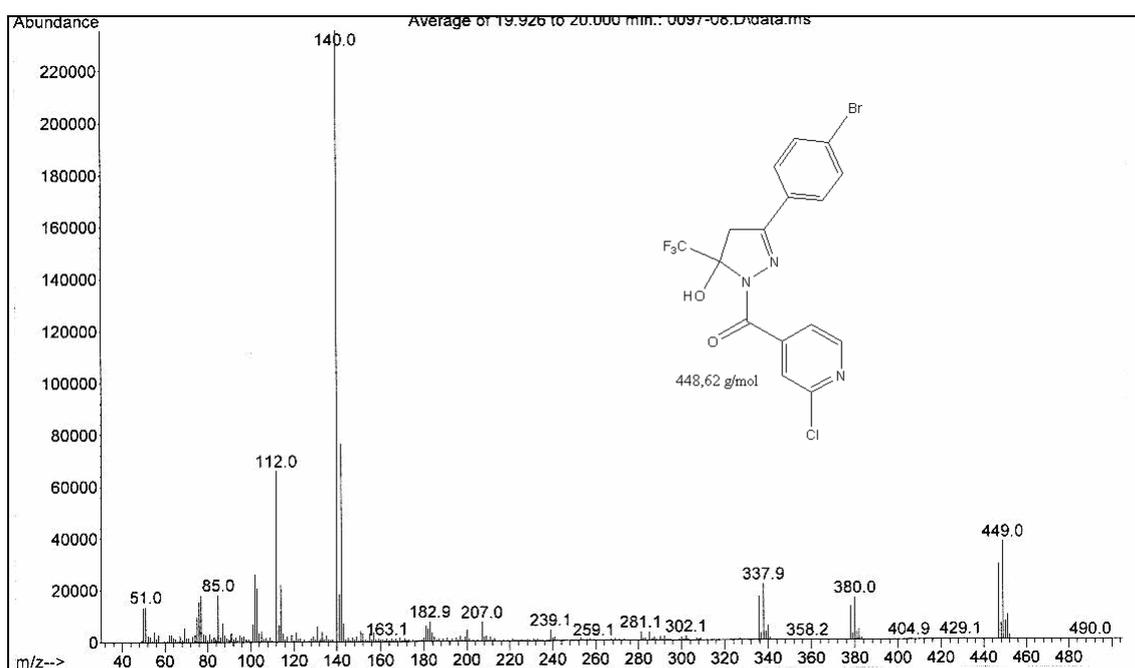


Figura 39: Espectro de Massas do composto 5-hidroxi-3-(4-bromofenil)-5-trifluormetil-4,5-diidro-1H-1-(2-cloroisonicotinoil)pirazol (**7e**).

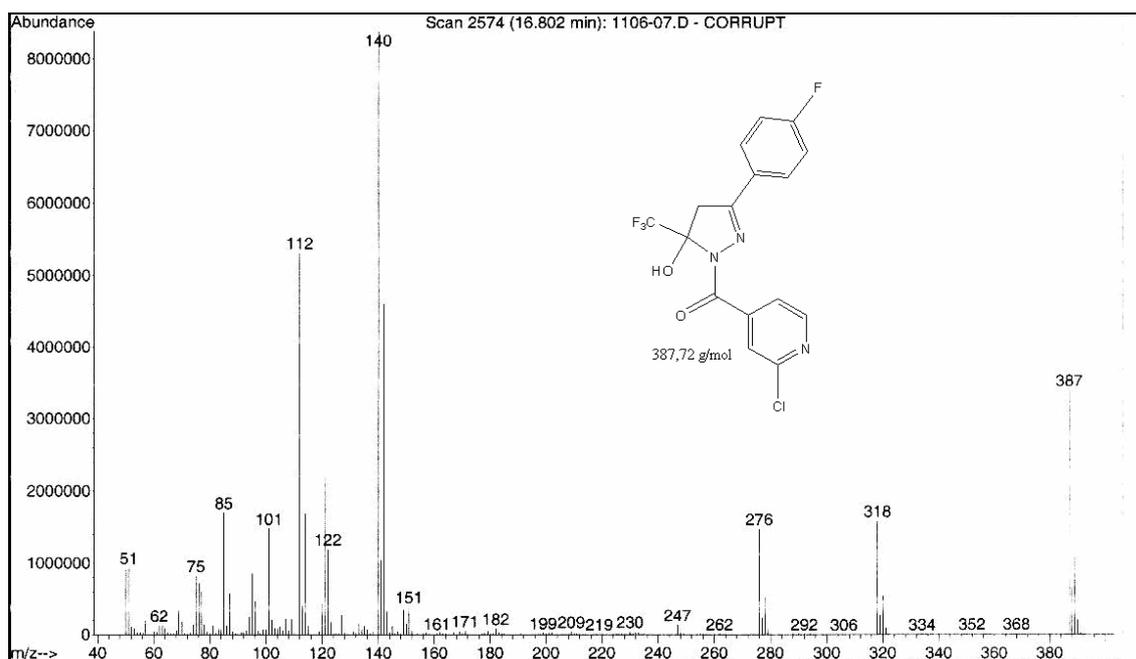


Figura 40: Espectro de Massas do composto 5-hidroxi-3-(4-flúorfenil)-5-trifluormetil-4,5-diidro-1H-1-(2-cloroisonicotinoil)pirazol (**7f**).

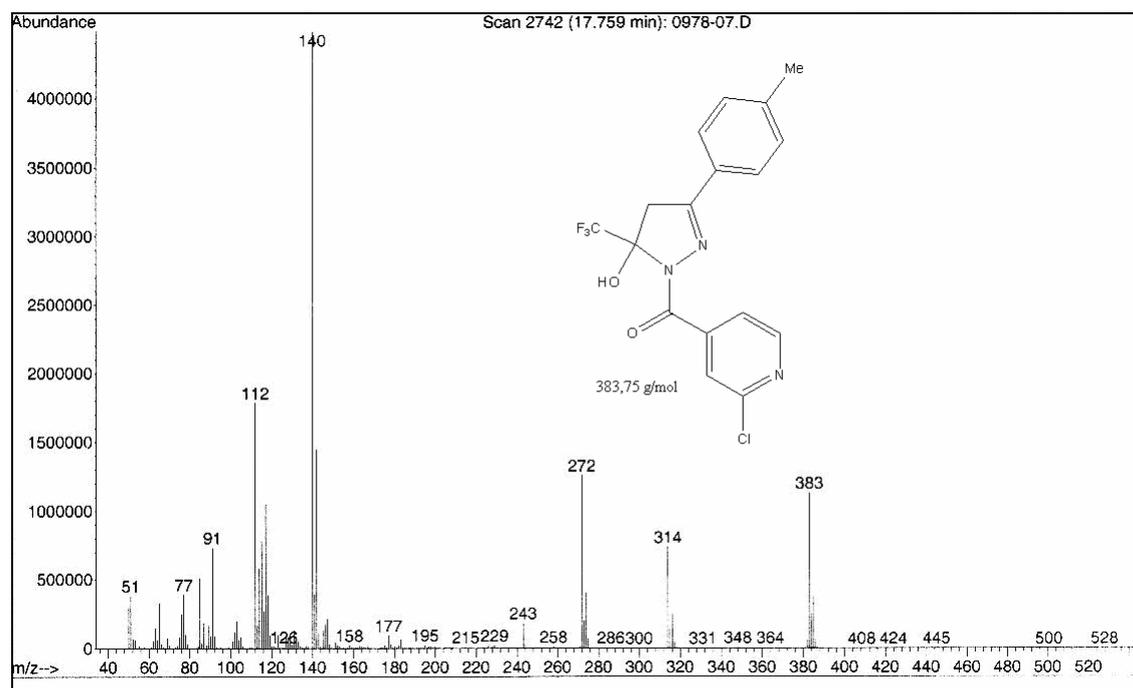


Figura 41: Espectro de Massas do composto 5-hidroxi-3-(4-metilfenil)-5-trifluormetil-4,5-diidro-1H-1-(2-cloroisonicotinoil)pirazol (**7g**).

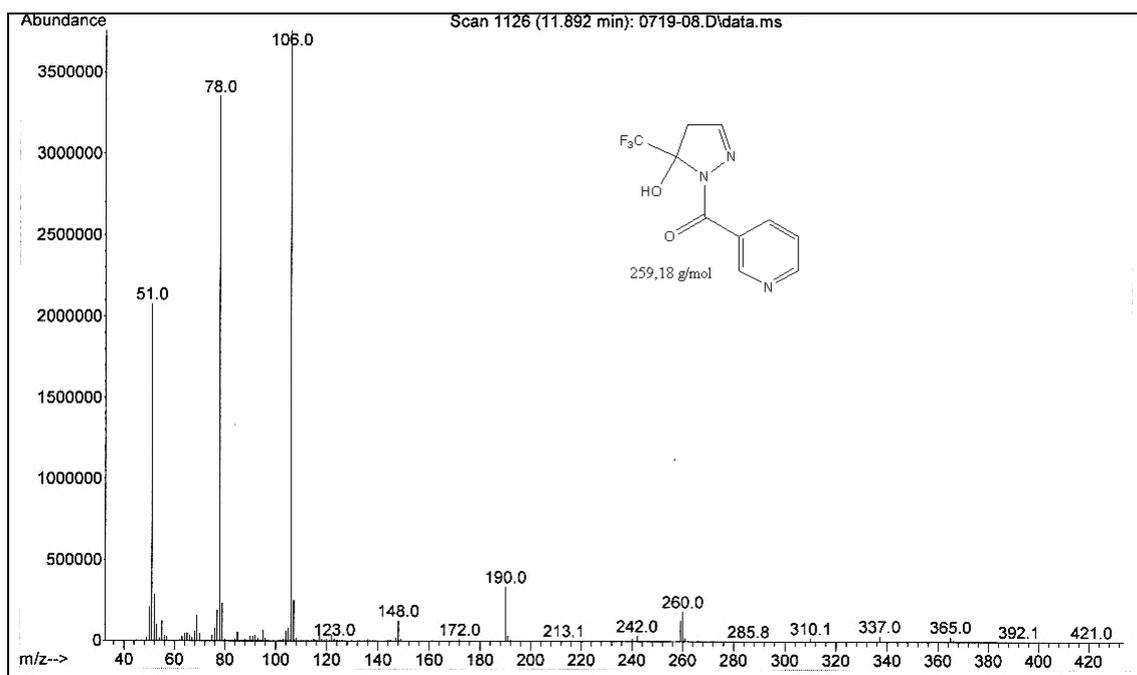


Figura 42: Espectro de Massas do composto 5-hidroxi-5-trifluormetil-4,5-diidro-1*H*-1-(nicotinoil)pirazol (**8a**).

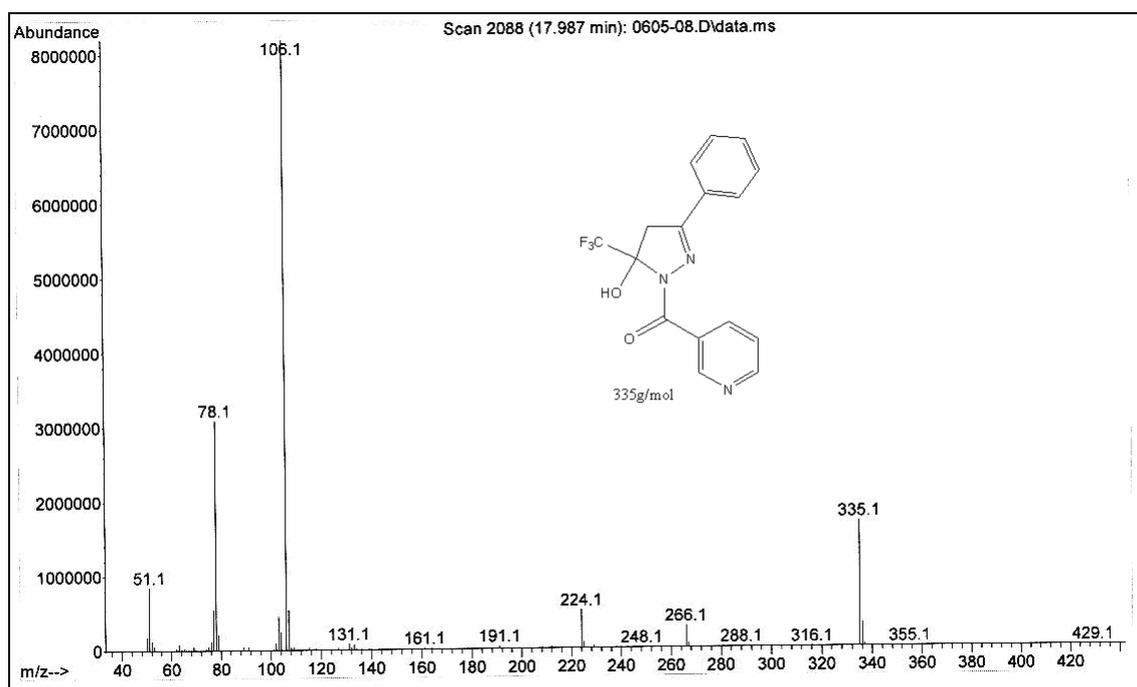


Figura 43: Espectro de Massas do composto 5-hidroxi-3-(fenil)-5-trifluormetil-4,5-diidro-1*H*-1-(nicotinoil)pirazol (**8c**).

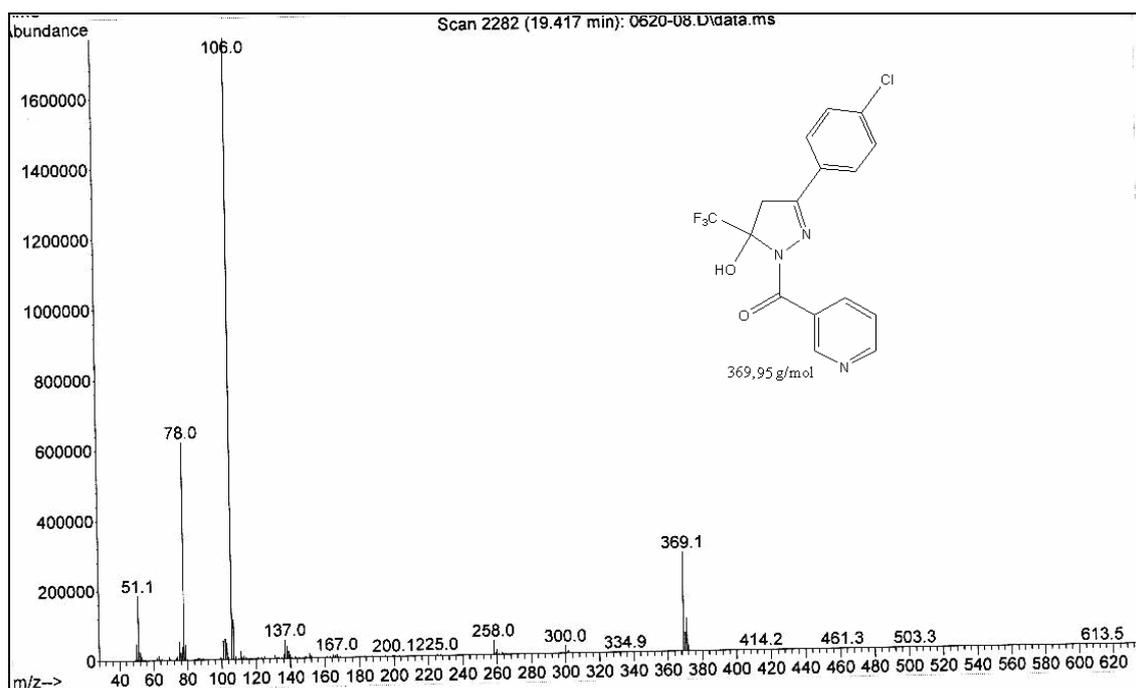


Figura 44: Espectro de massas de 5-hidroxi-3-(4-clorofenil)-5-trifluormetil-4,5-diidro-1*H*-1-(nicotinoil)pirazol (**8d**).

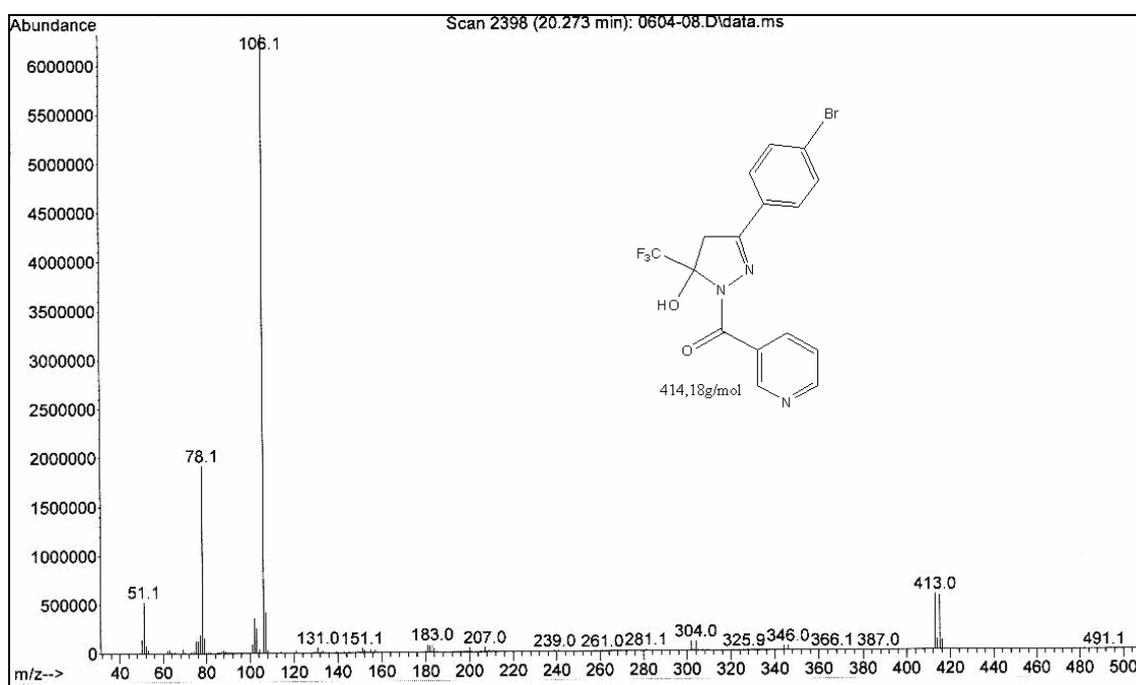


Figura 45: Espectro de Massas do composto 5-hidroxi-3-(4-bromofenil)-5-trifluormetil-4,5-diidro-1*H*-1-(nicotinoil)pirazol (**8e**).

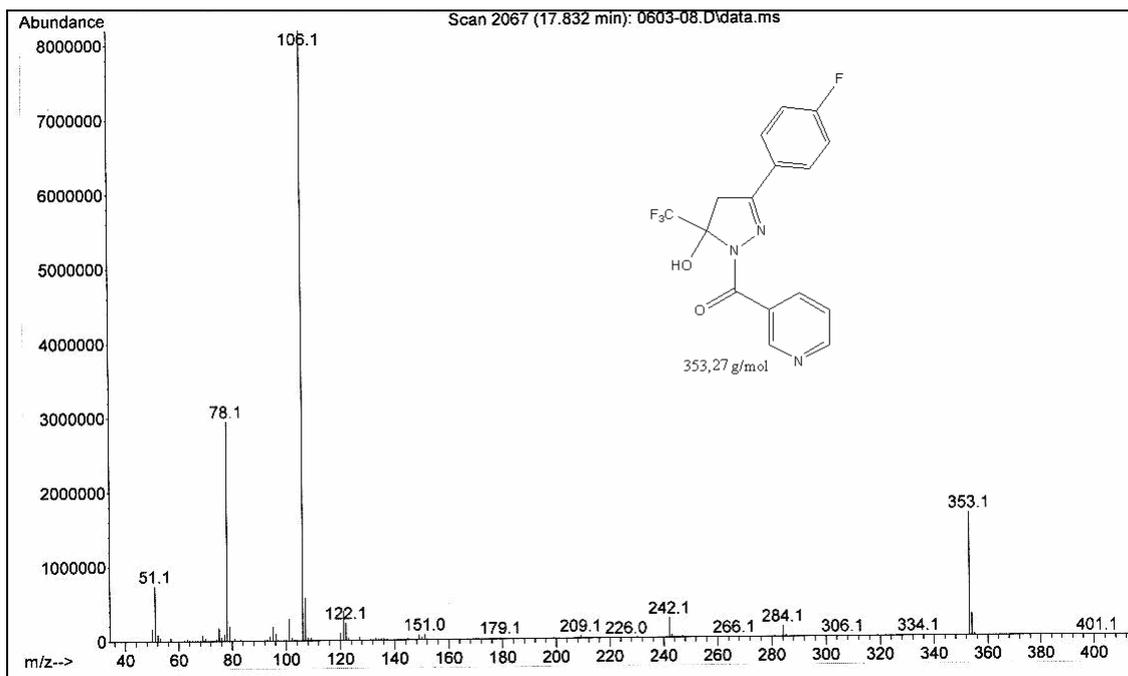


Figura 46: Espectro de Massas do composto 5-hidroxi-3-(4-metilfenil)-5-trifluorometil-4,5-diidro-1*H*-1-(nicotinoil)pirazol (**8f**).

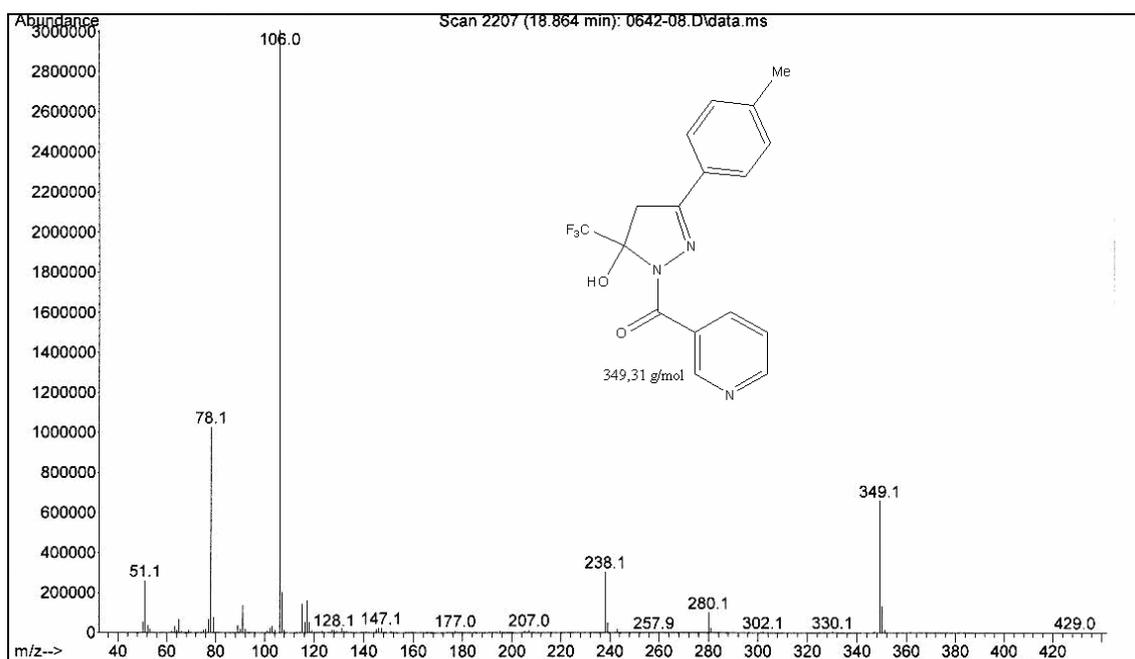


Figura 47: Espectro de Massas do composto 5-hidroxi-3-(4-metilfenil)-5-trifluorometil-4,5-diidro-1*H*-1-(nicotinoil)pirazol (**8g**).

9. ANEXO III

Artigo publicado