

**SÍNTESE E INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE
BIOLÓGICA DE PIRAZÓIS FUNCIONALIZADOS**

Luciana de Carvalho Tavares

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

**SÍNTESE E INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA
DE PIRAZÓIS FUNCIONALIZADOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Luciana de Carvalho Tavares

**Santa Maria, RS, Brasil
2006**

SÍNTESE E INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE PIRAZÓIS FUNCIONALIZADOS

por

Luciana de Carvalho Tavares

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-graduação
em Química, Área de Concentração em Síntese Orgânica, da Universidade
Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do
grau de

Mestre em Química Orgânica

Orientadora: Prof^a Dr^a Mara E. F. Braibante

Santa Maria, RS, Brasil

2006

*No tempo da vida que passa,
há sinais de eternidade
que ficam...*

*Obrigada Senhor meu Deus por confortar
meu coração nos momentos difíceis, por cada
amanhecer que iluminou e que continue a
iluminar os bons caminhos...*

Ao meu amado pai João, que sempre esteve ao meu lado, obrigada pelo seu amor e a minha querida mãe Elaine (in memoriam) dedico esta Dissertação de Mestrado.

Meu eterno carinho e admiração!

A Neusa e aos meus irmãos, agradeço por me ajudarem a construir mais uma etapa da minha vida...

Meu eterno carinho!

*A prof^a Dr.^a Mara E. F. Braibante, meu
agradecimento pela orientação, amizade e
essencial contribuição na minha formação e
execução deste trabalho.*

Minha sincera gratidão!

*Ao prof. Hugo T. S. Braibante, meu
agradecimento pela importante contribuição
na minha formação, amizade e colaboração
no desenvolvimento deste trabalho.*

Minha sincera gratidão!

AGRADECIMENTOS

Aos colegas e ex-colegas do laboratório Alessandro, Carla Costa, Daniela (Dani), Denise, Guilherme (Guigui), Jussara, Liliane (Lili), Letícia, Lilian, Marciana, Martin, Marcelo G., Marcelo S., Simone, Viviane, Fumaça, Andréia, Carolina, Gilvan e Vinicius (Vini) pelo companheirismo e agradável convivência;

A Graciela Maldaner (Graci), pela aquisição dos espectros de RMN e amizade construída no decorrer desta jornada.

A Caroline Stüker (Carol) pela realização dos testes de avaliação da atividade microbiológica e prestatividade em todos os momentos.

A Rosélia S. pela realização das análises biológicas frente a enzima AChE e Adriana Obregon pela ajuda com os mecanismos enzimáticos.

Ao prof. Dr. Ademir Farias Morel e a prof. Dr. Sandro Giacomelli pelas colaborações no exame de qualificação;

Aos funcionários da coordenação do Curso de Pós-Graduação em Química, Valéria Velásquez e Ademir Sartori pela ajuda na parte burocrática;

Eu não poderia deixar de agradecer por dois anos e meados onde entre um “COLUNÃO” e outro... um “bom” cheiro de H₂S... sorrisos e algumas lágrimas compartilhamos de momentos únicos e especiais que ficarão eternizados; a Carla com seus memoráveis bilhetinhos (muito úteis por sinal!) tinha que agüentar uma legitima MALA, Eu, e filosofar sobre a vida... nós pintando a mesa da salinha... até que nos saímos bem para químicos!?... as miojos X estudo... e como esquecer o “On the other had”... Meu sincero carinho! A Dani e seu eterno slogan “será”... O Martin e o Aldrich de travesseiro... como esquecer?! A Lili tendo que agüentar eu comer o leite em pó dela... A Marciana quietinha, mas quando fala sai de baixo... A Jussara e o slogan “ninguém merece”... O Marcelo Gindri e o açúcar da salinha... A Simone e o tratamento da sílica... as reações com enxofre... Obrigada! O Guigui e a eterna rivalidade grenal... O Fumaça com jeito grosso... mas amigo! O Vini e a obtenção do iodeto... o apoio nessa reta final... O Alessandro em coelhinho X máquina de lavar... A Letícia e suas maçãs na geladeira... sumiram! A Denise e o chocolate de páscoa... O Marcelo S. em a qualificação da Lú entregue... em tempo... Obrigada! A todos meu carinho e muito obrigada!!

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-graduação em Química Orgânica
Universidade Federal de Santa Maria

SÍNTESE E INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE PIRAZÓIS FUNCIONALIZADOS

AUTOR: Luciana de Carvalho Tavares
ORIENTADORA: Prof^a Dr^a Mara E. F. Braibante
Data e Local da Defesa: Santa Maria, 16 de agosto de 2006.

Neste trabalho, nós estudamos a obtenção de uma série de heterociclos que preservassem o grupo amino dos compostos de partida. Para tanto, obtivemos α -oxocetenos O,N-acetais a partir da reação entre β -oxotioxi éster e diferentes aminas primárias. A reatividade dos centros eletrofílicos dos O,N-acetais foi investigada em reações de ciclização usando 1,2-dinucleófilos como hidrazina e fenil hidrazina em reações com suporte sólido. Obteve-se seletivamente os heterociclos funcionalizados 5(3)-amino substituído 3(5)-fenil 1H-pirazóis e 3-amino substituído 1,5-difenil pirazóis. Quando utilizamos como 1,2-dinucleófilos os cloridratos de hidrazina e fenil hidrazina, obtivemos 5(3)-etóxi 1H-pirazol, 3-etóxi 1,5-difenil pirazol e 5-etóxi 1,3-difenil pirazol demonstrando a influência destes sais na formação de diferentes padrões de substituição. A investigação da possível atividade biológica *in vitro* dos sistemas pirazólicos obtidos foi realizada por meio da análise da atividade antimicrobiana pelo método de Bioautografia e Concentração Inibitória Mínima (CIM) frente a uma coleção de diferentes microrganismos indicadores; bem como análise da atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE).

Palavras-chaves: K-10, ultra-som, pirazóis, atividade biológica.

ABSTRACT

Masters Dissertation in Chemistry
Graduate Course in Chemistry
Universidade Federal de Santa Maria

SYNTHESIS THE INVESTIGATION OF THE BIOLOGICAL ACTIVITY OF FUNCTIONALIZED PYRAZOLES.

AUTHOR: Luciana de Carvalho Tavares

ADVISOR: Mara E. F. Braibante

Date and Place: Santa Maria, 16th August, 2006.

In this work, a method for the synthesis of a series of heterocyclic compounds that preserve the amino group of the starting material, is presented. For this study, α -oxoketene O,N-acetals were obtained from the reaction of β -oxothio ester and different primary amines. The reactivity of the electrophilic centers of O,N-acetals was investigated through cyclization reactions using 1,2-dinucleophiles such as hydrazine and phenylhydrazine with the reaction carried out in solid support. The functionalized heterocycles 5(3)-amino substituted 3(5)-phenyl 1H-pyrazoles and 3-amino substituted 1,5-diphenyl pyrazoles, were obtained selectively. When 1,2-dinucleophiles such as hydrazine and phenylhydrazine hydrochloride were used, ethoxy pyrazoles 5(3)-ethoxy 1H-pyrazole, 3-ethoxy 1,5-diphenyl pyrazole and 5-ethoxy 1,3-diphenyl pyrazole, were obtained, demonstrating the influence of these salts in the formation of different substitution pattern. The investigation of the possible biological activity of the pyrazoles systems obtained was performed in vitro and was accomplished through the analysis of the antimicrobial activity by the Bioautography method and Minimal Inhibitory Concentration (MIC) front to a collection of different indicative microorganisms. The inhibitory activity of the acetylcholinesterase (AChE) enzyme was also investigated.

Word-key: K-10, ultrasound, pyrazole, biological activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estrutura de um composto β -enamino carbonílico.....	06
Figura 2 - Formas tautoméricas dos enamino carbonílicos acíclicos I-IV	07
Figura 3- Híbridos de ressonância dos compostos β -enamino carbonílicos.....	07
Figura 4- Conformações possíveis dos compostos β -enamino carbonílicos.....	08
Figura 5 – Estrutura primária que faz parte da constituição de um argilo mineral.....	09
Figura 6 – Estrutura secundária que faz parte da constituição de um argilo mineral	10
Figura 7 – Estrutura lamelar da montmorillonita, K-10.....	11
Figura 8- Acetal O,N-substituído.....	16
Figura 9- Estrutura básica de β -enamino carbonílico.....	29
Figura 10- Espectro de RMN de HMQC a 400 MHz em $CDCl_3$ dos tautômeros 3f (3f').....	40
Figura 11- Espectro de RMN de HMBC a 400 MHz em $CDCl_3$ dos tautômeros 3f (3f').....	41
Figura 12- Estrutura do Reagente de Lawesson.....	48
Figura 13- Estrutura de raio-X a) composto 4b b) composto 4e	50
Figura 14- Estrutura de raio-X do composto 7	59
Figura 15- Estruturas dos compostos 3a-g , 4b,d-g , 5 e 7 onde f representa o substituinte [(R)(+)- α -CH(CH ₃)Ph] e g o enantiômero [(S)(-)- α -CH(CH ₃)Ph].....	62
Figura 16- Bioensaio realizado por Bioautografia para o amino pirazol 3g contra a bactéria Gram-positiva Escherichia coli.....	66
Figura 17- Bioensaio realizado por Bioautografia para o amino pirazol 3g contra a bactéria Gram-positiva Bacillus subtilis.....	66
Figura 18- Estruturas dos compostos 3a-g , 5 e 7 onde f apresenta o substituinte [(R)(+)- α -CH(CH ₃)Ph] e g o enantiômero [(S)(-)- α -CH(CH ₃)Ph].....	70
Figura 19- Gráfico do efeito do 5(3)-benzilamino 3(5)-fenil 1H-Pirazol 3e na atividade da enzima AChE . *Diferente do controle, $p < 0,05$	71
Figura 20- Gráfico do efeito do 5(3)-amino 3(5)-fenil 1H-Pirazol 3a na atividade da enzima AChE . *Diferente do controle, $p < 0,05$	71
Figura 21- Gráficos do efeito do 5(3)-fenilamino 3(5)-fenil 1H-Pirazol 3d na atividade da enzima AchE nas três estruturas cerebrais a) estriado, b) córtex e c) hipocampo de ratos. *Diferente do controle, $p < 0,05$	72

Figura 22- Gráficos do efeito do 5(3)-etóxi 3(5)-fenil 1H-Pirazol 5 na atividade da enzima AChE . *Diferente do controle, $p < 0,05$	73
Figura 23- Gráficos do efeito do 1,3-difenil 5-etóxi pirazol 7 na atividade da enzima AChE nas três estruturas cerebrais a) estriado, b) córtex e c) hipocampo. *Diferente do controle, $p < 0,05$	74
Figura 24- Espectro de RMN de ^1H (a) a 200 MHz e ^{13}C (b) a 50 MHz em CDCl_3 do β -oxotioxo éster (1).....	100
Figura 25- Espectro de RMN de ^1H (a) a 200 MHz e ^{13}C (b) a 50 MHz em CDCl_3 do α -oxoceteno 3-amino 3-etóxi acetal (2a).....	101
Figura 26- Espectro de RMN de ^1H (a) a 200 MHz e ^{13}C (b) a 50 MHz em CDCl_3 do α -oxoceteno 3-etóxi 3-metilamino acetal (2b).....	102
Figura 27- Espectro de RMN de ^1H (a) a 200 MHz e ^{13}C (b) a 50 MHz em CDCl_3 do α -oxoceteno 3-alilamino 3-etóxi acetal (2c).....	103
Figura 28- Espectro de RMN de ^1H (a) a 400 MHz e ^{13}C (b) a 100 MHz em CDCl_3 do α -oxoceteno 3-etóxi 3-fenilamino acetal (2d).....	104
Figura 29- Espectro de RMN de ^1H (a) a 200 MHz e ^{13}C (b) a 50 MHz em CDCl_3 do α -oxoceteno 3-benzilamino 3-etóxi acetal (2e).....	105
Figura 30- Espectro de RMN de ^1H (a) a 200 MHz e ^{13}C (b) a 50 MHz em CDCl_3 do α -oxoceteno 3-(R(+)- α -feniletilamino 3-etóxi acetal (2f) e α -oxoceteno 3-(S(-)- α -feniletilamino 3-etóxi acetal (2g).....	106
Figura 31- Espectro de RMN de ^1H (a) a 200 MHz e ^{13}C (b) a 50 MHz em CDCl_3 do α -oxoceteno 3-etóxi 3-isopropilamino acetal (2h).....	107
Figura 32- Espectro de RMN de ^1H (a) a 400 MHz e ^{13}C (b) a 100 MHz em CDCl_3 do 5(3)-amino 3(5)-fenil 1H-pirazol (3a).....	108
Figura 33- Espectro de RMN de ^1H (a) a 200 MHz e ^{13}C (b) a 50 MHz em CDCl_3 do 3(5)-fenil 5(3)-metilamino 1H-pirazol (3b).....	109
Figura 34- Espectro de RMN de ^1H (a) a 200 MHz e ^{13}C (b) a 50 MHz em CDCl_3 do 5(3)-alilamino 3(5)-fenil 1H-pirazol (3c).....	110
Figura 35- Espectro de RMN de ^1H (a) a 400 MHz e ^{13}C (b) a 100 MHz em CDCl_3 do 5(3)-fenilamino 3(5)-fenil 1H-pirazol (3d).....	111
Figura 36- Espectro de RMN de ^1H (a) a 400 MHz e ^{13}C (b) a 100 MHz em CDCl_3 do	

5(3)-benzilamino 3(5)-fenil 1H-pirazol (3e).....	112
Figura 37- Espectro de RMN de ^1H (a) a 200 MHz e ^{13}C (b) a 50 MHz em CDCl_3 do 5(3)-(R(+)- α -feniletilamino) 3(5)-fenil 1H-pirazol (3f (3f')).....	113
Figura 38- Espectro de RMN de HMQC a 400 MHz em CDCl_3 do 5(3)-(R(+)- α -feniletilamino) 3(5)-fenil 1H-pirazol (3f , 3f').....	114
Figura 39- Espectro de RMN de HMBC a 400 MHz em CDCl_3 do 5(3)-(R(+)- α -feniletilamino) 3(5)-fenil 1H-pirazol (3f , 3f').....	115
Figura 40- Espectro de RMN de ^1H (a) a 200 MHz e ^{13}C (b) a 100 MHz em CDCl_3 do 5(3)-(S(-)- α -feniletilamino) 3(5)-fenil 1H-pirazol (3g).....	116
Figura 41- Espectro de RMN de ^1H (a) a 200 MHz e ^{13}C (b) a 100 MHz em CDCl_3 do 1,5-difenil 3-metilamino pirazol (4b).....	117
Figura 42- Espectro de RMN de ^1H (a) a 400 MHz e ^{13}C (b) a 100 MHz em CDCl_3 do 1,5-difenil 3-fenilamino pirazol (4d).....	118
Figura 43- Espectro de RMN de ^1H (a) a 400 MHz e ^{13}C (b) a 100 MHz em CDCl_3 do 1,5-difenil 3-benzilamino pirazol (4e).....	119
Figura 44- Espectro de RMN de ^1H (a) a 400 MHz e ^{13}C (b) a 100 MHz em CDCl_3 do 3-(R(+)- α -feniletilamino) 1,5-difenil pirazol (4f) e 3-(S(-)- α -feniletilamino) 1,5-difenil pirazol (4g).....	120
Figura 45- Espectro de RMN de NOESY a 400 MHz em CDCl_3 do 3-(R(+)- α -feniletilamino) 1,5-difenil pirazol (4f).....	121
Figura 46- Espectro de RMN de ^1H (a) a 400 MHz e ^{13}C (b) a 100 MHz em CDCl_3 do 5(3)-etóxi 3(5)-fenil 1H-pirazol (5).....	122
Figura 47- Espectro de RMN de ^1H (a) a 200 MHz e ^{13}C (b) a 50 MHz em CDCl_3 do 1,5-difenil 3-etóxi pirazol (6).....	123
Figura 48- Espectro de RMN de ^1H (a) a 400 MHz e ^{13}C (b) a 100 MHz em CDCl_3 do 1,3-difenil 5-etóxi pirazol (7).....	124
Figura 49- Espectro de RMN de NOESY a 400 MHz em CDCl_3 do 1,3-difenil 5-etóxi pirazol (7).....	125
Figura 50- Estrutura de raio-X do composto 1,5-difenil 3-metilamino pirazol 4b	127
Figura 51- Estrutura de raio-X do composto 3-benzilamino 1,5-difenil pirazol 4e	129
Figura 52- Estrutura de raio-X do composto 1,3-difenil 5-etóxi pirazol 7	131

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Dados espectroscópicos de ^1H e ^{13}C do β -oxotioxo éster 1 e dos α -oxocetenos O,N-acetais 2a-h	26
Tabela 2 – Dados espectroscópicos de ^1H e ^{13}C dos Amino pirazóis 3a-g	42
Tabela 3 – Dados espectroscópicos de ^1H e ^{13}C dos N-fenil Amino pirazóis 4b,d-g	50
Tabela 4 – Dados espectroscópicos de ^1H e ^{13}C dos Etóxi pirazóis 5, 6 e 7	60
Tabela 5 . Resultados da análise biológica por Bioautografia (μg) dos amino pirazóis 3a-g ..	64
Tabela 6 . Resultados da análise biológica por Bioautografia (μg) do etóxi pirazol 5	65
Tabela 7 . Resultados da CIM, CBM e CFM ($\mu\text{g/mL}$) para os amino pirazóis 3a-g	68
Tabela 8 - Dados da determinação da estrutura 1,5-difenil 3-metilamino pirazol 4b , desvio padrão entre parênteses.....	128
Tabela 9 - Dados da determinação da estrutura, 3-benzilamino 1,5-difenil pirazol 4e , desvio padrão entre parênteses.....	130
Tabela 10 - Dados da determinação da estrutura 1,3-difenil 5-etóxi pirazol 7 , desvio padrão entre parênteses.....	132

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS OU SÍMBOLOS

μg	Micrograma
col	Colaboradores
MO	Energia de microondas
W	Watts
EPZG	Suporte sólido polimérico de marca registrada
)))	Energia de Ultra-som
NBS	<i>N</i> - bromosuccinimida
Hz	Hertz
MHz	Mega hertz
GHz	Giga hertz
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
ppm	Partes por milhão
<i>J</i>	Constante de acoplamento
δ	Deslocamento químico relativo ao padrão
s	Singleto
sl	Singleto largo
d	Dubleto
t	Tripleto
q	Quarteto
qui	Quinteto
m	Multipleto
Sa	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538p)
Se	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (ATCC 12228)
Ec	<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25792)
Ss	<i>Salmonella setubal</i> (ATCC 19796)
Kp	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 10031)
Bs	<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6633)

Pa	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)
Sc	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (ATCC 2601)
Ca	<i>Candida albicans</i> (ATCC 10231)
Cd	<i>Candida dubliniensis</i> (isolado clínico SM-26)
Cn	<i>Cryptococcus neoformans</i> (ATCC 28952)

Sumário

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

1- INTRODUÇÃO E OBJETIVOS.....	1
1.1- Compostos β -Enamino Carbonílicos	6
1.2- Suporte Sólido Montmorillonita, K-10.....	9
1.3-Utilização de Ultra-som em Reações Orgânicas.....	13
1.4-Utilização de Microondas em Reações Orgânicas.....	14
2-REVISÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	16
2.1- Síntese dos β -enamino carbonílicos (α -oxocetenos O,N-acetais)	17
2.2- Síntese de Sistemas Heterocíclicos Polifuncionalizados.....	29
2.2.1-Reações entre α -Oxocetenos O,N-acetais 2a-h e Hidrazina.....	35
2.2.3-Reações entre α -Oxocetenos O,N-acetais 2b,d-g e Fenil Hidrazina	45
2.2.4-Reações dos α -Oxocetenos O,N-acetais 2a,e e do β -oxotioxo éster 1 com Cloridrato de Hidrazina e Cloridrato de Fenil Hidrazina.....	52
2.3- Determinação da Atividade Biológica <i>in vitro</i>	62
2.3.1- Determinação da Atividade Antimicrobiana.....	62
2.3.1.1- Determinação da Atividade Antimicrobiana pelo método de Bioautografia..	62
2.3.1.2- Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) pelo Método da Microdiluição	67
2.3.2- Determinação da Atividade da Enzima Acetilcolinesterase.....	69
3- CONCLUSÕES	75
4- PARTE EXPERIMENTAL	77
4.1- Instrumentação Geral.....	77
4.2- Reagentes e Solventes.....	77
4.3 – Síntese do β -oxotioxo éster 1	78
4.3.1– Síntese do O-etil ditiocarbonato de potássio	78
4.3.2– Síntese do O-etil S-metil ditiocarbonato	78
4.3.3– Síntese do O-etil 3-oxo 3-fenil propanotiolato (β -oxotioxo éster 1).....	78
4.4– Síntese dos α -oxocetenos O,N-acetais 2a-h	79

4.4.1– Síntese do α -oxoceteno 3-amino 3-etóxi acetal (2a)- Reação entre β -oxotioxo éster (1) e hidróxido de amônio.....	79
4.4.2– Síntese do α -oxoceteno 3-etóxi 3-metilamino acetal (2b)- Reação entre β -oxotioxo éster (1) e metilamina.....	80
4.4.3– Síntese do α -oxoceteno 3-alilamino 3-etóxi acetal (2c)- Reação entre β -oxotioxo éster (1) e alilamina	80
4.4.4– Síntese do α -oxoceteno 3-etóxi 3-fenilamino acetal (2d)- Reação entre β -oxotioxo éster (1) e fenilamina	81
4.4.5– Síntese do α -oxoceteno 3-benzilamino 3-etóxi acetal (2e)- Reação entre β -oxotioxo éster (1) e benzilamina	81
4.4.6– Síntese do α -oxoceteno 3-(R)(+)- α -feniletilamino 3-etóxi acetal (2f) e α -oxoceteno 3-(S)(+)- α -feniletilamino 3-etóxi acetal (2g)- Reação entre β -oxotioxo éster (1) com (R)(+)- α -metilbenzilamina ou (S)(-)- α -metilbenzilamina.....	82
4.4.7– Síntese do α -oxoceteno 3-etóxi 3-isopropilamino acetal (2h)- Reação entre β -oxotioxo éster (1) e isopropilamina.....	83
4.5– Síntese dos sistemas heterocíclicos	83
4.5.1– Síntese dos compostos amino pirazólicos 3a-g.....	83
4.5.1.1– Síntese do 5(3)-amino 3(5)-fenil 1H-pirazol (3a)- Reação entre α -oxoceteno 3-amino 3-etóxi acetal (2a) e hidrazina	83
4.5.1.2– Síntese do 3(5)-fenil 5(3)-metilamino 1H-pirazol (3b)- Reação entre α -oxoceteno 3-etóxi 3-metilamino acetal (2b) e hidrazina.....	84
4.5.1.3– Síntese do 5(3)-alilamino 3(5)-fenil 1H-pirazol (3c)- Reação entre α -oxoceteno 3-alilamino 3-etóxi acetal (2c) e hidrazina.....	84
4.5.1.4– Síntese do 5(3)-fenilamino 3(5)-fenil 1H-pirazol (3d)- Reação entre α -oxoceteno 3-etóxi 3-fenilamino acetal (2d) e hidrazina.....	85
4.5.1.5– Síntese do 5(3)-benzilamino 3(5)-fenil 1H-pirazol (3e)- Reação entre α -oxoceteno 3-benzilamino 3-etóxi acetal (2e) e hidrazina.....	86
4.5.1.6– Síntese do 5(3)-(R)(+)- α -feniletilamino 3(5)-fenil 1H-pirazol (3f)- Reação entre α -oxoceteno 3-(R)(+)- α -feniletilamino 3-etóxi acetal (2f) e hidrazina	86
4.5.1.7– Síntese do 5(3)-(S)(-)- α -feniletilamino 3(5)-fenil 1H-pirazol (3g)- Reação entre α -oxoceteno 3-(S)(-)- α -feniletilamino 3-etóxi acetal (2g) e hidrazina.....	87
4.5.2– Síntese dos compostos amino pirazólicos 4b,d-g.....	88

4.5.2.1– Síntese do 1,5-difenil 3-metilamino pirazol (4b)- Reação entre α -oxoceteno 3-etóxi 3-metilamino acetal (2b) e fenil hidrazina	88
4.5.2.2– Síntese do 1,5-difenil 3-fenilamino pirazol (4d)- Reação entre α -oxoceteno 3-etóxi 3-fenilamino acetal (2d) e fenil hidrazina	88
4.5.2.3– Síntese do 3-benzilamino 1,5-difenil pirazol (4e)- Reação entre α -oxoceteno 3-benzilamino 3-etóxi acetal (2e) e fenil hidrazina	89
4.5.2.4– Síntese do 3-(R)(+)- α -feniletilamino 1,5-difenil pirazol (4f) e 3-(S)(-)- α -feniletilamino 1,5-difenil pirazol (4g) - Reação entre α -oxoceteno 3-(R)(+)- α -feniletilamino 3-etóxi acetal (2f) ou α -oxoceteno 3-(S)(-)- α -feniletilamino 3-etóxi acetal (2g) com fenil hidrazina	90
4.5.3– Síntese dos compostos etóxi pirazólicos 5, 6 e 7	91
4.5.3.1– Síntese do 5(3)-etóxi 3(5)-fenil 1H- pirazol (5)- Reação entre α -oxoceteno 3-amino 3-etóxi acetal (2a), α -oxoceteno 3-benzilamino 3-etóxi acetal (2e) ou β -oxotioxo éster (1) com cloridrato de hidrazina.....	91
4.5.3.2– Síntese do 1,5-difenil 3-etóxi pirazol (6)- Reação entre α -oxoceteno 3-amino 3-etóxi acetal (2a) ou α -oxoceteno 3-benzilamino 3-etóxi (2e) e cloridrato de fenil hidrazina	91
4.5.3.3– Síntese do 1,3-difenil 5-etóxi pirazol (7)- Reação entre β -oxotioxo éster (1) e cloridrato de fenil hidrazina.....	92
4.6– Determinação da atividade biológica in vitro	93
4.6.1– Determinação da atividade antimicrobiana pelo método de bioautografia	93
4.6.2–Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) pelo método de microdiluição	94
4.6.3– Determinação da atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE).....	94
5-BIBLIOGRAFIA	96
ESPECTROS DE RMN DE ^1H e ^{13}C.....	99
ANEXO I.....	126

1- INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

A obtenção de compostos heterocíclicos se caracteriza como um importante campo de estudos dentro da química orgânica sendo de grande interesse dos químicos devido a presença constante destes compostos na natureza, as suas interações no metabolismo de organismos vivos desempenhando várias funções bioquímicas, e assim encontrando uma vasta aplicação graças as suas propriedades bioativas. Os compostos pirazólicos são uma importante classe de sistemas heterocíclicos que apresentam pronunciadas propriedades biológicas, tais como anti-hiperglicêmica¹ e antimicrobiana.^{2a-b}

Em nosso grupo de pesquisa a síntese de heterociclos a partir de moléculas pequenas funcionalizadas como compostos β -enamino carbonílicos, que podem funcionar tanto como nucleófilo ambidentado como eletrófilo ambidentado, tem sido desenvolvida com eficiência utilizando a metodologia de reações com suporte sólido, montmorillonita (K-10). O emprego desses versáteis precursores, β -enamino cetonas e β -enamino ésteres tem propiciado a construção de diferentes sistemas heterocíclicos polifuncionalizados onde o grupo amino do precursor é substituído na ciclização.³⁻⁵

A partir deste aspecto, temos por objetivo neste trabalho o estudo de obtenção de uma série de heterociclos que preservem o grupo amino dos diferentes β -enamino carbonílicos precursores através da metodologia de reações em meio heterogêneo, bem como avaliarmos o efeito da utilização desta metodologia na seletividade das reações de obtenção destes precursores. Também temos por alvo a investigação de um possível efeito biológico dos sistemas pirazólicos obtidos frente a diferentes microrganismos indicadores bem como na atividade enzimática da acetilcolinesterase.

Nossa estratégia sintética consistiu no emprego de α -oxocetenos O,N-acetais, que são cetenos polarizados que representam uma classe de enamino carbonílicos funcionalizados como intermediários sintéticos na geração dos requeridos heterociclos amino substituídos.

¹ Kees, K.L.; Fitzgerald, J.J.; Steiner, K.E.; Mattes, J.F.; Mithan, B.; Tosi, T.; Mondoro, D.; McCaleb, M.L. *J. Med. Chem.* **1996**, 39, 3920.

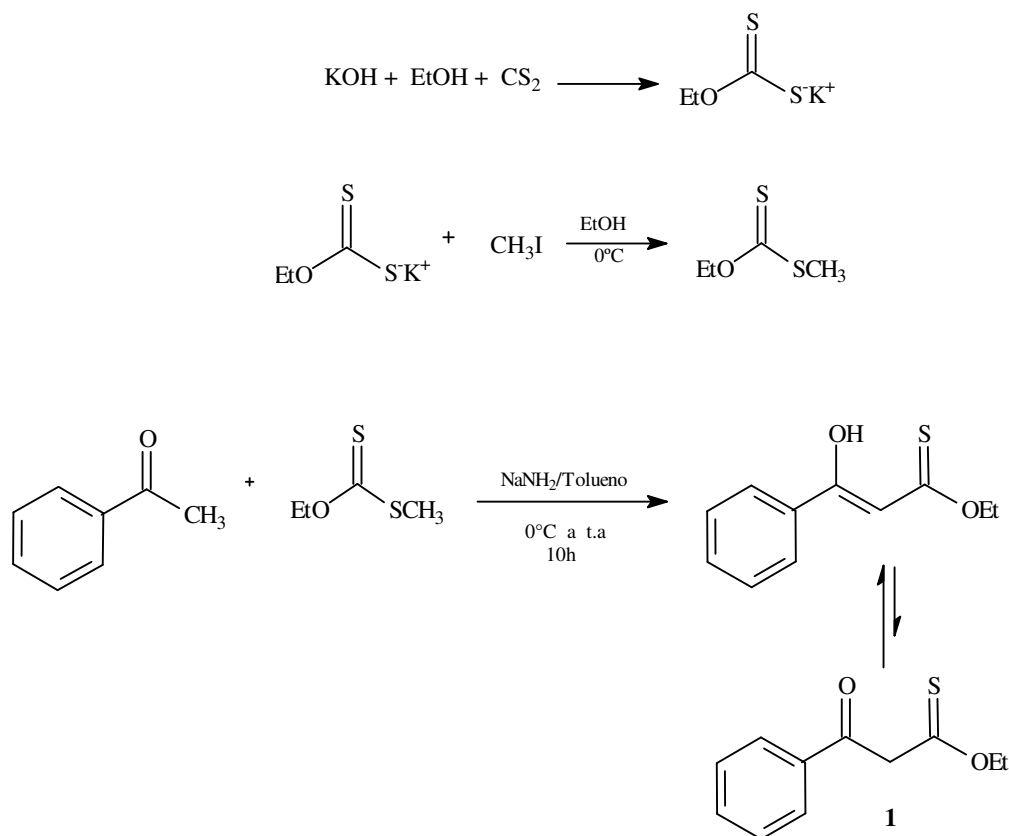
² a) Sridhar, R.; Perumal, P.T.; Etti, S.; Shanmugam, G.; Ponnuswamy, M.N.; Prabavathy, V.R. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, 14, 6035. b) Kane, J.L.; Hirth, B.H.; Liang, B.; Gourlie, B.B.; Nahill, S.; Barsomian, G. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, 13, 4463.

³ Braibante, M.E.F.; Braibante, H.T.S.; Valduga, C. J. *J. Heterocycl. Chem.* **1997**, 34, 1453.

⁴ Braibante, M.E.F.; Braibante, H.T.S.; Valduga, C. J.; Santis, D.B. *J. Heterocycl. Chem.* **1999**, 36, 505.

⁵ Braibante, M.E.F.; Braibante, H.T.S.; Costa, C.C.; Martins, D.B. *Tetrahedron Letters* **2002**, 43, 8079.

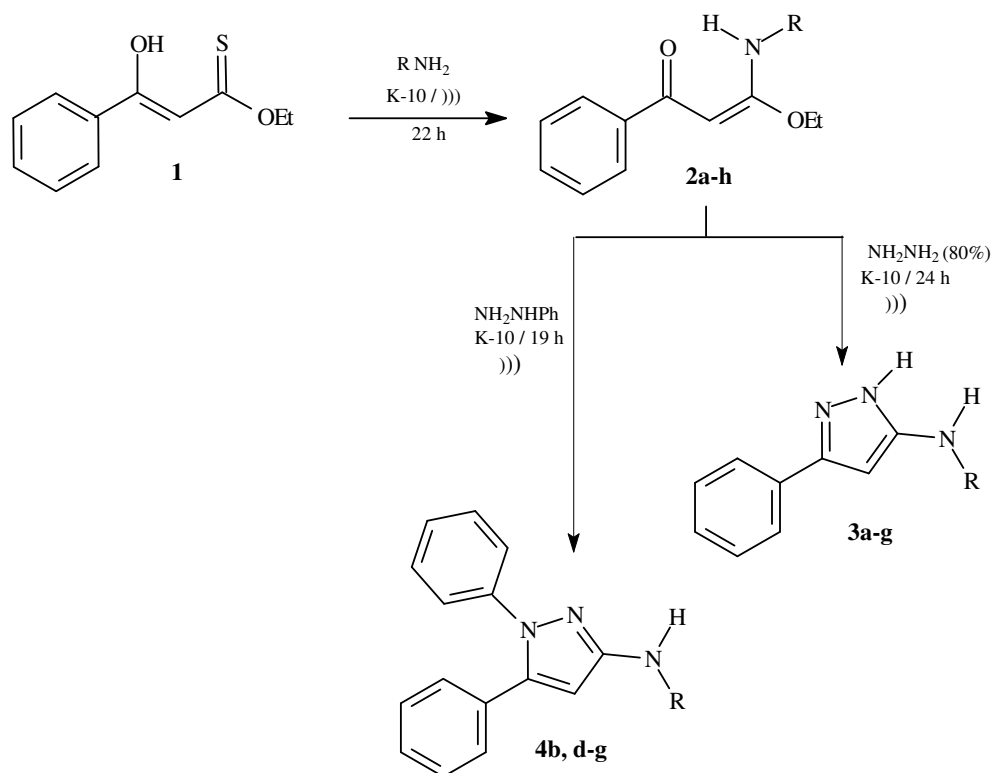
A formação dos O,N-acetais desejados **2a-h** ocorreu a partir do composto β -oxotioxi éster **1**, que por sua vez foi sintetizado conforme descrito na literatura⁶ como demonstra o Esquema 1.



Esquema 1- Obtenção do β -oxotioxi éster **1**.

A reatividade dos centros eletrofílicos dos α -oxocetenos O,N-acetais **2a-h** gerados a partir do β -oxotioxi éster **1** foi estudada em reações de ciclização com dinucleófilos como hidrazina e fenil hidrazina, avaliando-se a o padrão de reatividade destes compostos e a regioquímica dos heterociclos amino funcionalizados obtidos **3a-g** e **4b,d-g** conforme demonstra o Esquema 2.

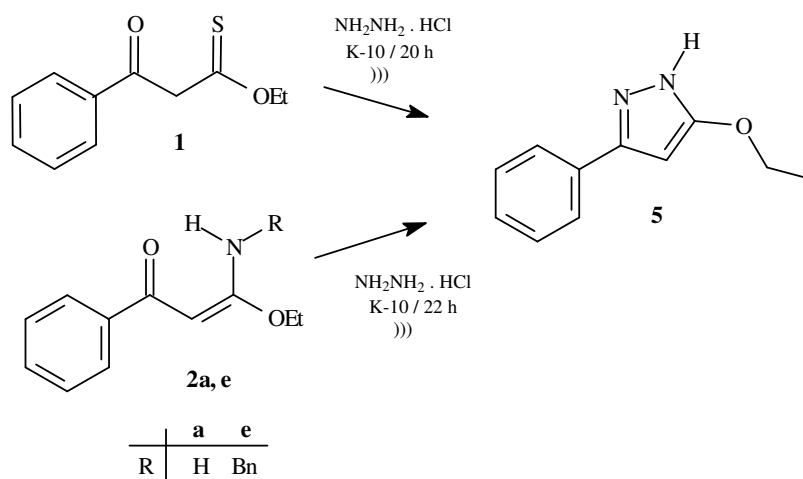
⁶ Scheithauer, S.; Pech, H. German Patent 94, 361 (1972); *Chem. Abstr.* **1973**, 79, 5176.



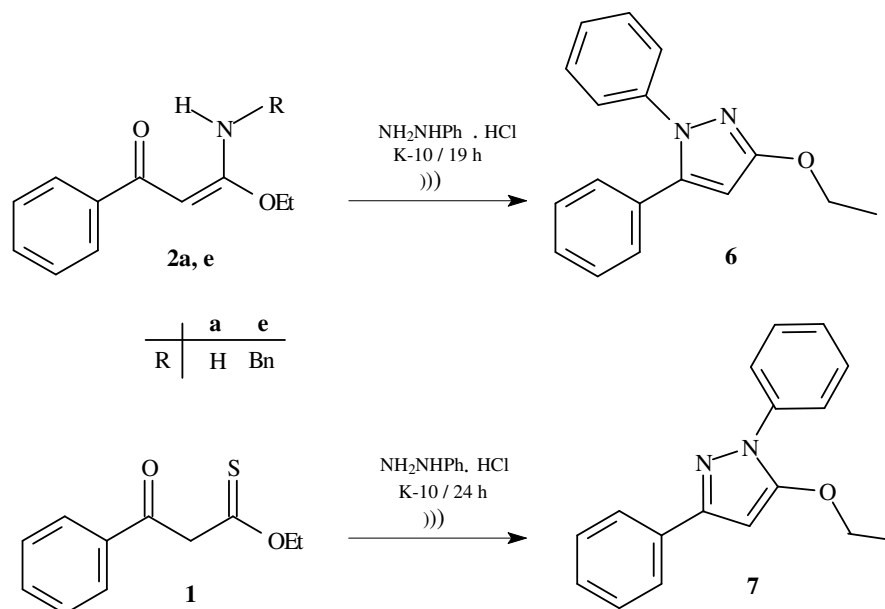
	a	b	c	d	e	f, g	h
R	H	CH ₃	Alil	Ph	Bn	CH(CH ₃)Ph	<i>i</i> -Pr

Esquema 2- Obtenção dos O,N-acetais **2a-h** e dos amino pirazóis **3a-g** e **4b,d-g** em meio heterogêneo, onde **f** representa o substituinte [(R)(+)- α -CH(CH₃)Ph] e **g** o enantiômero [(S)(-)- α -CH(CH₃)Ph].

No sentido de avaliar a reatividade do acetal O,N-não substituído **2a** e do acetal O,N- substituído **2e** e o caminho reacional frente aos dinucleófilos cloridrato de hidrazina e cloridrato de fenil hidrazina em meio heterogêneo, sintetizou-se etóxi pirazóis **5** e **6** como demonstra os Esquemas 3 e 4. Estas reações foram reproduzidas utilizando como substrato o composto β -oxotioxo éster **1**, gerando-se o mesmo etóxi pirazol **5** obtido a partir dos enamino **2a,e** quando utilizou-se o dinucleófilo cloridrato de hidrazina (Esquema 3). Já o composto **1** frente a cloridrato de fenil hidrazina utilizando o suporte sólido, K-10 formou o etóxi pirazol **7** que é regioisômero do heterociclo **6** obtido a partir dos enamino **2a,e** conforme o Esquema 4.



Esquema 3- Obtenção do etóxi pirazol **5** em meio heterogêneo a partir do β -oxotioéster **1** e dos O,N-acetais **2a, e**.



Esquema 4- Obtenção dos regioisômeros **6** e **7** em meio heterogêneo a partir dos O,N-acetais **2a, e** e do β -oxotioéster **1**, respectivamente.

O suporte sólido empregado nas reações é um argilo mineral montmorillonita, K-10, pertencente a série dos K-catalisadores derivados de um mineral de hidrosilicato de alumínio que devido as suas camadas de aluminosilicatos catalisam reações em numerosos caminhos. Esse argilo mineral apresenta uma camada octaédrica, intercalada entre duas camadas de sílica de estrutura tetraédrica. Entre essas "folhas" existe um espaço lamelar, onde as moléculas de água, ou eventualmente solvente e/ou reagentes podem penetrar, produzindo expansão acentuada da estrutura. Entre outras características do K-10 pode-se destacar a sua acidez superficial de Brönsted podendo substituir ácidos minerais em reações orgânicas, e a sua superfície com partículas muito finas (dimensão média de 2 μ)⁷.

A investigação da possível atividade biológica *in vitro* dos sistemas pirazólicos obtidos **3a-g**, **4b,d-g**, **5** e **7** foi realizada por meio de três diferentes análises: atividade antimicrobiana através do método de Bioautografia e determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) pelo método de Microdiluição frente a uma coleção de diferentes microrganismos indicadores; atividade da enzima acetilcolinesterase. Nestes ensaios visamos comparar os pirazóis com diferentes padrões de substituição com a finalidade de promover uma possível correlação estrutura-atividade.

⁷ Lazlo, P. "Preparative Chemistry Using Supported Reagents" Academic Press, U.S.A, 1987.

1.1- Compostos β -Enamino Carbonílicos

-Revisão e Aspectos Gerais

O termo β -enamino carbonílico, é utilizado para indicar qualquer composto contendo o sistema conjugado descrito na Figura 1, sendo utilizado para definir o produto da reação entre aminas com 1,3-dicetona, β -cetoéster ou reagentes 1,3-bifuncionais similares.⁸

Os β -enamino carbonílicos apresentam três centros nucleofílicos (**a**, **c** e **e**) e dois centros eletrofílicos (**b** e **d**)⁹⁻¹¹ representados na

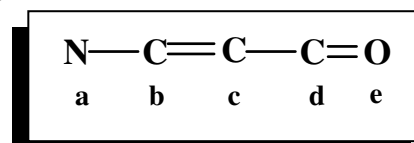


Figura 1- Estrutura de um composto β -enamino carbonílico.

Figura 1, sendo dessa forma considerados como intermediários sintéticos de alta versatilidade pois são susceptíveis tanto a reações com eletrófilos como nucleófilos.

Os enamino carbonílicos acíclicos primários e secundários podem apresentar, teoricamente, três formas tautoméricas: forma iminoenol (**I**), forma cetamino (**II**) e forma oxoimino (**III**) (Figura 2). Em dioxano aquoso a estrutura **I** é predominante, mas ambas as estruturas **I** e **II** devem exibir deslocalização eletrônica e a extensão pode ser influenciada pela natureza dos substituintes R_1 , R_2 e R_3 .

A literatura¹² concluiu através de estudos termoquímicos e cristalográficos realizados para os compostos **A-E**, que no estado cristalino o tautômero **II** está presente. A estrutura **IV** é a que melhor representa os compostos **C** e **D**, pois nesta estrutura os elétrons estão mais deslocalizados do que na estrutura **I**.

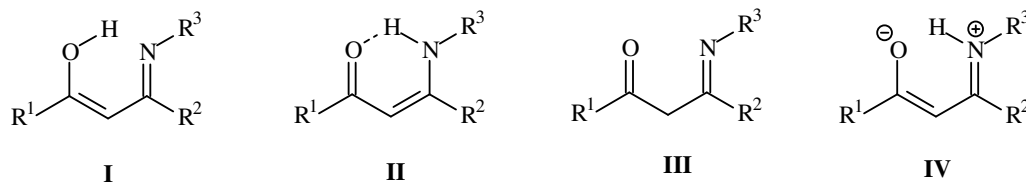
⁸ Greenhill, J. V. *Chem. Soc. Rev.* **1977**, 6, 277.

⁹ Lue, P.; Greenhill, J. V. *Adv. Heterocycl. Chem.* **1997**, 67, 207.

¹⁰ Kascheres, C. M. *J. Braz. Chem. Soc.* **2003**, 14, 945.

¹¹ Elassar, A.Z. A.; El-Khair, A. A. *Tetrahedron* **2003**, 59, 8463.

¹² Silva, M.AV.R.; Silva, M. D. M. C. R.; Paiva, J. P. A. *J. Chem. Soc. Perkin Trans 2* **1993**, 1765.



- A) $R^1, R^2 = \text{CH}_3$; $R^3 = \text{C}_6\text{H}_5$
 B) $R^1, R^2 = \text{CH}_3$; $R^3 = p\text{-NO}_2\text{C}_6\text{H}_4$
 C) $R^1 = \text{C}_6\text{H}_5$; $R^2 = \text{CH}_3$; $R^3 = \text{H}$
 D) $R^1 = \text{C}_6\text{H}_5$; $R^2, R^3 = \text{CH}_3$
 E) $R^1, R^3 = \text{C}_6\text{H}_5$; $R^2 = \text{CH}_3$.

Figura 2 -Formas tautoméricas dos enamino carbonílicos acíclicos I-IV.

Em solução, a forma tautomérica que predomina nos compostos β -enamino acíclicos é a forma **II**, conforme estudos espectroscópicos de RMN de ^1H e infravermelho, realizados por Dudek¹³. Essa conclusão foi assegurada pelo fato do autor constatar que nos espectros de RMN de ^1H em CCl_4 haviam sinais mais desprotegidos que só poderiam ser atribuídos a hidrogênios ácidos fazendo parte de ligações de hidrogênio.

Considerando as possibilidades da densidade eletrônica no sistema β -enamino cetona ou β -enamino éster são possíveis três híbridos de ressonância para estes sistemas¹⁴ conforme a Figura 3.

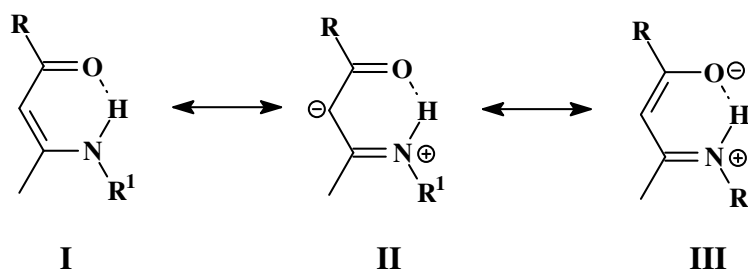


Figura 3- Híbridos de ressonância dos compostos β -enamino carbonílicos.

¹³ Dudek, G.O.; Holm, R.H. *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, 81, 475.

¹⁴ Cone, E.J.; Garner, R.H.; Hayes, A.W. *J. Org. Chem.* **1972**, 37, 4436.

Como as rotações em torno da ligação C=C e da ligação simples C-C=O dos β -enamino compostos são restritas, estas podem apresentar quatro conformações,¹⁵ conforme a Figura 4. Ambas as formas *Z* e *E* podem existir em compostos β -enamino carbonílicos contendo grupos amino primário ou secundário.

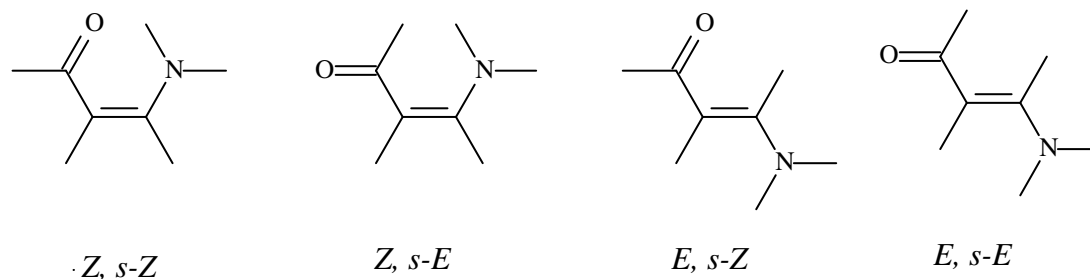


Figura 4- Conformações possíveis dos compostos β -enamino carbonílicos.

Se tivermos pelo menos um átomo de hidrogênio ligado ao nitrogênio, então o isômero *Z* tem uma ligação hidrogênio intramolecular. Havendo dois substituintes diferentes no nitrogênio, o isômero *E* (o qual não apresenta esta ligação hidrogênio intramolecular) pode existir como um par de isômeros de estabilidade limitada (esta estabilidade depende tanto do conformero como da isomeria geométrica) como consequência do caráter parcial de dupla ligação entre C-N.¹⁶⁻¹⁷ A interconversão entre a forma *Z* e *E* é facilitada pela conjugação do sistema.

Métodos espectroscópicos têm mostrado que β -enamino carbonílicos primários e secundários existem predominantemente, em alguns casos completamente, na forma *Z, s-Z* em solução de solventes apolares. A contribuição da forma *E* aumenta quando há um aumento na polaridade do solvente, especialmente solventes que formam ligações hidrogênio intermoleculares fortes. Compostos β -enamino carbonílicos terciários tendem a adotar a forma *E*, que são estericamente menos impedidas.¹⁵

¹⁵ Kascheres, C. M.; Kascheres, A. J.; Negri, G. *J. Heterocycl. Chem.* **2004**, 41, 461.

¹⁶ Macháček, V.; Lycka, A.; Simunik, R.; Weidlich, T. *Magn. Reson. Chem.* **2000**, 38, 293.

¹⁷ Chiara, J. L.; Gómez-Sanchez, A.; Bellanato, J. *J. Chem. Soc. Perkin Trans 2*, **1998**, 1797.

1.2- Suporte Sólido Montmorillonita, K-10

- Utilização de Suportes Sólidos em Reações Químicas

Os químicos têm utilizado reagentes imobilizados em sólidos finamente divididos, os quais foram chamados de suportes sólidos por Posner,¹⁸ em 1978. Os suportes sólidos podem ser divididos em dois grupos segundo a sua natureza: polímeros orgânicos, nos quais os reagentes são ligados covalentemente ao suporte (Resina de Merrifield,¹⁹ EPZG) e os sólidos inorgânicos nos quais os reagentes são adsorvidos no suporte, dentre estes podemos destacar os argilo minerais, os quais ocorrem abundantemente na natureza e suas propriedades têm sido exploradas para aplicações catalíticas durante as últimas décadas.

As estruturas atômicas dos argilo minerais comuns têm sido determinada por inúmeros investigadores, que se basearam em estudos generalizados feitos por Pauling,²⁰ sobre a estrutura das micas e minerais relacionados.

Os argilo minerais geralmente apresentam duas unidades estruturais básicas: a estrutura primária e a estrutura secundária. A estrutura primária consiste em duas folhas formadas por oxigênios e/ou hidroxilas, com as quais um cátion metálico (alumínio, ferro ou magnésio) está coordenado octaetricamente. O cátion fica equidistante dos seis oxigênios ou hidroxilas (Figura 5 a). Já a estrutura secundária é constituída de tetraedros de sílica. Em cada tetraedro, o átomo é equidistante dos quatro oxigênios ou hidroxilas (Figura 6 a).

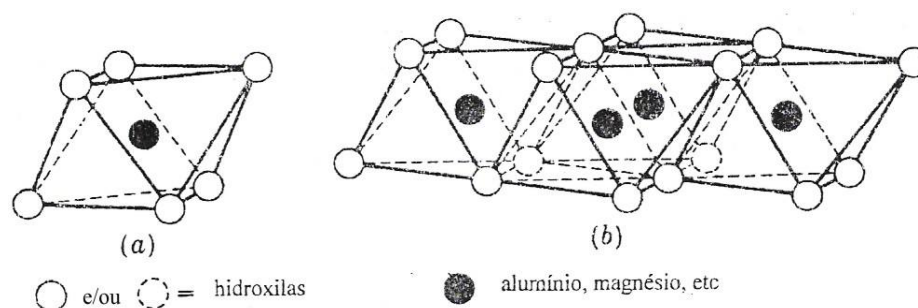


Figura 5 – Estrutura primária que faz parte da constituição de um argilo mineral.

¹⁸ Posner, G.H. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1978**, 17, 487.

¹⁹ Merrifield, R.B. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85, 2149.

²⁰ Pauling, L. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1930**, 36, 578.

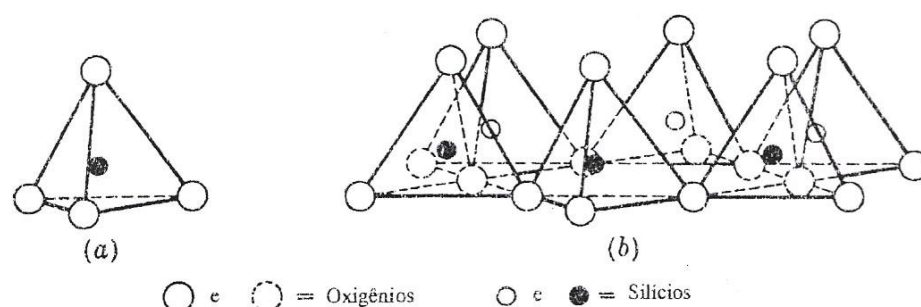


Figura 6 – Estrutura secundária que faz parte da constituição de um argilo mineral.

Os argilos minerais são classificados de acordo com o número relativo de folhas tetraédricas e octaédricas que constituem suas camadas.²¹ Os três principais arranjos encontrados são:

- as camadas constituídas por uma folha tetraédrica alternada com uma folha octaédrica (estrutura conhecida como 1:1). Ex.: caolinitas;
- as camadas constituídas na forma de “sanduíche” nas quais uma folha octaédrica encontra-se entre duas folhas tetraédricas (estrutura conhecida como 2:1). Ex.: montmorillonita;
- as camadas constituídas por estruturas 2:1 alternadas com estruturas 2:1:1. Ex.: clorita.

Uma das argilas mais utilizadas em aplicações catalíticas na química orgânica é a montmorillonita, K-10, que pertence a classe dos K-catalisadores derivados de um mineral de hidrosilicato de alumínio. Os tetraedros de sílica da estrutura secundária estão ligados uns aos outros por meio de três vértices, formando uma rede hexagonal (Figura 6 b). O quarto vértice de cada tetraedro está associado a um vértice de um octaedro de alumina da estrutura primária, formando uma camada em comum (Figura 7).

²¹ Martin, D.F.; Janusonis, G.A.; Martin, B.B. *J. Am. Chem. Soc.* **1961**, 83, 73.

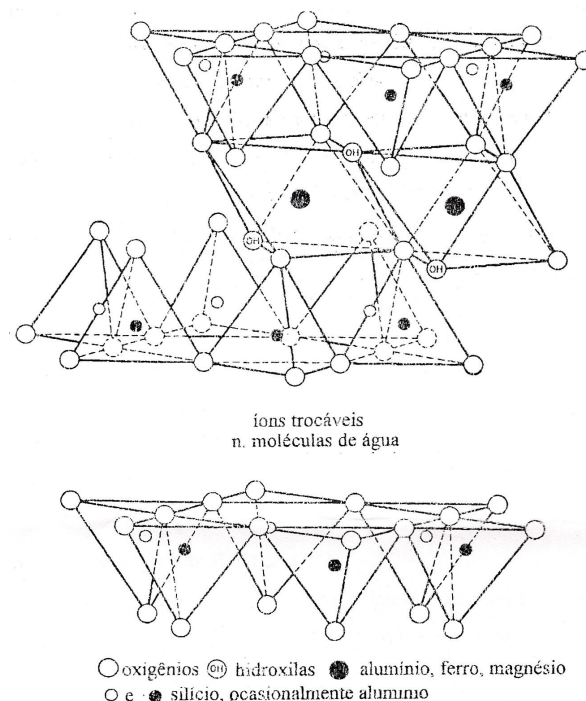


Figura 7 – Estrutura lamelar da montmorillonita, K-10.

Como na unidade empilhada de sílica-alumina-sílica, os oxigênios de cada tetraedro ou octaedro são adjacentes aos oxigênios da camada vizinha, têm-se uma fraca ligação e uma excelente clivagem entre elas.

A estrutura da montmorillonita apresenta uma importante característica, onde a água e outras moléculas polares, como certas moléculas orgânicas podem penetrar entre as camadas causando sua expansão. Os cátions trocáveis localizam-se entre essas camadas e o tamanho do espaço interlamelar da montmorillonita completamente desidratada depende somente do tamanho dos cátions interlamelares. Os principais cátions presentes em argilas montmorilloníticas são Na^+ , K^+ , H_3O^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Al^{3+} e Fe^{3+} .

Uma das principais propriedades das argilas refere-se a sua superfície, contendo partículas muito finas, com dimensão média de 2μ . Conseqüentemente, as argilas apresentam superfície extremamente grande; no caso da montmorillonita (K-10) a superfície varia em média de $500\text{-}760 \text{ m}^2/\text{g}$.

Na superfície do K-10 há um excesso de cargas negativas, atribuindo a propriedade de acidez superficial. Essa acidez é decorrente de grupos hidroxilas terminais e da interação entre oxigênios, da estrutura secundária da montmorillonita, que lhe confere um caráter ácido de Brönsted. A acidez também é resultante da estrutura primária da argila, devido à presença de cátions metálicos (Al^{3+} , Mg^{2+}), que atuam como sítios ácidos de Lewis. Além disso, outros cátions metálicos podem estar presentes na camada interlamelar da argila também agindo como ácidos de Lewis.

Reações orgânicas em meio heterogêneo, utilizando montmorillonita, K-10, como suporte sólido e/ou catalisador possuem algumas vantagens com relação a reações em solução como: condições brandas de reação, os produtos podem ser facilmente removidos no final da reação através de uma simples filtração; melhora na seletividade da reação devido à estrutura rígida da argila, com área superficial grande e partículas muito finas; a remoção da água formada é facilitada devido a sua capacidade de expansão lamelar; a frequência de choques entre reagentes aumenta a medida em que eles se difundem na superfície da argila, verificando-se um aumento na velocidade da reação.

A superfície da argila com seus respectivos íons, forma uma dupla camada elétrica que é equivalente a um cátodo mergulhado em uma solução eletrolítica, faltando apenas a corrente elétrica contínua. Portanto, a reação de oxi-redução, realmente, deve ocorrer nesta superfície, se a mesma contiver energia disponível, e essa energia, pode surgir da reorganização da látice da argila.

A forma mais simples de oxidação de moléculas aromáticas é devido à ação de cátions de metais de transição presentes ou induzidos nos silicatos. Os sistemas mais empregados são montmorillonita impregnada com nitrato de ferro III (K-10/ $\text{Fe}(\text{NO}_3)_2$), denominado Clayfen e com nitrato de cobre II (K-10/ $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$) denominado Claycop.^{22,23} Obtenção de álcoois,²⁴ formação de lactonas,²⁵ obtenção de compostos β -enamino²⁶⁻²⁸ a partir de β -dicarbonílicos, alquilações e acilações de anéis aromáticos em presença de ácidos de Lewis,²⁹ obtenção de heterociclos,³⁻⁵ são alguns exemplos de reações nas quais utiliza-se montmorillonita, K-10.

²² Cornelis, A.; Laszlo, P. *Synthesis* **1978**, 909.

²³ Cornelis, A.; Herzé, P.Y.; Laszlo, P.; Monthy, A. *Tetrahedron Letters* **1982**, 23, 5035.

²⁴ Adams, J.M.; Graham, S.H.; Clement, D.E. *Clays and Clay Minerals* **1982**, 30, 129.

²⁵ Adams, J.M.; Davies, M.; Graham, S.H.; Thomas, J.M. *J. Catalysis* **1982**, 78, 179.

²⁶ Braibante, M. E. F.; Braibante, H. T. S.; Salvatore, S.J.S.A. *Química Nova* **1990**, 13, 67.

²⁷ Braibante, M. E. F.; Braibante, H. T. S.; Missio, L.; Andricopulo, A. *Synthesis* **1994**, 898.

²⁸ Braibante, M. E. F.; Braibante, H. T. S.; Valduga, C.; Squizani, A. *Synthesis* **1998**, 1019.

²⁹ Varma, R.S. *Tetrahedron* **2002**, 58, 1235.

1.3-Utilização de Ultra-som em Reações Orgânicas

- Revisão e Aspectos Gerais

Em 1950, foram comercializados os primeiros aparelhos geradores de ondas ultra-sonoras, o que possibilitou estudar o efeito destas ondas sobre os sistemas químicos. O estudo da influência das ondas ultra-sonoras sobre sistemas químicos é denominado sonoquímica e a aplicação destas ondas sonicação.³⁰

No aparelho de ultra-som, o “banho”, a fonte de energia ultra-sonora é uma cerâmica piezelétrica disposta entre duas chapas metálicas este sistema constitui o transdutor piezelétrico. O gerador de frequência transmite um sinal a cerâmica piezelétrica, que transforma ondas elétricas em ondas mecânicas, as chapas metálicas amplificam estes sinais, o transdutor transmite a energia ultra-sonora através de um líquido, normalmente água ao sistema reacional. A sensibilidade do ouvido humano está na faixa de 16 Hz a 16 KHz, a frequência característica de ultra-som, em geral, está no intervalo de 16 KHz a 1 MHz. Sendo que frequências de 1 a 10 MHz correspondem à região de alta frequência. O símbolo internacional de ultra-som é US)).

A propagação das ondas ultra-sônicas é baseada no processo de criar, aumentar e implodir cavidades (microbolhas) de vapor e gases, denominado cavitação, em um líquido promovendo efeitos de ativação em reações químicas.³¹ Durante a propagação da radiação ultra-sônica no meio reacional ocorre uma variação de pressão, esta variante cria ciclos de compressão-expansão que gera as cavidades características do fenômeno da cavitação.³²

Num líquido com partículas sólidas dispersas, os gases são adsorvidos nos poros das partículas.³¹ Na etapa de compressão os gases ou vapores, no interior da cavidade, são comprimidos para o interior da partícula e na etapa de expansão esses gases ou vapores são dirigidos para fora da partícula. A cavidade aumenta de tamanho em direção ao interior do líquido e separa-se da partícula.

Ciclos periódicos de compressão e expansão causam o aumento do tamanho da cavidade, que ao atingir um tamanho crítico implode liberando grande quantidade de calor e pressão num curto período de tempo e em pontos localizados do líquido.

Em sistemas heterogêneos os principais fenômenos físicos, responsáveis pela eficiência das ondas ultra-sonoras, evidenciados a partir de numerosos estudos, são: criação

³⁰ Barboza, J. C. S.; Serra, A. A. *Química Nova* **1992**, 15, 302.

³¹ Martines, M. A. U.; Davolos, M. R.; Jafelicci, M. J. *Química Nova* **2000**, 23, 251.

³² Sulisck, K. S. *Scientific American* **1989**, 2, 80.

de emulsão na interface líquido-líquido; erosão cavitacional e limpeza da interface sólido-líquido; produção de ondas de choque suscetíveis de provocar deformações na superfície sólida; crescimento de superfícies devido à fragmentação de sólidos e favorecimento do transporte de massa devido a turbulência e aos micromovimentos simultâneos.³⁰ Em reações químicas o ultra-som pode desempenhar um papel importante, aumentando o rendimento, diminuindo o tempo reacional e favorecendo reações que não ocorrem em condições normais. Reações catalisadas por metais de transição,^{30,33} reações de oxidação,³⁴ e reações de redução³⁰ são alguns exemplos da utilização do ultra-som em reações químicas.

1.4-Utilização de Microondas em Reações Orgânicas

- Revisão e Aspectos Gerais

No espectro eletromagnético, a região da radiação de microondas está localizada entre a radiação do infravermelho e ondas de rádio. As microondas tem comprimento de onda de 1mm-1m, correspondentes a frequências entre 0,3 e 300 GHz. A fim de evitar interferências em equipamentos de telecomunicações e radares que também operam em frequências dessa magnitude, os aparelhos de microondas industriais e domésticos utilizados para fins de aquecimento estão regulados para operar em comprimentos de onda de 12,2 cm, que correspondem a uma frequência de 2,450 ($\pm 0,050$) GHz.³⁵

As microondas são um tipo de radiação não ionizante, incapaz de quebrar ligações, sendo uma forma de energia e não de calor. Elas interagem com os meios materiais nos quais elas podem ser refletidas (metais), transmitidas (bons isolantes que não são aquecidos) ou absorvidas (decréscimo da energia de microondas e rápido aquecimento de uma dada amostra).³⁶ O tipo de aquecimento gerado em reações orgânicas conduzidas em microondas é devido principalmente a polarização dielétrica. Um pré-requisito para que um material possa ser aquecido pela ação das microondas é que esse apresente propriedades dielétricas. A geração de calor em uma substância devido à dissipação de microondas, chamado de aquecimento dielétrico, ocorre devido à atuação da componente do campo elétrico da radiação, que pode ser explicada pelo mecanismo de condução:

³³ Bonrath, W. *Ultrasonics Sonochemistry* **2005**, 12, 103.

³⁴ Brown, H. C.; Racherla, U. S. *Tetrahedron Letters* **1985**, 26, 4311.

³⁵ Gedye, R.; Smith, F.; Westaway, K.; Ali, H.; Baldisera, L.; Labgerge, L.; Rousell, J. *Tetrahedron Letters* **1986**, 27, 279.

³⁶ Varma, R. S. *Pure Appl. Chem.* **2001**, 73, 193.

- mecanismo de condução: íons dissolvidos se movem sob a influência de um campo elétrico, resultando na dissipação da energia da radiação em forma de calor devido ao atrito entre os íons, que depende do tamanho, carga, condutividade e interações com o solvente.

Quando a molécula é irradiada com microondas, ela sofre uma rotação e se alinha ao campo aplicado. A frequência da rotação molecular é similar à frequência da radiação e conseqüentemente a molécula tende continuamente a se realinhar, ocorrendo a absorção de energia.

Quando ocorre o aumento da constante dielétrica, aumenta também o efeito de aquecimento das microondas sobre o material. Assim, solventes tais como água, metanol, acetato de etila, acetona, clorofórmio, ácido acético e diclorometano são todos aquecidos quando irradiados com microondas. Solventes tais como hexano, tolueno e éter etílico não aquecem com irradiação de microondas, embora seja possível o uso de misturas de solventes ativos e não ativos à irradiação.³⁷

Existem numerosas metodologias para realizar reações orgânicas, utilizando a energia de microondas. As reações podem ser realizadas em vasos reacionais abertos utilizando solventes orgânicos, esse método consiste na dissolução dos reagentes em solventes apropriados (polares, com alto ponto de ebulição) que quando irradiados por microondas geram a energia requerida para promover a reação. Várias reações como ciclizações, substituições eletrofílicas aromáticas, oxidações podem ser realizadas por essa técnica.^{36, 38-39} Um inconveniente destas reações que utilizam solventes é a dificuldade no isolamento dos produtos, devido aos altos pontos de ebulição dos solventes. Por esta razão, a maioria das reações vem sendo efetuada na ausência de solvente.

A necessidade de controle em fornos de microondas domésticos quando se promove a síntese sob irradiação de microondas tem conduzido a um vasto número de incidentes. Por isso, a maioria das reações orgânicas é efetuada na ausência de solventes, sob irradiação de microondas, empregando a metodologia de suporte sólido. Esse método consiste em impregnar os reagentes em suportes inorgânicos, como argilas, alumina e sílica, antes de se efetuar a exposição à energia de microondas. Em muitas reações, a matriz inorgânica funciona como suporte sólido e catalisador.

³⁷ Caddick, S. *Tetrahedron* **1995**, 51, 10403.

³⁸ Lidström, P.; Tierney, J. Wathey, B.; Westman, J. *Tetrahedron* **2001**, 57, 9225.

³⁹ Strauss, C. R.; Trainor, R. W. *Aust. J. Chem.* 1995, 48, 1665.

2-REVISÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

No desenvolvimento deste trabalho visamos o estudo de obtenção de sistemas heterocíclicos amino substituídos a partir O,N-acetais empregando a metodologia de reações sob suporte sólido, K-10, associado ao uso de ultra-som e a investigação de um possível efeito biológico desses sistemas frente a diferentes microrganismos indicadores bem como na atividade da enzima acetilcolinesterase. É bem conhecido^{40a-c} que α -oxocetenos X,Y-acetais (com X e/ou Y = S,N,O) são versáteis intermediários na construção de um grande número de compostos heterocíclicos, entretanto, poucos exemplos são descritos a partir de O,N-acetais.

O estudo realizado está subdividido em três tópicos principais que descrevem: a obtenção de β -enamino carbonílicos acíclicos, especificadamente os α -oxocetenos O,N-acetais; as reações de ciclização destes compostos envolvendo os sítios eletrofílicos e os bioensaios *in vitro* análise antimicrobiana e análise da atividade da enzima acetilcolinesterase.

Os β -enamino carbonílicos estudados neste trabalho apresentam variações na sua cadeia principal, um grupo etóxi no carbono β e diferentes substituintes no nitrogênio (R= H, Me, Alil, Ph, Bn, (S) e (R)-CH(CH₃)Ph, *i*-Pr) como ilustra Figura 8.

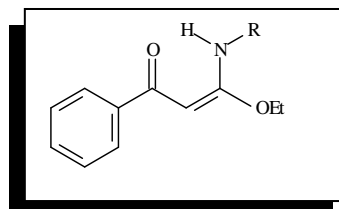


Figura 8- Acetal O,N-substituído

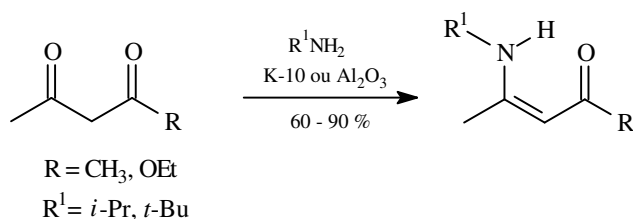
Os α -oxocetenos O,N-acetais **2a-h** sintetizados foram estudados através de reações com dinucleófilos como hidrazina e fenil hidrazina para avaliarmos a reatividade e a regioquímica na obtenção de uma série de heterociclos amino funcionalizados. A seguir será abordado separadamente cada um dos três tópicos, já mencionados, que fundamentaram o presente trabalho.

^{40 a)} Kolb, M. *Synthesis* **1990**, 171. ^{b)} Suresh, J.R.; Barun, O.; Ila, H.; Junjappa, H. *Tetrahedron* **2000**, 56, 8153. ^{c)} Nandi, S.; Panda, K.; Suresh, J.R.; Ila, H.; Junjappa, H. *Tetrahedron* **2004**, 60, 3663.

2.1- Síntese dos β -enamino carbonílicos (α -oxocetenos O,N-acetais)

Devido a grande versatilidade dos β -enamino compostos como “synton” para síntese de novos padrões moleculares de sistemas heterocíclicos, nosso grupo vem desenvolvendo estudos na perspectiva de obtê-los com maior grau de pureza e bons rendimentos em meio heterogêneo, sem o uso de solventes. A literatura cita^{8-9,41} que a condensação de aminas e β -dicarbonílicos com remoção azeotrópica da água formada é o método mais direto para a síntese de enamino compostos. Dependendo da reatividade das aminas utilizadas e do ambiente estérico do composto ceto, outros métodos sintéticos são descritos empregando autoclave e altas temperaturas, o que conduzem a formação de produtos secundários em altas proporções.

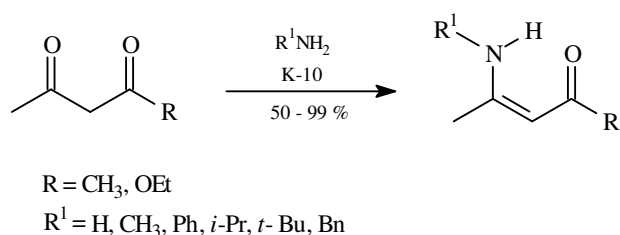
O nosso grupo vem sintetizado compostos enamino carbonílicos a partir de dicarbonílicos empregando a metodologia de reações sob suporte sólido, nesse sentido Braibante e col.²⁶ publicaram um estudo sistemático para a síntese de β -enamino compostos (cetonas e ésteres), explorando reações em meio heterogêneo (Esquema 5). Neste trabalho a reação entre o composto β -dicarbonílico, acetoacetato de etila ou acetil acetona com aminas impedidas como *i*-propilamina e *t*-butilamina sob suporte sólido alumina neutra ou montmorillonita, levou à formação dos respectivos enamino carbonílicos. O estudo comparativo entre os suportes sólidos empregados demonstrou que a montmorillonita, K-10, foi mais eficiente, obtendo-se desta forma β -enamino cetonas e β -enamino ésteres com alta seletividade, excelentes rendimentos e condições brandas, pois as reações foram conduzidas a temperatura ambiente e facilmente isoladas, através de uma simples filtração do suporte sólido.



Esquema 5- Obtenção de β -enamino carbonílicos N-substituídos sob suporte sólido K-10 ou Al_2O_3 .

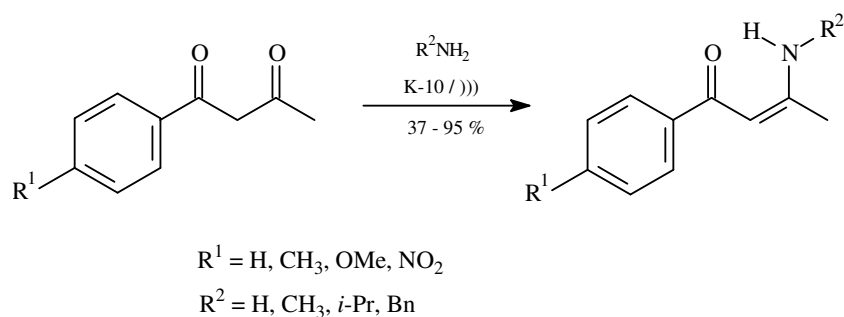
⁴¹ Ferraz, H. M. C.; Pereira, F.L.C. *Química Nova* **2004**, 27, 89.

Em outro estudo,²⁷ o nosso grupo descreveu a síntese de uma série de β -enamino cetonas e ésteres utilizando a metodologia de reações em meio heterogêneo, empregando K-10 em temperatura ambiente, constituindo-se em um método simples com tempo reacional de 24 h, seletivo e versátil para a obtenção de compostos β -enamino carbonílicos, conforme o Esquema 6.



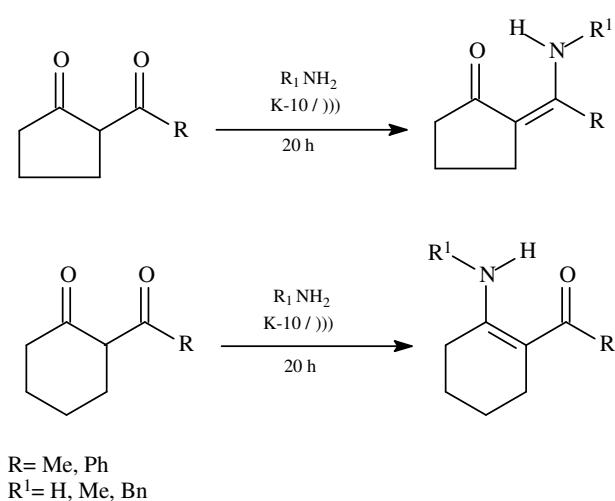
Esquema 6- Obtenção de compostos β -enamino N-substituídos sob suporte sólido K-10.

Devido aos bons resultados descritos acima utilizando o suporte sólido e com o objetivo de diminuir o tempo reacional, o nosso grupo resolveu investigar as reações de obtenção de uma série de β -enamino cetonas não simétricas empregando o uso do K-10 associado ao banho de ultra-som, utilizando sistemas 1,3-dicarbonílicos *p*-fenil substituídos,²⁸ como demonstra o Esquema 7. As β -enamino cetonas foram convenientemente obtidas a partir de 1,3-dicetonas com bons rendimentos e tempo de reação em torno de 5-24 h, demonstrando que o emprego do argilo mineral associado ao uso de ultra-som é uma alternativa eficiente para essa classe de compostos.



Esquema 7- Obtenção de β -enamino cetonas não simétricas sob suporte sólido K-10/ ultra-som.

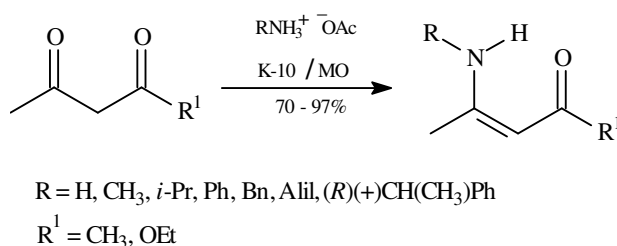
A mesma metodologia foi aplicada na reação de obtenção de compostos β -enamino carbonílicos cíclicos²⁸ a partir de sistemas 1,3-dicarbonílicos derivados de 2-acilcicloalcanonas de 5 e 6 membros com aminas primárias. Observou-se uma regioseletividade no ataque da amina ao centro eletrofílico formando-se enamino cetonas *exocíclicas* para anéis de 5 membros e enamino cetonas *endocíclicas* para sistemas de 6 membros (Esquema 8).



Esquema 8- Obtenção de β -enamino cetonas exo e endocíclica sob suporte sólido K-10/ ultra-som.

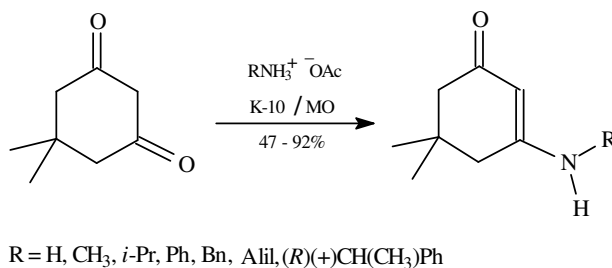
Posteriormente, Braibante e col.⁴² avaliaram reações sob suporte sólido associado à energia de microondas (MO) com sucesso, constituindo-se em um método eficiente para o emprego de aminas de baixo ponto de ebulição. A condensação de sistemas 1,3-dicarbonílicos com aminas forneceu os compostos enamino carbonílicos correspondentes (Esquema 9). Para tanto, utilizou-se acetato das aminas correspondentes, com exceção das aminas (R= Alil, Ph e {(R)(+)- α -CH(CH₃)Ph}) que foram utilizadas sem transformá-las em seus sais.

⁴² Rosso, Giovani Bernardi. “Dissertação de Mestrado” 2000, UFSM, Santa Maria.



Esquema 9- Obtenção de β -enamino cetonas e ésteres sob suporte sólido K-10/ M.O.

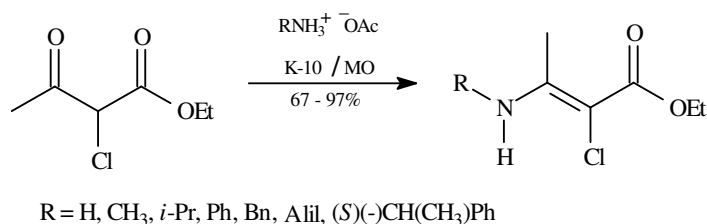
Com o objetivo de obter enamino carbonílicos cíclicos empregando o K-10 associado a energia de microondas, metodologia que esta já bem estabelecida em nossos laboratórios para obtenção dessa classe de compostos, Braibante e col.⁴² utilizaram 5,5-dimetil 1,3-ciclohexadiona com os sais das aminas correspondentes de baixo ponto de ebulição. Foram obtidas 5,5-dimetil 2-ciclohexen-1-ona-3-amino substituídas satisfatoriamente de acordo com o Esquema 10.



Esquema 10- Obtenção de β -enamino cetonas cíclicas sob suporte sólido K-10/ M.O.

O êxito desta metodologia induziu o nosso grupo de pesquisa a utiliza-la na preparação de outros compostos β -enamino carbonílicos, neste caso α -cloro substituídos com configuração estabelecida. Os β -enamino ésteres α -clorados⁴³ foram obtidos com excelentes rendimentos (Esquema 11).

⁴³ Braibante, H.T.S.; Braibante, M.E.F.; Rosso, G. B.; Oriques, D. A. *J. Braz. Chem. Soc.* **2003**, 6, 994.

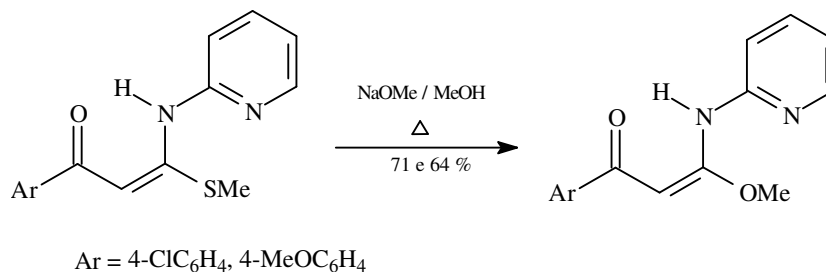


Esquema 11 - Obtenção de β -enamino ésteres α -clorados sob suporte sólido K-10/ M.O.

Até o presente momento foram descritos os estudos realizados pelo nosso grupo na obtenção de diferentes compostos enamino carbonílicos a partir de dicarbonílicos, β -ceto ésteres ou dicetonas, utilizando a metodologia de reações em meio heterogêneo, sob suporte sólido, K-10 associado ou não a energia de microondas e ultra-som.

Na presente dissertação iremos abordar a obtenção de α -oxocetenos O,N- acetais, que são cetenos polarizados que representam uma classe de versáteis compostos enamino funcionalizados, a partir do composto β -oxotioxo éster empregando K-10 e ultra-som. Faz-se necessário salientar a importância deste estudo realizado tanto pelo emprego da nova metodologia bem como, pelo fato de que α -oxocetenos O,N-acetais são pouco descritos na literatura.

Um dos poucos métodos citados na literatura⁴⁴ para obtenção de O,N-acetais é a reação entre os α -oxoceteno N,S-acetais frente a metóxido de sódio utilizando metanol como solvente. Os O,N-acetais aril substituídos foram obtidos seletivamente, porém sob condições drásticas (Esquema 12).

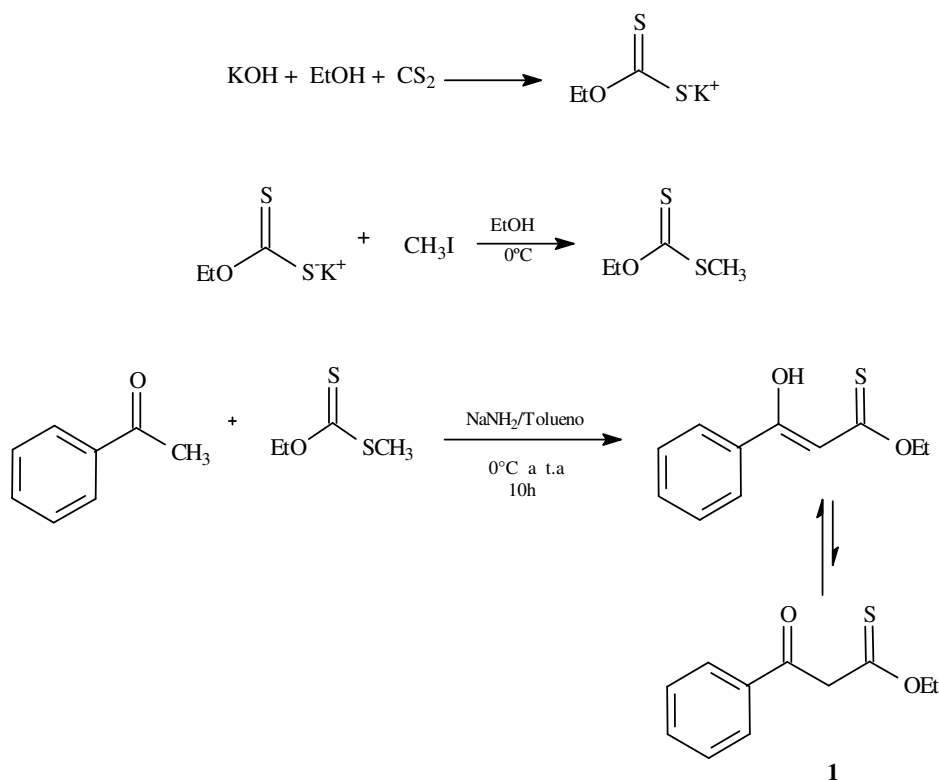


Esquema 12- Obtenção regioseletiva de α -oxocetenos O,N-acetais em solução.

⁴⁴ Barun, O.; Ila, H.; Junjappa, H. *J. Org. Chem.* **2000**, 65, 1583.

Uma outra rota para preparação O,N-acetais reportado na literatura é a partir de β -oxotioxo éster, este selecionado por nós para a obtenção dos O,N-acetais desejados, porém, empregando a metodologia de reações em meio heterogêneo ao invés do método tradicional em solução. O que nos influenciou na escolha do β -oxotioxo éster como precursor na preparação dos acetais requeridos, foi no sentido de avaliar a rota sintética, a reatividade e a aplicação de compostos carbonílicos β -heterosubstituídos.

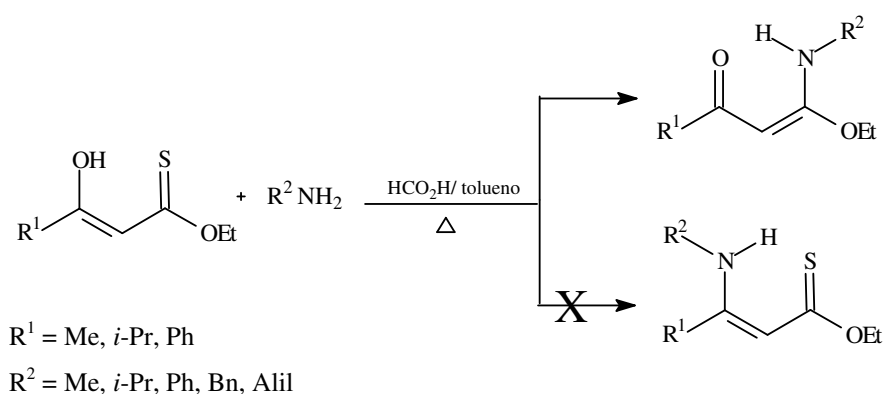
A obtenção do β -tioxo éster **1**, envolve a reação do etóxido de potássio com dissulfeto de carbono, fornecendo o O-etil ditiocarbonato de potássio o qual foi submetido a agitação com iodeto de metila, resultando no O-etil S-metil ditiocarbonato⁴⁵ com 85% de rendimento. A literatura cita⁶ a preparação de **1** através da etóxitiocarbonilação de enolatos com O-etil S-metil ditiocarbonato, usando amideto de sódio ou terc-butoxido de sódio como base. Nós testamos a reação da acetofenona com O-etil S-metil ditiocarbonato com essas duas bases específicas, mas obtivemos melhores rendimentos utilizando amideto de sódio em tolueno (Esquema 13).



Esquema 13- Obtenção do β -oxotioxo éster **1**.

⁴⁵ vogel, Pratical Organic Chemistry, 793.

Sabe-se que o ataque nos carbonos sp^2 ($C=S$) ou ($C=O$) dos β -oxotioxo ésteres é dependente do meio e das condições reacionais.⁴⁶ De acordo com a literatura,⁴⁷ o método regioespecífico para obtenção de α -oxocetenos O,N-acetais é a reação dos β -oxotioxo ésteres com aminas primárias em refluxo com tolueno na presença de ácido fórmico (Esquema 14). A regioespecificidade da condensação é modificada quando se conduz a reação sem ácido fórmico em tolueno, com eliminação azeotrópica de água, resultando em uma mistura de produtos na proporção de 1:1, que são resultantes do ataque nos dois sítios eletrofílicos do β -oxotioxo éster na sua forma ceto. A regioespecificidade da reação obtida em meio ácido pode ser explicada pelo favorecimento da forma enólica do tioxo éster nestas condições, dessa maneira o $C=S$ é o único centro susceptível ao ataque nucleofílico.

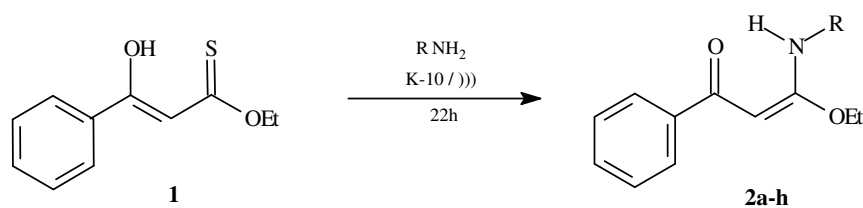


Esquema 14- Obtenção específica de O,N-acetais em meio homogêneo com ácido fórmico.

Neste trabalho conduzimos as reações de obtenção de α -oxocetenos O,N-acetais utilizando diferentes aminas primárias em suporte sólido, montmorillonita (K-10), associado ao uso de ultra-som, na ausência de ácidos e solventes conforme o Esquema 15.

⁴⁶ Katrizky, A. R.; Barczynski, P.; Ostercamp, D. L.; Yousaf, T. I. *J. Org. Chem.* **1986**, 51, 4037.

⁴⁷ Moussoung, J.; Bouquant, J.; Chucho, J. *Synthesis* **1994**, 483.

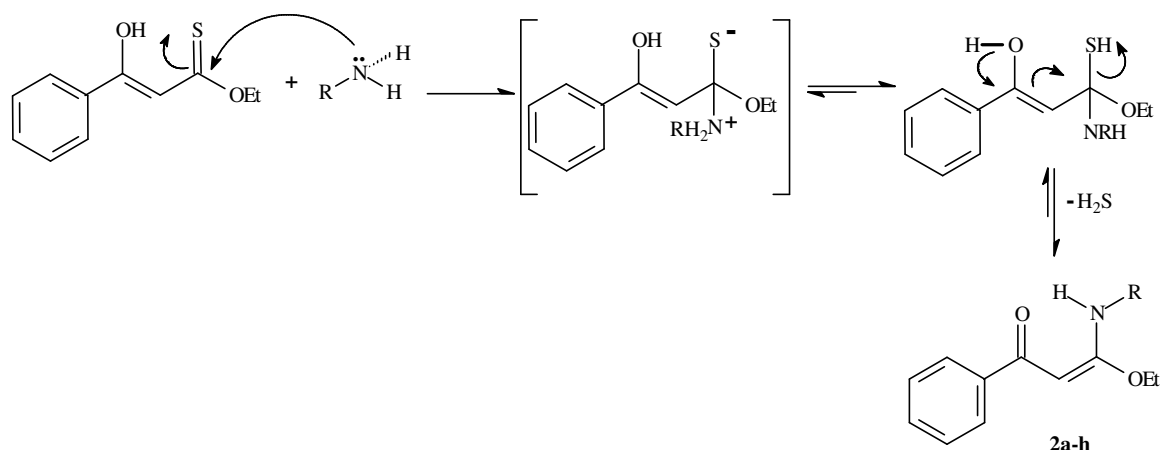


2	a	b	c	d	e	f, g	h
R	H	CH ₃	Alil	Ph	Bn	CH(CH ₃)Ph	<i>i</i> -Pr
%	78	45	45	42	60	67, 45	82

Esquema 15- Obtenção regioespecífica de O,N-acetais **2a-h** em meio heterogêneo, onde **2f** apresenta o substituinte [(R)(+)- α -CH(CH₃)Ph] e **2g** o enantiômero [(S)(-)- α -CH(CH₃)Ph].

A metodologia empregada na obtenção dos α -oxocetenos O,N-acetais **2a-h** demonstrou facilidade no isolamento da reação e conduziu a formação específica destes compostos. O K-10, suporte sólido, possui acidez superficial de Brønsted, podendo substituir ácidos minerais em reações orgânicas.⁷ Devido a essa característica podemos explicar a formação regioespecífica dos O,N-acetais **2a-h** da mesma maneira que foi proposto anteriormente para as reações com ácido fórmico. Outro aspecto relevante ao emprego da montmorillonita, como suporte sólido, é o fato desse argilo mineral possuir propriedades de adsorver água e/ou moléculas orgânicas em seu espaço interlamelar, favorecendo o deslocamento do equilíbrio químico para a formação dos produtos desejados.

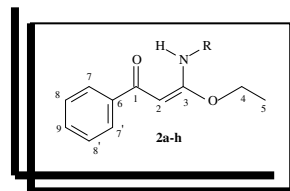
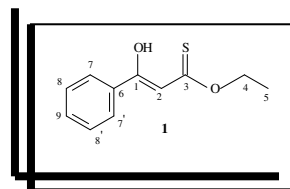
O mecanismo proposto para formação dos α -oxocetenos O,N-acetais consiste no ataque nucleofílico do par de elétrons livres do nitrogênio ao carbono sp^2 (C=S) com posterior eliminação de sulfeto de hidrogênio conforme o Esquema 16.



Esquema 16- Mecanismo proposto para obtenção dos enaminos, α -oxocetenos O,N-acetais **2a-h**.

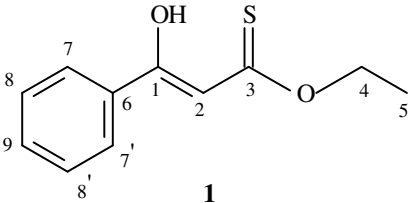
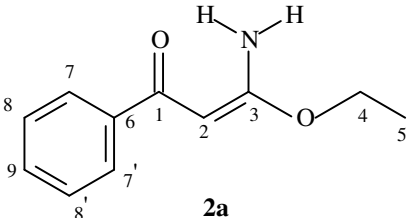
As estruturas dos O,N-acetais sintetizados por nós foram caracterizadas através de espectroscopia de RMN de 1H e ^{13}C em $CDCl_3$ (Figuras 25 a 31, páginas 101 a 107), e os respectivos deslocamentos químicos estão listados na Tabela 1.

Na análise dos espectros de RMN de 1H , foi possível detectar a formação dos α -oxocetenos O,N-acetais **2a-h** através dos sinais sob forma de singletos alargados característicos de átomos de hidrogênio ligados a átomos de nitrogênio que aparecem geralmente na região de 8-12 ppm quando estão realizando ligação de hidrogênio, neste caso com o oxigênio da carbonila. A proteção no deslocamento químico do hidrogênio vinílico (H-2) de 6,35 ppm no composto de partida **1** para 5,35-5,53 ppm nos acetais **2a-h**. Ainda observamos a permanência dos sinais referentes aos hidrogênios metílicos (H-5) na região entre 1,21-1,41 ppm e hidrogênios metilênicos (H-4) na região entre 4,03-4,22 ppm pertencentes ao grupo etóxi. Para os enaminos **2f** e **2g**, que possuem o substituinte [(R)(+)- α -CH(CH₃)Ph] e [(S)(-)- α -CH(CH₃)Ph] respectivamente, (Figura 30, página 106) observou-se o aparecimento de um multipeto ao invés de um quarteto para os hidrogênios H-4, esta constatação nos indica a não equivalência dos hidrogênios metilênicos H-4, que provavelmente foi ocasionada devido a mudança de ambiente químico proporcionado pelo substituinte ligado ao nitrogênio [(R) e (S) CH(CH₃)Ph] detentor de um centro assimétrico.

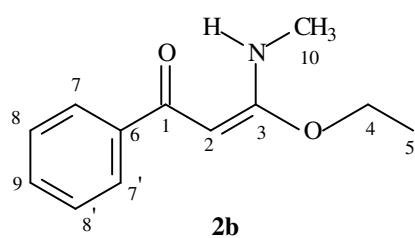


Na análise dos espectros de RMN de ^{13}C dos compostos **2a-h**, a confirmação de que o ataque nucleofílico do nitrogênio das diferentes aminas primárias aconteceu no C-3 do composto de partida **1** resultando os compostos **2a-h** é devido a proteção observada no deslocamento químico do C-3 de 208,26 ppm para 165,97-169,57 ppm. Observou-se também a desproteção no deslocamento químico do C-1 do composto de partida **1** de 172,38 ppm para 186,21-187,51 ppm nos compostos **2a-h** referente a presença da carbonila. O carbono metínico C-2 aparece na região entre 73,90-75,22 ppm, sendo que no composto de partida apresentava-se com deslocamento químico de 100,63 ppm.

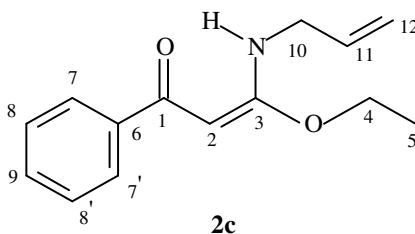
Tabela 1 – Dados espectroscópicos de ^1H e ^{13}C do β -oxotioxi éster **1** e dos α -oxocetenos O,N-acetais **2a-h**.

Estrutura*/Composto	RMN ^1H (CDCl_3/TMS) δ (ppm), J (Hz)	RMN ^{13}C (CDCl_3/TMS) δ (ppm)
 <p style="text-align: center;">1</p>	1,40 (t, 3H, CH_3 , $J=7,2$, H-5); 4,51 (q, 2H, CH_2 , $J=7,2$, H-4); 6,35 (s, 1H, CH, H-2); 7,37-7,46 (m, 3H, CH, Ph); 7,79-7,84 (m, 2H, CH, Ph); 14,15 (s, 1H, OH).	13,75 (C-5); 65,45 (C-4); 100,63 (C-2); 126,13 (C-7,7'); 128,52 (C-8,8'); 131,48 (C-9); 134,43 (C-6); 172,38 (C-1); 208,26 (C-3).
 <p style="text-align: center;">2a</p>	1,27 (t, 3H, CH_3 , $J=7,0$, H-5); 4,03 (q, 2H, CH_2 , $J=7,0$, H-4); 5,39 (s, 1H, CH, H-2); 7,36-7,39 (m, 3H, CH, Ph); 7,82-7,86 (m, 2H, CH, Ph); 10,08 (sl, 1H, NH).	13,88 (C-5); 63,57 (C-4); 74,70 (C-2); 126,43 (C-7,7'); 127,78 (C-8,8'); 130,13 (C-9); 140,52 (C-6); 169,57 (C-3); 187,51 (C-1).

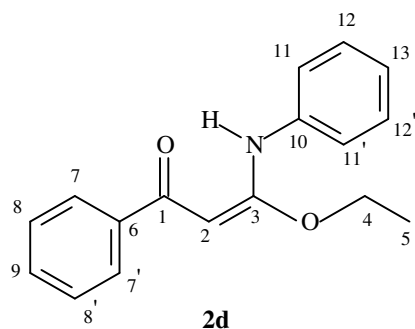
Continuação da Tabela 1



1,41 (t, 3H, CH₃, $J=7,0$, H-5); 14,28 (C-5); 26,36 (C-10);
 2,92 (d, 3H, CH₃, $J=5,0$, H-10); 64,26 (C-4); 73,98 (C-2);
 4,15 (q, 2H, CH₂, $J=7,0$, H-4); 126,50 (C-7,7');
 5,37 (s, 1H, CH, H-2); 127,96 (C-8,8'); 129,99 (C-9);
 7,35-7,42 (m, 3H, CH, Ph); 141,08 (C-6); 169,08 (C-3);
 7,80-7,85 (m, 2H, CH, Ph); 186,34 (C-1).
 10,91 (sl, 1H, NH).

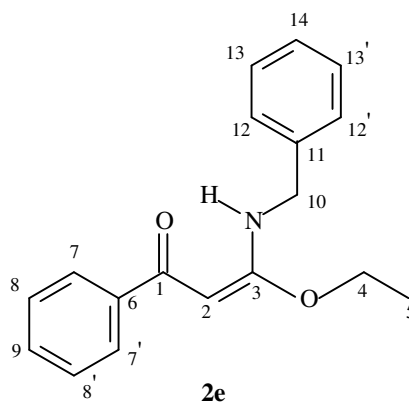
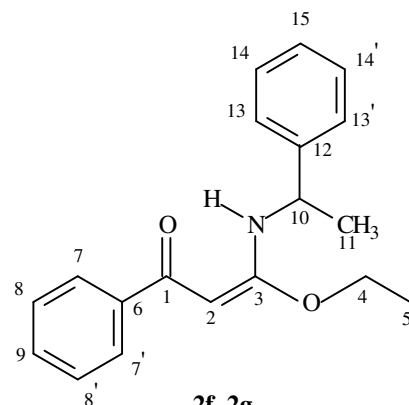
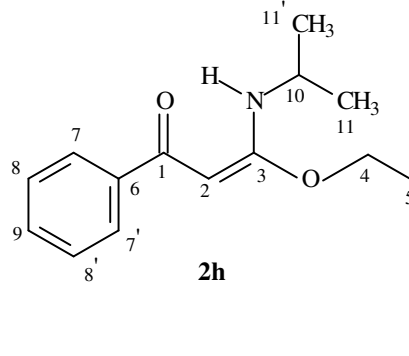


1,41 (t, 3H, CH₃, $J=7,0$, H-5); 14,20 (C-5); 42,30 (C-10);
 3,93-3,98 (m, 2H, CH₂, H-10); 64,20 (C-4); 73,90 (C-2);
 4,16 (q, 2H, CH₂, $J=7,0$, H-4); 115,80 (C-12);
 5,12-5,31 (m, 2H, CH₂, H-12); 126,40 (C-7,7');
 5,40 (s, 1H, CH, H-2); 127,90 (C-8,8'); 130,00 (C-9);
 5,80-5,99 (m, 1H, CH, H-11); 133,70 (C-11); 140,80 (C-6);
 7,36-7,42 (m, 3H, CH, Ph); 168,30 (C-3); 186,50 (C-1).
 7,82-7,86 (m, 2H, CH, Ph);
 11,09 (sl, 1H, NH).



1,45 (t, 3H, CH₃, $J=7,0$, H-5); 14,00 (C-5); 64,79 (C-4);
 4,22 (q, 2H, CH₂, $J=7,0$, H-4); 75,22 (C-2);
 5,53 (s, 1H, CH, H-2); 121,24 (C-11,11');
 7,03-7,90 (m, 10H, CH, Ph); 123,67 (C-13);
 13,18 (sl, 1H, NH); 126,55 (C-12,12');
 128,00 (C-7,7');
 128,71 (C-8,8'); 130,49 (C-9),
 137,45 (C-10); 140,23 (C-6);
 165,97 (C-3); 186,99 (C-1).

Continuação da Tabela 1

 <p>2e</p>	<p>1,39 (t, 3H, CH₃, <i>J</i>=7,0, H-5); 4,17 (q, 2H, CH₂, <i>J</i>=7,0, H-4); 4,53 (d, 2H, CH₂, <i>J</i>=6,0, H-10); 5,42 (s, 1H, CH, H-2); 7,26-7,41 (m, 8H, CH, Ph); 7,81-7,86 (m, 2H, CH, Ph); 11,38 (sl, 1H, NH).</p>	<p>14,27 (C-5); 43,98 (C-10); 64,42 (C-4); 74,09 (C-2); 126,58 (C-7,7'); 127,16 (C-12,12'); 127,24 (C-14); 128,03 (C-8,8'); 128,50 (C-13,13'); 130,42 (C-9); 138,15 (C-6); 140,80 (C-11); 168,37 (C-3); 186,70 (C-1).</p>
 <p>2f, 2g</p>	<p>1,21 (t, 3H, CH₃, <i>J</i>=7,0, H-5); 1,55 (d, 2H, CH₃, <i>J</i>=6,8, H-11); 4,05 (m, 2H, CH₂, H-4); 4,93 (qui, 1H, CH, <i>J</i>=6,8, H-10); 5,36 (s, 1H, CH, H-2); 7,22-7,87 (m, 10H, CH, Ph); 11,49 (sl, 1H, NH).</p>	<p>13,95 (C-5); 23,41 (C-11); 50,23 (C-10); 64,18 (C-4); 73,96 (C-2); 125,55 (C-7,7'); 126,45 (C-13,13'); 126,77 (C-15); 127,88 (C-8,8'); 128,30 (C-14,14'); 130,06 (C-9); 140,67 (C-6); 143,97 (C-12); 167,68 (C-3); 186,47 (C-1).</p>
 <p>2h</p>	<p>1,26 (d, 6H, CH₃, <i>J</i>=7,0, H-11,11'); 1,41 (t, 3H, CH₃, <i>J</i>=7,0, H-5); 3,95-4,05 (m, 1H, CH, H-10); 4,16 (q, 2H, CH₂, <i>J</i>=7,0, H-4); 5,35 (s, 1H, CH, H-2); 7,36-7,40 (m, 3H, CH, Ph); 7,80-7,85 (m, 2H, CH, Ph); 10,95 (sl, 1H, NH).</p>	<p>14,60 (C-5); 23,40 (C-11,11'); 42,46 (C-10); 64,18 (C-4); 73,90 (C-2); 126,83 (C-7,7'); 128,30 (C-8,8'); 130,33 (C-9); 141,39 (C-6); 168,12 (C-3); 186,21 (C-1).</p>

*A numeração acima, foi utilizada apenas para atribuição de sinais.

2.2- Síntese de Sistemas Heterocíclicos Polifuncionalizados

O nosso grupo de pesquisa vem efetuando o estudo da reatividade de inúmeros compostos β -enamino carbonílicos substituídos frente a dinucleófilos tais como, hidrazina, metil hidrazina, fenil hidrazina, cloridrato de hidroxilamina e cloridrato de semicarbazida visando a obtenção de sistemas heterocíclicos polifuncionalizados e o estudo da regioquímica destes compostos nas reações de ciclização. A obtenção de anéis heterocíclicos nitrogenados através de moléculas pequenas funcionalizadas se caracteriza como um importante campo de estudos dentro da química orgânica, sendo de grande interesse devido a suas características bioativas.

É essencial salientar que a reatividade dos compostos β -enamino carbonílicos deve-se a polifuncionalidade de seu esqueleto básico demonstrado na Figura 9, apresentando um grupo amino na posição β , um carbono carbonílico (que poderá ser de cetona ou de éster dependendodo R^3) e uma insaturação α ao carbono carbonílico, que os torna versáteis intermediários sintéticos.

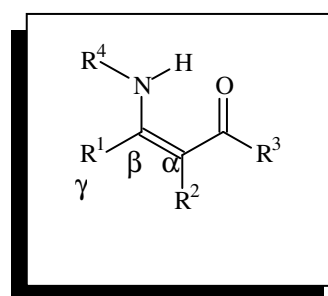


Figura 9- Estrutura básica de β -enamino carbonílico

Dessa forma é possível avaliar a reatividade destes centros através de reações com eletrófilos e nucleófilos, ou seja, reações de acilação,²⁷ halogenação,⁴⁸ redução e ciclização. A introdução de diferentes substituintes nas posições α , β e γ de β enamino cetonas e ésteres (R^3 = alquil, aril e OEt respectivamente), bem como a variação dos substituintes no nitrogênio do grupo amino (R^4), vem sendo alvo de estudo por nosso grupo.

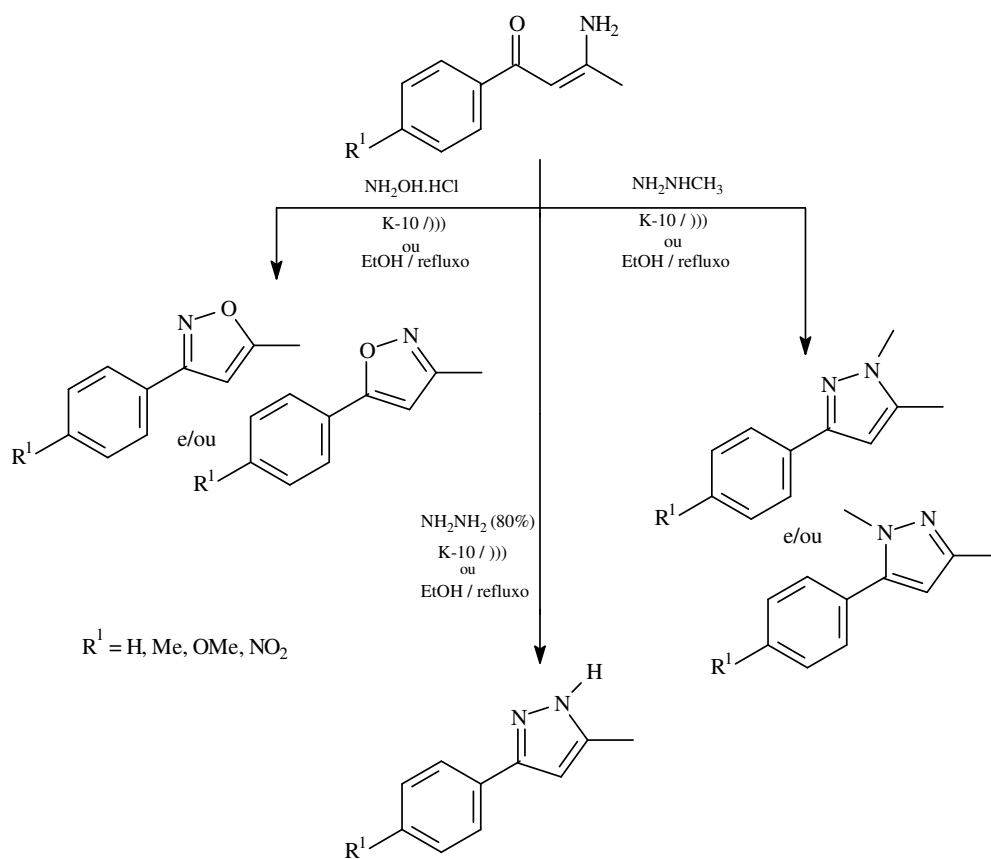
Descreveremos a seguir, alguns resultados obtidos em nossos laboratórios, envolvendo os sítios eletrofílicos dos β -enamino compostos substituídos frente a dinucleófilos.

Braibante e col.⁴⁹ estudaram a reatividade de compostos β -enamino carbonílicos (cetona e éster) α -acilados com hidrazina e cloridrato de hidrazina obtendo uma série de sistemas pirazólicos. As reações demonstram-se dependentes do meio reacional, bem como do tipo do substrato ($Y = O$ ou $Y = S$) conforme os Esquemas 17 e 18.

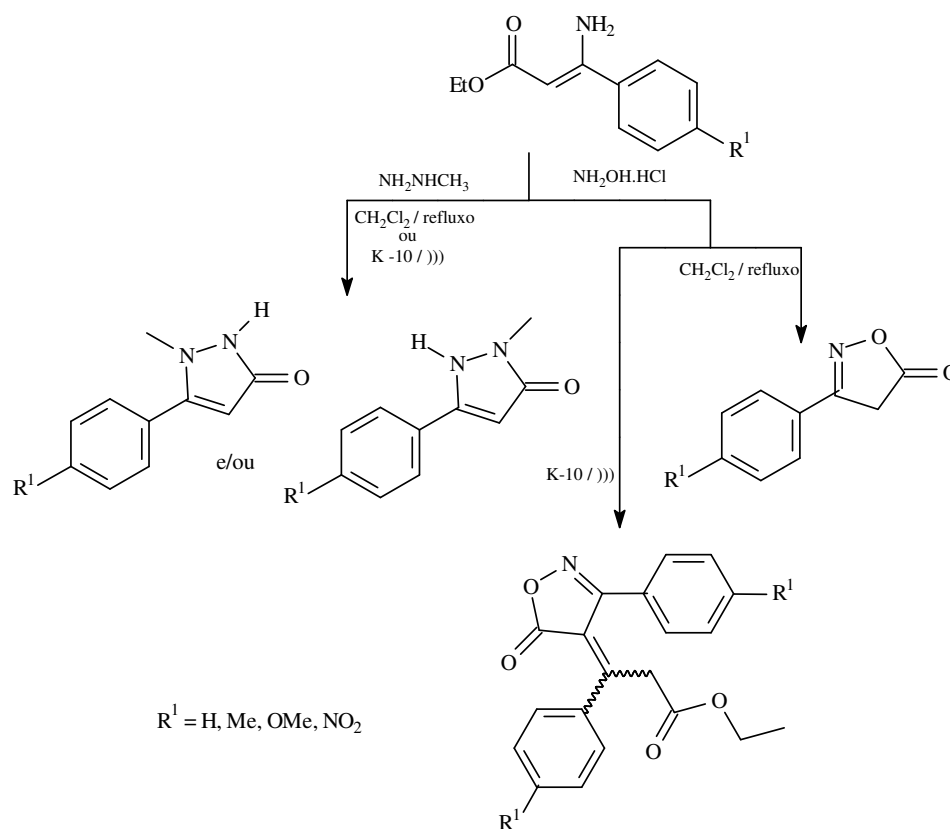
⁴⁸ Braibante, M.E.F.; Braibante, H.T.S.; Rosso, G. B.; Roza, J. K. *Synthesis* **2001**, 13, 1935.

⁴⁹ Braibante, M. E. F.; Braibante, H. T. S.; Missio, L. J. *J. Heterocycl. Chem.* **1996**, 33, 1243.

A partir da ciclização de compostos β -enamino carbonílico *p*-fenil substituídos com hidrazina, metil hidrazina e cloridrato de hidroxilamina, Esquemas 19 e 20, Braibante e col.³⁻⁴ sintetizaram heterociclos *p*-fenil substituídos do tipo pirazóis, isoxazóis, N-metil pirazolonas e isoxazolinonas. As reações foram realizadas em meio homogêneo, refluxo em etanol, e em suporte sólido montmorillonita (K-10), onde a regioquímica na ciclização mostrou dependência das condições reacionais empregadas, bem como dos substituintes no anel aromático.

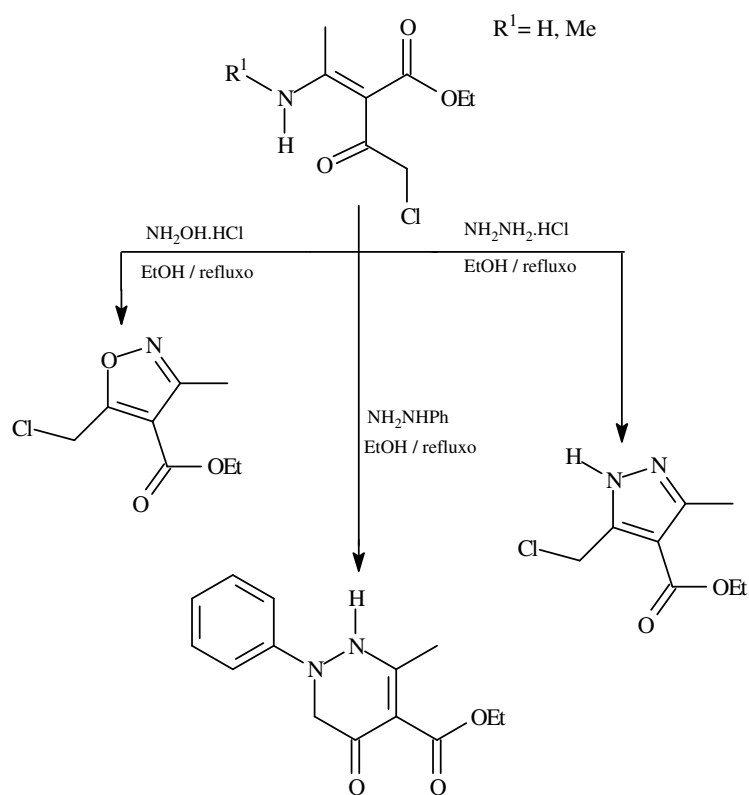


Esquema 19- Obtenção de pirazóis e isoxazóis a partir de enaminonas *p*-fenil substituídas.



Esquema 20- Obtenção de N-metil pirazolonas e isoxazolinonas a partir de β -enamino ésteres *p*-fenil substituídos.

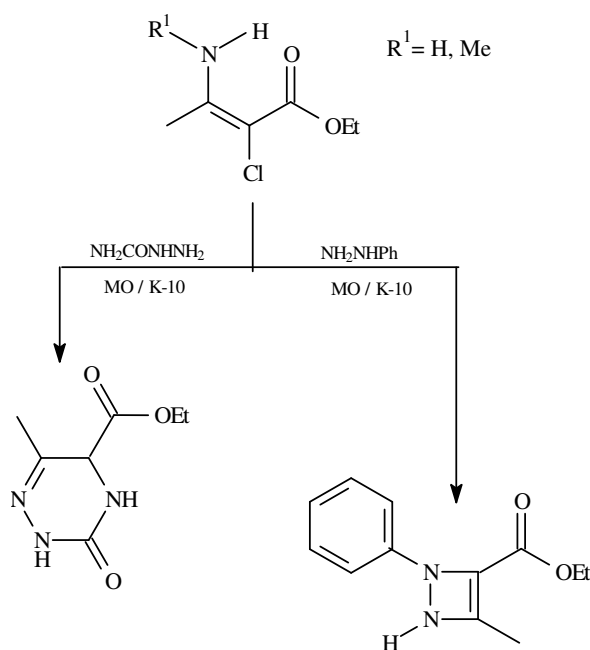
Em outro estudo, o nosso grupo de pesquisa⁵ avaliou o padrão de reatividade de β -enamino ésteres α -cloroacetilados frente a hidrazina, fenil hidrazina e hidroxilamina, Esquema 21 obtendo-se piridazinas, pirazóis e isoxazóis. A regioquímica foi dependente da substituição na posição α dos enamino ésteres, visto que a ciclização com cloridratos de hidrazina e hidroxilamina ocorreu no carbono carbonílico desse grupo acetila pelo ataque do nitrogênio e com a fenil hidrazina ocorreu no carbono metilênico deste mesmo grupo pelo ataque do nitrogênio substituído com perda do cloro.



Esquema 21- Obtenção de pirazóis, isoxazóis e piridazinas a partir de β -enamino ésteres α -cloroacetilados.

Braibante e col.⁵⁰ sintetizaram também triazinona e diazetina a partir de β -enamino ésteres α -clorados frente a semicarbazida e fenil hidrazina, respectivamente, utilizando metodologia de reações em meio heterogêneo associado a irradiação de microondas. Constatou-se que a presença do cloro na posição α dos enamino ésteres influenciou a regioquímica dos compostos obtidos (Esquema 22).

⁵⁰ Oriques, Daniela Alves. “Dissertação de Mestrado” 2006, UFSM, Santa Maria.



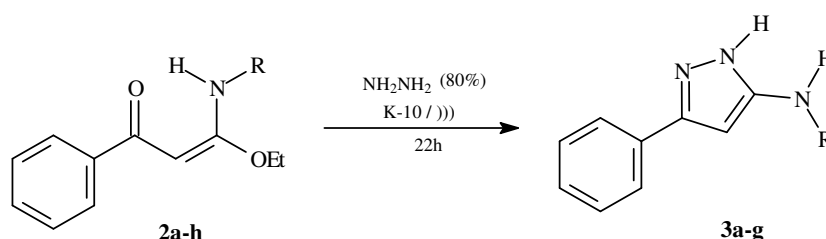
Esquema 22- Obtenção de triazinona e diazetina a partir de β -enamino ésteres α -clorados.

O nosso grupo de pesquisa obteve com sucesso, conforme já descrito, diferentes classes de heterociclos a partir de compostos enamino carbonílicos funcionalizados com dinucleófilos onde o grupo amino de todos os β -enamino compostos de partida, independente do substituinte no nitrogênio, foi substituído na ciclização.

O presente estudo visa a obtenção de uma série de compostos heterocíclicos do tipo pirazóis que incorporem o grupo amino do enamino composto precursor. A literatura tem descrito algumas rotas sintéticas para obtenção de sistemas amino pirazólicos, porém são métodos específicos onde não ocorre a formação direta do heterociclo com o nitrogênio substituído.⁵⁵⁻⁵⁶

2.2.1-Reações entre α -Oxocetenos O,N-acetais **2a-h** e Hidrazina

Os α -oxocetenos O,N-acetais **2a-h** possuem dois centros eletrofílicos diferenciados: o carbono carbonílico e o carbono β . A reação dos compostos **2a-h** frente ao dinucleófilo hidrazina utilizando montmorillonita como suporte sólido associado ao uso de ultra-som forneceu os heterociclos 5(3)-amino substituídos 3(5)-fenil 1H-pirazóis **3a-g**, preservando o grupo amino dos respectivos O,N-acetais de partida (Esquema 23). O heterociclo **3h** requerido não foi isolado a partir do O,N-acetal **2h** (R= *i*-Pr) nas condições empregadas, provavelmente devido ao substituinte volumoso isopropila que dificulta estericamente o ataque efetivo do dinucleófilo ao sítio eletrofílico β .

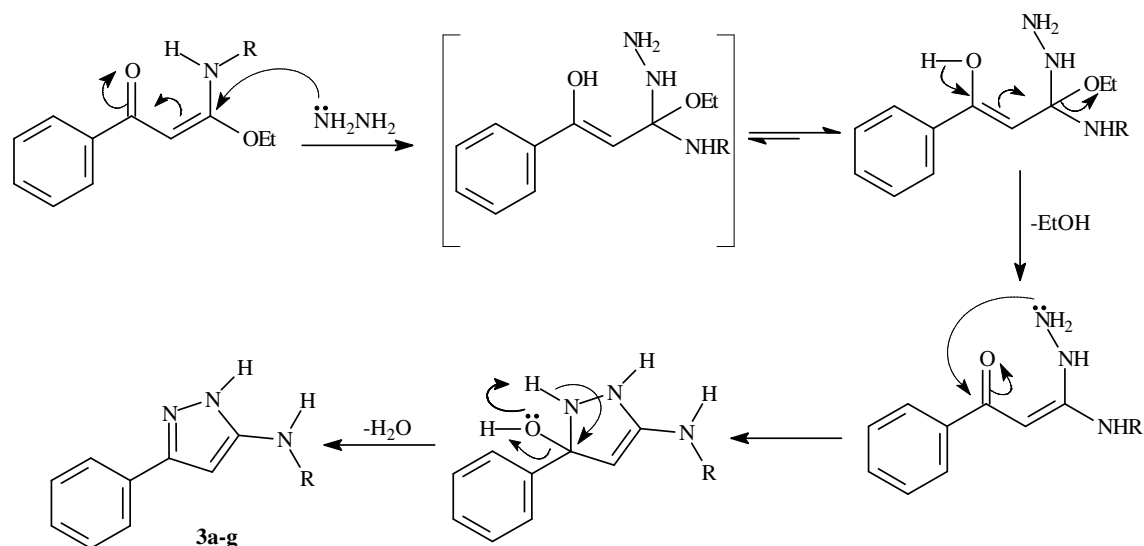


3	a	b	c	d	e	f, g
R	H	CH ₃	Alil	Ph	Bn	CH(CH ₃)Ph
%	45	54	50	56	45	51, 40

Esquema 23- Obtenção dos amino pirazóis **3a-g** em meio heterogêneo, onde **3f** apresenta o substituinte [(R)(+)- α -CH(CH₃)Ph] e **3g** o enantiômero [(S)(-)- α -CH(CH₃)Ph].

Utilizando estas condições, o processo de ciclização do anel pirazólico ocorreu de acordo com as regras de Baldwin⁵¹ resultando no produto *5-exo-trig* favorecido para anéis de cinco membros envolvendo centros trigonais. O mecanismo proposto para a formação dos compostos **3a-g**, é descrito no Esquema 24 e demonstra o ataque do par de elétrons do nitrogênio do dinucleófilo hidrazina ao carbono β , ocorrendo eliminação do grupo etóxi com posterior ciclização.

⁵¹ Baldwin, J. E. *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* **1976**, 734.



Esquema 24- Mecanismo proposto para obtenção dos amino pirazóis **3a-g**.

A síntese de núcleos pirazólicos é bastante requerida devido a suas expressivas características farmacológicas, sendo descritos como agentes terapêuticos no tratamento de alterações circulatórias tal como a trombose,⁵² apresentando ação anti-inflamatória⁵³ e anti-tumoral/anti-viral.⁵⁴ Contudo, a literatura tem descrito poucos exemplos de obtenção de amino pirazóis, onde as rotas são específicas não obtendo diretamente pirazóis amino N-substituído.

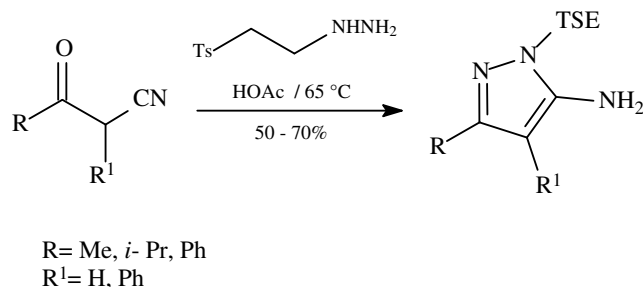
Dastrup e col.⁵⁵ efetuaram reações de β -cetonitrilas com β -tosiletilhidrazina na presença de ácido acético glacial gerando regioseletivamente 5-amino pirazóis N-*p*-tosil etil (TSE) protegidos (Esquema 25). A desproteção destes heterociclos conduz a obtenção exclusivamente de 5-amino pirazóis.

⁵² Vijaykumar, D.; Sprengeler, P.A.; Shaghafi, M.; Spencer, R.; Katz, B.A.; Yu, C.; Rai, R.; Young, W.B.; Schultz, B.; Janc, J. *Bioorg. Méd. Chem. Lett.* **2006**, 16, 2796.

⁵³ Menozi, G.; Mosti, L.; Fossa, P.; Mattioli, F.; Ghia, M. *J. Heterocycl. Chem.* **1997**, 34, 963.

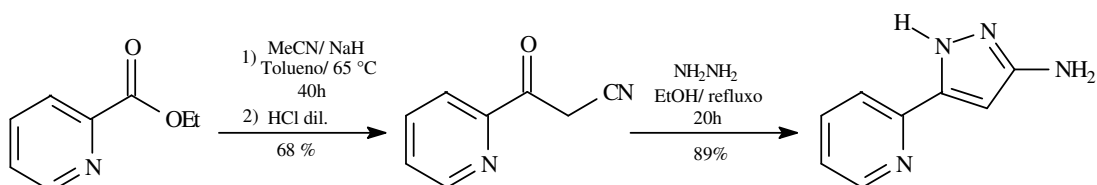
⁵⁴ Manfredini, S.; Bazzanini, R.; Baraldi, P.G.; Guarneri, M.; Simoni, D.; Marongiu, M.E.; Pani, A.; Tramontano, E.; Colla, P.L. *J. Med. Chem.* **1992**, 35, 917.

⁵⁵ Dastrup, D. M.; Yap, A. H.; Weinreb, S. M.; Henry, J. R.; Lechleiter, A. J. *Tetrahedron* **2004**, 60, 901.



Esquema 25- Obtenção de 5-amino pirazóis protegidos.

Outro exemplo é descrito por Pask e col.⁵⁶ sendo a síntese de 3(5)-amino 5(3)-(2-piridil) 1H-pirazol a partir da respectiva nitrila com hidrato de hidrazina usando etanol como solvente (Esquema 26). A nitrila foi obtida através da reação do reagente comercial etil picolinato com MeCN usando como base hidreto de sódio. O exclusivo amino pirazol obtido foi posteriormente submetido a reações frente a diferentes eletrófilos.



Esquema 26- Obtenção de 3(5)-amino 5(3)-(2-piridil) 1H-pirazol.

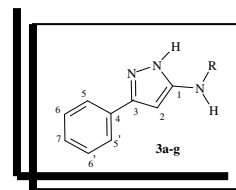
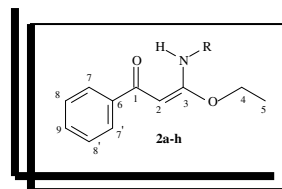
Nós obtivemos satisfatoriamente uma série de pirazóis amino N-substituído **3a-g** a partir dos O,N-acetais **2a-h** empregando a metodologia de reações sob suporte sólido, K-10, que por sua vez proporcionou condições brandas de reação e fácil isolamento.

De acordo com os dados espectroscópicos de RMN de ^1H e ^{13}C em CDCl_3 (Figuras 32 a 40, páginas 108 a 116) foram comprovadas as estruturas dos amino pirazóis **3a-g** e os respectivos deslocamentos químicos estão listados na Tabela 2.

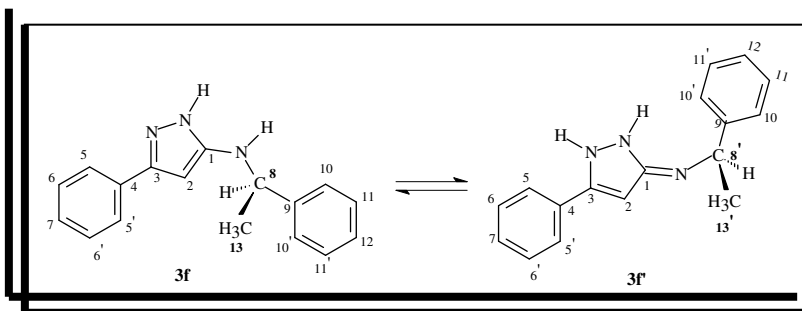
⁵⁶ Pask, C. M.; Camm, K. D.; Kilner, C. A.; Halcrow, M. A. *Tetrahedron Letters* **2006**, 47.

Através da análise dos espectros de RMN de ^1H dos compostos **3a-g**, pode-se observar o desaparecimento do tripleto na região entre 1,21-1,41 ppm e do quarteto em 4,03-4,22 ppm, sinais atribuídos ao grupo etóxi dos compostos de partida **2a-h**.

Nos espectros RMN de ^{13}C dos compostos **3a-g** observou-se que o C-1 aparece em 149,52-157,57 ppm indicando que ocorreu o ataque da hidrazina nos compostos de partida com posterior perda do grupo etóxi, pois este carbono numerado como C-3 nos precursores **2a-h** apresentava deslocamento químico na região entre 165,97-169,57 ppm. Pode-se detectar também, que o C-3 aparece na região entre 143,65-146,15 ppm característico de carbono insaturado de pirazol, sendo que este carbono estabelecido como C-1 (carbono carbonílico) nos precursores **2a-h** apresentava deslocamento químico de 186,21-187,51 ppm indicando que ocorreu a ciclização com posterior eliminação de água.



Para o heterociclo **3f** onde $\text{R} = (\text{R})(+)\text{-CH}(\text{CH}_3)\text{Ph}$, foi observado duas formas tautoméricas nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C (Figura 37, página 113). No espectro de RMN de ^1H foram detectados sinais duplicados para o hidrogênio metínico do grupo



quiral $[\text{CH}(\text{CH}_3)\text{Ph}]$ como um quinteto em 5,24 ppm (H-8) e um quarteto em 4,53 ppm (H-8') correspondendo às formas **3f** e **3f'**, respectivamente.

No espectro de RMN de ^{13}C o carbono assimétrico do grupo quiral $[\text{CH}(\text{CH}_3)\text{Ph}]$ apresentou diferentes deslocamentos químicos para as estruturas tautoméricas, 47,59 ppm (C-8) para **3f** e 54,75 ppm (C-8') para **3f'**, já o carbono metílico apareceu na região de 21,62 ppm (C-13) e 24,45 ppm (C-13') para **3f** e **3f'**, respectivamente.

Pela análise de RMN bidimensional heteronuclear HMQC (Figura 10) que mostra a correlação de ^1H - ^{13}C foi possível detectar a correlação entre os hidrogênios metílicos (H-13 e H-13') com o respectivo carbono metílico (C-13 e C-13') do grupo quiral $[\text{CH}(\text{CH}_3)\text{Ph}]$, para as formas tautoméricas **3f** e **3f'** respectivamente. Também pode-se observar a correlação entre o hidrogênio do centro quiral (H-8 e H-8') das formas tautoméricas **3f** e **3f'** com o respectivo carbono quiral (C-8 e C-8'). Outra constatação foi à correlação entre o hidrogênio vinílico (H-2) com o carbono vinílico (C-2) para ambas estruturas tautoméricas **3f** e **3f'**.

Pela análise de RMN bidimensional heteronuclear HMBC (Figura 11) que mostra a correlação de ${}^{2-4}J$ H-C foi possível confirmar os deslocamentos químicos de todos os ${}^1\text{H}$ e ${}^{13}\text{C}$ presentes nas formas tautoméricas **3f** e **3f'**. Observou-se a correlação entre os hidrogênios metílicos (H-13 e H-13') do grupo quiral $[\text{CH}(\text{CH}_3)\text{Ph}]$ com o carbono quiral (C-8 e C-8'), para as formas tautoméricas **3f** e **3f'** respectivamente. Outra correlação existente foi entre os hidrogênio metínico (H-8 e H-8') do grupo quiral $[\text{CH}(\text{CH}_3)\text{Ph}]$ com o carbono metílico (C-13 e C-13') para as estruturas tautoméricas **3f** e **3f'** respectivamente. Também foi possível identificar a correlação entre o hidrogênio metínico (H-8) ligado ao carbono quiral (C-8) da estrutura tautomérica **3f** com o C-2, a correlação entre o hidrogênio metínico (H-8') ligado ao carbono quiral (C-8') da estrutura tautomérica **3f'** com os carbonos quaternários (C-1) e (C-3). Outra correlação evidenciada foi entre os hidrogênios metílicos (H-13 e H-13') do grupo quiral $[\text{CH}(\text{CH}_3)\text{Ph}]$ com o carbono aromático (C-9) do mesmo grupo quiral $[\text{CH}(\text{CH}_3)\text{Ph}]$.

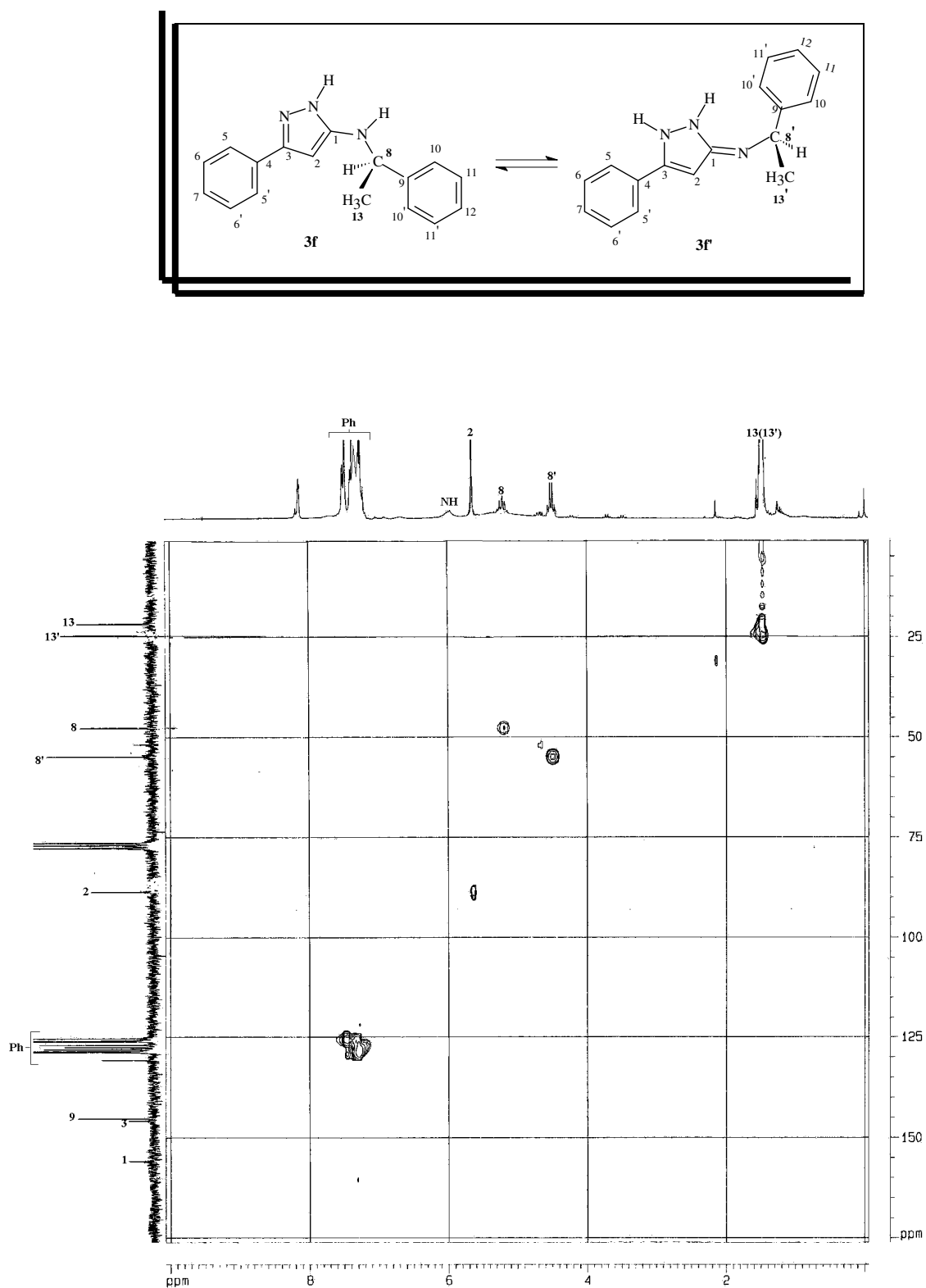


Figura 10- Espectro de RMN de HMQC a 400 MHz em CDCl₃ dos tautômeros **3f** (**3f'**).

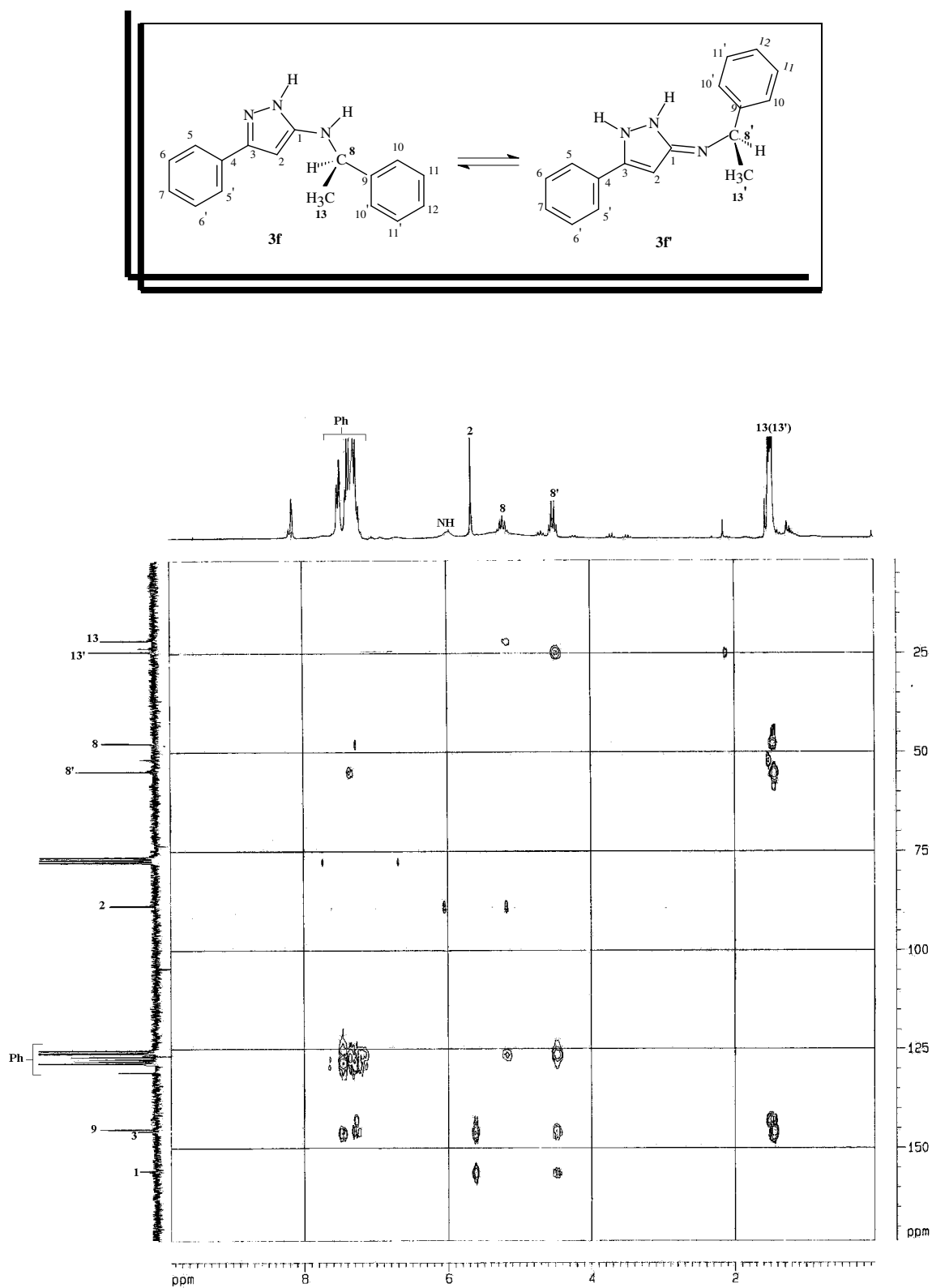
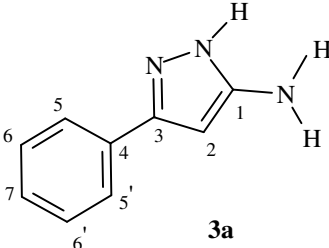
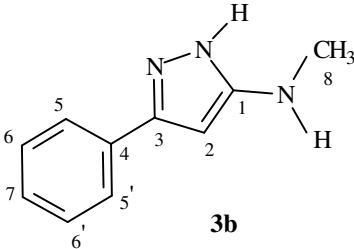
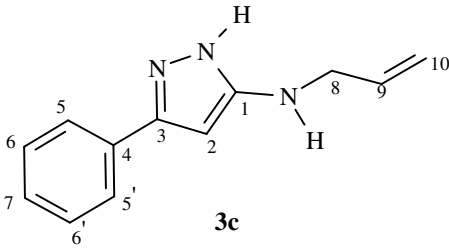
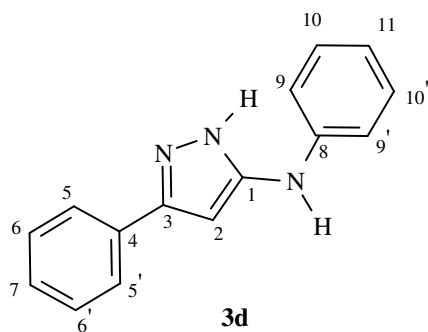


Figura 11- Espectro de RMN de HMBC a 400 MHz em CDCl₃ dos tautômeros **3f** (**3f'**).

Tabela 2 – Dados espectroscópicos de ^1H e ^{13}C dos Amino pirazóis 3a-g

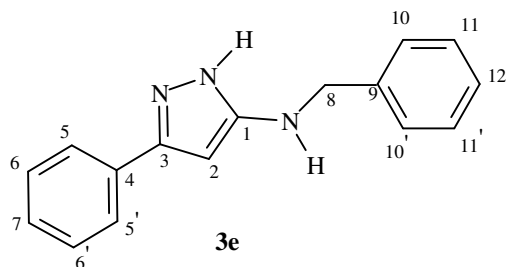
Estrutura*/Composto	RMN ^1H (CDCl_3 / TMS) δ (ppm), J (Hz)	RMN ^{13}C (CDCl_3 / TMS) δ (ppm)
 <p style="text-align: center;">3a</p>	4,32 (sl, 3H, NH_2 , NH); 5,39 (s, 1H, CH, H-2); 7,23-7,66 (m, 5H, CH, Ph).	88,72 (C-2); 124,88 (C-5,5'); 127,40 (C-7); 128,23 (C-6,6'); 130,50 (C-4); 145,56 (C-3); 153,02 (C-1).
 <p style="text-align: center;">3b</p>	2,80 (s, 3H, CH_3 , H-8); 5,80 (s, 1H, CH, H-2); 6,90 (sl, 2H, NH); 7,23-7,59 (m, 5H, CH, Ph).	31,76 (C-8); 87,38 (C-2); 125,43 (C-5,5'); 127,97 (C-7); 128,68 (C-6,6'); 130,86 (C-4); 146,14 (C-3); 157,57 (C-1).
 <p style="text-align: center;">3c</p>	3,73-3,75 (m, 2H, CH_2 , H-8); 5,07-5,08 (m, 1H, CH_2 , H-10); 5,10-5,11 (m, 1H, CH_2 , H-10); 5,82 (s, 1H, CH, H-2); 5,87-5,97 (m, 1H, CH, H-9); 7,23-7,58 (m, 5H, CH, Ph).	49,13 (C-8); 87,04 (C-2); 115,80 (C-10); 125,44 (C-5,5'); 128,01 (C-7); 128,62 (C-6,6'); 130,75 (C-4); 135,71 (C-9); 146,10 (C-3); 156,41 (C-1).

Continuação da Tabela 2



6,30 (sl, 2H, NH);
 6,31 (s, 1H, CH, H-2);
 6,79-7,72 (m, 10H, CH, Ph).

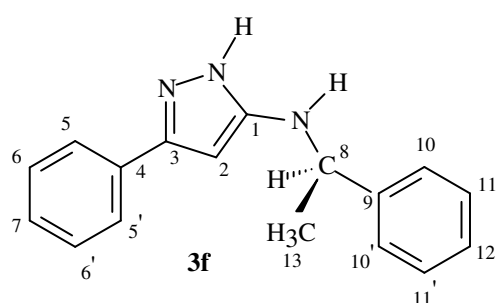
88,75 (C-2);
 114,74 (C-9,9');
 118,33 (C-11);
 124,37 (C-5,5');
 127,19 (C-7);
 127,66 (C-10,10');
 127,88 (C-6,6');
 128,80 (C-4);
 142,14 (C-8);
 143,65 (C-3);
 149,52 (C-1).



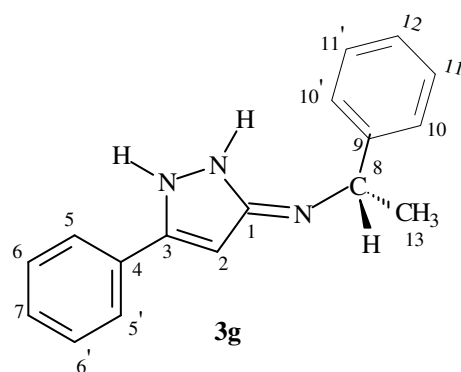
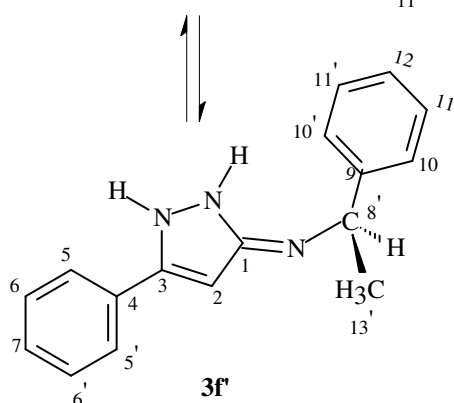
4,19 (s, 2H, H-8);
 5,72 (s, 1H, CH, H-2);
 7,17-7,53 (m, 10H, CH, Ph).

49,13 (C-8); 87,55 (C-2);
 125,43 (C-5,5');
 126,93 (C-12);
 127,33 (C-10,10');
 127,90 (C-7);
 128,32 (C-11,11');
 128,61 (C-6,6');
 130,64 (C-4);
 139,43 (C-9);
 146,07 (C-3);
 156,42 (C-1).

Continuação da Tabela 2



1,48 (d, 3H, CH₃, *J*=6,8, H-13); 21,62 (C-13);
 1,52 (d, 3H, CH₃, *J*=6,8, H-13'); 24,45 (C-13');
 4,53 (q, 1H, CH, *J*=6,8, H-8'); 47,59 (C-8); 54,75 (C-8');
 5,24 (qui, 1H, CH, *J*=6,8, H-8); 88,58 (C-2);
 5,54 (s, 1H, CH, H-2); 125,32 (C-12);
 5,98 (sl, 1H, NH); 125,95 (C-5,5');
 7,17-7,50 (m, 10H, CH, Ph). 126,13 (C-10,10');
 127,51 (C-7);
 128,05 (C-6,6');
 128,72 (C-11,11');
 130,69 (C-4);
 145,20 (C-9);
 145,70 (C-3);
 155,81 (C-1).



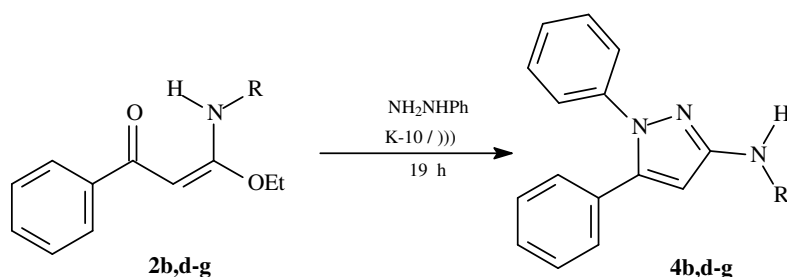
1,45 (d, 3H, CH₃, *J*=6,8, H-13); 24,47 (C-13); 54,74 (C-8);
 4,46 (q, 1H, CH, *J*=6,8, H-8); 88,38 (C-2);
 5,59 (s, 1H, CH, H-2); 125,42 (C-12);
 6,34 (sl, 1H, NH); 125,91 (C-5,5');
 7,27-7,50 (m, 10H, CH, Ph). 126,90 (C-10,10');
 128,04 (C-7);
 128,51 (C-6,6');
 128,70 (C-11,11');
 130,72 (C-4);
 145,12 (C-9);
 145,89 (C-3);
 155,61 (C-1).

*A numeração acima, foi utilizada apenas para atribuição de sinais.

2.2.3-Reações entre α -Oxocetenos O,N-acetais **2b,d-g** e Fenil Hidrazina

Com o objetivo de avaliarmos a regioquímica de alguns O,N-acetais sintetizados neste trabalho bem como obter heterociclos polifuncionalizados efetuamos as reações de ciclização com fenil hidrazina empregando a metodologia em meio heterogêneo, obtendo-se 3-amino substituídos 1,5-difenil pirazóis.

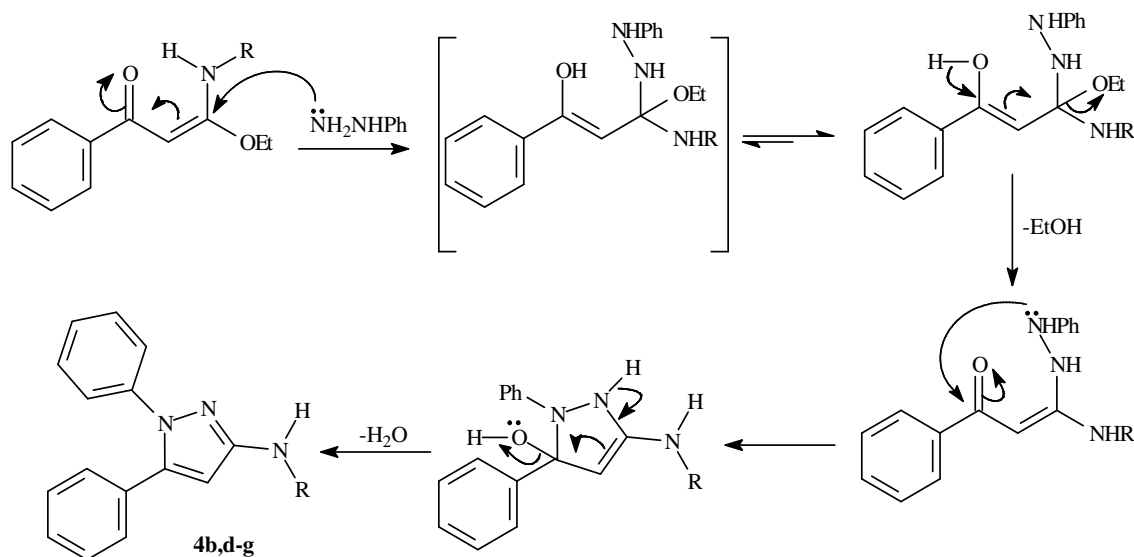
A série de N-fenil amino pirazóis **4b,d-g** foi obtida seletivamente pela reação entre α -oxocetenos O,N-acetais **2b,d-g** e fenil hidrazina usando suporte sólido, K-10, associado ao uso de ultra-som, conforme o Esquema 27.



4	b	d	e	f, g
R	CH ₃	Ph	Bn	CH(CH ₃)Ph
%	38	43	19	10, 21

Esquema 27- Obtenção regioseletiva dos amino pirazóis **4b,d-g** em meio heterogêneo, onde **4f** apresenta o substituinte [(R)(+)- α -CH(CH₃)Ph] e **4g** o enantiômero [(S)(-)- α -CH(CH₃)Ph].

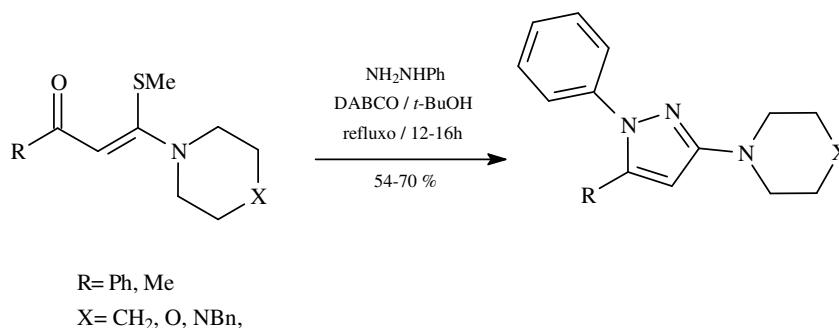
O fechamento do anel pirazólico dos compostos **4b,d-g**, da mesma forma que seus análogos amino pirazólicos **3a-g**, ocorreu de acordo com as regras de Baldwin resultando no produto *5-exo-trig*. A seguir está demonstrado (Esquema 28) o mecanismo proposto para a formação dos heterociclos **4b,d-g**, que consiste no ataque inicial do par de elétrons do nitrogênio não substituído da fenil hidrazina ao carbono β , com perda do grupo etóxi seguido pela ciclização através do ataque do par de elétrons do nitrogênio substituído ao carbono carbonílico.



Esquema 28- Mecanismo proposto para obtenção dos N-fenil 3-amino pirazóis **4b,d-g**.

O emprego da metodologia sob suporte sólido, o argilo mineral K-10 na obtenção dos pirazóis N-fenil 3-amino substituído a partir de O,N-acetais foi eficiente proporcionando seletividade e condições brandas de reação, enquanto que na literatura⁵⁷ somente obtiveram sistemas semelhantes a esta classe de compostos com controle regioseletivo quando utilizaram condições reacionais especiais, altas temperaturas e base específica, como descrito a seguir.

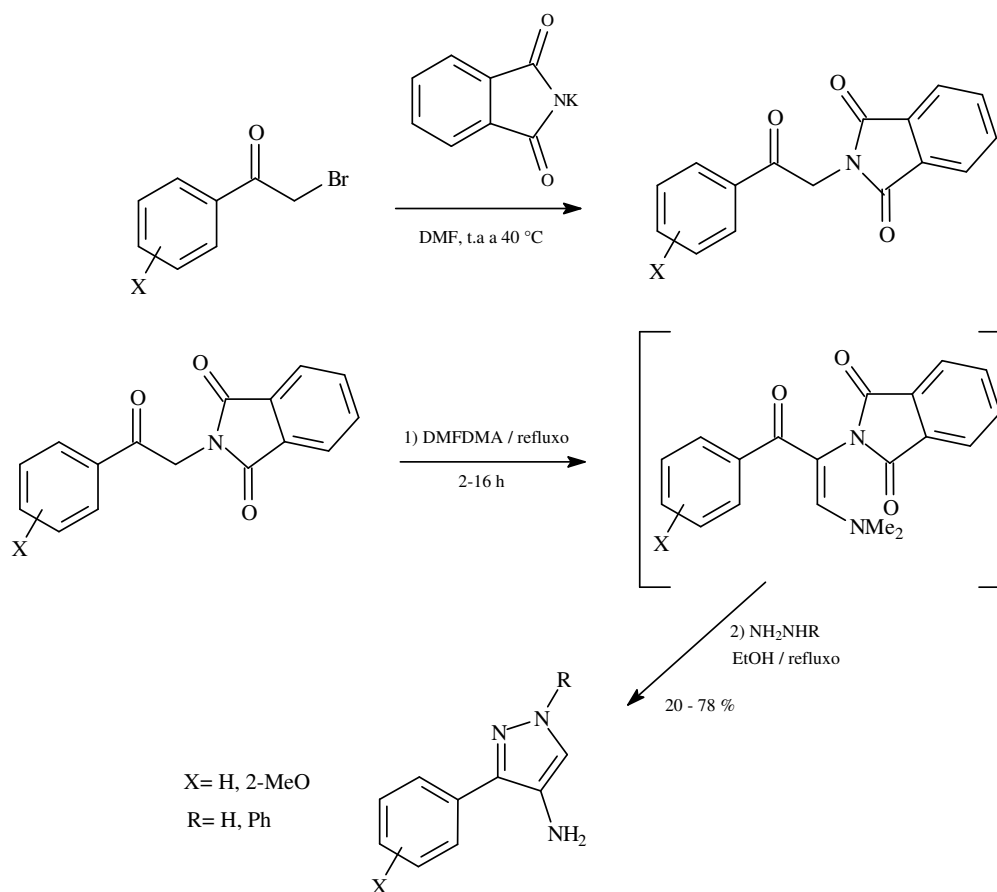
Os heterociclos pirazólicos N-fenil 3-cicloamino substituído foram obtidos a partir de N,S-acetais com fenil hidrazina utilizando como base DABCO e como solvente terc-butanol conforme o Esquema 29.



Esquema 29- Obtenção regioseletiva de N-fenil 3-cicloamino substituído pirazóis em meio homogêneo.

⁵⁷ Peruncheralathan, S.; Yadav, A. K.; Ila, H.; Junjappa, H. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 9644.

Em outro estudo, Chen e col.⁵⁸ obtiveram N-fenil 4-amino pirazóis a partir da reação de α -ftaloilaminoacetofenona em um processo “one pot” com N,N-dimetilformamida dimetil acetal (DMFDMA) em refluxo gerando a enamina intermediária, que foi submetida seqüencialmente a reação de ciclização frente a fenil hidrazina (R=Ph) utilizando etanol como solvente formando os respectivos amino pirazóis. A α -ftaloilaminoacetofenona foi sintetizada a partir de α -bromo acetofenona substituída com o sal de ftalamida com DMF (Esquema 30). O inconveniente da rota sintética desenvolvida é o fato desta ser limitada a obtenção de pirazóis do tipo amino não substituído no nitrogênio e também a necessidade de altas temperaturas.



Esquema 30- Obtenção de N-fenil 4-amino pirazóis a partir de ftaloilaminoacetofenona em sistema “one-pot”.

⁵⁸ Chen, C.; Wilcoxon, K.; McCarthy, J. C. *Tetrahedron Letters* **1998**, 39, 8229.

A literatura descreve⁵⁹ uma rota versátil para obtenção de N-fenil 5-amino pirazóis, porém de custo elevado quando comparamos a nossa promissora metodologia de reações sob suporte sólido aplicada a obtenção de sistemas heterocíclicos semelhantes, como relatamos anteriormente. A estratégia sintética para a obtenção de N-fenil 5-amino pirazóis

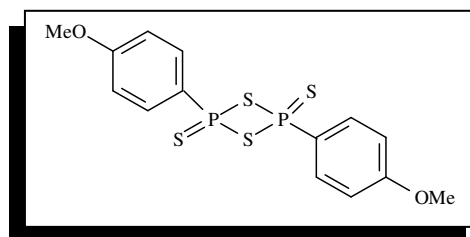
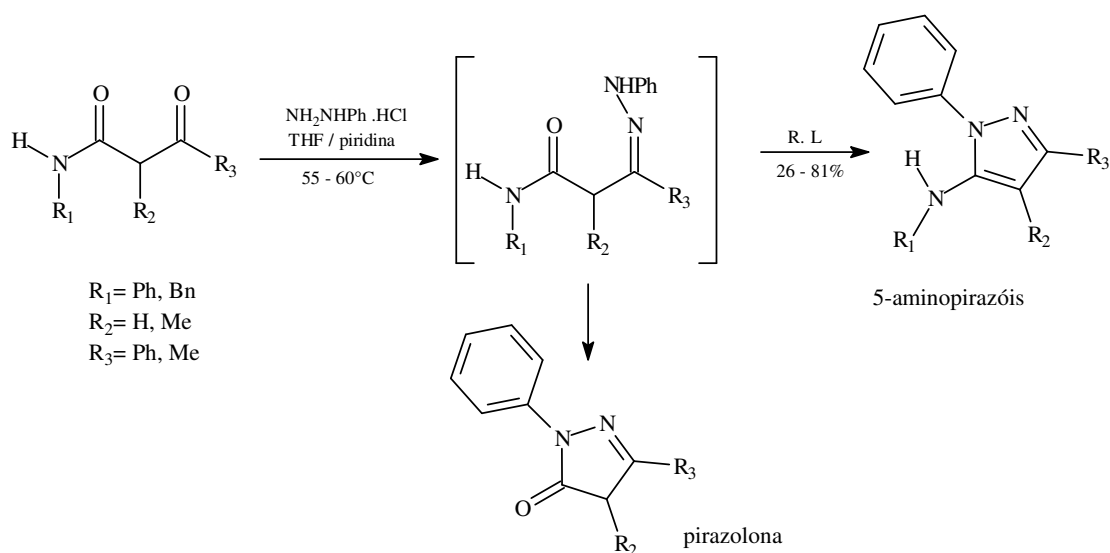


Figura 12- Estrutura do Reagente de Lawesson

consiste na reação de β -cetoamidas com cloridrato de fenil hidrazina na presença do reagente de Lawesson (R.L) em THF/piridina em um processo de uma única etapa. A obtenção dos 5-amino pirazóis ocorreu pela formação inicial da hidrazona intermediária seguida pela reação do carbono da amida com o reagente de Lawesson gerando β -cetotioamida e posterior ciclização (Esquema 31). Foi identificado nestas condições reacionais a formação dos heterociclos do tipo pirazolonas a partir da hidrazona intermediária, este produto lateral ocasionou, em geral, no decréscimo do rendimento dos correspondentes 5-amino pirazóis.



Esquema 31- Obtenção de N-fenil 5-amino pirazóis a partir de β -cetoamidas em sistema “one-pot”.

⁵⁹ Dodd, D. S.; Martinez, R. L. *Tetrahedron Letters* **2004**, 45, 4265.

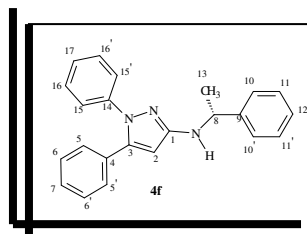
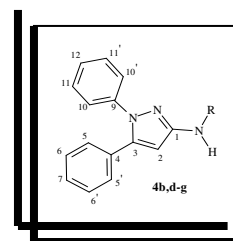
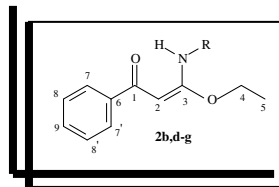
As estruturas dos compostos **4b,d-g** foram identificadas baseadas na análise dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C em CDCl_3 (Figuras 41 a 44, páginas 117 a 120) e cujos respectivos deslocamentos químicos estão listados na Tabela 3, bem como através da cristalografia de raio-X **4b** e **4e** Figura 13 e Anexo I.

Nos espectros de RMN de ^1H dos compostos **4b,d-g**, foi possível observar o desaparecimento do tripleto e quarteto característicos do grupo etóxi dos precursores **2b,d-g**. O aumento no número de sinais observado é relativo aos hidrogênios aromáticos que aparecem na região entre 6,19-7,42 ppm, devido a presença de mais um grupo fenila na estrutura no N-1 do anel pirazólico.

Enquanto que na análise dos espectros RMN de ^{13}C dos compostos **4b,d-g**, verificou-se uma proteção no deslocamento químico do C-1 e C-3. O C-1 aparece na região entre 151,97-157,62 ppm e nos precursores **2b,d-g** apresentava-se na região entre 165,97-169,57 ppm como C-3, indicando que ocorreu o ataque nucleofílico do par de elétrons do nitrogênio não substituído da fenil hidrazina neste sítio reativo com eliminação da etoxila. Já o C-3 aparece na região entre 143,60-144,14 ppm e nos precursores **2b,d-g** aparecia entre 186,21 e 187,51 ppm correspondente ao carbono carbonílico.

Pelo espectro de RMN bidimensional homonuclear NOESY $J\text{H-H}$ (Figura 45, página 121), o qual indica a correlação entre hidrogênios através de aproximações espaciais, não observou-se para o composto **4f** onde $\text{R} = (\text{R})(+)\text{-CH}(\text{CH}_3)\text{Ph}$ a correlação entre os hidrogênios aromáticos da fenila do grupo quiral com os hidrogênios metílicos (H-13) ou com hidrogênio metínico (H-8). A única correlação observada foi entre H-8 e H-13.

Através da cristalografia de raio-X dos compostos **4b** ($\text{R} = \text{Me}$) e **4e** ($\text{R} = \text{Bn}$) conforme a Figura 13, as estruturas foram totalmente elucidadas comprovando que a fenila ligada ao nitrogênio do anel pirazólico, posição 1, está vizinho a fenila que se encontra na posição 5 do anel pirazólico, confirmando o mecanismo proposto para a série de heterociclos **4b,d-g**.



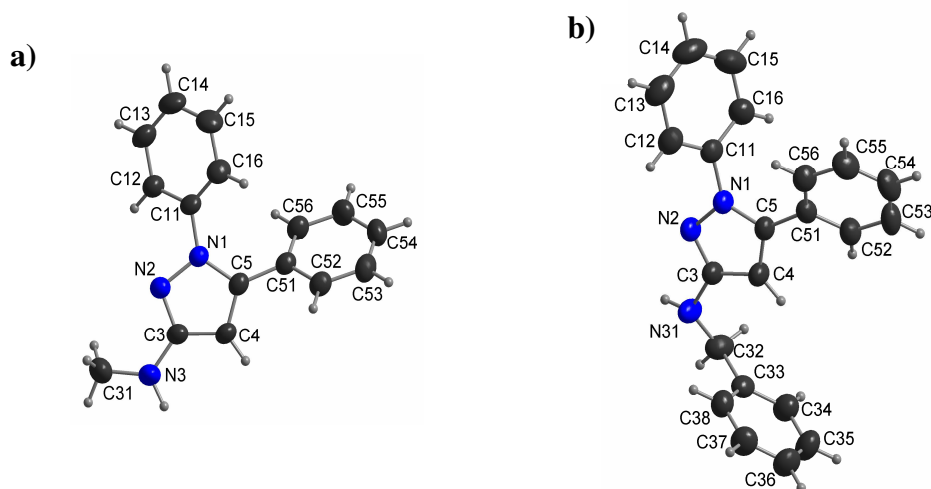
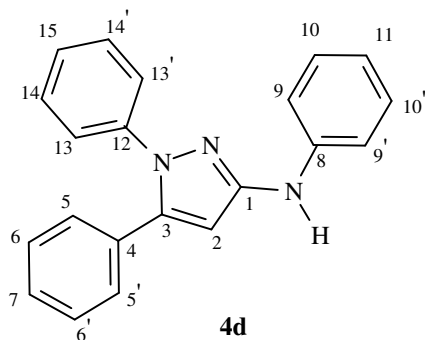


Figura 13- Estrutura de raio-X a) composto **4b** b) composto **4e**.

Tabela 3 – Dados espectroscópicos de ^1H e ^{13}C dos N-fenil Amino pirazóis **4b,d-g**

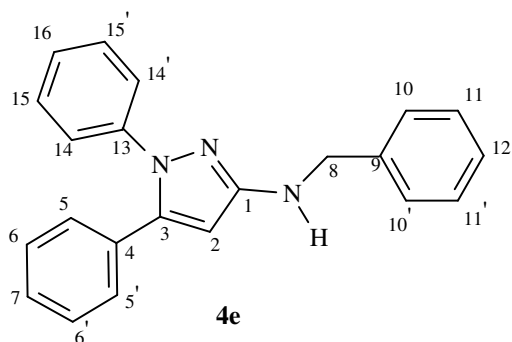
Estrutura*/Composto	RMN ^1H (CDCl_3/TMS) δ (ppm), J (Hz)	RMN ^{13}C (CDCl_3/TMS) δ (ppm)
<p>4b</p>	2,93 (s, 3H, CH_3 , H-8); 3,94 (sl, 1H, NH); 5,92 (s, 1H, CH, H-2); 7,19-7,28 (m, 10H, CH, Ph).	31,57 (C-8); 94,56 (C-2); 124,76 (C-10,10'); 126,48 (C-7); 128,18 (C-12); 128,31 (C-5,5'); 128,58 (C-6,6'); 128,72 (C-11,11'); 130,69 (C-4); 139,96 (C-9); 144,14 (C-3); 157,62 (C-1).

Continuação da Tabela 3



6,26 (s, 1H, CH, H-2);
6,31 (sl, 1H, NH);
7,19-7,32 (m, 15H, CH, Ph).

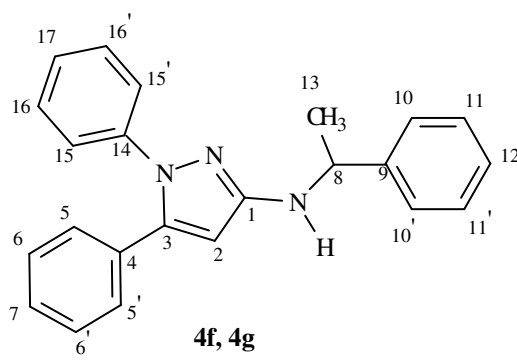
97,23 (C-2);
116,13 (C-9,9');
120,10 (C-11);
124,77 (C-13,13');
126,68 (C-7); 128,30 (C-15);
128,40 (C-5,5');
128,68 (C-10,10');
128,74 (C-6,6');
129,17 (C-14,14');
130,59 (C-4); 139,97 (C-12);
142,81 (C-8); 143,60 (C-3);
151,97 (C-1).



3,87 (sl, 1H, NH);
4,42 (s, 2H, CH₂, H-8);
5,83 (s, 1H, CH, H-2);
7,14-7,42 (m, 15H, CH, Ph).

48,96 (C-8); 94,73 (C-2);
124,62 (C-14,14');
126,25 (C-12);
127,04 (C-7);
127,54 (C-5,5');
128,05 (C-16);
128,25 (C-10,10');
128,42 (C-6,6');
128,56 (C-11,11');
128,61 (C-15,15');
130,85 (C-4); 139,81 (C-9);
140,14 (C-13);
143,84 (C-3); 157,19 (C-1).

Continuação da Tabela 3

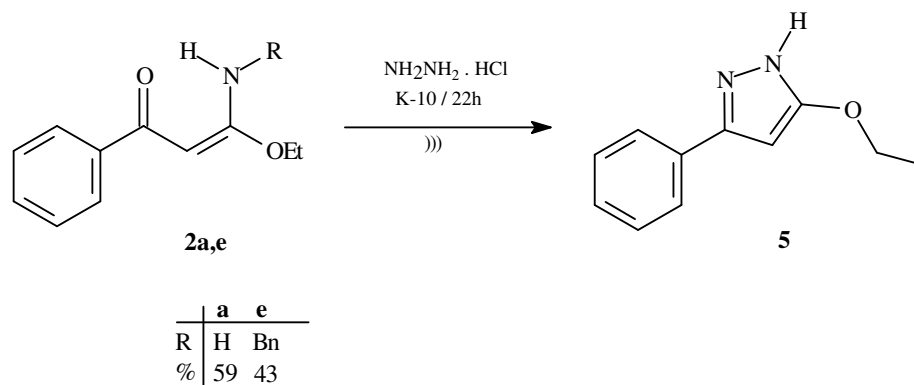
 <p>4f, 4g</p>	1,45 (d, 3H, CH ₃ , <i>J</i> =6,8, H-13);	24,35 (C-13); 54,57 (C-8);
	4,46 (q, 1H, CH, <i>J</i> =6,8, H-8);	94,38 (C-2);
	4,58 (sl, 1H, NH);	124,56 (C-15,15');
	5,55 (s, 1H, CH, H-2);	126,04 (C-5,5');
	7,05-7,33 (m, 15H, CH, Ph).	126,36 (C-12);
		126,87 (C-7); 128,10 (C-17);
		128,21 (C-10,10');
		128,45 (C-6,6');
		128,54 (C-16,16');
		128,62 (C-11,11');
	130,62 (C-4); 139,80 (C-14);	
	143,74 (C-3); 145,21 (C-9);	
	156,37 (C-1).	

*A numeração acima, foi utilizada apenas para atribuição de sinais.

2.2.4-Reações dos α -Oxocetenos O,N-acetais **2a,e** e do β -oxotioxi éster **1** com Cloridrato de Hidrazina e Cloridrato de Fenil Hidrazina

Devido a alta seletividade observada na formação dos compostos heterocíclicos **4a,d-g** em meio heterogêneo, resolvemos investigar a reatividade dos α -Oxocetenos O,N-acetais não substituído **2a** e substituído **2e** (R= Bn) frente aos dinucleófilos cloridrato de hidrazina e cloridrato de fenil hidrazina empregando a mesma metodologia avaliada no desenvolvimento deste trabalho, o K-10.

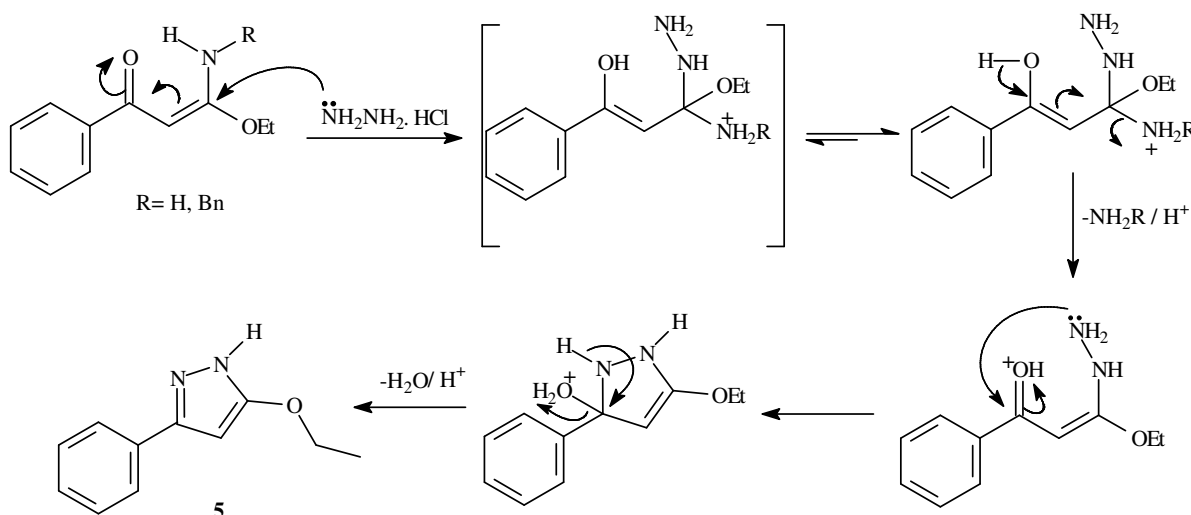
Os α -Oxocetenos O,N-acetais **2a,e** reagiram com cloridrato de hidrazina em suporte sólido e sonicação por ultra-som fornecendo exclusivamente o heterociclo 3(5)-fenil 5(3)-etóxi 1H-pirazol **5**, conforme demonstra o Esquema 32.



Esquema 32- Obtenção regioseletiva do etóxi pirazol **5** em meio heterogêneo a partir dos enaminos **2a,e**.

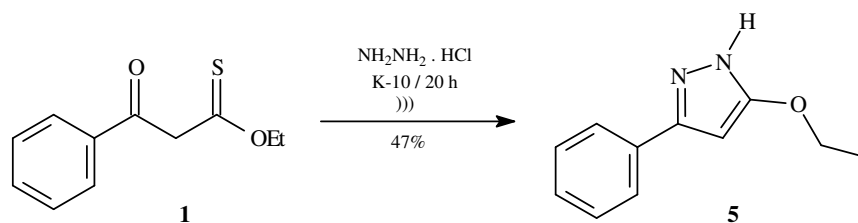
A não esperada perda do grupo amino na formação do heterociclo **5** provavelmente foi devido ao meio ácido, proporcionado pela presença do cloridrato de hidrazina, tornando este grupo melhor grupo de saída que a etoxila. É importante salientar que quando os mesmos substratos utilizados, os compostos **2a,e** foram submetidos a reações com hidrazina na sua forma livre, também em condições heterogêneas o produto gerado destas reações foram os amino pirazóis **3a,e** reforçando desta forma o argumento de que as condições ácidas propiciaram a obtenção do etóxi pirazol.

O mecanismo proposto para a reação de obtenção do etóxi pirazol **5** está descrito no Esquema 33 e fundamenta-se no ataque inicial do nitrogênio do cloridrato de hidrazina ao carbono β , com perda do grupo amino seguido pela ciclização com eliminação de água.



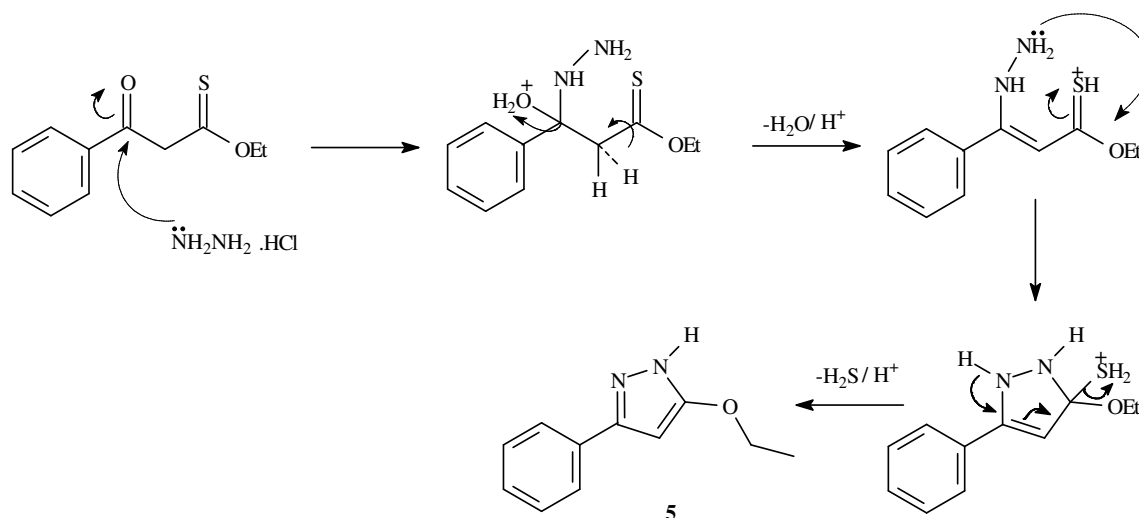
Esquema 33- Mecanismo proposto para obtenção do etóxi pirazol **5** a partir dos enaminos **2a,e**.

Devido a perda do grupo amino na formação do composto **5**, fomos levados a repetir a reação de ciclização, porém usando como substrato o precursor dos enaminos **2a,e** o β -oxotioxo éster **1**, de forma a avaliar a sua reatividade nas condições reacionais empregadas (Esquema 34). Foi isolado o mesmo heterociclo do Esquema 32, o que denotou que tanto via enamino não substituído **2a** e substituído **2e** como também através do composto **1** a reação de ciclização com cloridrato de hidrazina conduz a formação do 3(5)-fenil 5(3)-etóxi pirazol **5**.



Esquema 34- Obtenção regioseletiva do etóxi pirazol **5** em meio heterogêneo a partir do β -oxotioxo éster **1**.

O mecanismo proposto para obtenção do composto pirazólico **5** a partir do β -oxotioxo éster **1** consiste no ataque do nitrogênio do sal de hidrazina ao carbono carbonílico, com perda de água seguido pela ciclização com eliminação de sulfeto de hidrogênio como descrito no Esquema 35. Acreditamos que a forma ceto do tioxo éster é que se faz presente nas condições reacionais utilizadas, pois é através desta forma tautomérica que temos a probabilidade da formação do composto **5** discutido.



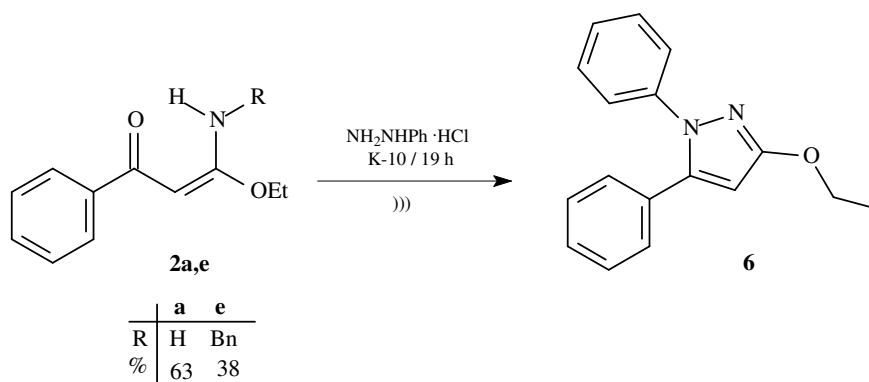
Esquema 35- Mecanismo proposto para obtenção do etóxi pirazol **5** a partir do β -oxotioxo éster **1**.

O composto **5** teve sua estrutura comprovada por espectroscopia de RMN de ^1H e ^{13}C em CDCl_3 (Figura 46, página 122) cujos deslocamentos químicos estão listados na Tabela 4.

Pela análise do espectro de RMN de ^1H para o composto **5**, detectou-se a permanência dos sinais atribuídos ao grupo etóxi, na forma de um tripleto em 1,32 ppm referente ao H-9 e o quarteto em 4,15 ppm correspondente ao H-8.

Na análise do espectro RMN de ^{13}C para o composto **5** identificou-se a presença dos sinais referentes aos carbonos do grupo etóxi, C-9 em 14,81 ppm e em 65,00 ppm o C-8. Observou-se uma proteção no deslocamento químico do C-1, pois este aparece em 163,78 ppm e nos precursores enamino carbonílicos **2a,e** e β -oxotioxi éster **1** o C-3 que é o correspondente possui deslocamento químico de 169,57 ppm (**2a**), 168,78 ppm (**2e**) e 208,26 ppm (**1**). O C-3 aparece na região de 144,80 ppm e nos enamino carbonílicos de partida **2a,e** aparecia em 187,51 ppm (**2a**), 186,78 ppm (**2e**) sendo equivalente aos carbonos carbonílicos (C-1). Ainda observamos que o carbono metínico (C-2) aparece em 87,51 ppm, sofrendo uma desproteção, pois este carbono nos enaminos de partida apresentava um deslocamento químico de 74,70 ppm (**2a**) e 74,09 ppm (**2e**). A ciclização foi confirmada a partir dos diferentes precursores utilizados pelo desaparecimento do sinal do carbono carbonílico (C-1) dos enamino carbonílicos **2a,e** com perda de H_2O e pelo desaparecimento do sinal do carbono ligado ao enxofre (C-3) do β -oxotioxi éster **1**, com perda de H_2S .

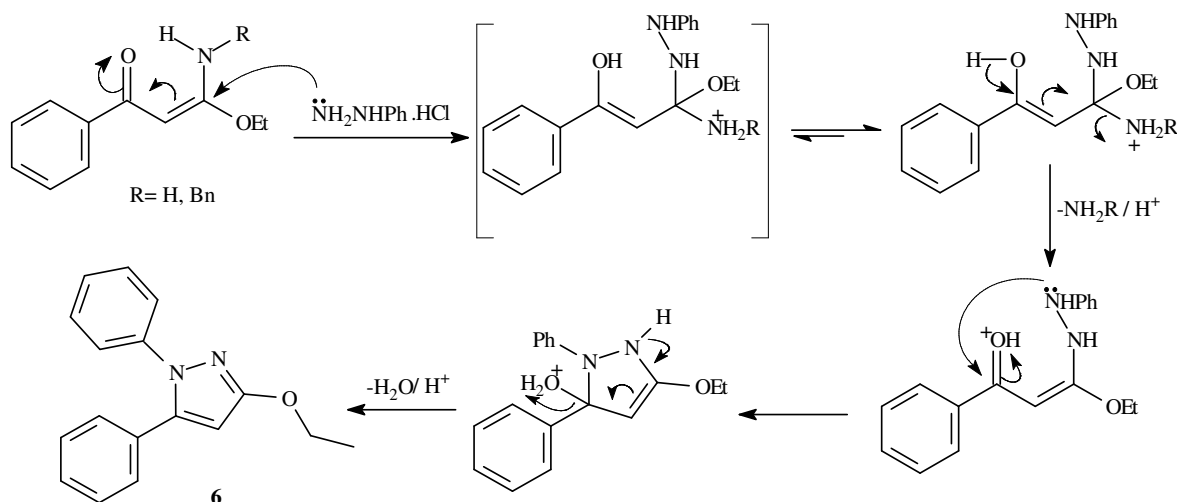
Prosseguindo o estudo da reatividade dos enamino carbonílicos **2a,e** realizamos a reação destes com cloridrato de fenil hidrazina sob suporte sólido e ultra-som que geraram seletivamente o heterociclo 3-etóxi 1,5-difenil pirazol **6** conforme esboça o Esquema 36.



Esquema 36- Obtenção regioseletiva do 3-etóxi N-fenil pirazol **6** em meio heterogêneo a partir dos enaminos **2a,e**.

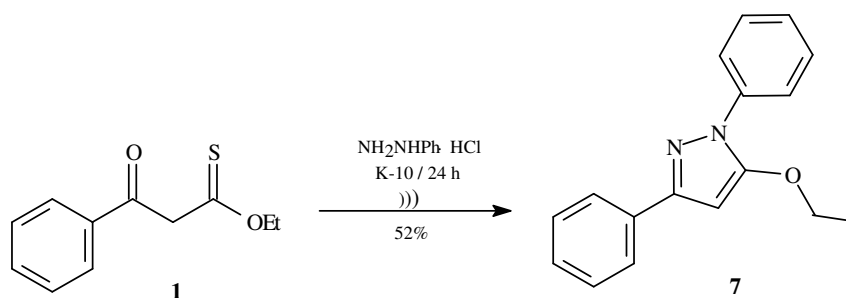
A formação do composto pirazólico **6**, da mesma forma que o heterociclo **5**, ocorreu com perda do grupo amino a partir da reação de ciclização com os enamino carbonílicos não substituído **2a** e substituído **2e**, desta maneira sustentando o argumento relatado anteriormente de que o meio ácido, proporcionado pelo dinucleófilo, tornou o grupo amino melhor grupo de saída do que o grupo etóxi.

O mecanismo sugerido para a reação que forneceu o 3-etóxi N-fenil pirazol **6** está baseado no ataque do par de elétrons do nitrogênio não substituído do cloridrato de fenil hidrazina ao carbono β , com eliminação do grupo amino seguido pela ciclização através do ataque do nitrogênio substituído com perda de água, como demonstra o Esquema 37.



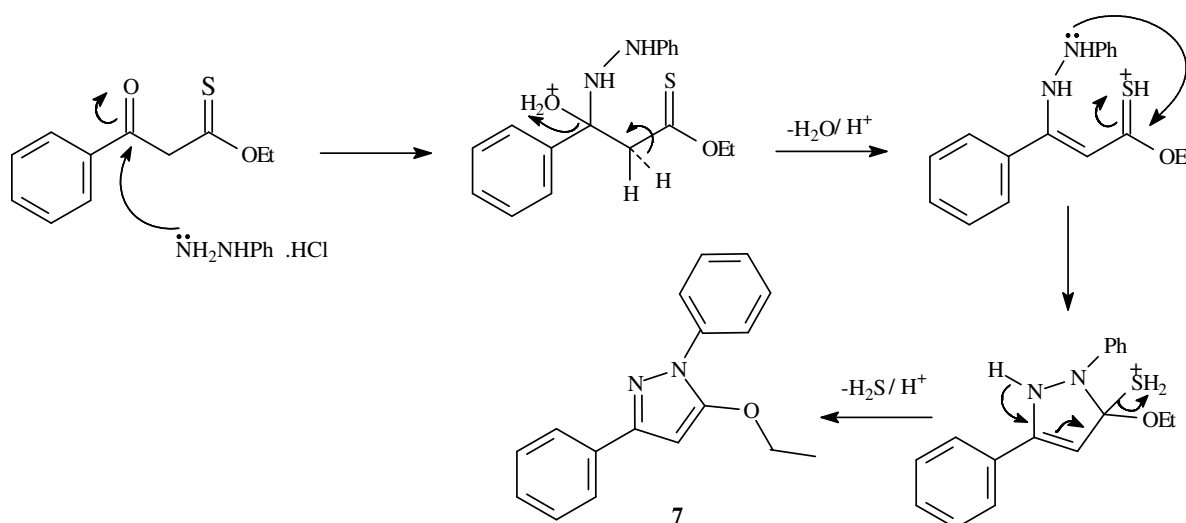
Esquema 37- Mecanismo proposto para obtenção do 3-etóxi N-fenil pirazol **6** a partir dos enamino **2a,e**.

Reproduzimos a reação de ciclização acima, utilizando como substrato o β -oxotioxo éster **1**, no sentido de investigar sua reatividade nas condições reacionais empregadas, levando em consideração o mesmo aspecto abordado quando reproduzimos a reação de ciclização do composto **5** utilizando como substrato o tioxo éster **1** (devido a eliminação do grupo amino na ciclização a partir dos enamino carbonílicos **2a,e**), conforme Esquema 38. Foi obtido exclusivamente o regioisômero do composto **6**, o heterociclo 5-etóxi 1,3-difenil pirazol **7**.



Esquema 38- Obtenção regioseletiva do 5-etóxi N-fenil pirazol **7** em meio heterogêneo a partir do β -oxotioxo éster **1**.

O mecanismo proposto para obtenção do composto heterocíclico 5-etóxi N-fenil pirazol **7** a partir do β -oxotioxo éster **1** fundamenta-se no ataque do nitrogênio não substituído do cloridrato de fenil hidrazina ao carbono carbonílico, com perda de água seguido pela ciclização com eliminação de sulfeto de hidrogênio (Esquema 39).

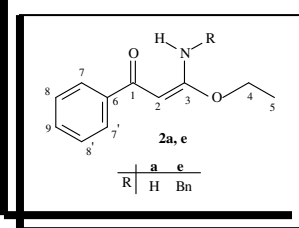


Esquema 39- Mecanismo proposto para obtenção do 5-etóxi N-fenil pirazol **7** a partir do β -oxotioxo éster **1**.

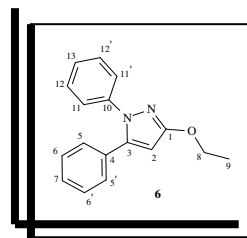
As estruturas dos regioisômeros **6** e **7** foram comprovadas por espectroscopia de RMN de ^1H e ^{13}C em CDCl_3 (Figura 47 e 48, páginas 123 e 124) cujos os respectivos deslocamentos químicos estão listados na Tabela 4 e através da cristalografia de raio-X para o composto **7**, Figura 14 e Anexo I.

As principais modificações nos deslocamentos químicos que evidenciam a obtenção dos regioisômeros **6** e **7**, provenientes dos diferentes substratos, são observadas através dos dados espectroscópicos de RMN de ^{13}C para os carbonos C-1, C-2 e C-3 dos respectivos compostos.

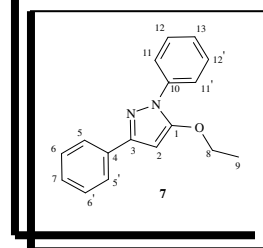
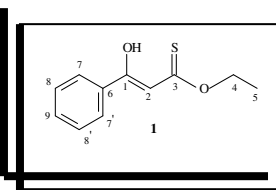
Para o heterociclo **6**, através da análise do espectro de RMN de ^1H verificou-se a permanência do grupo etóxi dos enamino carbonílicos **2a,e** de partida, os sinais atribuídos a esse grupo aparecem no composto ciclizado em 1,43 ppm correspondendo aos hidrogênios metílicos (H-9) e em 4,31 ppm os hidrogênios metilênicos (H-8). Observou-se um maior número de sinais referentes aos hidrogênios aromáticos que aparecem na região entre 7,19-7,31 ppm, indicando a presença de mais um grupo fenila na estrutura gerada.



Enquanto que na análise do espectro RMN de ^{13}C para o composto **6** detectou-se o desaparecimento do sinal equivalente ao carbono carbonílico (C-1) para **2a,e**, aparecendo o correspondente ao carbono olefínico (C-3). Pode-se observar também que os sinais dos carbonos atribuídos a etoxila permaneceram, aparecendo o carbono metílico em 14,88 ppm e o carbono metilênico em 64,71 ppm. Os carbonos não hidrogenados C-1 e C-3 aparecem com deslocamentos químicos mais protegidos em relação ao enamino carbonílico de partida **2a**, o deslocamento químico 169,57 ppm passa para 163,53 ppm e de 187,51 ppm para 144,11 ppm, respectivamente. Foi possível identificar a desproteção do carbono metínico (C-2) de 74,70 ppm para 93,69 ppm.



Para o heterociclo **7** foi possível verificar através dos dados espectroscópicos de RMN de ^1H a presença dos sinais equivalentes ao grupo etóxi, tripleto em 1,45 ppm e quarteto em 4,20 ppm, indicando que ocorreu a ciclização a partir do β -oxotioxi éster **1** com eliminação de sulfeto de hidrogênio. Já na análise do espectro RMN de ^{13}C para o composto **7** identificou-se sinais dos carbonos equivalentes ao grupo etóxi, o C-9 aparecendo em 14,56 ppm e o C-8 em 68,02 ppm. Pode-se observar que o C-1 e o C-3 apresentam deslocamentos químicos na região de 155,24 ppm e de 150,41 ppm, respectivamente. O carbono metilênico (C-2) aparece em 83,74 ppm.



Pelo espectro de RMN de NOESY J H-H (Figura 49, página 125), esperávamos uma possível correlação entre os hidrogênios metílicos (H-9) e metilênicos (H-8) do grupo etóxi com os hidrogênios aromáticos da fenila ligada ao nitrogênio do anel (posição 1) indicando que estes substituintes estão no mesmo lado para o regioisômero **7**, porém essa correlação não foi observada. Pode-se observar a correlação entre os hidrogênios metílicos (H-9) com os hidrogênios metilênicos (H-8) da etoxila.

Foi através da cristalografia de raio-X do composto **7** que a estrutura foi esclarecida comprovando que a fenila ligada ao nitrogênio do anel pirazólico, posição 1, está vizinha ao grupo etóxi na posição 5, confirmando o mecanismo sugerido para a obtenção deste 5-etóxi N-fenil pirazol **7**.

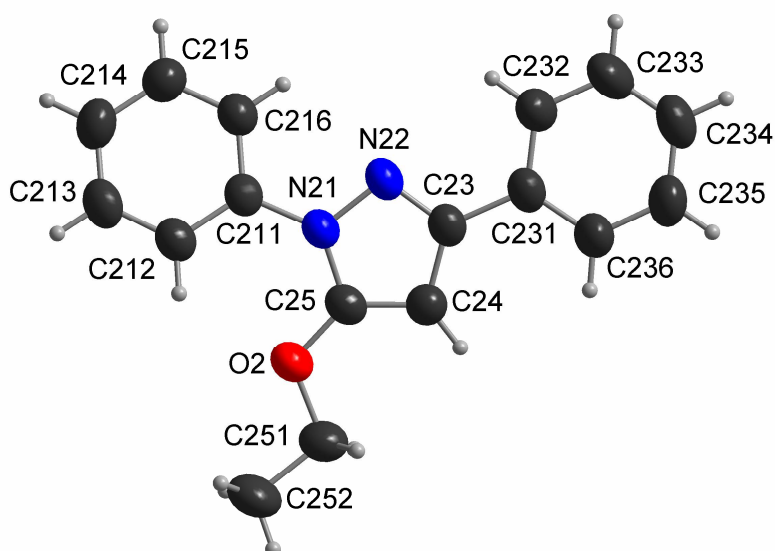
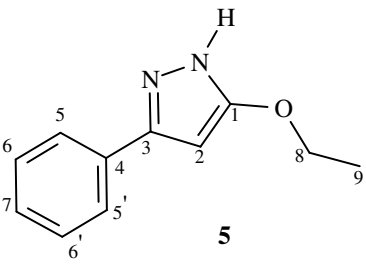
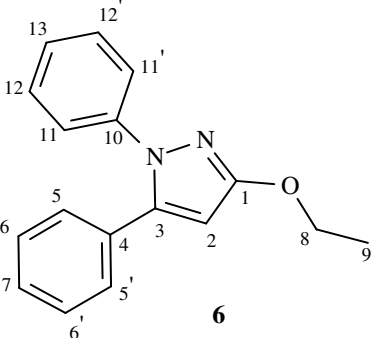
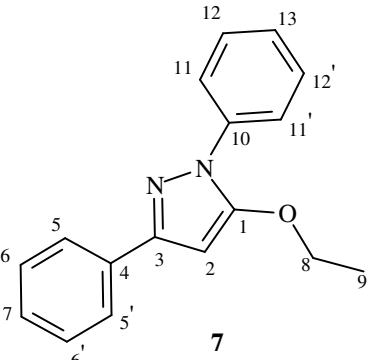


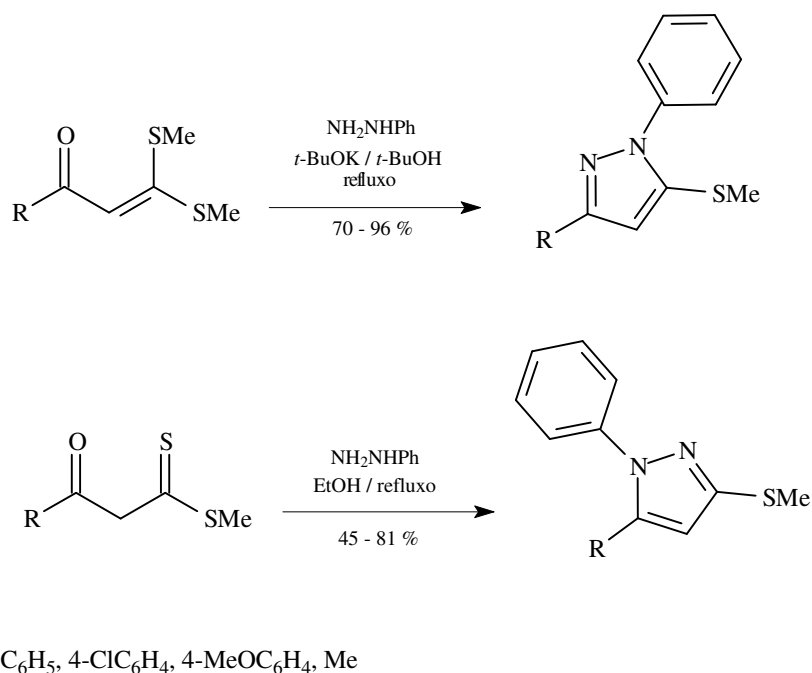
Figura 14- Estrutura de raio-X do composto **7**.

Tabela 4 – Dados espectroscópicos de ^1H e ^{13}C dos Etóxi pirazóis 5, 6 e 7

Estrutura*/Composto	RMN ^1H (CDCl_3/TMS) δ (ppm), J (Hz)	RMN ^{13}C (CDCl_3/TMS) δ (ppm)
 <p style="text-align: center;">5</p>	1,37 (t, 3H, $J=6,8$, H-9), 4,22 (q, 2H, $J=6,8$, H-8); 5,93 (s, 1H, CH, H-2); 7,32-7,60 (m, 5H, CH, Ph).	14,84 (C-9); 65,00 (C-8) 87,93 (C-2); 125,36 (C-5,5'); 128,44 (C-7); 128,87 (C-6,6'); 129,98 (C-4); 144,95 (C-3); 163,96 (C-1).
 <p style="text-align: center;">6</p>	1,43 (t, 3H, $J=7,0$, H-9); 4,31 (q, 2H, $J=7,0$, H-8); 5,95 (s, 1H, CH, H-2); 7,19-7,31 (m, 10H, CH, Ph).	14,88 (C-9); 64,71 (C-8); 93,69 (C-2); 124,93 (C-11,11'); 126,61 (C-7); 128,27 (C-13); 128,37 (C-5,5'); 128,69 (C-6,6'); 128,74 (C-12,12'); 130,77 (C-4); 140,11 (C-10); 144,11(C-3); 163,53 (C-1).
 <p style="text-align: center;">7</p>	1,46 (t, 3H, $J=7,0$, H-9); 4,21 (q, 2H, $J=7,1$, H-8); 5,97 (s, 1H, CH, H-2); 7,23-7,86 (m, 10H, CH, Ph).	14,56 (C-9); 68,02 (C-8); 83,74 (C-2); 122,02 (C-11,11'); 125,49 (C-5,5'); 126,04 (C-13); 127,97 (C-7); 128,47 (C-12,12'); 128,73 (C-6,6'); 133,32 (C-4); 138,77 (C-10); 150,43(C-3); 155,28 (C-1).

*A numeração acima, foi utilizada apenas para atribuição de sinais.

A literatura cita⁶⁰ que a obtenção dos regioisômeros N-fenil 3-(metiltio) pirazóis e N-fenil 5-(metiltio)pirazóis a partir de ditioéster e S,S-acetais, respectivamente, depende de condições reacionais especiais tais como temperaturas elevadas e bases específicas, enquanto que a nossa estratégia permitiu a obtenção regioseletiva de sistemas semelhantes, heterociclos **6** e **7**, em condições brandas (K-10 /ultra-som) a partir dos O,N-acetais **2a,e** e do tioxo éster **1**. O Esquema 40 demonstra os regioisômeros provenientes da reação dos S,S-acetais com fenil hidrazina em meio básico e da reação dos ditioésteres com fenil hidrazina em meio homogêneo utilizando etanol como solvente.



Esquema 40- Obtenção dos N-fenil 5- (metiltio)pirazol e N-fenil 3-(metiltio) pirazol em meio homogêneo.

⁶⁰ Peruncheralathan, S.; Khan, T. A.; Ila, H.; Junjappa, H. *J. Org. Chem.* **2005**, 70, 10030.

2.3- Determinação da Atividade Biológica *in vitro*

Os sistemas pirazólicos obtidos neste trabalho foram submetidos a análise para determinação de atividade biológica *in vitro*. Para tanto utilizou-se diferentes análises:

2.3.1. Determinação da Atividade Antimicrobiana.

2.3.1.1. Determinação da Atividade Antimicrobiana pelo método de Bioautografia.

2.3.1.2. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) pelo método de Microdiluição.

2.3.2. Determinação da Atividade da Enzima Acetilcolinesterase.

2.3.1- Determinação da Atividade Antimicrobiana

2.3.1.1- Determinação da Atividade Antimicrobiana pelo método de Bioautografia

A determinação da atividade microbiológica foi realizada para os seguintes pirazóis: 5(3)-amino-substituído 3(5)-fenil 1H-pirazóis **3a-g**, 3-amino-substituído 1,5-difenil pirazóis **4b,d-g** e os etóxi pirazóis 5(3)-etóxi 3(5)-fenil 1H-pirazol **5** e 5-etóxi 1,3-difenil pirazol **7** (Figura 15).

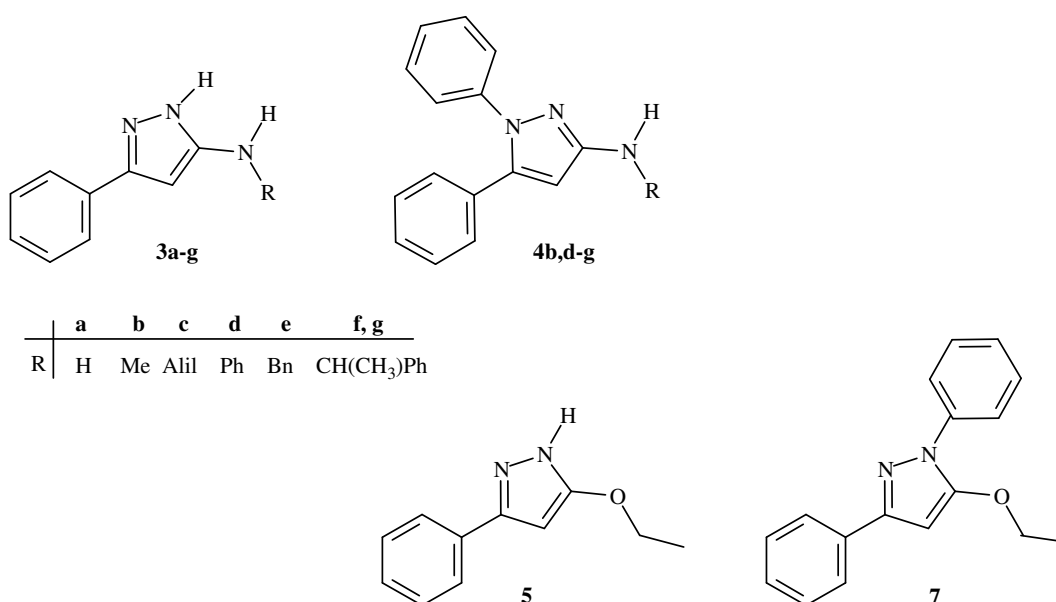


Figura 15- Estruturas dos compostos **3a-g**, **4b,d-g**, **5** e **7** onde **f** representa o substituinte [(R)(+)- α -CH(CH₃)Ph] e **g** o enantiômero [(S)(-)- α -CH(CH₃)Ph].

A atividade antimicrobiana foi determinada por Bioautografia direta⁶¹ que é um método qualitativo que combina a cromatografia em camada delgada (CCD) com bioensaio *in vitro* contra uma linhagem de microrganismos indicadores. Através desta técnica são obtidas zonas de inibição bem definidas que são visualizadas pela detecção da atividade da enzima dehidrogenase (do microrganismo) com sal de tetrazóleo, usado como revelador. Esse sal de tetrazóleo é convertido em um complexo colorido chamado de formazan.

Para avaliação da atividade antimicrobiana pelo método da Bioautografia, faz-se necessário preparar diluições dos meios de cultura, inóculos e determinação da quantidade de substância ativa (QSA).

Os heterociclos submetidos a análise antimicrobiana foram aplicados em placas de CCD na faixa de concentração de 0,15-100 µg, posteriormente essas cromotoplas foram depositadas em placas de petri e o meio inoculado com o microrganismo indicador foi adicionado. A coleção de onze microrganismos utilizados incluiu três bactérias Gram-positivas: *Bacillus subtilis* (Bs), *Staphylococcus aureus* (Sa), *Staphylococcus epidermidis* (Se); quatro bactérias Gram-negativas: *Escherichia coli* (Ec), *Salmonella setubal* (Ss), *Pseudomonas aeruginosa* (Pa), *Klebsiella pneumoniae* (Kp) e quatro fungos: *Candida albicans* (Ca), *Saccharomyces cerevisiae* (Sc), *Cryptococcus neoformans* (Cn), *Candida dubliniensis* (Cd). Os microrganismos empregados foram cepas padrões de ATCC (American Type Culture Collection), com exceção da *Candida dubliniensis* que é um isolado clínico (SM-26) cedido pelo Laboratório de Micologia do Departamento de Farmácia da UFSM.

Foi possível constatar com os resultados do ensaio biológico que a série de compostos amino pirazólicos **3a-g** exibiram promissora atividade antibacteriana contra todas as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas testadas. Enquanto que em relação aos fungos foram inativos e/ou pouco expressivos (Tabela 5), com exceção do pirazol **3d** (R=Ph) que apresentou uma boa atividade antifúngica (0,75 µg) contra o fungo *C. neoformans*. O composto **3g** R= [(S)(-)-α-CH(CH₃)Ph] exibiu maior potencial antibacteriano (0,15 µg) contra toda a linhagem de bactérias testadas, mas foi inativo contra todos os fungos analisados da mesma forma que o composto **3b**.

⁶¹ a) Hamburger, M.; Hostettmann, K. *Phytochemistry* **1991**, 30, 3864. b) Hamburger, A. L.; Fuchs, A. *Journal of Chromatography* **1970**, 51, 327.

Os excelentes resultados da inibição bacteriana demonstrado pelo composto **3g** quando comparado aos resultados do seu enantiômero **3f** e com os outros amino pirazóis avaliados, sugere que a estereoquímica [(S)(-)- α -CH(CH₃)Ph] presente na sua estrutura tem uma importante influência.

Tabela 5. Resultados da análise biológica por Bioautografia (μ g) dos amino pirazóis **3a-g**.

Microrganismos		3a	3b	3c	3d	3e	3f	3g	Padrão (μ g) ^a
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538p	3,12	0,75	0,5	0,75	0,5	6,25	0,15	0,7
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 12228	3,12	3,12	25	0,15	0,75	1,0	0,15	0,7
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633	6,25	1,56	12,5	0,5	3,12	0,5	0,15	0,8
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25792	3,12	3,12	0,5	0,15	3,12	1,0	0,15	0,5
<i>Salmonella setubal</i>	ATCC 19796	3,12	1,0	12,5	0,15	1,0	0,15	0,15	0,7
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 10031	6,25	3,12	12,5	0,15	0,15	0,5	0,15	0,5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	6,25	1,0	12,5	0,75	1,56	3,12	0,15	0,6
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ATCC 2601	na	na	na	na	na	na	na	3,24
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231	na	na	100	na	na	na	na	2,43
<i>Cryptococcus neoformans</i>	ATCC 28952	100	na	na	0,75	25	na	na	2,43
<i>Candida dubliniensis</i>	isolado clínico SM-26	na	na	na	25	6,25	25	na	4,05

^aPadrão antibiótico Cloranfenicol (bactérias) e Nistatina (fungos).
na= não ativo

A partir do comportamento bioativo apresentado pela série dos amino pirazóis **3a-g** decidimos investigar a relação estrutura atividade dos seus análogos N-fenil 3-amino pirazóis **4b,d-g**, assim como dos etóxi pirazóis 5(3)-etóxi 1H-pirazol **5** e N-fenil 5-etóxi pirazol **7**.

O bioensaio realizado com os sistemas heterocíclicos **4b,d-g** revelou que esses compostos são inativos contra todos microrganismos testados. Essa descoberta indicou claramente que a presença do substituinte fenil na posição N-1 dos anéis pirazólicos influencia no sentido de perder a atividade observada quando este grupo não estava presente frente as bactérias e fungos empregados.

Idêntico resultado ao descrito acima foi observado com o composto N-fenil 5-etóxi pirazol **7**. Apesar de **7** possuir um padrão de substituição diferenciado da série **4b,d-g** (grupo etóxi na posição 5 do anel pirazólico) também não foi capaz de apresentar qualquer atividade antimicrobiana contra todos microrganismos analisados. Por outro lado, o composto heterocíclico **5** demonstrou moderada atividade antibacteriana contra as bactérias testadas (Tabela 6), quando comparado ao padrão e a série **3a-g**, com exceção da bactéria

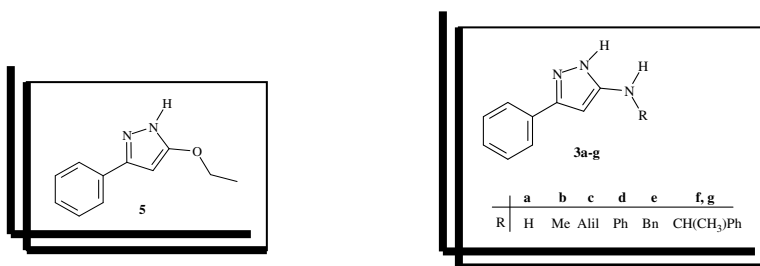
Gram-negativa *K. pneumoniae* que não foi ativo. Já contra os fungos o composto **5** foi inativo (Tabela 6) do mesmo modo que **3b**, **3g** e **4b,d,g**.

Tabela 6. Resultados da análise biológica por Bioautografia (μg) do etóxi pirazol **5**.

Microrganismos		5	Padrão (μg) ^a
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538p	50	0,7
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 12228	3,12	0,7
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633	12,5	0,8
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25792	12,5	0,5
<i>Salmonella setubal</i>	ATCC 19796	50	0,7
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 10031	na	0,5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	25	0,6
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ATCC 2601	na	3,24
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231	na	2,43
<i>Cryptococcus neoformans</i>	ATCC 28952	na	2,43
<i>Candida dubliniensis</i>	isolado clínico SM-26	na	4,05

^a Padrão antibiótico Cloranfenicol (bactéria) e Nistatina (Fungos).
na= não ativo

O fato do etóxi pirazol **5** ter apresentado inibição bacteriana contra todas bactérias Gram-positivas e contra três bactérias Gram-negativas, provavelmente, foi devido a posição N-1 do anel pirazólico estar livre, ou seja, não apresentar o substituinte fenil da mesma forma que os amino pirazóis **3a-g** que foram ativos contra todas bactérias testadas.



A seguir apresentamos as Figuras 16 e 17 que ilustram os bioensaios realizados através do método da Bioautografia.

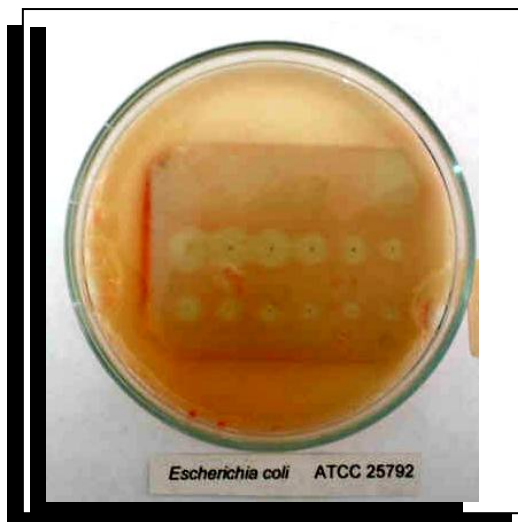


Figura 16- Bioensaio realizado por Bioautografia para o amino pirazol **3g** contra a bactéria Gram-positiva *Escherichia coli*

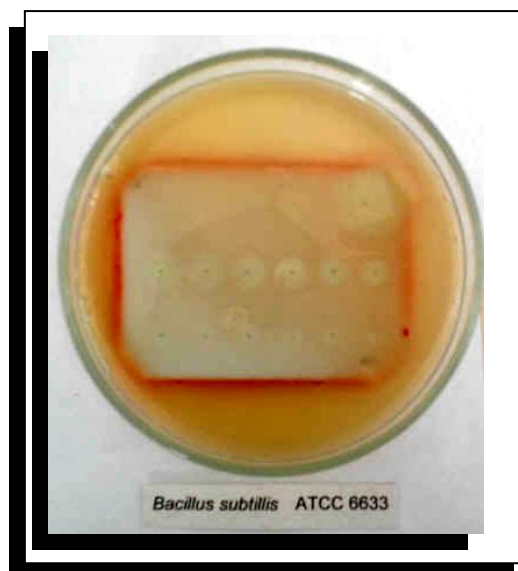


Figura 17- Bioensaio realizado por Bioautografia para o amino pirazol **3g** contra a bactéria Gram-positiva *Bacillus subtilis*

2.3.1.2- Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) pelo Método da Microdiluição

A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) pelo método da microdiluição é um ensaio quantitativo *in vitro* aplicado a avaliação da potência da atividade antimicrobiana de misturas ou substâncias puras. Este método de microdiluição (100-500 µL) avalia o comportamento de diferentes microrganismos frente a concentrações crescentes dos compostos analisados em meio de cultura líquido. A menor concentração capaz de inibir a multiplicação dos microrganismos é denominada de CIM.⁶²

Através do método de microdiluição a CIM é determinada em placas de cultura de 96 poços onde uma série de diluições da amostra é realizada em meio líquido, podendo conter um elemento surfactante. Os poços são então inoculados com uma suspensão microbiana e as placas são incubadas. O crescimento microbiano (turvação) e a CIM são observados visualmente, sendo que as culturas que não apresentam crescimento são usadas para inocular placas com meio sólido, de forma a determinar a Concentração Bactericida ou Fungicida Mínima (CBM/ CFM).

Os sistemas heterocíclicos **3a-g**, **4b,d-g**, **5** e **7** foram submetidos a avaliação da concentração inibitória mínima (CIM) através do método de microdiluição frente uma série de microrganismos indicadores. Os microrganismos utilizados foram: bactérias Gram-positivas *Bacillus subtilis* (Bs), *Staphylococcus aureus* (Sa), *Staphylococcus epidermidis* (Se); bactérias Gram-negativas: *Escherichia coli* (Ec), *Salmonella setubal* (Ss), *Pseudomonas aeruginosa*(Pa), *Klebsiella pneumoniae* e os fungos: *Candida albicans* (Ca), *Saccharomyces cerevisiae* (Sc), *Cryptococcus neoformans* (Cn), *Candida dubliniensis* (Cd). Os microrganismos empregados foram cepas padrões de ATCC (American Type Culture Colection), com exceção da *Candida dubliniensis* que é um isolado clínico (SM-26) cedido pelo Laboratório de Micologia do Departamento de Farmácia da UFSM.

Os resultados deste ensaio microbiológico indicaram uma tendência antimicrobiana semelhante aos resultados observados através do método de bioautografia. Entre os amino pirazóis **3a-g** o composto que apresentou maior tendência antibacteriana foi o **3g**, com CIM de 6,25 µg/mL contra todas as bactérias. Este apresentou característica bacteriostática, exceto frente a *Bacillus subtilis* (Bs) onde o valor de CIM coincide com o de CBM, apresentando

⁶² a) Hammer, K. A.; Carson, C. F.; Riley, T. V. *Journal of Applied Microbiology* **1999**, 86, 985. b) Akbas, E.; Berber, I.; Sener, A.; Hasanov, B. *II. Farmaco* **2004**, 322.

desta forma característica bactericida (Tabela 7). Contra os fungos nenhum composto da série **3a-g** apresentou atividade na faixa de concentração testada de 3,12-100 µg/mL. O composto **3f** onde R={R(+)-α-CH(CH₃)Ph} foi o único da série que não apresentou atividade antibacteriana, diferente do observado por bioautografia.

Tabela 7. Resultados da CIM, CBM e CFM (µg/mL) para os amino pirazóis **3a-g**.

M.o ^a	3a		3b		3c		3d		3e		3f		3g		Padrão ^b
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	
<i>Sa</i>	25	>100	12,5	>100	50	>100	25	>100	12,5	>100	>100	-	6,25	50	6,25
<i>Se</i>	25	>100	25	>100	50	>100	12,5	>100	12,5	>100	>100	-	6,25	50	3,12
<i>Bs</i>	25	>100	25	>100	50	>100	12,5	>100	12,5	>100	>100	-	6,25	6,25	1,56
<i>Ec</i>	25	>100	12,5	>100	50	>100	12,5	>100	12,5	>100	>100	-	6,25	50	6,25
<i>Ss</i>	25	>100	25	>100	50	>100	25	>100	12,5	>100	>100	-	6,25	25	1,56
<i>Kp</i>	25	>100	25	>100	50	>100	12,5	>100	12,5	>100	>100	-	6,25	50	6,25
<i>Pa</i>	25	>100	25	>100	50	>100	12,5	>100	12,5	>100	>100	-	6,25	50	3,12
	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	
<i>Sc</i>	>100	-	>100	-	>100	-	>100	-	>100	-	>100	-	>100	-	10,3
<i>Ca</i>	>100	-	>100	-	>100	-	>100	-	>100	-	>100	-	>100	-	5,15
<i>Cn</i>	>100	-	>100	-	>100	-	>100	-	>100	-	>100	-	>100	-	5,15
<i>Cd</i>	>100	-	>100	-	>100	-	>100	-	>100	-	>100	-	>100	-	10,3

^aM.o = Microrganismos indicadores.

^b Padrão antibiótico Cloranfenicol (bactérias) e Nistatina (fungos).

Observou-se que os heterociclos **4b,d-g** e **7** não apresentaram caráter inibitório frente a todos os microrganismos empregados na faixa de concentração testada (3,12-100 µg/mL) o que reafirma os resultados obtidos no teste de bioautografia para estes compostos.

O etóxi pirazol **5** não apresentou nenhuma ação antimicrobiana, diferente da moderada atividade antibacteriana demonstrada pelo teste da bioautografia.

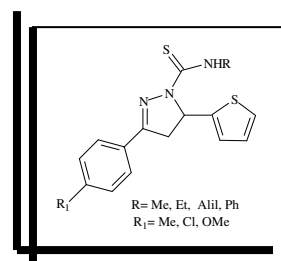
2.3.2- Determinação da Atividade da Enzima Acetilcolinesterase

O neurotransmissor acetilcolina (ACh) possui um papel crucial no sistema nervoso participando de processos envolvendo comportamento, aprendizado e memória.⁶³ A enzima acetilcolinesterase (AChE) encontra-se presente nos neurônios colinérgicos e catalisa a reação de hidrólise do neurotransmissor acetilcolina, exercendo uma função essencial como enzima regulatória dos eventos fisiológicos promovidos por este neurotransmissor.⁶⁴

Alguns agentes anticolinesterásicos, ou seja, inibidores da AChE, têm sido propostos como agentes terapêuticos no controle de doenças neurodegenerativas, tal como a Doença de Alzheimer. A inibição da enzima AChE impede que esta realize sua função catalítica de hidrolisar o neurotransmissor acetilcolina em ácido acético e colina, desta forma o neurotransmissor se acumula podendo a vir potencializar a atividade colinérgica. Esta potencialização na transmissão de impulsos nervosos está vinculada a tentativa de reverter os “déficits” cognitivos com a perspectiva de amenizar o quadro clínico de perda de habilidades como pensar, memorizar e raciocinar apresentado por pacientes com a Doença de Alzheimer. Galantamina (Reminil®)⁶⁵ e Rivastigmina (Exelon®),⁶⁶ por exemplo, são inibidores da acetilcolinesterase.

Devido a importância que a acetilcolinesterase possui na neurotransmissão colinérgica, torna-se relevante o estudo de novos compostos que possam interagir com a atividade desta enzima em busca de agentes terapêuticos para distúrbios que envolvam o sistema colinérgico.

A literatura cita⁶⁷ que heterociclos nitrogenados do tipo pirazolinas amino substituídas são representantes de uma nova classe de inibidores da acetilcolinesterase. A partir desse aspecto foi investigado *in vitro* o potencial de inibição dos amino pirazóis



5(3)-amino-substituído 3(5)-fenil 1H-pirazóis **3a-g** e etóxi pirazóis 5(3)-etóxi 3(5)-fenil 1H-pirazol **5** e 1,3-difenil 5-etóxi pirazol **7** (Figura 18) sobre a atividade da enzima

⁶³ Purves, D.; Augustine, G.; Fitzpatrick, D.; Katz, I.; Lamantia, A.; Mcnamara, J.; Williams, S. *Neurociências* **2005**, 2ed. Porto Alegre, Artmed, p.728.

⁶⁴ Das, A.; Dikshit, M.; Nath, C. *Life Sciences* **2001**, 68, 1545.

⁶⁵ Guillou, C.; Mary, A.; Renko, D. Z.; Gras, E.; Thal, C. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, 10, 637.

⁶⁶ Mustazza, C.; Borioni, A.; Giudice, M. R. D.; Gatta, F.; Ferretti, R.; Meneguz, A.; Volpe, M. T.; Lorenzini, P. *Eur. J. Med. Chem.* **2002**, 37, 91.

⁶⁷ Ucar, G.; Gokhan, N.; Yesilada, A.; Bilgin, A. A. *Neuroscience Letters* **2005**, 382, 327.

acetilcolinesterase através do ensaio biológico em estruturas cerebrais de ratos machos Wistar adultos conforme procedimentos de Ellmann e col.⁶⁸

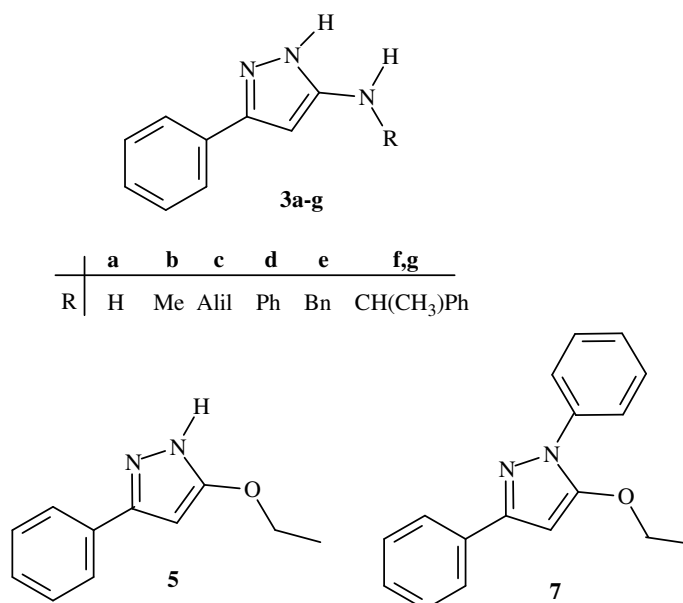


Figura 18- Estruturas dos compostos **3a-g**, **5** e **7** onde **f** apresenta o substituinte [(R) (+)- α -CH(CH₃)Ph] e **g** o enantiômero [(S) (-)- α -CH(CH₃)Ph].

Dentre os compostos amino pirazólicos **3a-g** analisados o heterociclo **3e** que possui o substituinte R=Bn foi o único que inibiu a enzima acetilcolinesterase. Este pirazol **3e** inibiu a enzima AChE apenas na estrutura cerebral estriado de ratos na maior concentração testada (0,250 mM) quando comparado ao grupo controle, onde p é o grau de significância pela estatística conforme a Figura 19.

Já os pirazóis **3a** e **3d** que apresentam R=H e R=Ph respectivamente, demonstraram uma tendência a aumentar a atividade da enzima AChE nas três estruturas cerebrais empregadas. O composto **3a** aumentou significativamente a atividade da enzima acetilcolinesterase apenas na estrutura cerebral hipocampo nas concentrações testadas de 0,015 e 0,031 mM comparado ao grupo controle, como esboça a Figura 20.

⁶⁸ Ellmann, G. L.; Courtney, K. D.; Andres, J. R.; Featherstone, R. M. *Biochem. Pharmacol.* **1961**, 7, 88.

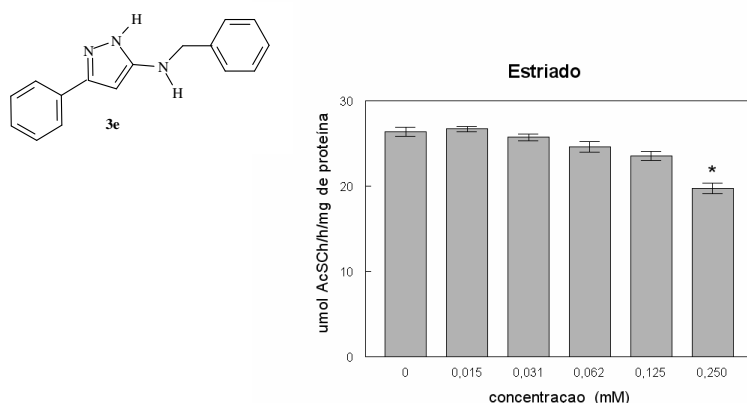


Figura 19- Gráfico do efeito do 5(3)-benzilamino 3(5)-fenil 1H-Pirazol **3e** na atividade da enzima AChE .

* Diferente do controle, $p < 0,05$.

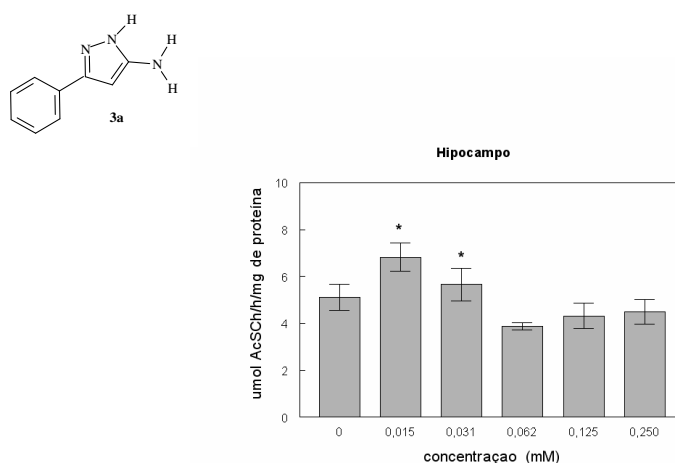


Figura 20- Gráfico do efeito do 5(3)-amino 3(5)-fenil 1H-Pirazol **3a** na atividade da enzima AChE .

* Diferente do controle, $p < 0,05$.

O heterociclo **3d** aumentou a atividade da enzima acetilcolinesterase nas três estruturas cerebrais. No estriado e córtex aumentou na concentração de 0,125 mM já no hipocampo aumentou nas concentrações intermediárias testadas (0,031 e 0,062 mM) em relação ao grupo controle (Figura 21).

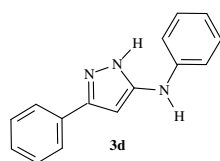
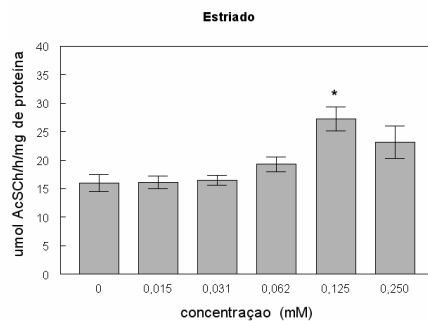
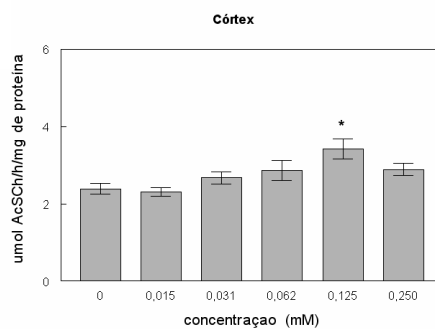
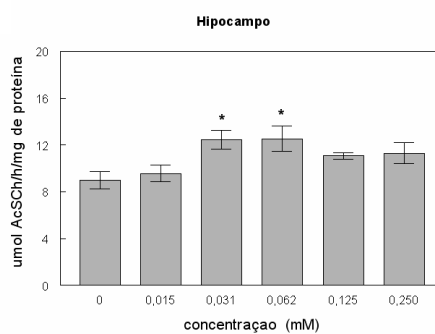
**a)****b)****c)**

Figura 21- Gráficos do efeito do 5(3)-fenilamino 3(5)-fenil 1H-Pirazol **3d** na atividade da enzima AChE nas três estruturas cerebrais **a)** estriado, **b)** córtex e **c)** hipocampo de ratos. * Diferente do controle, $p < 0,05$.

O etóxi pirazol **5** analisado demonstrou uma característica inibitória para a enzima AChE sendo significativo na estrutura cerebral córtex nas concentrações intermediárias de 0,031 e 0062 mM em relação ao grupo controle, conforme a Figura 22.

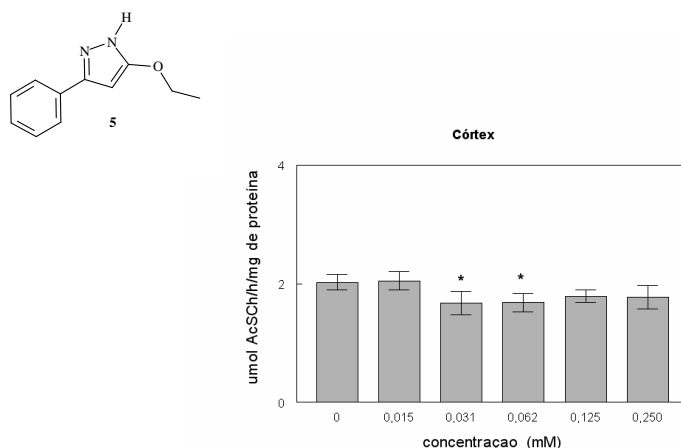
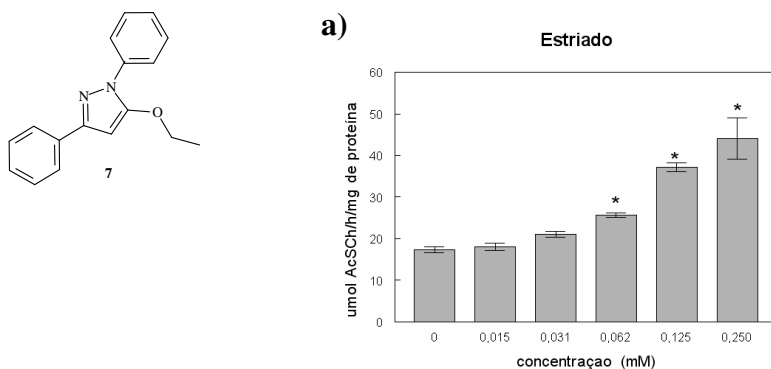


Figura 22- Gráficos do efeito do 5(3)-etóxi 3(5)-fenil 1H-Pirazol **5** na atividade da enzima AChE .

* Diferente do controle, $p < 0,05$.

O heterociclo 1,3-difenil 5-etóxi pirazol **7**, o qual apresenta um grupo etóxi na posição 5 do anel pirazólico e um grupo fenila na posição 1, se diferencia da série de amino pirazóis **3a-g** também analisados por possuir novos padrões de substituição. Este composto apresentou um aumento na atividade da enzima AChE de forma dose-dependente, aumentando a atividade da AChE significativamente nas três estruturas cerebrais estriado, córtex e hipocampo nas maiores concentrações testadas quando comparado ao grupo controle conforme a Figura 23.



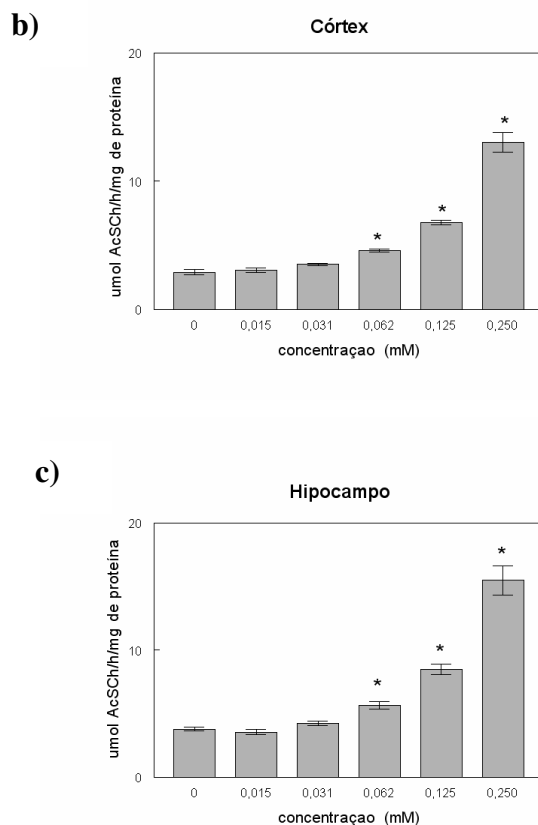


Figura 23- Gráficos do efeito do 1,3-difenil 5-etóxi pirazol **7** na atividade da enzima AChE nas três estruturas cerebrais **a)** estriado, **b)** córtex e **c)** hipocampo. * Diferente do controle, $p < 0,05$.

O amino pirazol **3e** (R=Bn) e o etóxi pirazol **5** apesar de apresentarem diferentes padrões de substituição na posição 5(3) do anel pirazólico demonstraram uma moderada inibição para a enzima AChE. Já os amino pirazóis **3a** (R=Me) e **3d** (R=Ph) e o etóxi pirazol **7** apresentaram uma tendência a aumentar a atividade da enzima AChE.

A literatura descreve que compostos organofosforados podem ser letais para os humanos porque inibem a enzima AChE levando ao acúmulo do neurotransmissor acetilcolina nas sinapses colinérgicas causando, entre outros efeitos, paralisia neuromuscular.⁶³ Desta forma, compostos que possam interagir com a enzima e provocar um aumento na sua atividade como o caso dos heterociclos **3a**, **3d** e **7** poderão ser importantes em casos de intoxicações por organofosforados levando a uma possível reativação da enzima.

3- CONCLUSÕES

Obteve-se, regioseletivamente, uma série de α -Oxocetenos O,N-acetais **2a-h** a partir da reação entre o β -oxotioxo éster **1** com diferentes amins primárias empregando a metodologia sob suporte sólido, K-10, associado ao uso de ultra-som. Esta regioseletividade observada foi atribuída, em parte, a acidez superficial da montmorillonita.

A estratégia sintética que foi abordada por nós para a obtenção de sistemas heterocíclicos polifuncionalizados que preservassem o grupo amino do enamino carbonílico precursor (α -Oxocetenos O,N-acetais) se mostrou satisfatória visto que não existe descrito na literatura rota semelhante. Obtivemos compostos amino pirazólicos **3a-g** e **4b,d-g** provenientes das reações de ciclização dos O,N-acetais com os dinucleófilos hidrazina e fenil hidrazina respectivamente, utilizando a metodologia de reações em meio heterogêneo.

Com a perspectiva de avaliarmos a regioquímica nas reações de ciclização dos O,N-acetais **2a,e** e do seu precursor o β -oxotioxo éster **1** realizamos um estudo através da utilização do suporte sólido empregando os dinucleófilos cloridratos de hidrazina e fenil hidrazina. Foram formados a partir desde estudo heterociclos de diferentes padrões moleculares, os etóxi pirazóis **5**, **6** e **7**, observando-se que o meio ácido proporcionado pelos sais de hidrazinas foi um dos aspectos determinantes para a formação destes novos padrões, além da provável contribuição do argilo mineral, K-10, na geração dos produtos discutidos.

Foi observado que a formação do heterociclo **5** ocorreu tanto através dos enamino carbonílicos **2a,e** como também a partir do β -oxotioxo éster **1** utilizando o cloridrato de hidrazina, estes mesmos substratos frente a cloridrato de fenil hidrazina geraram os regioisômeros **6** e **7** respectivamente.

Sob condições brandas (K-10/ ultra-som) e na ausência de solvente foram obtidos seletivamente todos os O,N-acetais, os requeridos sistemas amino pirazólicos e também os etóxi pirazóis descritos anteriormente, o que denota a eficiência da nova metodologia empregada e rota adotada.

Os resultados da avaliação biológica *in vitro* frente aos diferentes microrganismos indicaram que entre os compostos heterocíclicos do tipo pirazóis discutidos a série 5(3)-amino-substituído 3(5)-fenil 1H-pirazóis **3a-g**, apresentou acentuado caráter antibacteriano.

Além disso, durante o estudo de investigação da relação estrutura atividade foi possível detectar através de um paralelo dos resultados dos amino pirazóis **3a-g** com o etóxi

pirazol **5**, que a presença do grupo amino na posição 3(5) do anel potencializou a atividade antibacteriana contra as bactérias testadas. Outra notável constatação foi que independente da substituição na posição 3 ou 5 do anel pirazólico, grupo amino na série **4b,d-g** ou grupo etóxi no composto **7**, e provavelmente devido a presença do substituinte fenil na posição N-1 do anel estes heterociclos não apresentaram atividade contra todos os microrganismos empregados.

Nossos resultados demonstraram que os compostos **3a, 3d, 3e, 5 e 7** alteraram *in vitro* a atividade da enzima AChE em estriado, córtex e hipocampo cerebral de ratos. Sendo que somente os heterociclos **3e** e **5** inibiram moderadamente a enzima acetilcolinesterase em estriado e córtex cerebral respectivamente. Enquanto que os compostos **3a, 3d e 7** aumentaram significativamente a atividade da enzima AChE, resultado não esperado visto que a literatura atualmente descreve que heterociclos nitrogenados são inibidores da enzima AChE sendo promissores agentes terapêuticos para situações patológicas que envolvam o sistema colinérgico. Entretanto esses heterociclos, **3a, 3d e 7**, poderão ser importantes em casos de intoxicações por organofosforados levando a uma possível reativação da enzima, visto que muitos dos sintomas provenientes da intoxicação por organofosforados são devido a inibição da enzima AChE.

4- PARTE EXPERIMENTAL

4.1- Instrumentação Geral

A identificação dos compostos foi realizada por métodos espectroscópicos e por cristalografia de raio-x. Os espectros de ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C foram registrados em solução de clorofórmio deuterado (CDCl_3), com TMS como referência interna em Espectrômetro BRUKER DPX-200 e BRUKER DPX-400 que operam a 200 MHz para ^1H e 50 MHz para ^{13}C e 400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C respectivamente.

As medidas cristalográficas foram feitas através do aparelho Bruker Kappa-Apex II CCD empregando radiação $\text{Mo K}\alpha$ sendo utilizados os programas SHELXS-97, SHELXL-97 e ROTAX-2001 para refinar e resolver as estruturas.

Os pontos de fusão foram determinados em um aparelho Microquímica MQAPF-301 digital com termômetro não aferido.

As reações realizadas em meio heterogêneo foram efetuadas com o suporte sólido Montmorillonita (K-10) da marca Fluka.

O ultra-som (água) utilizado foi da marca Thornton, 50-60 Hz, 110/220 volts, 1.0 amps.

4.2- Reagentes e Solventes

O amideto de sódio 95% utilizado foi da marca Vetec.

O iodeto de metila usado foi da marca Merck.

Os solventes utilizados para a síntese dos compostos em estudo, foram de qualidade técnica ou p.a, e quando necessário purificados ou secos segundo procedimentos usuais descritos na literatura.⁶⁹

A sílica gel usada foi da marca Vetec (70-230 mesh).

⁶⁹ Perrin, D. D.; Armarego, L.F. “*Purification of Laboratory Chemicals*” 3rd Edition, Pergamon Press, São Paulo, SP, 1988.

4.3 – Síntese do β -oxotioxo éster 1

4.3.1– Síntese do O-etil ditiocarbonato de potássio

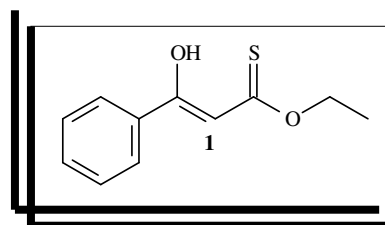
Em um balão de fundo redondo, provido de condensador de refluxo e agitação magnética, colocou-se 8,4 g (0,15 mols) de hidróxido de potássio em pastilhas e 30,0 mL de etanol absoluto, deixou-se sob refluxo por uma hora. Esfriou-se e transferiu-se o líquido para outro frasco seco, adicionou-se lentamente e com constante agitação 11,4 g (9,0 mL, 0,15 mols) de dissulfeto de carbono. Resfriou-se sob gelo, filtrou-se à vácuo o sólido resultante usando funil de vidro sinterizado, lavou-se com éter etílico (3 x 25,0 mL) e secou-se o produto obtido em dessecador a vácuo provido de sílica gel. Depois de seco o sólido adquire uma coloração marrom claro, obteve-se 78 % de rendimento.

4.3.2– Síntese do O-etil S-metil ditiocarbonato

Em um balão de fundo redondo, provido de agitação magnética adicionou-se 6,4 g (0,04 mols) de O-Etil ditiocarbonato de potássio em 30,0 mL de etanol absoluto. Adicionou-se sob gelo, 3,0 mL (0,04 mols) de iodeto de metila gota a gota. Deixou-se sob agitação por uma hora, a temperatura ambiente. Filtrou-se o sólido obtido, lavou-se com diclorometano. Secou-se com sulfato de magnésio anidro e evaporou-se o solvente em evaporador rotatório, obteve-se o produto líquido de coloração castanho escuro com 85 % de rendimento.

4.3.3– Síntese do O-etil 3-oxo 3-fenil propanotiolato (β -oxotioxo éster 1)

Uma mistura de S-metil O-etil ditiocarbonato (13,6 g, 100,0 mmols) e acetofenona (12,0 g, 100,0 mmols) foi adicionada gota a gota em uma suspensão de NaNH_2 (7,8 g, 200,0 mmols) em tolueno (100,0 mL) sob agitação à



0 °C. Após, elevou-se a temperatura da mistura até a t.a. e agitou-se continuamente por 10 h. Adicionou-se a mistura 200,0 mL de água gelada, acidificou-se com HCl diluído (10%) e extraiu-se com éter etílico (100,0 mL). Lavou-se a fase orgânica com solução saturada de NaCl (100,0 mL), secou-se com sulfato de magnésio anidro e concentrou-se sob vácuo. O resíduo foi purificado por coluna cromatográfica usando como eluente éter de petróleo/acetato de etila 15 %, obteve-se 79 % de rendimento do composto 1.

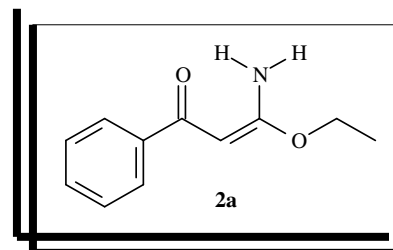
RMN ^1H (CDCl_3): δ 1,40 (t, 3H, CH_3 , $J=7,2$ Hz, H-5); 4,51 (q, 2H, CH_2 , $J=7,2$ Hz, H-4); 6,35 (s, 1H, CH, H-2); 7,37-7,46 (m, 3H, CH, Ph); 7,79-7,84 (m, 2H, CH, Ph); 14,15 (s, 1H, OH) ppm.

RMN ^{13}C (CDCl_3): δ 13,75 (C-5); 65,45 (C-4); 100,63 (C-2); 126,13 (C-7,7'); 128,52 (C-8,8'); 131,48 (C-9); 134,43 (C-6); 172,38 (C-1); 208,26 (C-3) ppm.

4.4– Síntese dos α -oxocetenos O,N-acetais 2a-h

4.4.1– Síntese do α -oxoceteno 3-amino 3-etóxi acetal (2a)- Reação entre β -oxotioxo éster (1) e hidróxido de amônio

Em um balão de fundo redondo, colocou-se 3,0 g de K-10, impregnou-se com 2,1 g (10,0 mmols) do β -oxotioxo éster (1) e adicionou-se hidróxido de amônio 2,1 g (12,0 mmols). Deixou-se por 22 h em banho de ultra-



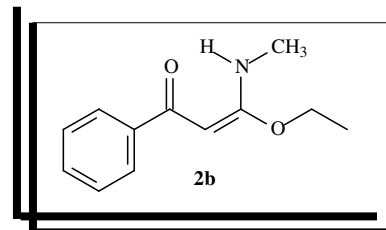
som. Lavou-se o bruto reacional com diclorometano e filtrou-se a vácuo. Lavou-se o filtrado com água, secou-se com sulfato de magnésio anidro e evaporou-se o solvente sob vácuo. Purificou-se através de coluna cromatográfica de sílica gel usando como eluente hexano/acetato de etila 20 %, obteve-se 78 % de rendimento do composto 2a. p.f.= 75-78 °C

RMN ^1H (CDCl_3): δ 1,27 (t, 3H, CH_3 , $J=7,0$ Hz, H-5); 4,03 (q, 2H, CH_2 , $J=7,0$ Hz, H-4); 5,39 (s, 1H, CH, H-2); 7,36-7,39 (m, 3H, CH, Ph); 7,82-7,86 (m, 2H, CH, Ph); 10,08 (sl, 1H, NH) ppm.

RMN ^{13}C (CDCl_3): δ 13,88 (C-5); 63,57 (C-4); 74,70 (C-2); 126,43 (C-7,7'); 127,78 (C-8,8'); 130,13 (C-9); 140,52 (C-6); 169,57 (C-3); 187,51 (C-1) ppm.

4.4.2– Síntese do α -oxoceteno 3-etóxi 3-metilamino acetal (**2b**)- Reação entre β -oxotioxo éster (**1**) e metilamina

Em um balão de fundo redondo, colocou-se 2,4 g de K-10, impregnou-se com 1,7 g (8,1 mmols) do β -oxotioxo éster (**1**) e adicionou-se metilamina 1,1 mL (9,7 mmols,



$d=0,67$). Deixou-se por 22 h em banho de ultra-som. Lavou-se o bruto reacional com diclorometano e filtrou-se a vácuo. Lavou-se o filtrado com água, secou-se com sulfato de magnésio anidro e evaporou-se o solvente sob vácuo. Purificou-se através de coluna cromatográfica de sílica gel usando como eluente éter de petróleo/acetato de etila 30 %, obteve-se 45 % de rendimento do composto **2b**. p.f.= 53-54 °C.

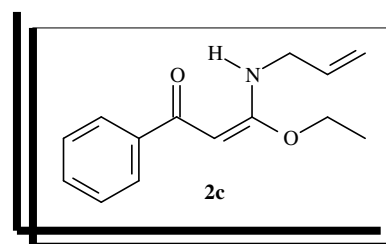
RMN ^1H (CDCl_3): δ 1,41 (t, 3H, CH_3 , $J=7,0$ Hz, H-5); 2,92 (d, 3H, CH_3 , $J=5,0$ Hz, H-10); 4,15 (q, 2H, CH_2 , $J=7,0$ Hz, H-4); 5,37 (s, 1H, CH, H-2); 7,35-7,42 (m, 3H, CH, Ph); 7,80-7,85 (m, 2H, CH, Ph); 10,91 (sl, 1H, NH) ppm.

RMN ^{13}C (CDCl_3): δ 14,28 (C-5); 26,36 (C-10) 64,26 (C-4); 73,98 (C-2); 126,50 (C-7,7'); 127,96 (C-8,8'); 129,99 (C-9); 141,08 (C-6); 169,08 (C-3); 186,34 (C-1) ppm.

4.4.3– Síntese do α -oxoceteno 3-alilamino 3-etóxi acetal (**2c**)- Reação entre β -oxotioxo éster (**1**) e alilamina

Em um balão de fundo redondo, colocou-se 3,3 g de K-10, impregnou-se com 2,3 g (11,6 mmols) do β -oxotioxo éster (**1**) e adicionou-se alilamina 0,8 g (13,4 mmols).

Deixou-se por 22 h em banho de ultra-som. Lavou-se o bruto reacional com diclorometano e filtrou-se a vácuo. Lavou-se o filtrado com água, secou-se com sulfato de magnésio anidro e evaporou-se o solvente sob vácuo. Purificou-se através de coluna cromatográfica de sílica gel usando como eluente hexano/acetato de etila 20 %, obteve-se 45 % de rendimento do composto **2c**. p.f.= 51-52 °C

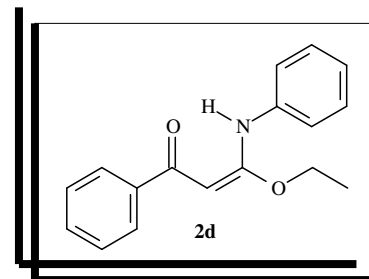


RMN ^1H (CDCl_3): δ 1,41 (t, 3H, CH_3 , $J=7,0$ Hz, H-5); 3,93-3,98 (m, 2H, CH_2 , H-10); 4,16 (q, 2H, H_2 , $J=7,0$ Hz, H-4); 5,12-5,31 (m, 2H, CH_2 , H-12); 5,40 (s, 1H, CH, H-2); 5,80-5,99 (m, 1H, CH, H-11); 7,36-7,42 (m, 3H, CH, Ph); 7,82-7,86 (m, 2H, CH, Ph); 11,09 (sl, 1H, NH) ppm.

RMN ^{13}C (CDCl_3): δ 14,20 (C-5); 42,30 (C-10); 64,20 (C-4); 73,90 (C-2); 115,80 (C-12); 126,40 (C-7,7'); 127,90 (C-8,8'); 130,00 (C-9); 133,70 (C-11); 140,80 (C-6); 168,30 (C-3); 186,50 (C-1) ppm.

4.4.4– Síntese do α -oxoceteno 3-etóxi 3-fenilamino acetal (2d)- Reação entre β -oxotioxo éster (1) e fenilamina

Em um balão de fundo redondo, colocou-se 2,9 g de K-10, impregnou-se com 2,0 g (9,6 mmols) do β -oxotioxo éster (1) e adicionou-se fenilamina 1,1 g (11,5 mmols). Deixou-se por 22 h em banho de ultra-som. Lavou-se o bruto reacional com diclorometano e filtrou-se a vácuo. Lavou-se o filtrado com água, secou-se com sulfato de magnésio anidro e evaporou-se o solvente sob vácuo. Purificou-se através de coluna cromatográfica de sílica gel usando como eluente hexano/acetato de etila 20 %, obteve-se 42 % de rendimento do composto **2d**. p.f.= 74-76 °C

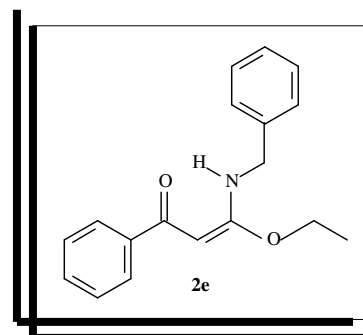


RMN ^1H (CDCl_3): δ 1,45 (t, 3H, CH_3 , $J=7,0$ Hz, H-5); 4,22 (q, 2H, CH_2 , $J=7,0$ Hz, H-4); 5,53 (s, 1H, CH, H-2); 7,03-7,90 (m, 10H, CH, Ph); 13,18 (sl, 1H, NH) ppm.

RMN ^{13}C (CDCl_3): δ 14,00 (C-5); 64,79 (C-4); 75,22 (C-2); 121,24 (C-11,11'); 123,67 (C-13); 126,55 (C-12,12'); 128,00 (C-7,7'); 128,71 (C-8,8'); 130,49 (C-9); 137,45 (C-10); 140,23 (C-6); 165,97 (C-3); 186,99 (C-1) ppm.

4.4.5– Síntese do α -oxoceteno 3-benzilamino 3-etóxi acetal (2e)- Reação entre β -oxotioxo éster (1) e benzilamina

Em um balão de fundo redondo, colocou-se 2,9 g de K-10, impregnou-se com 2,0 g (9,6 mmols) do β -oxotioxo éster (1) e adicionou-se benzilamina 1,2 g (11,5 mmols). Deixou-se por 22 h em banho de ultra-som. Lavou-se o bruto reacional com diclorometano e filtrou-se a vácuo. Lavou-se o



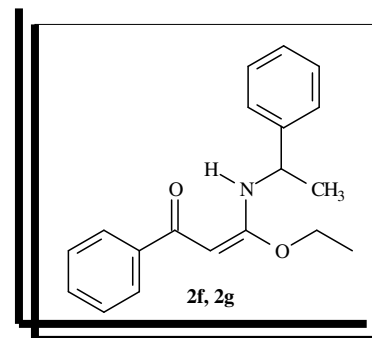
filtrado com água, secou-se com sulfato de magnésio anidro e evaporou-se o solvente sob vácuo. Purificou-se através de coluna cromatográfica de sílica gel usando como eluente hexano/acetato de etila 20 %, obteve-se 60 % de rendimento do composto **2e**. p.f.= 71-73 °C.

RMN ^1H (CDCl_3): δ 1,39 (t, 3H, CH_3 , $J=7,0$ Hz, H-5); 4,17 (q, 2H, CH_2 , $J=7,0$ Hz, H-4); 4,53 (d, 2H, CH_2 , $J=6,0$, H-10); 5,42 (s, 1H, CH, H-2); 7,26-7,41 (m, 8H, CH, Ph); 7,81-7,86 (m, 2H, CH, Ph); 11,38 (sl, 1H, NH) ppm.

RMN ^{13}C (CDCl_3): δ 14,27 (C-5); 43,98 (C-10); 64,42 (C-4); 74,09 (C-2); 126,58 (C-7,7'); 127,16 (C-12,12'); 127,24 (C-14); 128,03 (C-8,8'); 128,50 (C-13,13'); 130,42 (C-9); 138,15 (C-6); 140,80 (C-11); 168,37 (C-3); 186,70 (C-1) ppm.

4.4.6– Síntese do α -oxoceteno 3-(R)(+)- α -feniletilamino 3-etóxi acetal (**2f**) e α -oxoceteno 3-(S)(+)- α -feniletilamino 3-etóxi acetal (**2g**)- Reação entre β -oxotioxo éster (**1**) com (R)(+)- α -metilbenzilamina ou (S)(-)- α -metilbenzilamina

Em um balão de fundo redondo, colocou-se 2,9 g de K-10, impregnou-se com 2,1 g (9,7 mmols) do β -oxotioxo éster (**1**) e adicionou-se (R)(+)- α -metilbenzilamina ou (S)(-)- α -metilbenzilamina 1,4 g (11,7 mmols). Deixou-se por 22 h em banho de ultra-som. Lavou-se o bruto reacional com diclorometano e filtrou-se a vácuo. Lavou-se o filtrado com água, secou-se com sulfato de magnésio anidro e evaporou-se o solvente sob vácuo. Purificou-se através de coluna cromatográfica de sílica gel usando como eluente hexano/acetato de etila 20 %, obteve-se 67 % de rendimento do composto **2f** na forma de óleo e 45 % de rendimento do composto **2g** (p.f.= 64-66 °C).

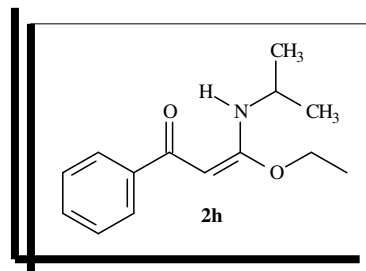


RMN ^1H (CDCl_3): δ 1,21 (t, 3H, CH_3 , $J=7,0$ Hz, H-5); 1,55 (d, 2H, CH_3 , $J=6,8$ Hz, H-11); 4,05 (m, 2H, CH_2 , H-4); 4,93 (qui, 1H, CH, $J=6,8$, H-10); 5,36 (s, 1H, CH, H-2); 7,22-7,87 (m, 10H, CH, Ph); 11,49 (sl, 1H, NH) ppm.

RMN ^{13}C (CDCl_3): δ 13,95 (C-5); 23,41 (C-11); 50,23 (C-10); 64,18 (C-4); 73,96 (C-2); 125,55 (C-7,7'); 126,45 (C-13,13'); 126,77 (C-15); 127,88 (C-8,8'); 128,30 (C-14,14'); 130,06 (C-9); 140,67 (C-6); 143,97 (C-12); 167,68 (C-3); 186,47 (C-1) ppm.

4.4.7– Síntese do α -oxoceteno 3-etóxi 3-isopropilamino acetal (**2h**)- Reação entre β -oxotioxo éster (**1**) e isopropilamina.

Em um balão de fundo redondo, colocou-se 2,9 g de K-10, impregnou-se com 2,0 g (9,6 mmols) do β -oxotioxo éster (**1**) e adicionou-se isopropilamina 0,7 g (11,5 mmols). Deixou-se por 22 h em banho de ultra-som. Lavou-se o bruto reacional com diclorometano e filtrou-se a vácuo. Lavou-se o filtrado com água, secou-se com sulfato de magnésio anidro e evaporou-se o solvente sob vácuo. Purificou-se através de coluna cromatográfica de sílica gel usando como eluente hexano/ acetato de etila 20 %, obteve-se 82 % de rendimento do composto **2h** na forma de óleo.



RMN ¹H (CDCl₃): δ 1,26 (d, 6H, CH₃, $J=7,0$ Hz, H-11,11'); 1,41 (t, 3H, CH₃, $J=7,0$ Hz, H-5); 3,95-4,05 (m, 1H, CH, H-10); 4,16 (q, 2H, CH₂, $J=7,0$ Hz, H-4); 5,35 (s, 1H, CH, H-2); 7,36-7,40 (m, 3H, CH, Ph); 7,80-7,85 (m, 2H, CH, Ph); 10,95 (sl, 1H, NH) ppm.

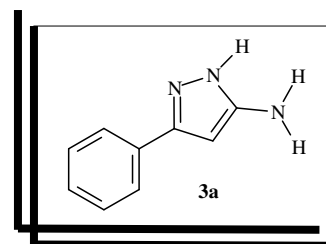
RMN ¹³C (CDCl₃): δ 14,60 (C-5); 23,40 (C-11,11'); 42,46 (C-10); 64,18 (C-4); 73,90 (C-2); 126,83 (C-7,7'); 128,30 (C-8,8'); 130,33 (C-9); 141,39 (C-6); 168,12 (C-3); 186,21 (C-1) ppm.

4.5– Síntese dos sistemas heterocíclicos

4.5.1– Síntese dos compostos amino pirazólicos 3a-g

4.5.1.1– Síntese do 5(3)-amino 3(5)-fenil 1H-pirazol (**3a**)- Reação entre α -oxoceteno 3-amino 3-etóxi acetal (**2a**) e hidrazina

Em um balão de fundo redondo adicionou-se 1,8 g de K-10, impregnou-se com 0,9 g (6,0 mmols) do α -oxoceteno 3-amino 3-etóxi acetal (**2a**) e gotejou-se 0,4 g (11,9 mmols) de hidrazina 80 %. Deixou-se sob agitação por 22 h em banho de



ultra-som. Lavou-se o bruto reacional com diclorometano e filtrou-se a vácuo. Lavou-se o filtrado com solução aquosa saturada de sal (NaCl), secou-se com sulfato de magnésio anidro

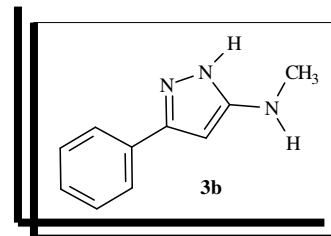
e evaporou-se o solvente sob vácuo. Recristalizou-se com éter diisopropílico, obteve-se 45 % de rendimento do composto **3a**. p.f.= 108-109 °C.

RMN ^1H (CDCl_3): δ 4,32 (sl, 3H, NH_2 , NH); 5,39 (s, 1H, CH, H-2); 7,23-7,66 (m, 5H, CH, Ph) ppm.

RMN ^{13}C (CDCl_3): δ 88,72 (C-2); 124,88 (C-5,5'); 127,40 (C-7); 128,23 (C-6,6'); 130,50 (C-4); 145,56 (C-3); 153,02 (C-1) ppm.

4.5.1.2– Síntese do 3(5)-fenil 5(3)-metilamino 1H-pirazol (3b)- Reação entre α -oxoceteno 3-etóxi 3-metilamino acetal (2b) e hidrazina

Em um balão de fundo redondo adicionou-se 1,1 g de K-10, impregnou-se com 0,7 g (3,7 mmols) do α -oxoceteno 3-etóxi 3-metilamino acetal (**2b**) e gotejou-se 0,2 g (7,4 mmols) de hidrazina 80 %. Deixou-se sob agitação por 22 h em banho de ultra-som. Lavou-se o bruto reacional com diclorometano e filtrou-se a vácuo. Lavou-se o filtrado com solução aquosa saturada de sal (NaCl), secou-se com sulfato de magnésio anidro e evaporou-se o solvente sob vácuo. Purificou-se por coluna cromatográfica de sílica gel usando como eluente diclorometano/acetato de etila 30 %, obteve-se 54 % de rendimento do composto **3b**. p.f.=122-124 °C.

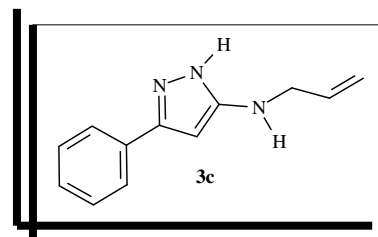


RMN ^1H (CDCl_3): δ 2,80 (s, 3H, CH_3 , H-8); 5,80 (s, 1H, CH, H-2); 6,90 (sl, 2H, NH); 7,23-7,59 (m, 5H, CH, Ph) ppm.

RMN ^{13}C (CDCl_3): δ 31,76 (C-8); 87,38 (C-2); 125,43 (C-5,5'); 127,97 (C-7); 128,68 (C-6,6'); 130,86 (C-4); 146,14 (C-3); 157,57 (C-1) ppm.

4.5.1.3– Síntese do 5(3)-alilamino 3(5)-fenil 1H-pirazol (3c)- Reação entre α -oxoceteno 3-alilamino 3-etóxi acetal (2c) e hidrazina

Em um balão de fundo redondo adicionou-se 1,3 g de K-10, impregnou-se com 1,0 g (4,5 mmols) do α -oxoceteno 3-alilamino 3-etóxi acetal (**2c**) e gotejou-se 0,3 g (9,0 mmols) de hidrazina 80 %. Deixou-se sob agitação por 22 h em banho de ultra-som. Lavou-se o bruto reacional com diclorometano e filtrou-se a vácuo. Lavou-se o filtrado com solução aquosa saturada de sal (NaCl), secou-se com sulfato



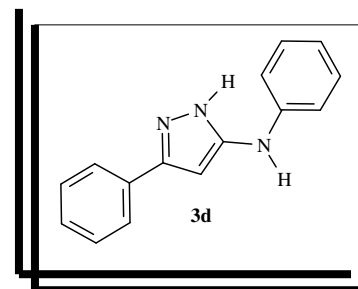
de magnésio anidro e evaporou-se o solvente sob vácuo. Purificou-se por coluna cromatográfica de sílica gel usando como eluente diclorometano/acetato de etila 30 %, obteve-se 50 % de rendimento do composto **3c**. p.f.=101-102 °C.

RMN ^1H (CDCl_3): δ 3,73-3,75 (m, 2H, CH_2 , H-8); 5,07-5,08 (m, 1H, CH_2 , H-10); 5,10-5,11 (m, 1H, CH_2 , H-10); 5,82 (s, 1H, CH, H-2); 5,87-5,97 (m, 1H, CH, H-9); 7,23-7,58 (m, 5H, CH, Ph) ppm.

RMN ^{13}C (CDCl_3): δ 49,13 (C-8); 87,04 (C-2); 115,80 (C-10); 125,44 (C-5,5'); 128,01 (C-7); 128,62 (C-6,6'); 130,75 (C-4); 135,71 (C-9); 146,10 (C-3); 156,41 (C-1) ppm.

4.5.1.4– Síntese do 5(3)-fenilamino 3(5)-fenil 1H-pirazol (**3d**)- Reação entre α -oxoceteno 3-etóxi 3-fenilamino acetal (**2d**) e hidrazina

Em um balão de fundo redondo adicionou-se 1,7 g de K-10, impregnou-se com 1,5 g (5,7 mmols) do α -oxoceteno 3-etóxi 3-fenilamino acetal (**2d**) e gotejou-se 0,4 g (11,4 mmols) de hidrazina 80 %. Deixou-se sob agitação por 22 h em banho de ultra-som. Lavou-se o bruto reacional com



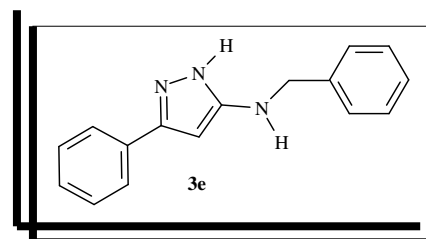
diclorometano e filtrou-se a vácuo. Lavou-se o filtrado com solução aquosa saturada de sal (NaCl), secou-se com sulfato de magnésio anidro e evaporou-se o solvente sob vácuo. Purificou-se em coluna cromatográfica de sílica gel usando como eluente hexano/acetato de etila 10 %, obteve-se 56 % de rendimento do composto **3d**. p.f.=153-154°C.

RMN ^1H (CDCl_3): δ 6,30 (sl, 2H, NH); 6,31 (s, 1H, CH, H-2); 6,79-7,72 (m, 10H, CH, Ph) ppm.

RMN ^{13}C (CDCl_3): δ 88,75 (C-2); 114,74 (C-9,9'); 118,33 (C-11); 124,37 (C-5,5'); 127,19 (C-7); 127,66 (C-10,10'); 127,88 (C-6,6'); 128,80 (C-4); 142,14 (C-8); 143,65 (C-3); 149,52 (C-1) ppm.

4.5.1.5– Síntese do 5(3)-benzilamino 3(5)-fenil 1H-pirazol (3e)- Reação entre α -oxoceteno 3-benzilamino 3-etóxi acetal (2e) e hidrazina

Em um balão de fundo redondo adicionou-se 1,6 g de K-10, impregnou-se com 1,5 g (5,3 mmols) do α -oxoceteno 3-benzilamino 3-etóxi acetal (2e) e gotejou-se 0,3 g (10,5 mmols) de hidrazina 80 %.



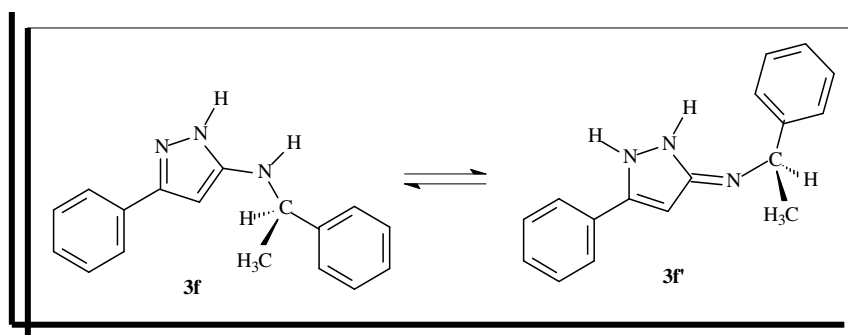
Deixou-se sob agitação por 22 h em banho de ultra-som. Lavou-se o bruto reacional com diclorometano e filtrou-se a vácuo. Lavou-se o filtrado com solução aquosa saturada de sal (NaCl), secou-se com sulfato de magnésio anidro e evaporou-se o solvente sob vácuo. Purificou-se por coluna cromatográfica de sílica gel usando como eluente hexano/acetato de etila 10 %, obteve-se 60 % de rendimento do composto 3e na forma de óleo.

RMN ^1H (CDCl_3): δ 4,19 (s, 2H, H-8); 5,72 (s, 1H, CH, H-2); 7,17-7,53 (m, 10H, CH, Ph) ppm.

RMN ^{13}C (CDCl_3): δ 49,13 (C-8); 87,55 (C-2); 125,43 (C-5,5'); 126,93 (C-12); 127,33 (C-10,10'); 127,90 (C-7); 128,32 (C-11,11'); 128,61 (C-6,6'); 130,64 (C-4); 139,43 (C-9); 146,07 (C-3); 156,42 (C-1) ppm.

4.5.1.6– Síntese do 5(3)-(R)(+)- α -feniletilamino 3(5)-fenil 1H-pirazol (3f)- Reação entre α -oxoceteno 3-(R)(+)- α -feniletilamino 3-etóxi acetal (2f) e hidrazina

Em um balão de fundo redondo adicionou-se 1,7 g de K-10, impregnou-se com 1,7 g (5,8



mmols) do α -oxoceteno 3-etóxi 3-((R)-1-feniletilamino) acetal (2f) e gotejou-se 0,4 g (11,6 mmols) de hidrazina 80 %. Deixou-se sob agitação por 22 h em banho de ultra-som. Lavou-se o bruto reacional com diclorometano e filtrou-se a vácuo. Lavou-se o filtrado com solução aquosa saturada de sal (NaCl), secou-se com sulfato de magnésio anidro e evaporou-se o solvente sob vácuo. Purificou-se por coluna cromatográfica de sílica gel usando como eluente

diclorometano/acetato de etila 30 %, obteve-se 51 % de rendimento do composto **3f** na forma de óleo.

RMN ^1H (CDCl_3): δ 1,48 (d, 3H, CH_3 , $J=6,8$ Hz, H-13); 1,52 (d, 3H, CH_3 , $J=6,8$ Hz, H-13'); 4,53 (q, 1H, CH, $J=6,8$ Hz, H-8'); 5,24 (qui, 1H, CH, $J=6,8$ Hz, H-8); 5,54 (s, 1H, CH, H-2); 5,98 (sl, 1H, NH); 7,17-7,50 (m, 10H, CH, Ph) ppm.

RMN ^{13}C (CDCl_3): δ 21,62 (C-13); 24,45 (C-13'); 47,59 (C-8); 54,75 (C-8'); 88,58 (C-2); 125,32 (C-12); 125,95 (C-5,5'); 126,13 (C-10,10'); 127,51 (C-7); 128,05 (C-6,6'); 128,72 (C-11,11'); 130,69 (C-4); 145,20 (C-9); 145,70 (C-3); 155,81 (C-1) ppm.

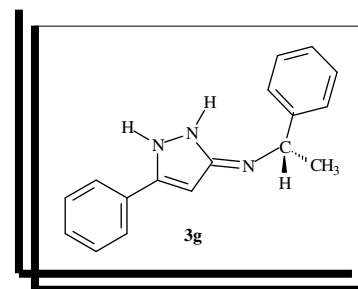
4.5.1.7– Síntese do 5(3)-(S)(-)- α -feniletilamino 3(5)-fenil 1H-pirazol (3g)- Reação entre α -oxoceteno 3-(S)(-)- α -feniletilamino 3-etóxi acetal (2g) e hidrazina

Em um balão de fundo redondo adicionou-se 1,9 g de K-10, impregnou-se com 1,9 g (6,4 mmols) do α -oxoceteno 3-(S)-feniletilamino 3-etóxi acetal (**2g**) e gotejou-se 0,4 g (12,9 mmols) de hidrazina 80 %. Deixou-se sob agitação por

22 h em banho de ultra-som. Lavou-se o bruto reacional com diclorometano e filtrou-se a vácuo. Lavou-se o filtrado com solução aquosa saturada de sal (NaCl), secou-se com sulfato de magnésio anidro e evaporou-se o solvente sob vácuo. Purificou-se por coluna cromatográfica de sílica gel usando como eluente hexano/acetato de etila 30 %, obteve-se 40 % de rendimento do composto **3g** na forma de óleo.

RMN ^1H (CDCl_3): δ 1,45 (d, 3H, CH_3 , $J=6,8$ Hz, H-13); 4,46 (q, 1H, CH, $J=6,8$ Hz, H-8); 5,63 (s, 1H, CH, H-2); 6,34 (sl, 1H, NH); 7,27-7,50 (m, 10H, CH, Ph) ppm.

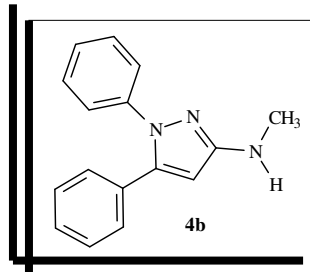
RMN ^{13}C (CDCl_3): δ 24,47 (C-13); 54,74 (C-8); 88,38 (C-2); 125,42 (C-12); 125,91 (C-5,5'); 126,90 (C-10,10'); 128,04 (C-7); 128,51 (C-6,6'); 128,70 (C-11,11'); 130,72 (C-4); 145,12 (C-9); 145,89 (C-3); 155,61 (C-1) ppm.



4.5.2– Síntese dos compostos amino pirazólicos 4b,d-g

4.5.2.1– Síntese do 1,5-difenil 3-metilamino pirazol (4b)- Reação entre α -oxoceteno 3-etóxi 3-metilamino acetal (2b) e fenil hidrazina

Em uma cápsula de porcelana adicionou-se 1,8 g de K-10, impregnou-se com 1,2 g (6,0 mmols) do α -oxoceteno 3-etóxi 3-metilamino acetal (2b) e colocou-se 1,3 g (12,1 mmols) de fenil hidrazina e macerou-se. Transferiu-se a mistura para um balão de fundo redondo e deixou-se sob agitação por 19 h em banho de ultra-som. Lavou-se o bruto reacional com diclorometano e filtrou-se a vácuo. Lavou-se o filtrado com solução aquosa saturada de sal (NaCl), secou-se com sulfato de magnésio anidro e evaporou-se o solvente sob vácuo. Purificou-se por coluna cromatográfica de sílica gel usando como eluente hexano/acetato de etila 30 %, obteve-se 39 % de rendimento do composto 4b. p.f.= 107-109 °C.

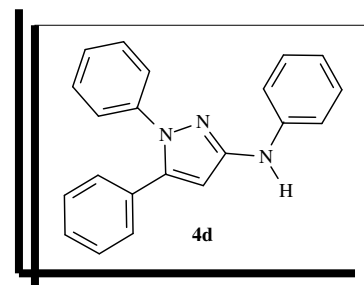


RMN ^1H (CDCl_3): δ 2,93 (s, 3H, CH_3 , H-8); 3,94, (sl, 1H, NH); 5,92 (s, 1H, CH, H-2); 7,19-7,28 (m, 10H, CH, Ph) ppm.

RMN ^{13}C (CDCl_3): δ 31,57 (C-8); 94,56 (C-2); 124,76 (C-10,10'); 126,48 (C-7); 128,18 (C-12); 128,31 (C-5,5'); 128,58 (C-6,6'); 128,72 (C-11,11'); 130,69 (C-4); 139,96 (C-9); 144,14 (C-3); 157,62 (C-1) ppm.

4.5.2.2– Síntese do 1,5-difenil 3-fenilamino pirazol (4d)- Reação entre α -oxoceteno 3-etóxi 3-fenilamino acetal (2d) e fenil hidrazina

Em uma cápsula de porcelana adicionou-se 1,4 g de K-10, impregnou-se com 1,3 g (4,8 mmols) do α -oxoceteno 3-etóxi 3-fenilamino acetal (2d) e colocou-se 1,0 g (9,6 mmols) de fenil hidrazina e macerou-se. Transferiu-se a mistura para um balão de fundo redondo e deixou-se sob agitação por 19 h em banho de ultra-som. Lavou-se o bruto reacional com diclorometano e filtrou-se a vácuo. Lavou-se o filtrado com solução aquosa saturada de sal (NaCl), secou-se com sulfato de magnésio anidro e evaporou-se o solvente sob vácuo. Purificou-se por coluna cromatográfica de sílica gel usando



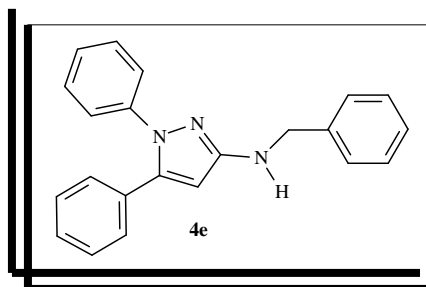
como eluente hexano/acetato de etila 25 %, obteve-se 43 % de rendimento do composto **4d** na forma de óleo.

RMN ^1H (CDCl_3): δ 6,26 (s, 1H, CH, H-2); 6,31 (sl, 1H, NH); 7,19-7,32 (m, 15H, CH, Ph) ppm.

RMN ^{13}C (CDCl_3): δ 97,23 (C-2); 116,13 (C-9,9'); 120,10 (C-11); 124,77 (C-13,13'); 126,68 (C-7); 128,30 (C-15); 128,40 (C-5,5'); 128,68 (C-10,10'); 128,74 (C-6,6'); 129,17 (C-14,14'); 130,59 (C-4); 139,97 (C-12); 142,81 (C-8); 143,60 (C-3); 151,97 (C-1) ppm.

4.5.2.3– Síntese do 3-benzilamino 1,5-difenil pirazol (4e)- Reação entre α -oxoceteno 3-benzilamino 3-etóxi acetal (2e) e fenil hidrazina

Em uma cápsula de porcelana adicionou-se 1,6 g de K-10, impregnou-se com 1,8 g (5,4 mmols) do α -oxoceteno 3-benzilamino 3-etóxi acetal (**2e**) e colocou-se 1,2 g (10,7 mmols) de fenil hidrazina e macerou-se. Transferiu-se a mistura para um balão de fundo redondo e deixou-se sob agitação por 19 h em banho de ultra-som. Lavou-se o bruto reacional com diclorometano e filtrou-se a vácuo. Lavou-se o filtrado com solução aquosa saturada de sal (NaCl), secou-se com sulfato de magnésio anidro e evaporou-se o solvente sob vácuo. Purificou-se por coluna cromatográfica de sílica gel usando como eluente hexano/acetato de etila 10 %, obteve-se 19 % de rendimento do composto **4e**. p.f.=114-116 °C.

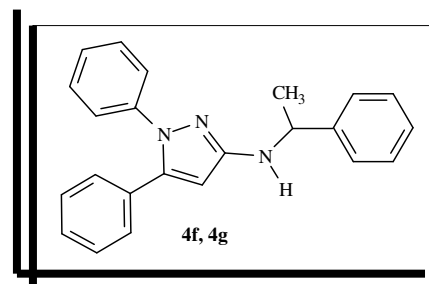


RMN ^1H (CDCl_3): δ 3,87 (sl, 1H, NH); 4,42 (s, 2H, CH_2 , H-8); 5,83 (s, 1H, CH, H-2); 7,14-7,42 (m, 15H, CH, Ph) ppm.

RMN ^{13}C (CDCl_3): δ 48,96 (C-8); 94,73 (C-2); 124,62 (C-14,14'); 126,25 (C-12); 127,04 (C-7); 127,54 (C-5,5'); 128,05 (C-16); 128,25 (C-10,10'); 128,42 (C-6,6'); 128,56 (C-11,11'); 128,61 (C-15,15'); 130,85 (C-4); 139,81 (C-9); 140,14 (C-13); 143,84 (C-3); 157,19 (C-1) ppm.

4.5.2.4– Síntese do 3-(R)(+)- α -feniletilamino 1,5-difenil pirazol (4f) e 3-(S)(-)- α -feniletilamino 1,5-difenil pirazol (4g) - Reação entre α -oxoceteno 3-(R)(+)- α -feniletilamino 3-etóxi acetal (2f) ou α -oxoceteno 3-(S)(-)- α -feniletilamino 3-etóxi acetal (2g) com fenil hidrazina

Em um balão de fundo redondo colocou-se 1,8 g de K-10, impregnou-se com 2,4 g (8,1 mmols) do α -oxoceteno 3-etóxi 3-((R)-1-feniletilamino) acetal (2f) ou α -oxoceteno 3-etóxi 3-((S)-1-feniletilamino) acetal



(2g) e colocou-se 1,8 g (16,2 mmols) de fenil hidrazina. Deixou-se sob agitação por 19 h em banho de ultra-som. Lavou-se o bruto reacional com diclorometano e filtrou-se a vácuo. Lavou-se o filtrado com solução aquosa saturada de sal (NaCl), secou-se com sulfato de magnésio anidro e evaporou-se o solvente sob vácuo. Purificou-se em coluna cromatográfica de sílica gel usando como eluente hexano/acetato de etila 10 %, obteve-se 10 % de rendimento do composto **4f** na forma de óleo. Purificou-se em coluna cromatográfica de sílica gel usando como eluente hexano/acetato de etila 25 %, obteve-se 21 % de rendimento do composto **4g** na forma de óleo.

RMN ^1H (CDCl_3): δ 1,45 (d, 3H, CH_3 , $J=6,8$ Hz, H-13); 4,46 (q, 1H, CH, $J=6,8$ Hz, H-8); 4,58 (sl, 1H, NH); 5,55 (s, 1H, CH, H-2); 7,05-7,33 (m, 15H, CH, Ph) ppm.

RMN ^{13}C (CDCl_3): δ 24,35 (C-13); 54,57 (C-8); 94,38 (C-2); 124,56 (C-15,15'); 126,04 (C-5,5'); 126,36 (C-12); 126,87 (C-7); 128,10 (C-17); 128,21 (C-10,10'); 128,45 (C-6,6'); 128,54 (C-16,16'); 128,62 (C-11,11'); 130,62 (C-4); 139,80 (C-14); 143,74 (C-3); 145,21 (C-9); 156,37 (C-1) ppm.

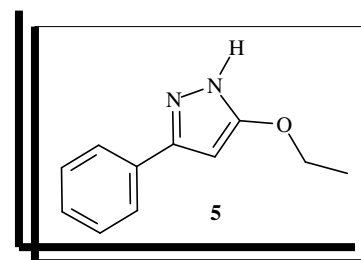
4.5.3– Síntese dos compostos etóxi pirazólicos 5, 6 e 7

4.5.3.1– Síntese do 5(3)-etóxi 3(5)-fenil 1H- pirazol (5)- Reação entre α -oxoceteno 3-amino 3-etóxi acetal (2a), α -oxoceteno 3-benzilamino 3-etóxi acetal (2e) ou β -oxotioxo éster (1) com cloridrato de hidrazina

Em um balão de fundo redondo colocou-se 2,2 g de K-10, impregnou-se com 1,4 g (7,2 mmols) do α -oxoceteno (2a) ou 1,9 g (6,8 mmols) α -oxoceteno 3-benzilamino 3-etóxi (2e) ou 1,5 g (7,2 mmols) do β -oxotioxo éster (1) e adicionou-se 1,0 g (14,4 mmols) de cloridrato de hidrazina. Deixou-se sob agitação por 22 h com os substratos 2a,e e 20 h com 1 em banho de ultra-som. Lavou-se o bruto reacional com diclorometano e filtrou-se a vácuo. Lavou-se o filtrado com solução aquosa saturada de sal (NaCl), secou-se com sulfato de magnésio anidro e evaporou-se o solvente sob vácuo. Purificou-se por coluna cromatográfica de sílica gel usando como eluente éter de petróleo/acetato de etila 15 %, obteve-se 59 % de rendimento do composto 5 a partir de 2a e 43 % de rendimento de 5 a partir de 2e. Purificou-se por coluna cromatográfica de sílica gel usando como eluente hexano/acetato de etila 20 %, obteve-se 47 % de rendimento do composto 5 a partir de 1. p.f.= 127-129 °C.

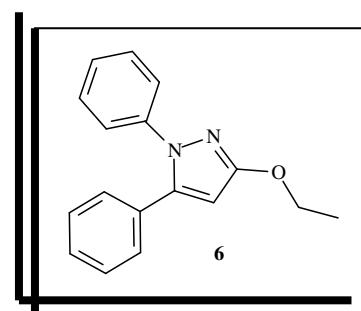
RMN ^1H (CDCl_3): δ 1,37 (t, 3H, J =6,8 Hz, H-9), 4,22 (q, 2H, J =6,8 Hz, H-8); 5,93 (s, 1H, CH, H-2); 7,32-7,60 (m, 5H, CH, Ph) ppm.

RMN ^{13}C (CDCl_3): δ 14,84 (C-9); 65,00 (C-8); 87,93 (C-2); 125,36 (C-5,5'); 128,44 (C-7); 128,87 (C-6,6'); 129,98 (C-4); 144,95 (C-3); 163,96 (C-1) ppm.



4.5.3.2– Síntese do 1,5-difenil 3-etóxi pirazol (6)- Reação entre α -oxoceteno 3-amino 3-etóxi acetal (2a) ou α -oxoceteno 3-benzilamino 3-etóxi (2e) e cloridrato de fenil hidrazina

Em uma cápsula de porcelana adicionou-se 1,8 g de K-10, impregnou-se com 1,1 g (6,0 mmols) do α -oxoceteno 3-amino 3-etóxi acetal (2a) ou 1,7 g (6,0 mmols) do



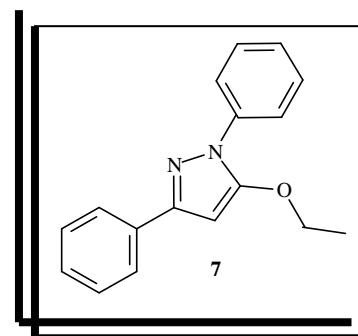
α -oxoceteno 3-benzilamino 3-etóxi (**2e**) e colocou-se 1,7 g (12,0 mmols) de cloridrato de fenil hidrazina e macerou-se. Transferiu-se a mistura para um balão de fundo redondo e deixou-se sob agitação por 19 h em banho de ultra-som. Lavou-se o bruto reacional com diclorometano e filtrou-se a vácuo. Lavou-se o filtrado com solução aquosa saturada de sal (NaCl), secou-se com sulfato de magnésio anidro e evaporou-se o solvente sob vácuo. Purificou-se por coluna cromatográfica de sílica gel usando como eluente hexano /acetato de etila 10 %, obteve-se 63 % de rendimento do composto **6** a partir do composto **2a** e 38 % de rendimento de **6** a partir de **2e** na forma de óleo.

RMN ^1H (CDCl_3): δ 1,43 (t, 3H, $J=7,0$ Hz, H-9); 4,31 (q, 2H, $J=7,0$ Hz, H-8); 5,95 (s, 1H, CH, H-2); 7,19-7,31 (m, 10H, CH, Ph) ppm.

RMN ^{13}C (CDCl_3): δ 14,88 (C-9); 64,71 (C-8); 93,69 (C-2); 124,93 (C-11,11'); 126,61 (C-7); 128,27 (C-13); 128,37 (C-5,5'); 128,69 (C-6,6'); 128,74 (C-12,12'); 130,77 (C-4); 140,11 (C-10); 144,11(C-3); 163,53 (C-1) ppm.

4.5.3.3– Síntese do 1,3-difenil 5-etóxi pirazol (**7**)- Reação entre β -oxotioxo éster (**1**) e cloridrato de fenil hidrazina

Em um balão de fundo redondo colocou-se 1,4 g de K-10, impregnou-se com 1,0 g (4,8 mmols) do β -oxotioxo éster (**1**) e em seguida adicionou-se 1,4 g (9,6 mmols) de cloridrato de fenil hidrazina. Deixou-se sob agitação por 24 h em banho de ultra-som. Lavou-se o bruto reacional com diclorometano e filtrou-se a vácuo. Lavou-se o filtrado com solução aquosa saturada de sal (NaCl), secou-se com sulfato de magnésio anidro e evaporou-se o solvente sob vácuo. Purificou-se em coluna cromatográfica de sílica gel usando como eluente hexano/ diclorometano 15 %, obteve-se 52 % de rendimento do composto **7**. p.f.=67-69 °C.



RMN ^1H (CDCl_3): δ 1,46 (t, 3H, $J=7,0$ Hz, H-9); 4,21 (q, 2H, $J=7,0$ Hz, H-8); 5,97 (s, 1H, CH, H-2); 7,23-7,86 (m, 10H, CH, Ph) ppm.

RMN ^{13}C (CDCl_3): δ 14,56 (C-9); 68,02 (C-8); 83,74 (C-2); 122,02 (C-11,11'); 125,49 (C-5,5'); 126,04 (C-13); 127,97 (C-7); 128,47 (C-12,12'); 128,73 (C-6,6'); 133,32 (C-4); 138,77 (C-10); 150,43 (C-3); 155,24 (C-1) ppm.

4.6– Determinação da atividade biológica in vitro

4.6.1– Determinação da atividade antimicrobiana pelo método de bioautografia

A análise da atividade antimicrobiana foi realizada no laboratório de microbiologia do Núcleo de Pesquisa de Produtos Naturais (NPPN) do Departamento de Química da UFSM sob coordenação do prof. Dr. Ademir F. Morel.

O bioensaio pelo método de bioautografia foi realizado de acordo com Hostettmann.⁶¹ As amostras analisadas foram aplicadas em uma série de concentrações na faixa de 0,15-100,0 µg em placas de CCD (Sílica-gel 60 F₂₅₄). Posteriormente as cromatoplas foram depositadas em placas de Petri (10 x 100 mm) estéreis, em seguida foi adicionado 10,0 mL do meio de cultura inoculado em cada placa com o respectivo microrganismo indicador. Após 20-30 min. de descanso as placas de Petri foram invertidas e incubadas.

Decorrido o período de incubação de 18-24 h a 35-37°C para bactérias gram-positivas (*Staphylococcus aureus* {ATCC 6538p}, *Staphylococcus epidermidis* {ATCC 12228}, *Bacillus subtilis* {ATCC 6633}) e gram-negativas (*Escherichia coli* {ATCC 25792}, *Salmonella setubal* {ATCC 19796}, *Klebsiella pneumoniae* {ATCC 10031}, *Pseudomonas aeruginosa* {ATCC 27853}) e de 48-72 h a 25-28 °C para fungos (*Saccharomyces cerevisiae* {ATCC 2601}, *Candida albicans* {ATCC 10231}, *Cryptococcus neoformans* {ATCC 28952}, *Candida dubliniensis* {isolado clínico SM-26}) as cromatoplas foram reveladas com uma solução aquosa sal de tetrazóleo e incubadas por um período de 2 a 4 h a 35 °C.

O inóculo foi padronizado de acordo com a escala de 0,5 de MacFarland;

O meio de cultura utilizado para as bactérias foi Ágar Müller-Hinton e para os fungos Ágar Sabourand, ambos mantidos em banho-maria (45-50°C); O padrão antibiótico utilizado para as bactérias foi Cloranfenicol e para fungos Nistatina. O padrão é aplicado na placa de CCD na quantidade específica para cada microrganismo.

4.6.2– Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) pelo método de microdiluição

Os ensaios foram realizadas no laboratório de microbiologia do Núcleo de Pesquisa de Produtos Naturais (NPPN) do Departamento de Química da UFSM. As análises foram realizadas em placas estéreis de 96 micropoços, onde efetuou-se uma série de diluições das amostras em meio caldo caseína de soja e sabouraud, contendo 2 % do surfactante Tween 80, iniciando da concentração de 20,0 mg/mL de amostra. Os poços foram então inoculados com a suspensão microbiana com intensa homogeneização, e as placas foram incubadas por 24 horas a 35 °C para bactérias e por 48 horas a 25 °C para fungos. Após o período de incubação, observou-se o crescimento microbiano, indicado pelo aparecimento de turvação, possibilitando assim, a verificação da CIM.

As culturas que não apresentaram crescimento nos poços foram usadas para inocular placas de Petri contendo meio ágar onde foram determinados a CBM e CFM, sendo consideradas como: a menor concentração da substância onde não ocorre crescimento microbiano. Testes em branco foram efetuados simultaneamente e as amostras foram realizadas em triplicatas.

4.6.3– Determinação da atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE)

A análise da atividade da enzima acetilcolinesterase foi realizada no Departamento de Química no Setor de Bioquímica da UFSM sob orientação da prof. Dr^a Vera Morsch.

Utilizou-se ratos machos Wistar, pesando entre 200,0 – 280,0 g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Maria. Os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Química com temperatura e iluminação controlada e livre acesso à água e ração comercial.

Para a determinação da atividade da AChE cerebral os ratos foram anestesiados e submetidos à eutanásia. As estruturas cerebrais (córtex, estriado e hipocampo) foram separadas e homogeneizadas em tampão Tris-HCl 10,0 mM. O homogeneizado foi submetido à centrifugação a 1000,0 g por 10 min., e o sobrenadante obtido foi armazenado a -20 °C até o momento dos ensaios enzimáticos. A atividade da AChE foi determinada de acordo com o método de Ellmann e col.⁶⁸ O meio de reação foi composto de 100,0 mM de tampão fosfato pH =7,5 e 10,0 mM de o ácido 5-5'-dinitrobenzóico (DTNB). A enzima foi pré-incubada

por 2 min. com diferentes concentrações dos compostos dissolvidos em álcool metílico (0,0 mM; 0,015 mM; 0,031 mM; 0,0625 mM; 0,125 mM e 0,250 mM). A reação foi iniciada pela adição de 0,8 mM do substrato acetilcolina e monitorada por 2 min. a 412 nm em espectrofotômetro. A atividade da AChE foi expressa em μmol de acetilcolina hidrolisada/hora/mg de proteína.

-Análise Estatística- Os dados foram analisados por Anova de uma via seguido do teste de Duncan. As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. Todos os dados foram expressos como média \pm erro padrão.

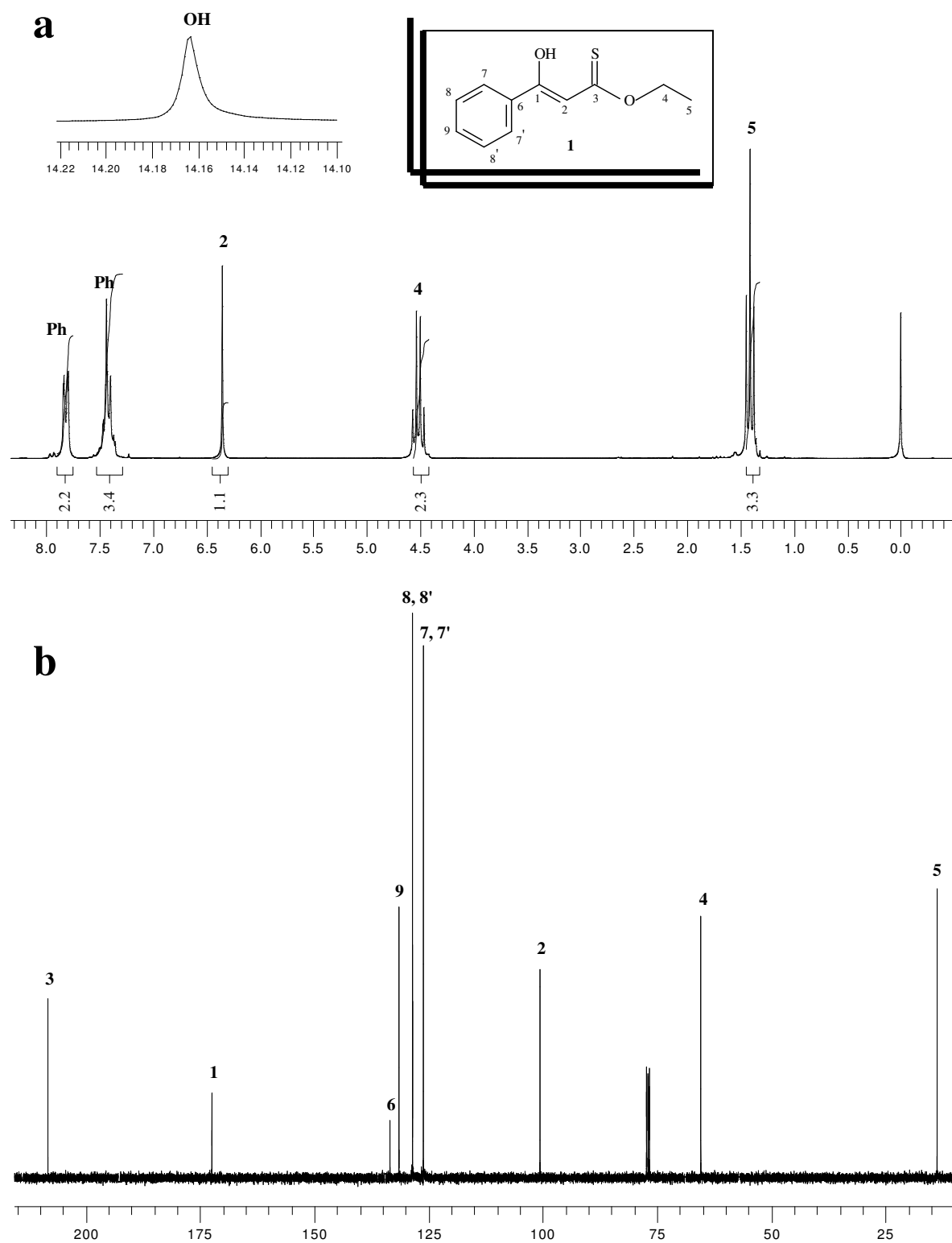
5-BIBLIOGRAFIA

- 1- Kees, K.L.; Fitzgerald, J.J.; Steiner, K.E.; Mattes, J.F.; Mithan, B.; Tosi, T.; Mondoro, D.; McCaleb, M.L. *J. Med. Chem.* **1996**, 39, 3920.
- 2- a) Sridhar, R.; Perumal, P.T.; Etti, S.; Shanmugam, G.; Ponnuswamy, M.N.; Prabavathy, V.R. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, 14, 6035. b) Kane, J.L.; Hirth, B.H.; Liang, B.; Gourlie, B. B.; Nahill, S.; Barsomian, G. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, 13, 4463.
- 3- Braibante, M. E. F.; Braibante, H. T. S.; Valduga, C. J. *J. Heterocycl. Chem.* **1997**, 34, 1453.
- 4- Braibante, M. E. F.; Braibante, H. T. S.; Valduga, C. J.; Santis, D. B. *J. Heterocycl. Chem.* **1999**, 36, 505.
- 5- Braibante, M.E.F.; Braibante, H.T.S.; Costa, C.C.; Martins, D.B. *Tetrahedron Letters* **2002**, 43, 8079.
- 6- Scheithauer, S.; Pech, H. German Patent 94, 361 (1972); *Chem. Abstr.* **1973**, 79, 5176.
- 7- Lazlo, P. "Preparative Chemistry Using Supported Reagents" Academic Press, U.S.A, **1987**.
- 8- Greenhill, J. V. *Chem. Soc. Rev.* **1977**, 6, 277.
- 9- Lue, P.; Greenhill, J. V. *Adv. Heterocycl. Chem.* **1997**, 67, 207.
- 10- Kascheres, C. M. *J. Braz. Chem. Soc.* **2003**, 14, 945.
- 11- Elassar, A.Z. A.; El-Khair, A. A. *Tetrahedron* **2003**, 59, 8463.
- 12- Silva, M.AV.R.; Silva, M. D. M. C. R.; Paiva, J. P. A. *J. Chem. Soc. Perkin Trans 2* **1993**, 1765.
- 13- Dudek, G.O.; Holm, R.H. *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, 81, 475.
- 14- Cone, E.J.; Garner, R.H.; Hayes, A.W. *J. Org. Chem.* **1972**, 37, 4436
- 15- Kascheres, C. M.; Kascheres, A. J.; Negri, G. *J. Heterocycl. Chem.* **2004**, 41, 461.
- 16- Macháček, V.; Lycka, A.; Simunik, R.; Weidlich, T. *Magn. Reson. Chem.* **2000**, 38, 293.
- 17- Chiara, J. L.; Gómez-Sánchez, A.; Bellanato, J. *J. Chem. Soc. Perkin Trans 2*, **1998**, 1797.
- 18- Posner, G.H. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1978**, 17, 487.
- 19- Merrifield, R.B. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85, 2149.
- 20- Pauling, L. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1930**, 36, 578.
- 21- Martin, D.F.; Janusonis, G.A.; Martin, B.B. *J. Am. Chem. Soc.* **1961**, 83, 73.
- 22- Cornelis, A.; Laszlo, P. *Synthesis* **1978**, 909.
- 23- Cornelis, A.; Herzé, P.Y.; Laszlo, P.; Monthy, A. *Tetrahedron Letters* **1982**, 23, 5035.

- 24- Adams, J.M.; Graham, S.H.; Clement, D.E. *Clays and Clay Minerals* **1982**, 30, 129.
- 25- Adams, J.M.; Davies, M.; Graham, S.H.; Thomas, J.M.. *J. Catalysis* **1982**, 78, 179.
- 26- Braibante, M. E. F.; Braibante, H. T.S.; Salvatore, S.J.S.A *Química Nova* **1990**, 13, 67.
- 27- Braibante, M. E. F.; Braibante, H. T. S.; Missio, L.; Andricopulo, A. *Synthesis* **1994**, 898.
- 28- Braibante, M. E. F.; Braibante, H. T. S.; Valduga, C.; Squizani, A. *Synthesis* **1998**, 1019.
- 29- Varma, R.S. *Tetrahedron* **2002**, 58, 1235.
- 30- Barboza, J. C. S.; Serra, A. A. *Química Nova* **1992**, 15, 302.
- 31- Martines, M. A. U.; Davolos, M. R.; Jafelicci, M. J. *Química Nova* **2000**, 23, 251.
- 32- Sulisck, K. S. *Scientific American* **1989**, 2, 80.
- 33- Bonrath, W. *Ultrasonics Sonochemistry* **2005**, 12, 103.
- 34- Brown, H. C.; Racherla, U. S. *Tetrahedron Letters* **1985**, 26, 4311.
- 35- Gedye, R.; Smith, F.; Westaway, K.; Ali, H.; Baldisera, L.; Labgerge, L.; Rousell, J. *Tetrahedron Letters* **1986**, 27, 279.
- 36- Varma, R. S. *Pure Appl. Chem.* **2001**, 73, 193.
- 37- Caddick, S. *Tetrahedron* **1995**, 51, 10403.
- 38- Lidström, P.; Tierney, J. Wathey, B.; Westman, J. *Tetrahedron* **2001**, 57, 9225.
- 39- Strauss, C. R.; Trainor, R. W. *Aust. J. Chem.* 1995, 48, 1665.
- 40- a) Kolb, M. *Synthesis* **1990**, 171. b) Suresh, J.R.; Barun, O.; Ila, H.; Junjappa, H. *Tetrahedron* **2000**, 56, 815. c) Nandi, S.; Panda, K.; Suresh, J.R.; Ila, H.; Junjappa, H. *Tetrahedron* **2004**, 60, 3663.
- 41- Ferraz, H. M. C.; Pereira, F.L.C. *Química Nova* **2004**, 27, 89.
- 42- Rosso, Giovanni Bernardi. “*Dissertação de Mestrado*” **2000**, UFSM, Santa Maria.
- 43- Braibante, H.T.S.; Braibante, M.E.F.; Rosso, G. B.; Oriques, D. A. *J. Braz. Chem. Soc.* **2003**, 6, 994.
- 44- Barun, O.; Ila, H.; Junjappa, H. *J. Org. Chem.* **2000**, 65, 1583.
- 45- Vogel, *Practical Organic Chemistry*, 793.
- 46- Katrizky, A. R.; Barczynski, P.; Ostercamp, D. L.; Yousaf, T. I. *J. Org.Chem.* **1986**, 51, 4037.
- 47- Moussounga, J.; Bouquant, J.; Chuche, J. *Synthesis* **1994**, 483.
- 48- Braibante, M.E.F.; Braibante, H.T.S.; Rosso, G. B.; Roza, J. K. *Synthesis* **2001**, 13, 1935.
- 49- Braibante, M. E. F.; Braibante, H. T. S.; Missio, L. J. *J. Heterocycl. Chem.* **1996**, 33, 1243.
- 50- Oriques, Daniela Alves. “*Dissertação de Mestrado*” **2006**, UFSM, Santa Maria.
- 51- Baldwin, J. E. *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* **1976**, 734.

- 52- Vijaykumar, D.; Sprengeler, P.A.; Shaghafi, M.; Spencer, R.; Katz, B.A.; Yu, C.; Rai, R.; Young, W.B.; Schultz, B.; Janc, J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, 16, 2796.
- 53- Menozi, G.; Mosti, L.; Fossa, P.; Mattioli, F.; Ghia, M. *J. Heterocycl. Chem.* **1997**, 34, 963.
- 54- Manfredini, S.; Bazzanini, R.; Baraldi, P.G.; Guarneri, M.; Simoni, D.; Marongiu, M.E.; Pani, A.; Tramontano, E.; Colla, P.L. *J. Med. Chem.* **1992**, 35, 917.
- 55- Dastrup, D. M.; Yap, A. H.; Weinreb, S. M.; Henry, J. R.; Lechleiter, A. J. *Tetrahedron* **2004**, 60, 901.
- 56- Pask, C. M.; Camm, K. D.; Kilner, C. A.; Halcrow, M. A. *Tetrahedron Letters* **2006**, 47.
- 57- Peruncheralathan, S.; Yadav, A. K.; Ila, H.; Junjappa, H. *J. Org. Chem.* **2005**, 70, 9644.
- 58- Chen, C.; Wilcoxon, K.; McCarthy, J. C. *Tetrahedron Letters* **1998**, 39, 8229.
- 59- Dodd, D. S.; Martinez, R. L. *Tetrahedron Letters* **2004**, 45, 4265.
- 60- Peruncheralathan, S.; Khan, T. A.; Ila, H.; Junjappa, H. *J. Org. Chem.* **2005**, 70, 10030.
- 61- a) Hamburguer, M.; Hostettmann, K. *Phytochemistry* **1991**, 30, 3864. b) Hamburguer, A. L.; Fuchs, A. *Journal of Chromatography* **1970**, 51, 327.
- 62- a) Hammer, K. A.; Carson, C. F.; Riley, T. V. *Journal of Applied Microbiology* **1999**, 86, 985. b) Akbas, E.; Berber, I.; Sener, A.; Hasanov, B. II. *Farmaco* **2004**, 322.
- 63- Purves, D.; Augustine, G.; Fitzpatrick, D.; Katz, I.; Lamantia, A.; Mcnamara, J.; Williams, S. *Neurociências* **2005**, 2ed. Porto Alegre, Artmed, p.728.
- 64- Das, A.; Dikshit, M.; Nath, C. *Life Sciences* **2001**, 68, 1545.
- 65- Guillou, C.; Mary, A.; Renko, D. Z.; Gras, E.; Thal, C. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, 10, 637.
- 66- Mustazza, C.; Borioni, A.; Giudice, M. R. D.; Gatta, F.; Ferretti, R.; Meneguz, A.; Volpe, M. T.; Lorenzini, P. *Eur. J. Med. Chem.* **2002**, 37, 91.
- 67- Ucar, G.; Gokhan, N.; Yesilada, A.; Bilgin, A. A. *Neuroscience Letters* **2005**, 382, 327.
- 68- Ellmann, G. L.; Courtney, K. D.; Andres, J. R.; Featherstone, R. M. *Biochem. Pharmacol.* **1961**, 7, 88.
- 69- Perrin, D. D.; Armarego, L.F. "Purification of Laboratory Chemicals" 3rd Edition, Pergamon Press, São Paulo, SP, **1988**.

ESPECTROS DE RMN DE ^1H E ^{13}C



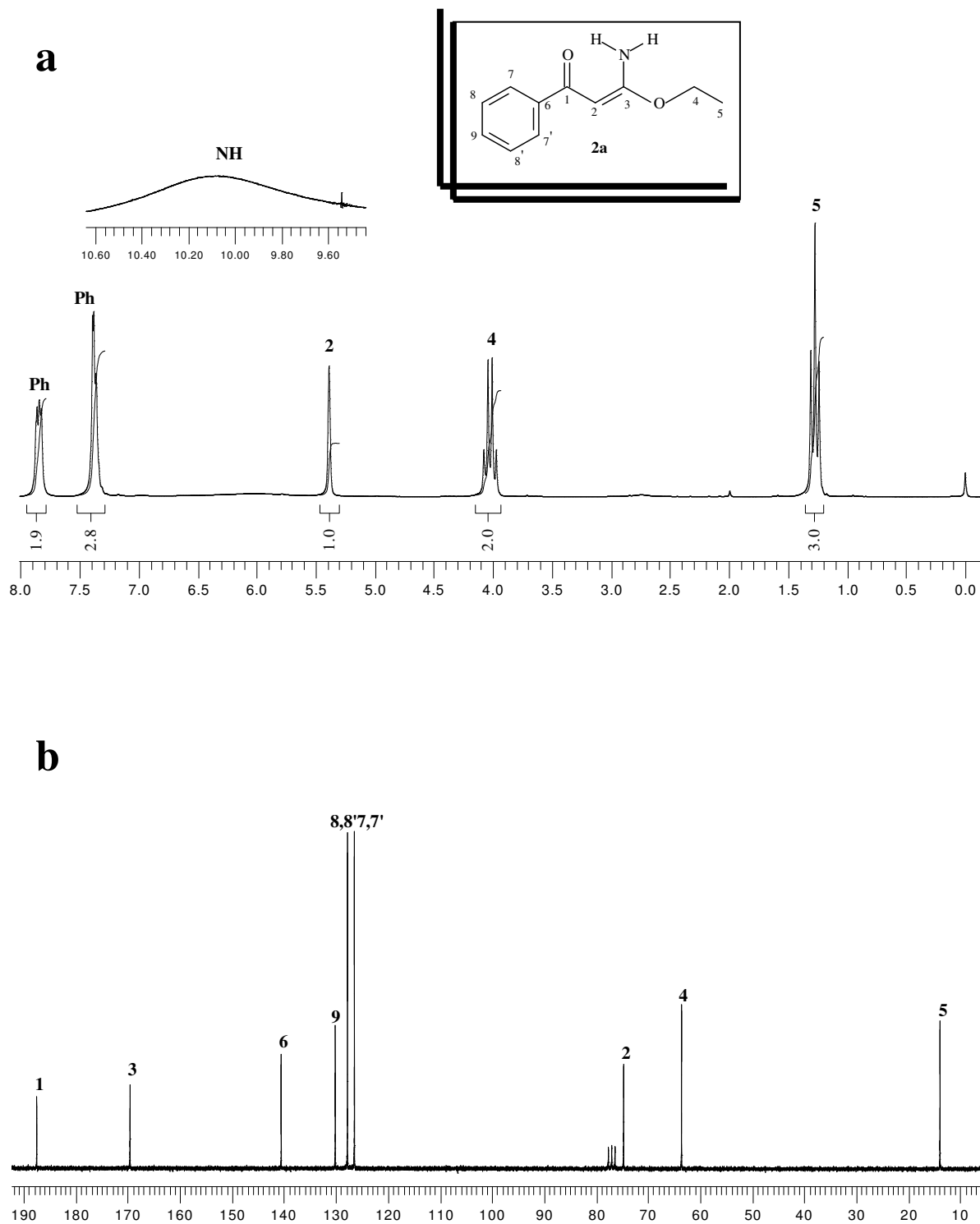


Figura 25- Espectro de RMN de ^1H (a) a 200 MHz e ^{13}C (b) a 50 MHz em CDCl_3 do α -oxoceteno 3-amino 3-etóxi acetal (**2a**).

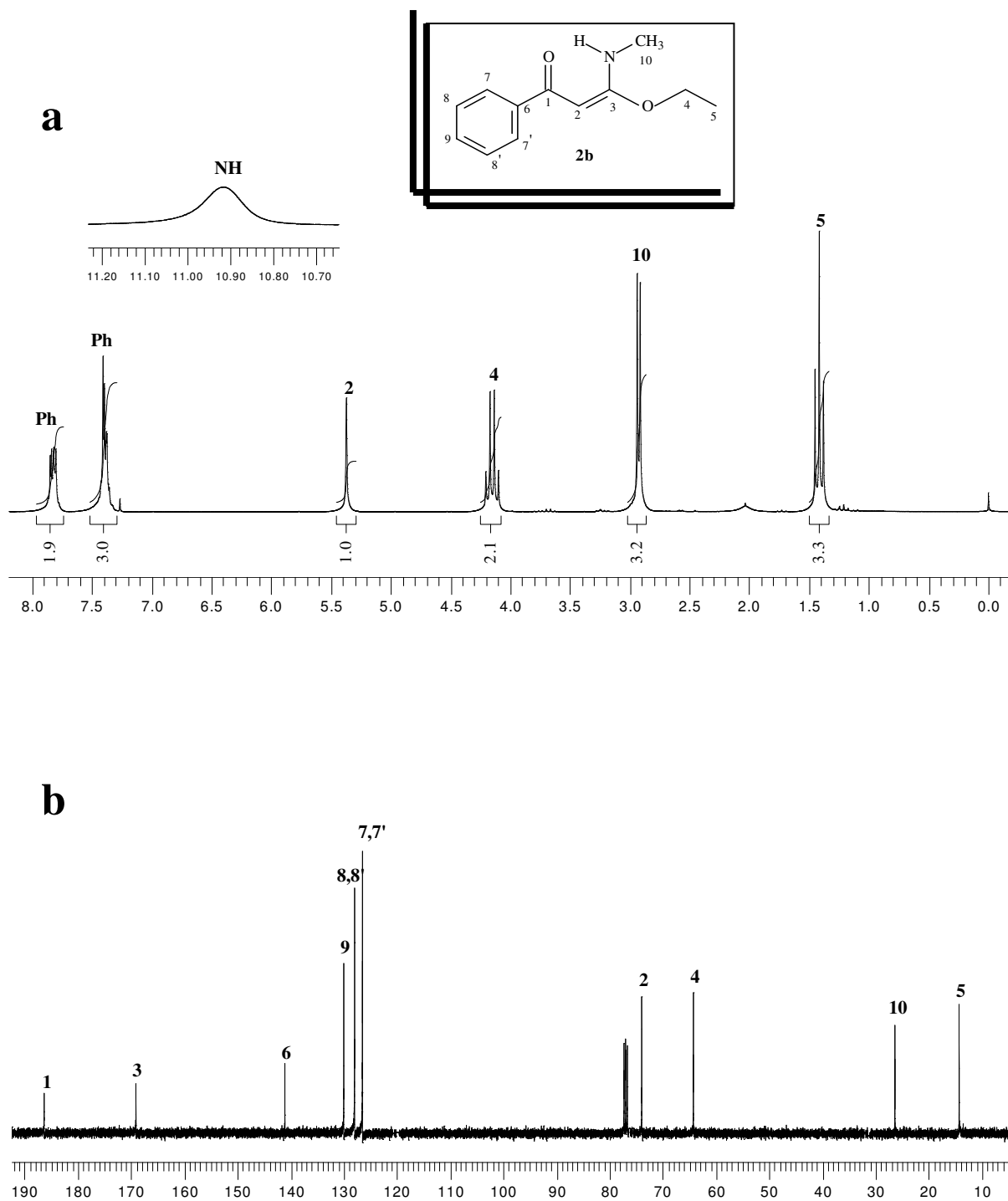


Figura 26- Espectro de RMN de ^1H (a) a 200 MHz e ^{13}C (b) a 50 MHz em CDCl_3 do α -oxoceteno 3-etóxi 3-metilamino acetal (**2b**).

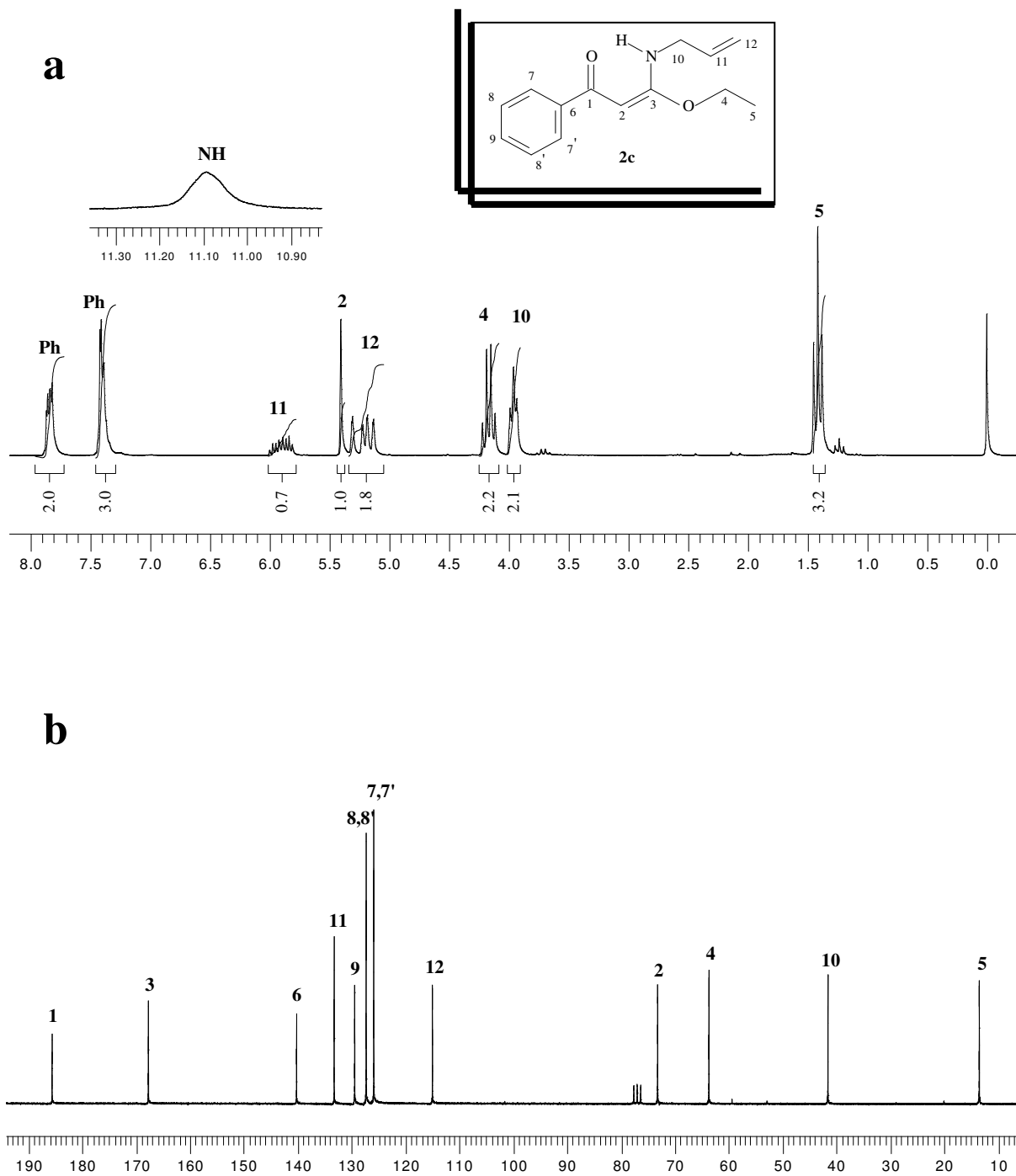


Figura 27- Espectro de RMN de ^1H (a) a 200 MHz e ^{13}C (b) a 50 MHz em CDCl_3 do α -oxoceteno 3-alilamino 3-etóxi acetal (**2c**).

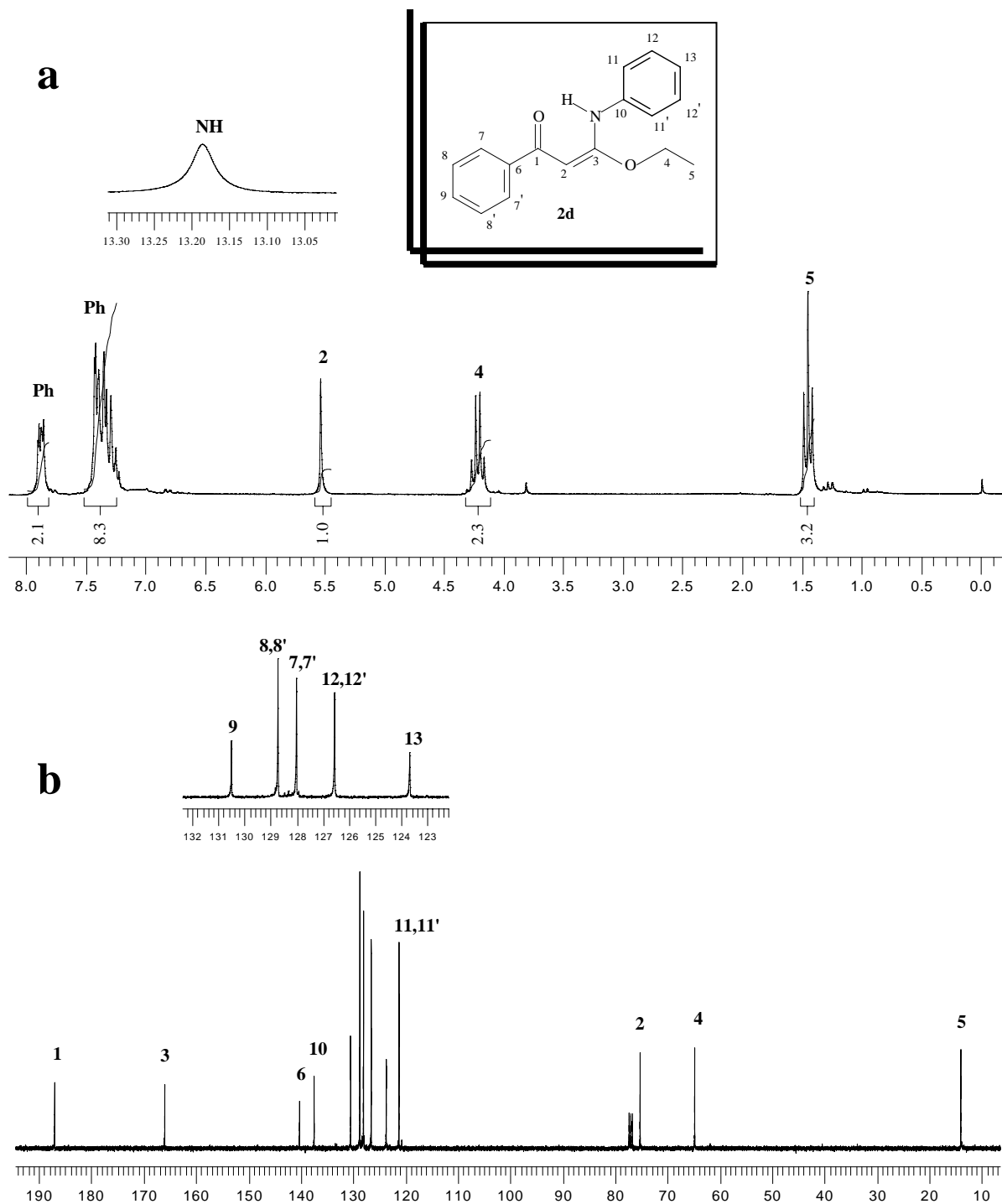
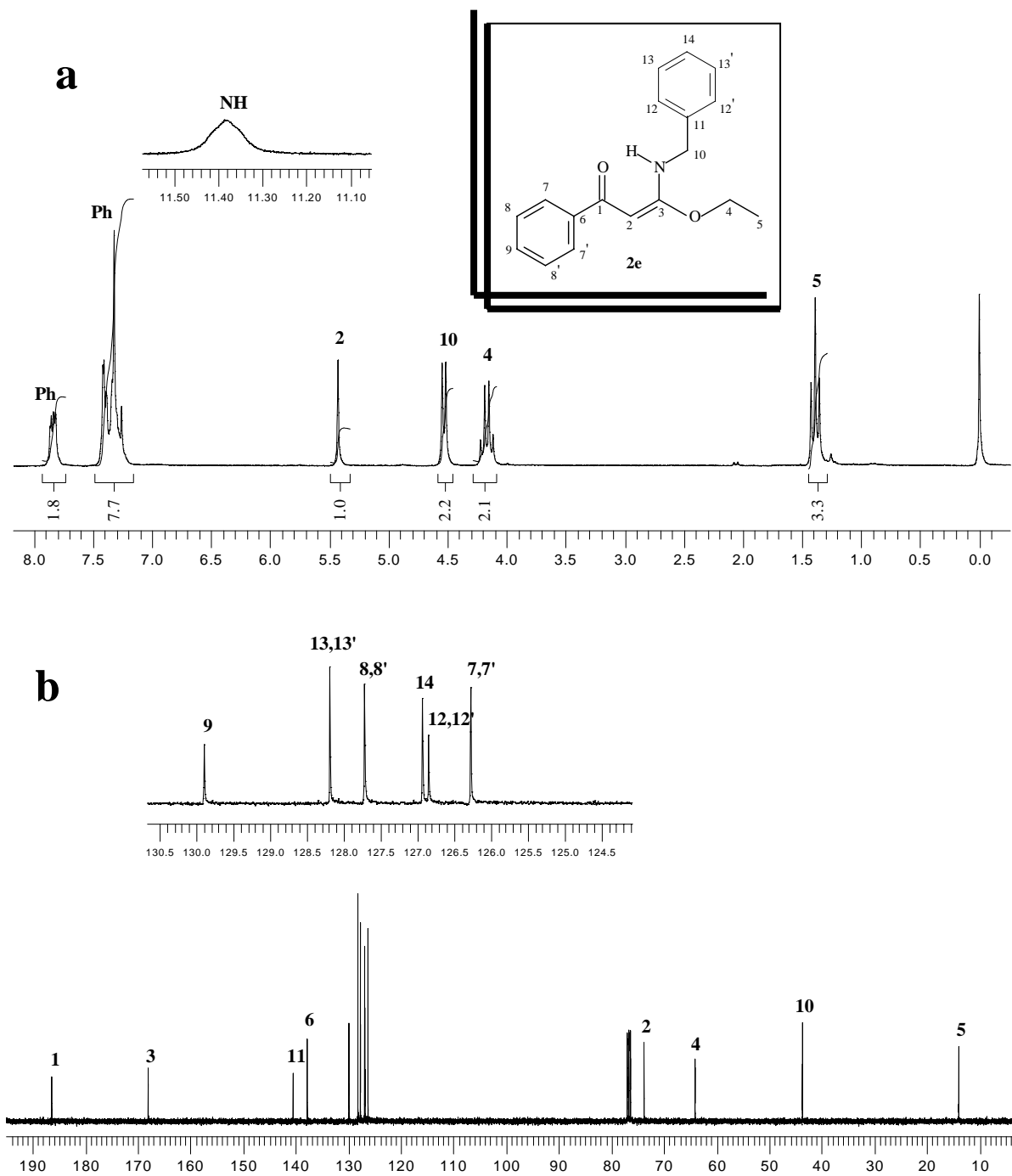


Figura 28- Espectro de RMN de ^1H (a) a 400 MHz e ^{13}C (b) a 100 MHz em CDCl_3 do α -oxoceteno 3-etóxi 3-fenilamino acetal (**2d**).



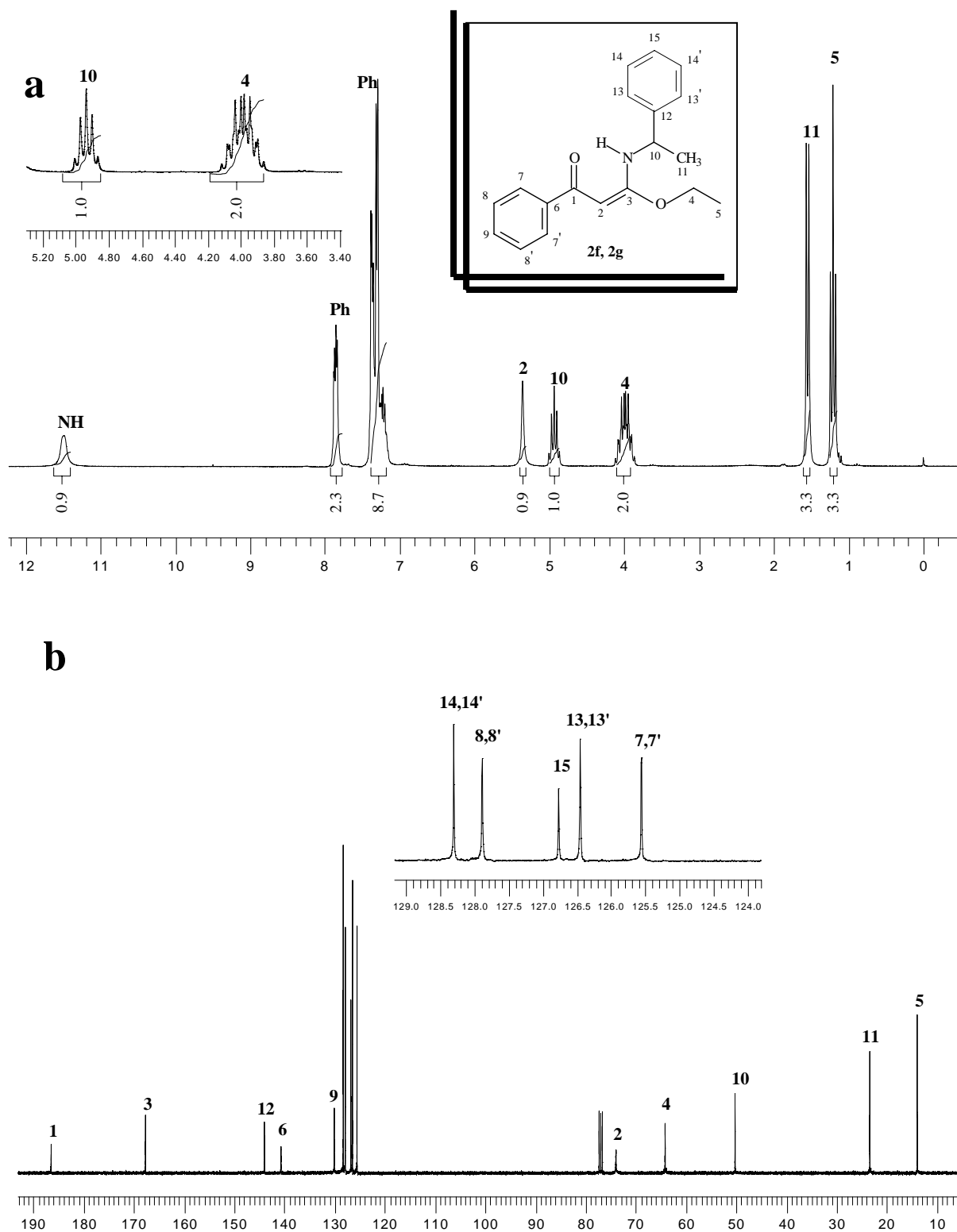
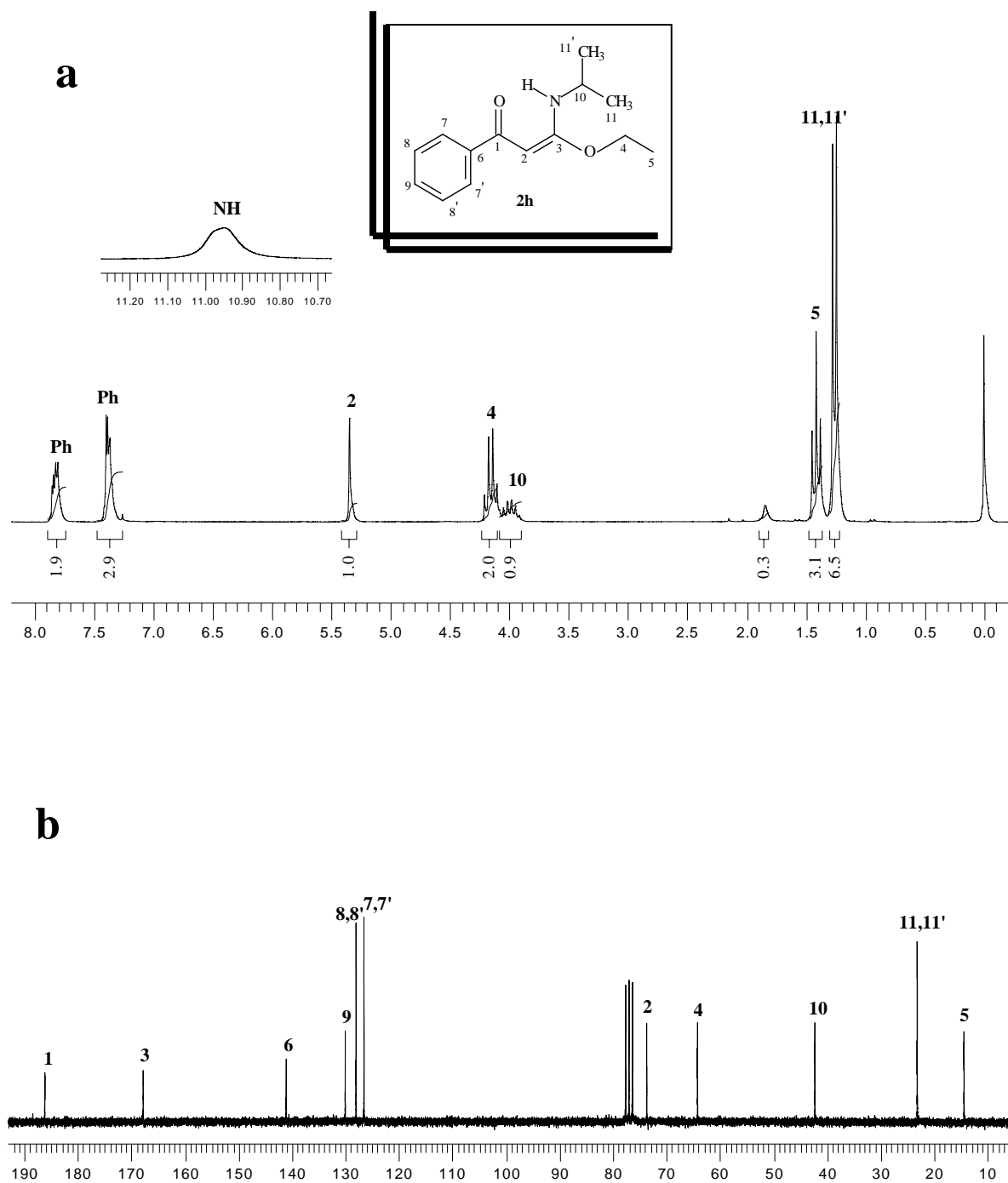
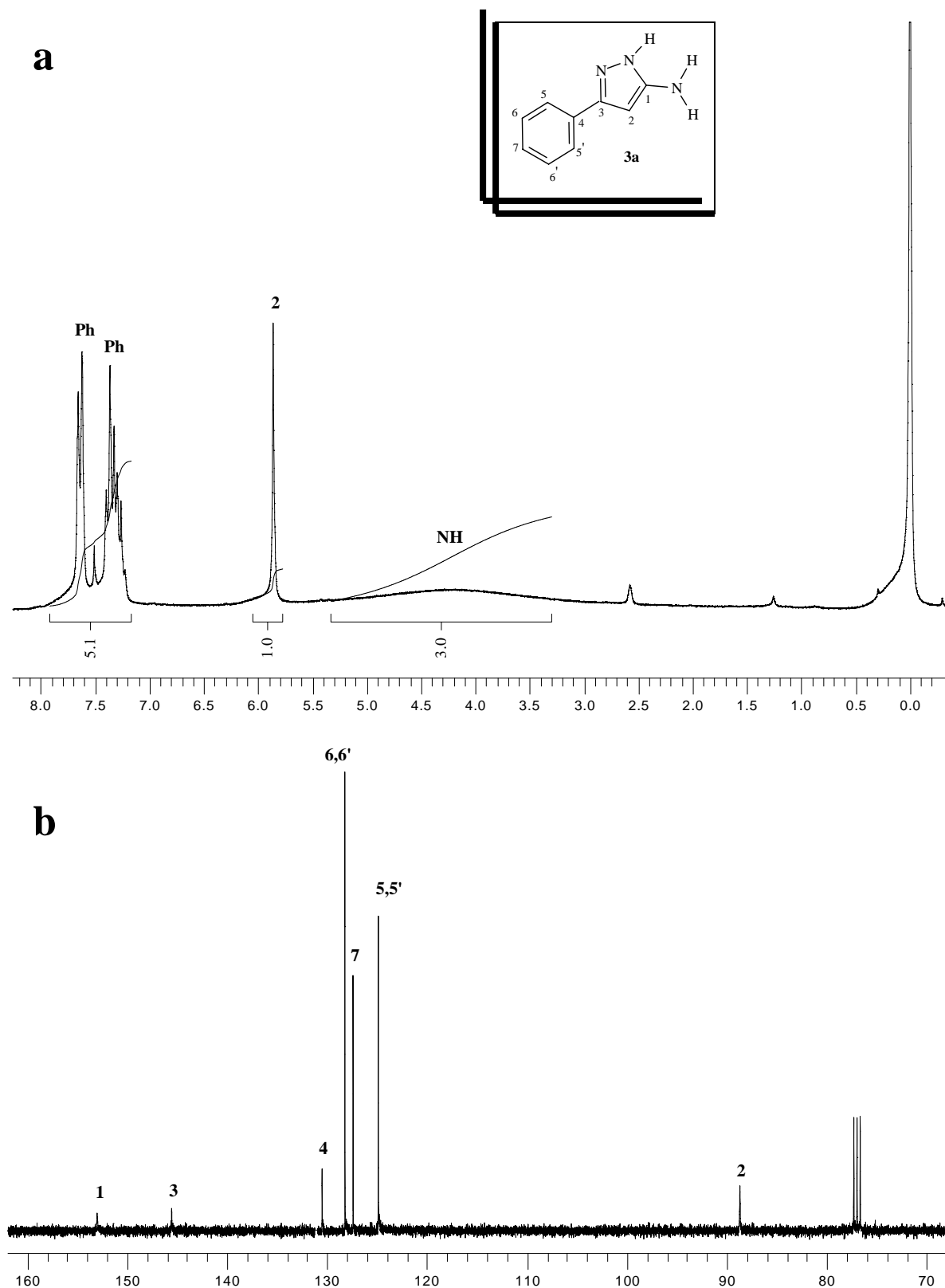


Figura 30- Espectro de RMN de ^1H (a) a 200 MHz e ^{13}C (b) a 50 MHz em CDCl_3 do α -oxoceteno 3-(R(+)- α -feniletilamino 3-etóxi acetal (**2f**) e α -oxoceteno 3-(S(-)- α -feniletilamino 3-etóxi acetal (**2g**).





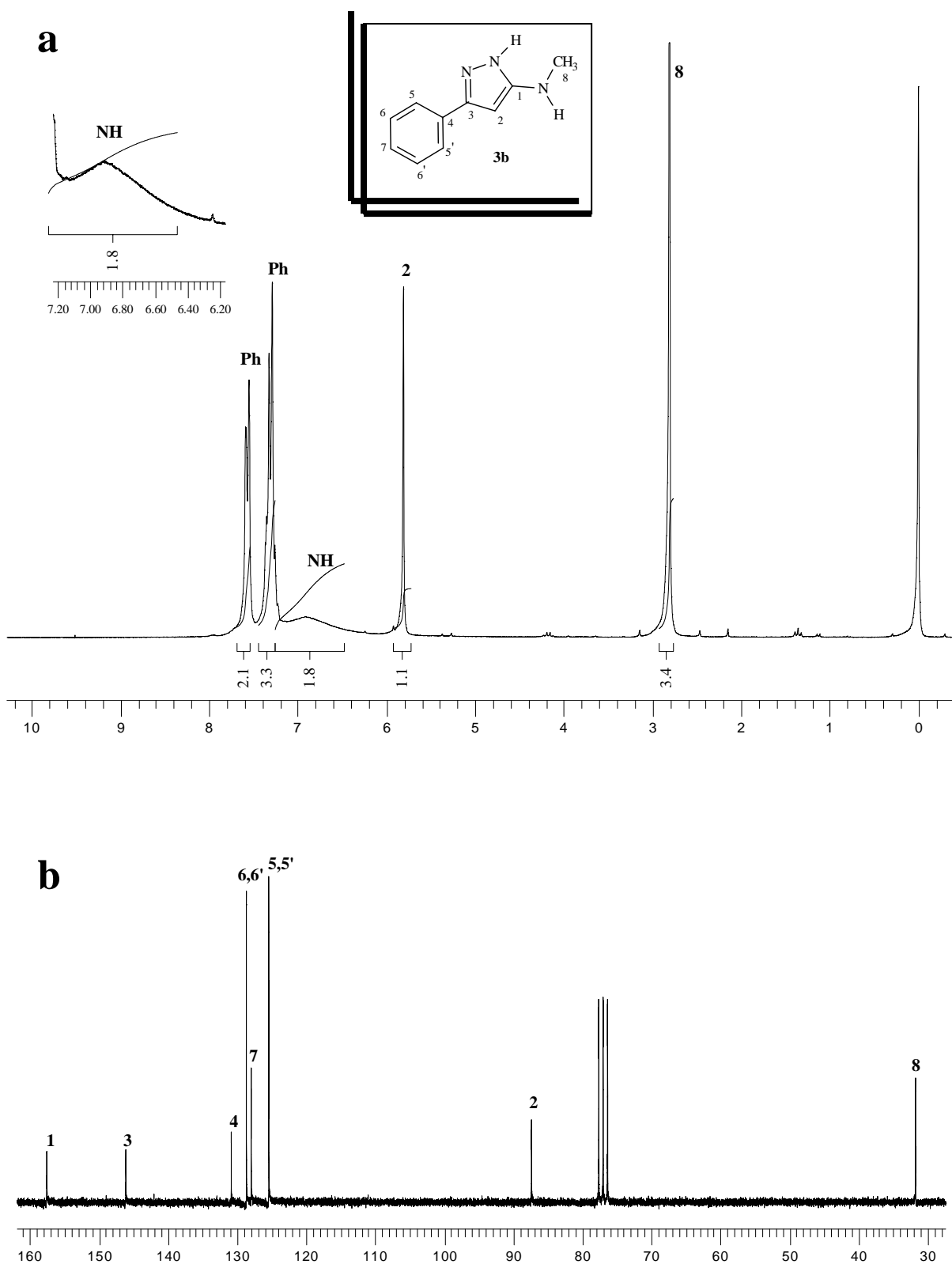


Figura 33- Espectro de RMN de ^1H (a) a 200 MHz e ^{13}C (b) a 50 MHz em CDCl_3 do 3(5)-fenil 5(3)-metilamino 1H-pirazol (**3b**).

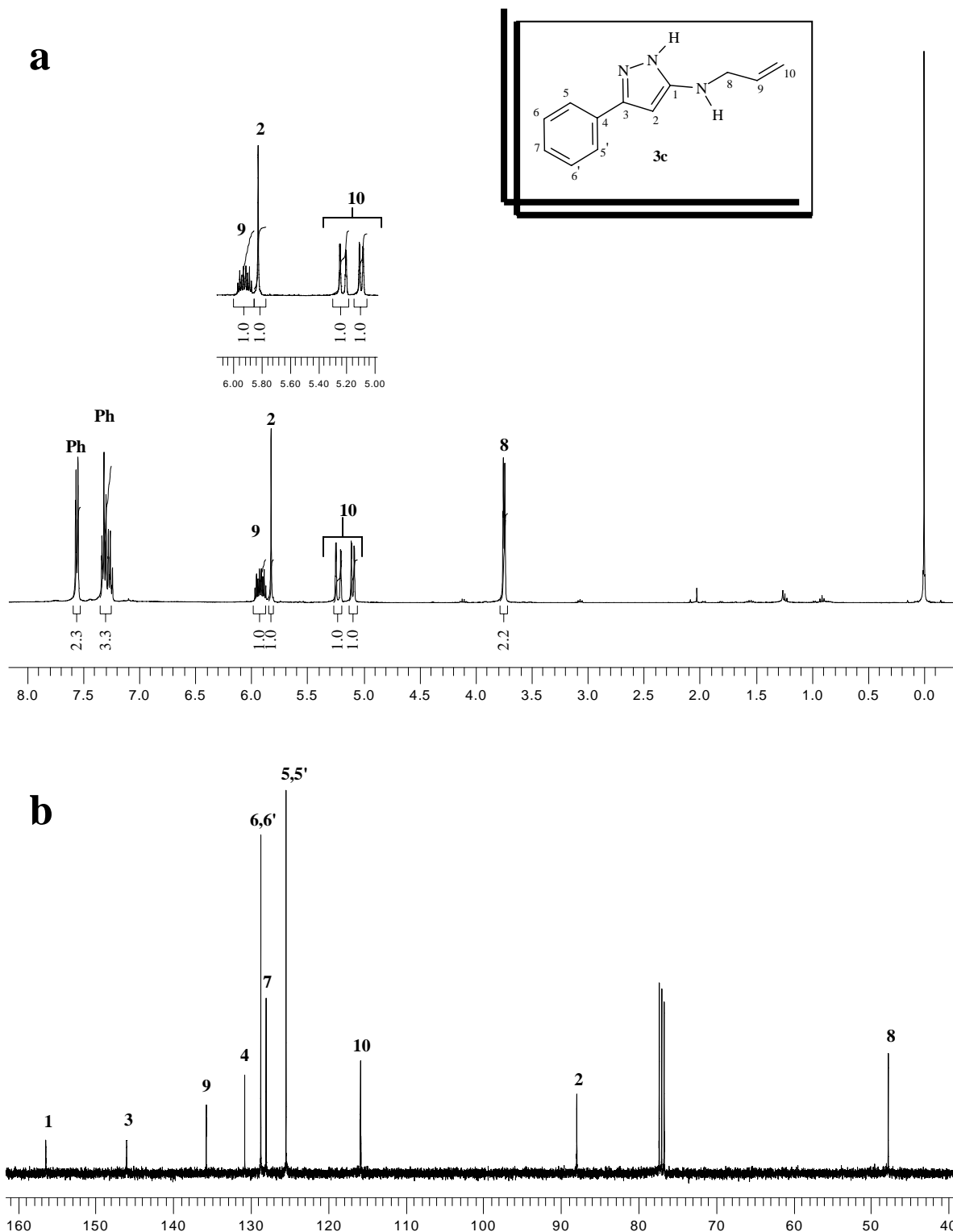
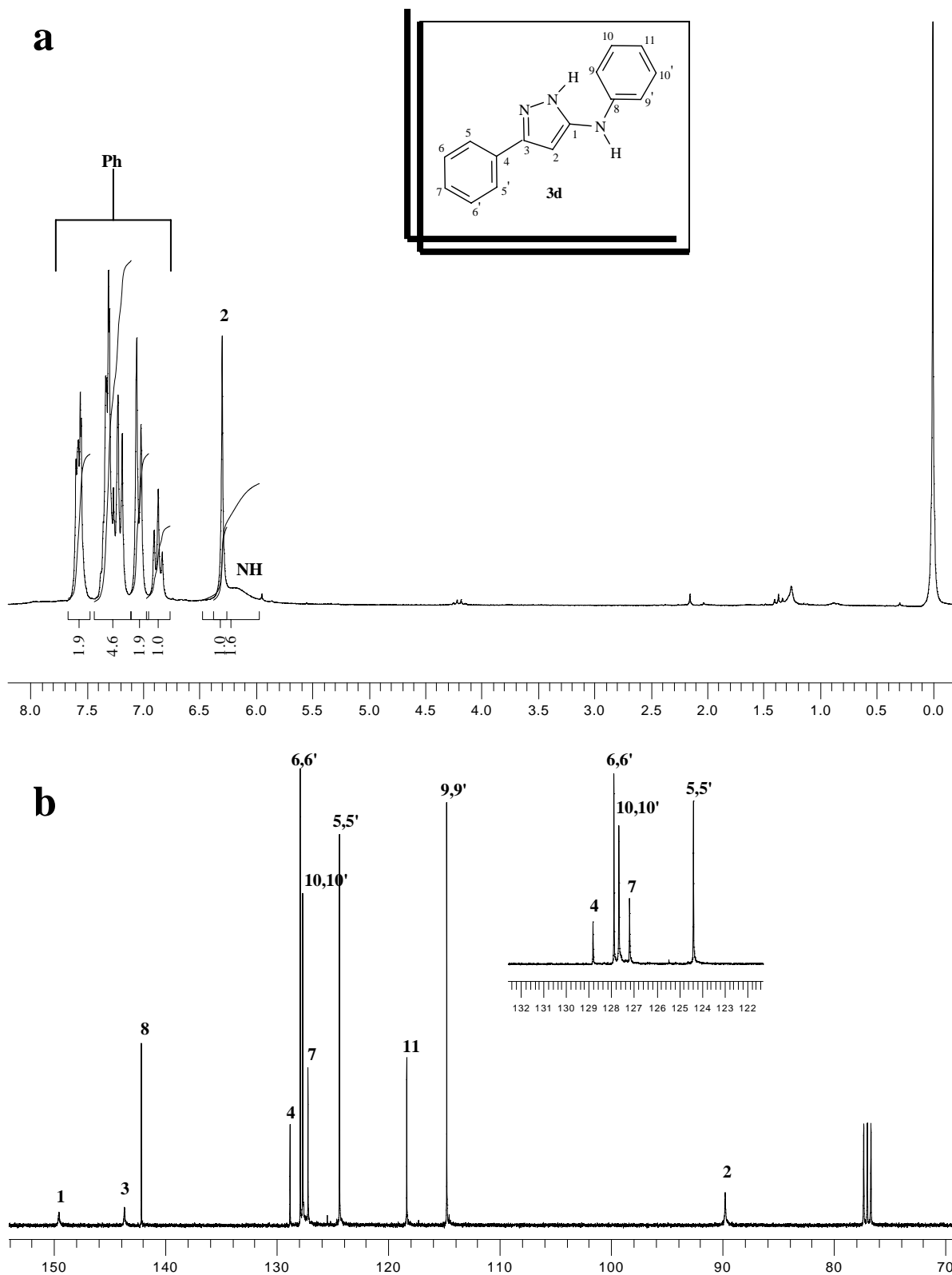
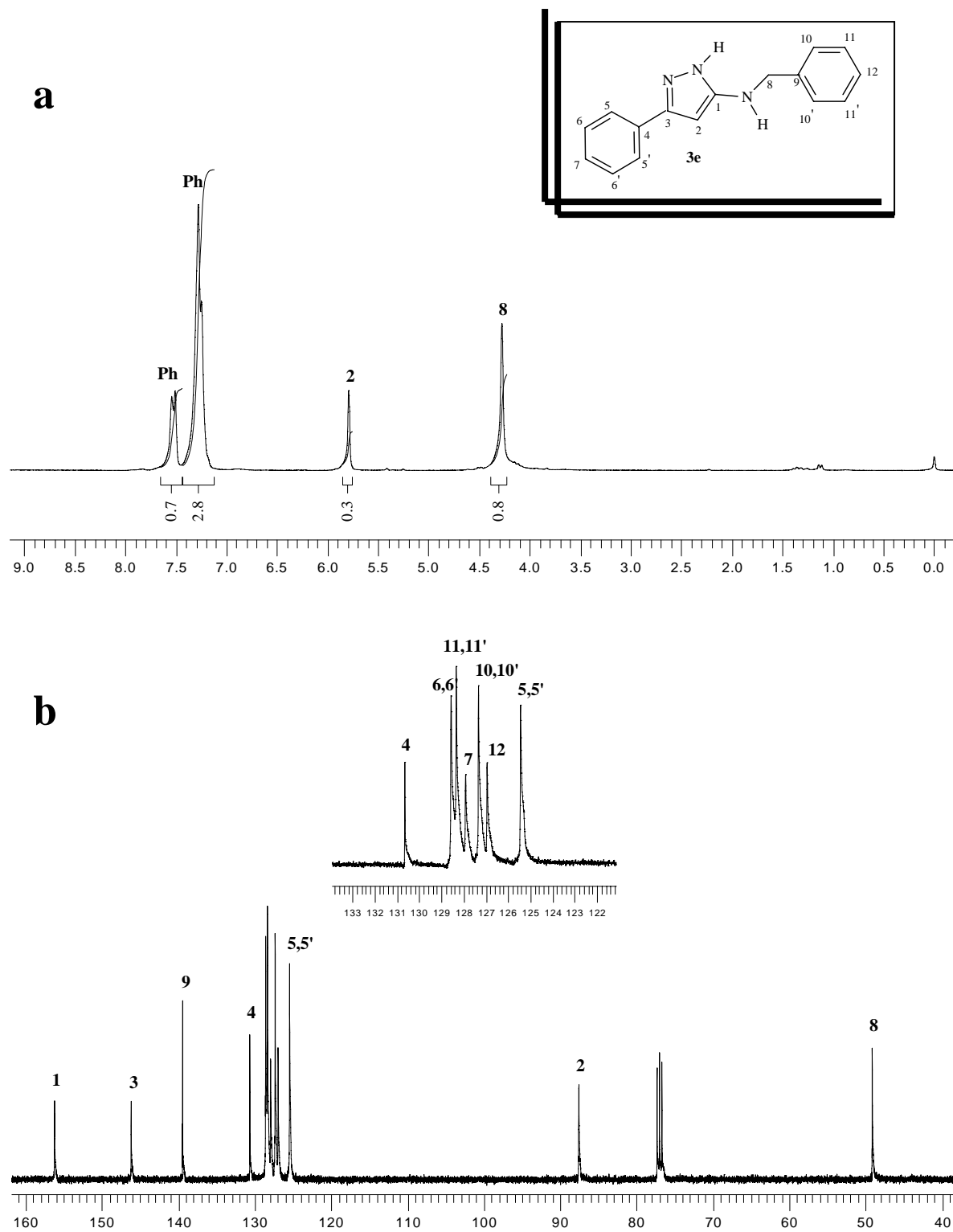


Figura 34- Espectro de RMN de ^1H (a) a 200 MHz e ^{13}C (b) a 50 MHz em CDCl_3 do 5(3)-alilamino 3(5)-fenil 1H-pirazol (**3c**).





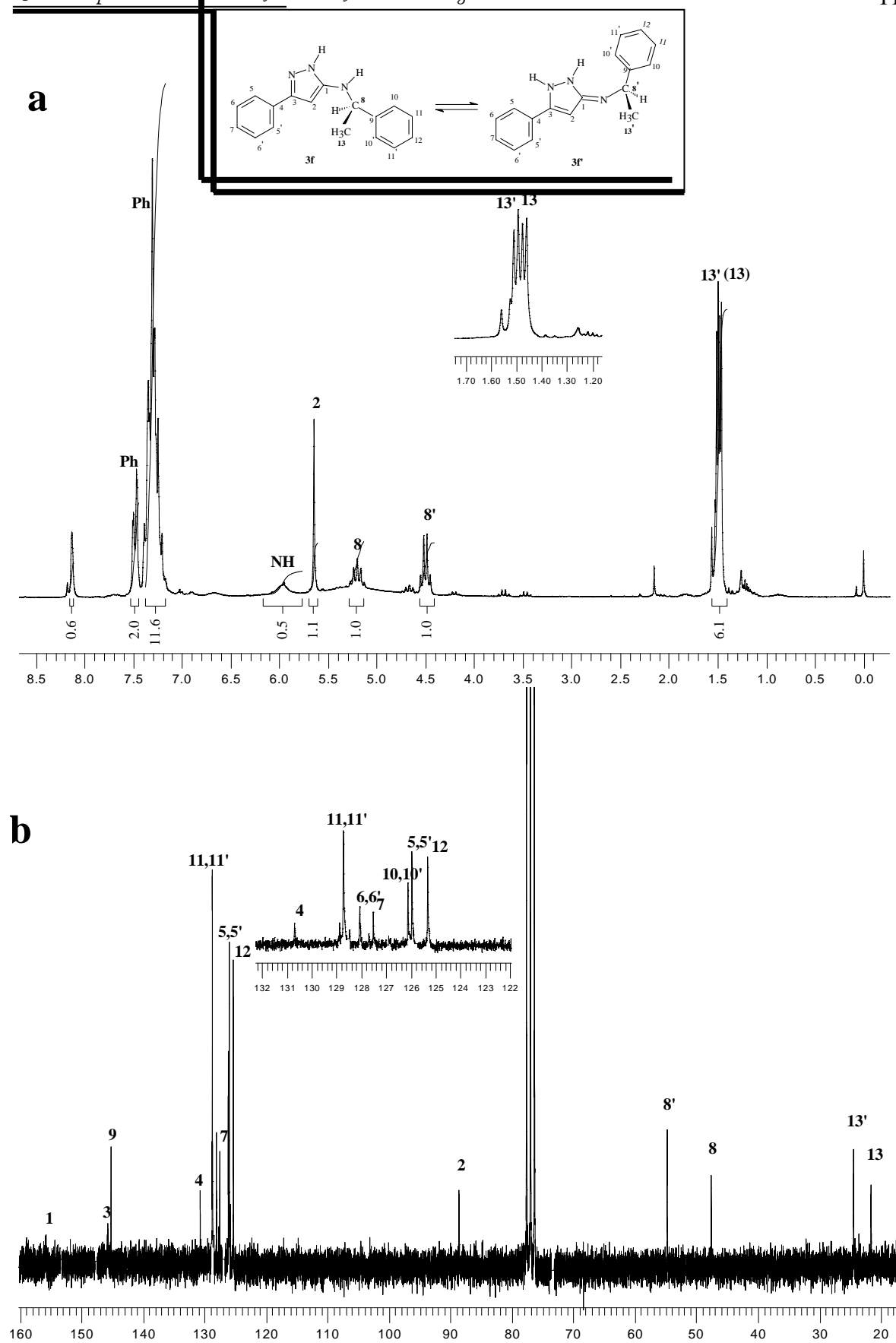


Figura 37- Espectro de RMN de ^1H (a) a 200 MHz e ^{13}C (b) a 50 MHz em CDCl_3 do 5(3)-(R(+)- α -feniletilamino) 3(5)-fenil 1H-pirazol (**3f** (**3f'**)).

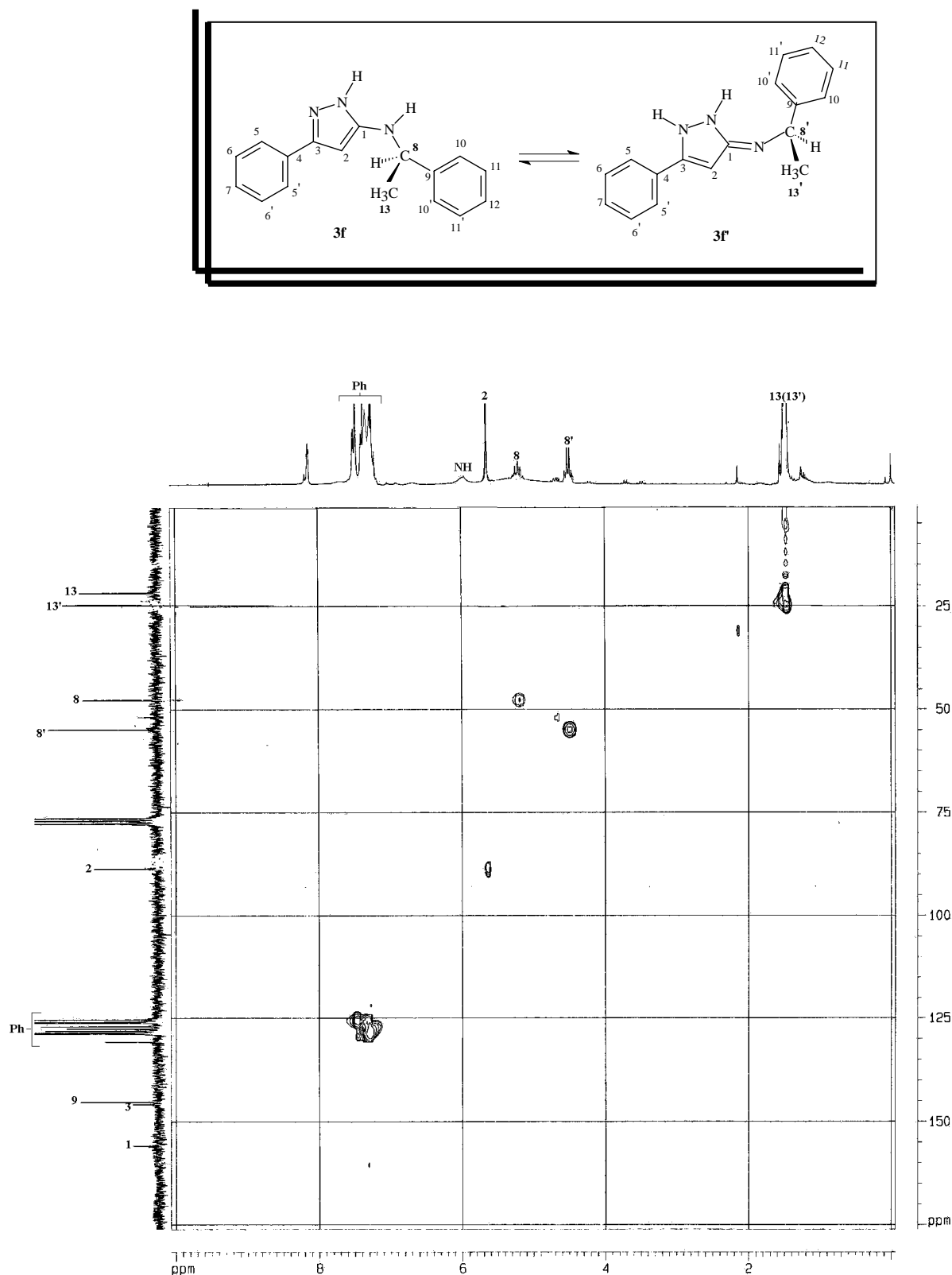


Figura 38-Espectro de RMN de HMQC a 400 MHz em CDCl_3 do 5(3)-(R(+)- α -feniletilamino) 3(5)-fenil 1H-pirazol (**3f**, **3f'**).

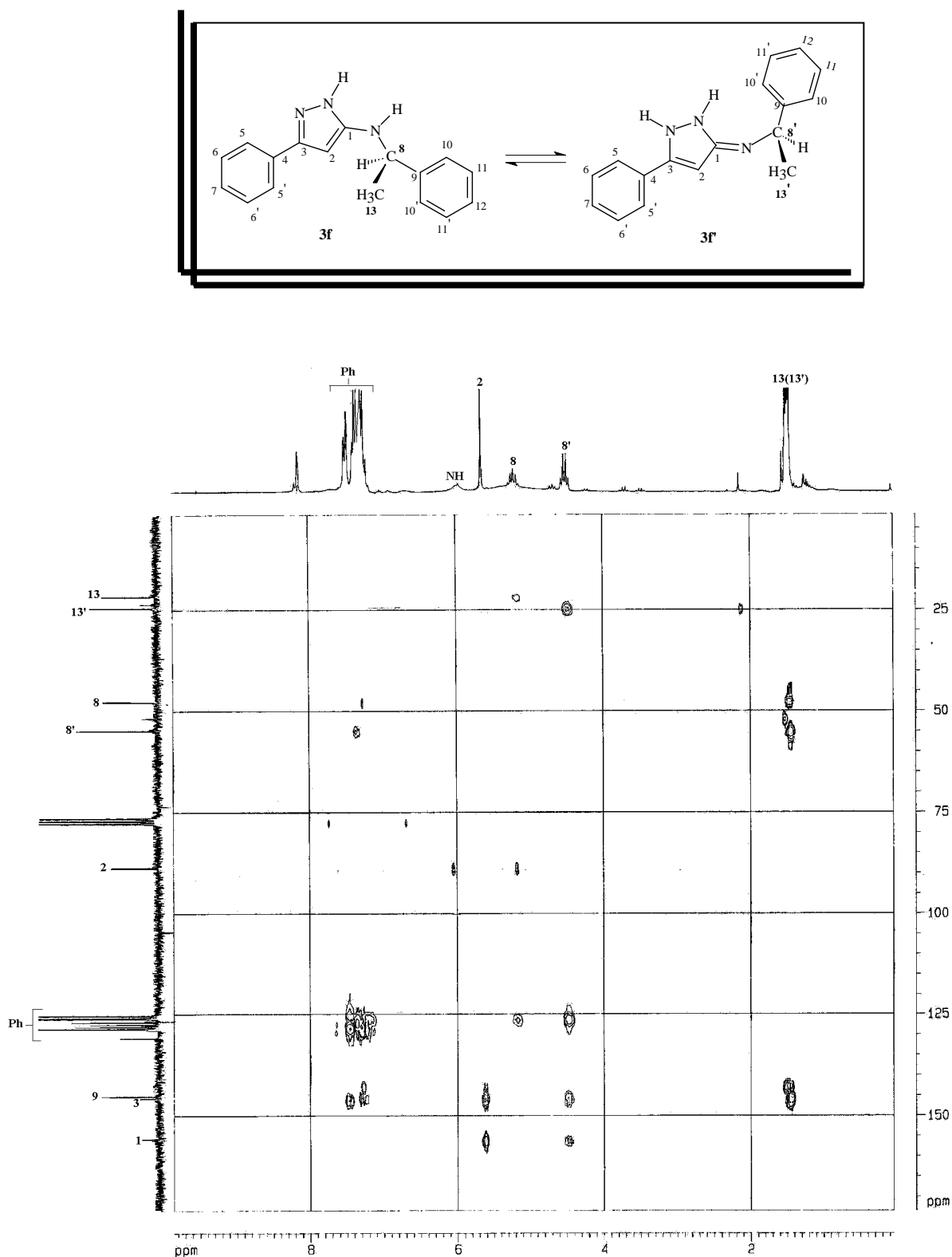


Figura 39-Espectro de RMN de HMBC a 400 MHz em CDCl₃ do 5(3)-(R(+)-α-feniletilamino) 3(5)-fenil 1H-pirazol (**3f**, **3f'**).

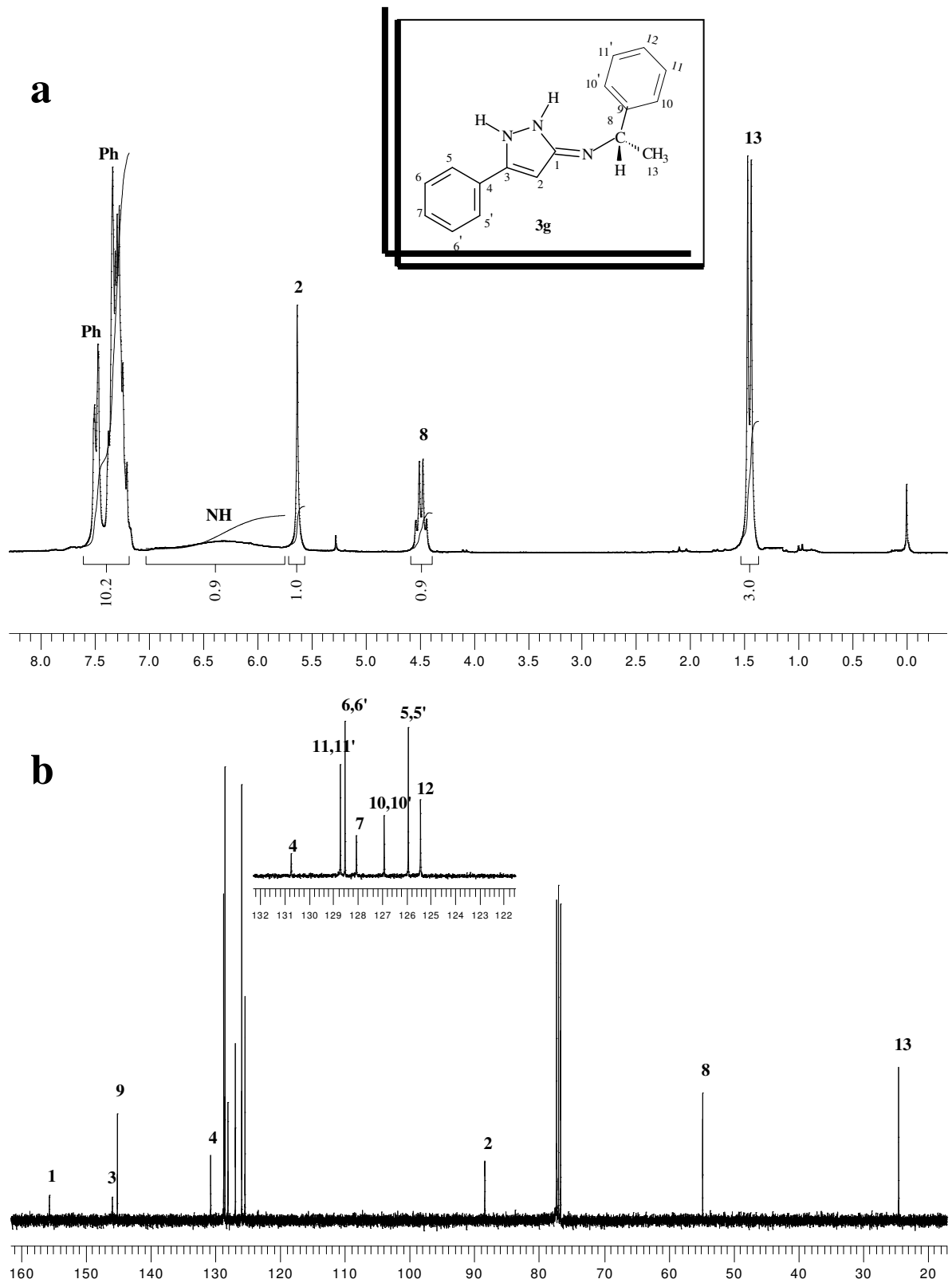


Figura 40- Espectro de RMN de ^1H (a) a 200 MHz e ^{13}C (b) a 100 MHz em CDCl_3 do 5(3)-(S-)- α -feniletilamino) 3(5)-fenil 1H-pirazol (**3g**).

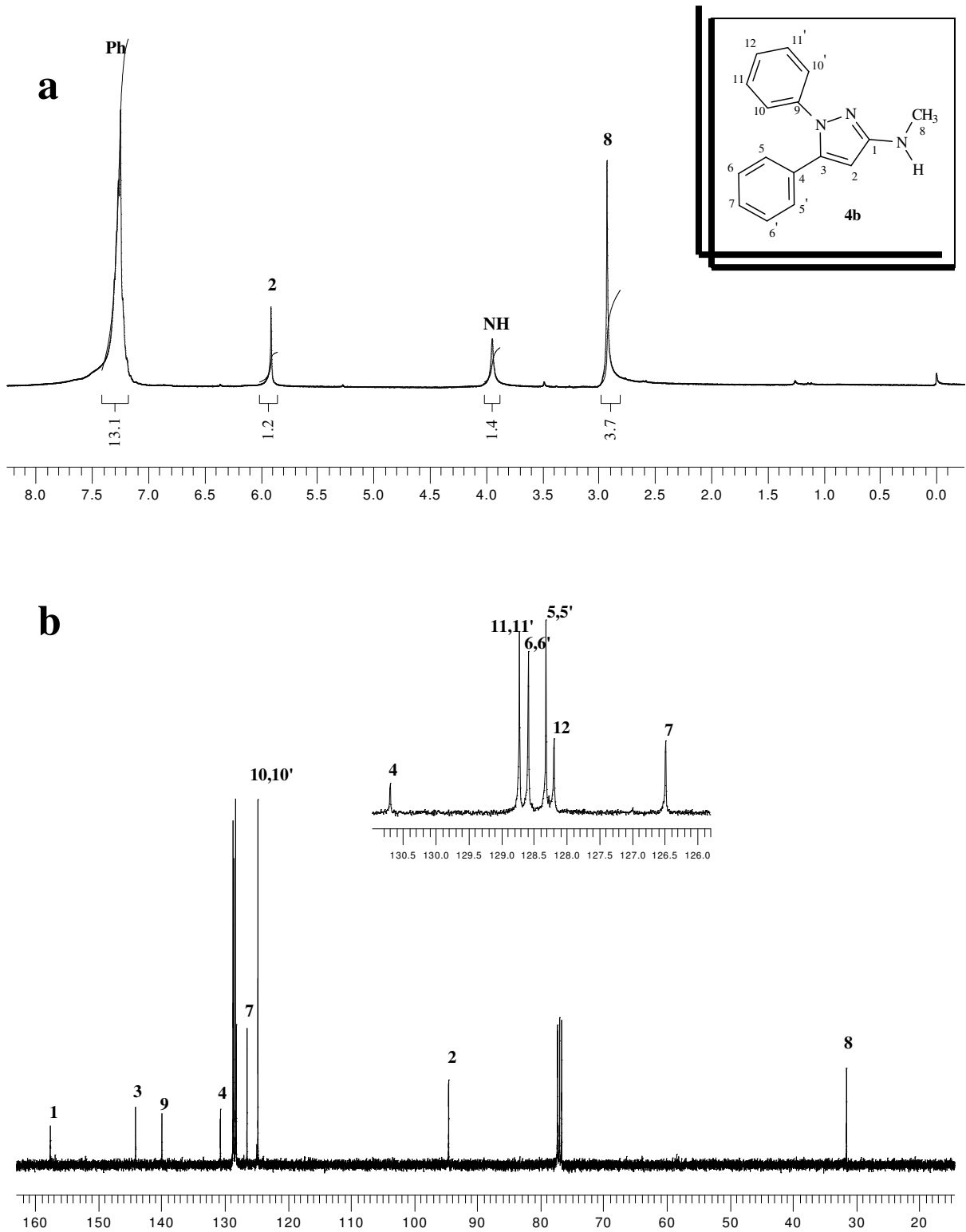


Figura 41- Espectro de RMN de ^1H (a) a 200 MHz e ^{13}C (b) a 100 MHz em CDCl_3 do 1,5-difenil 3-metilamino pirazol (4b).

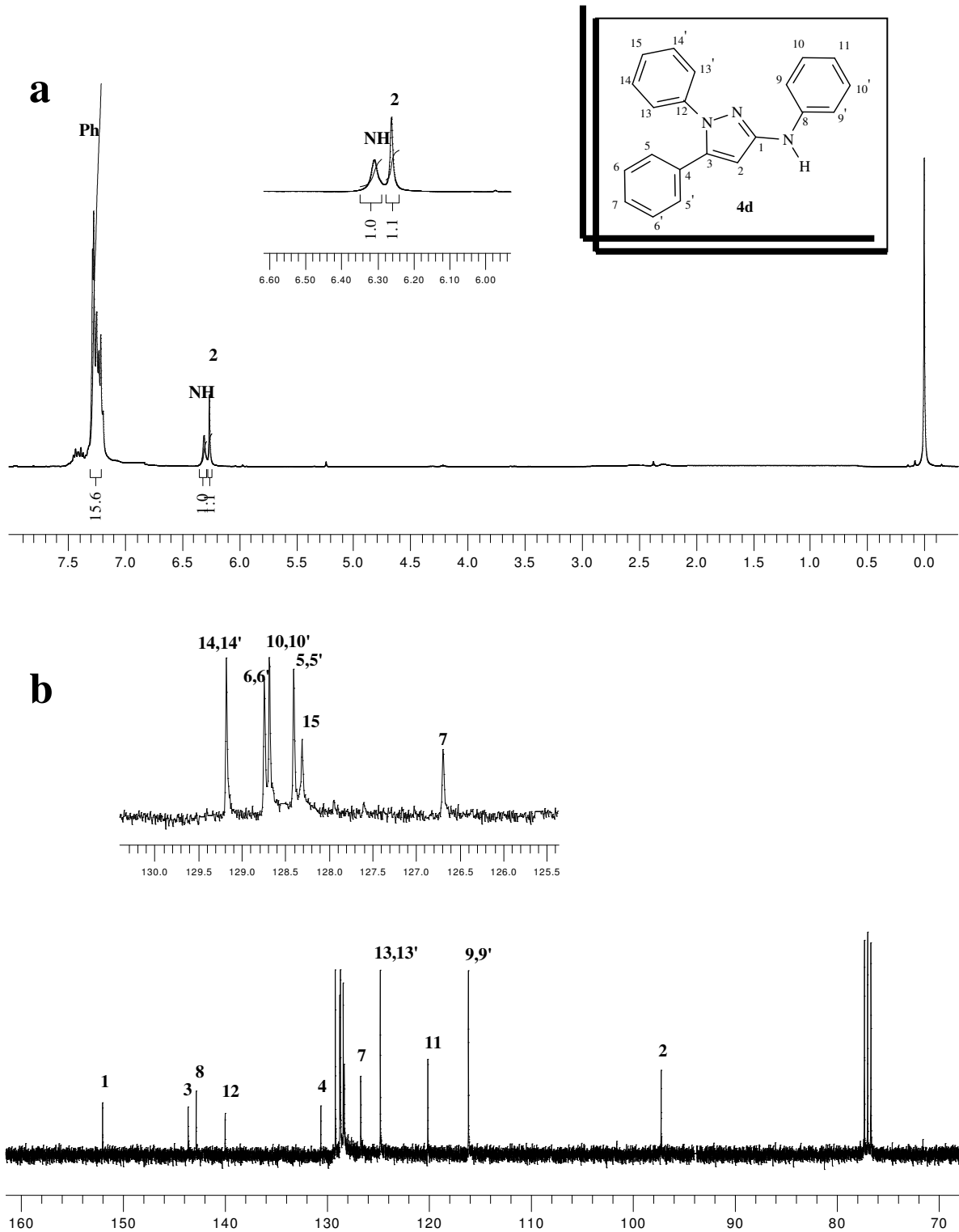
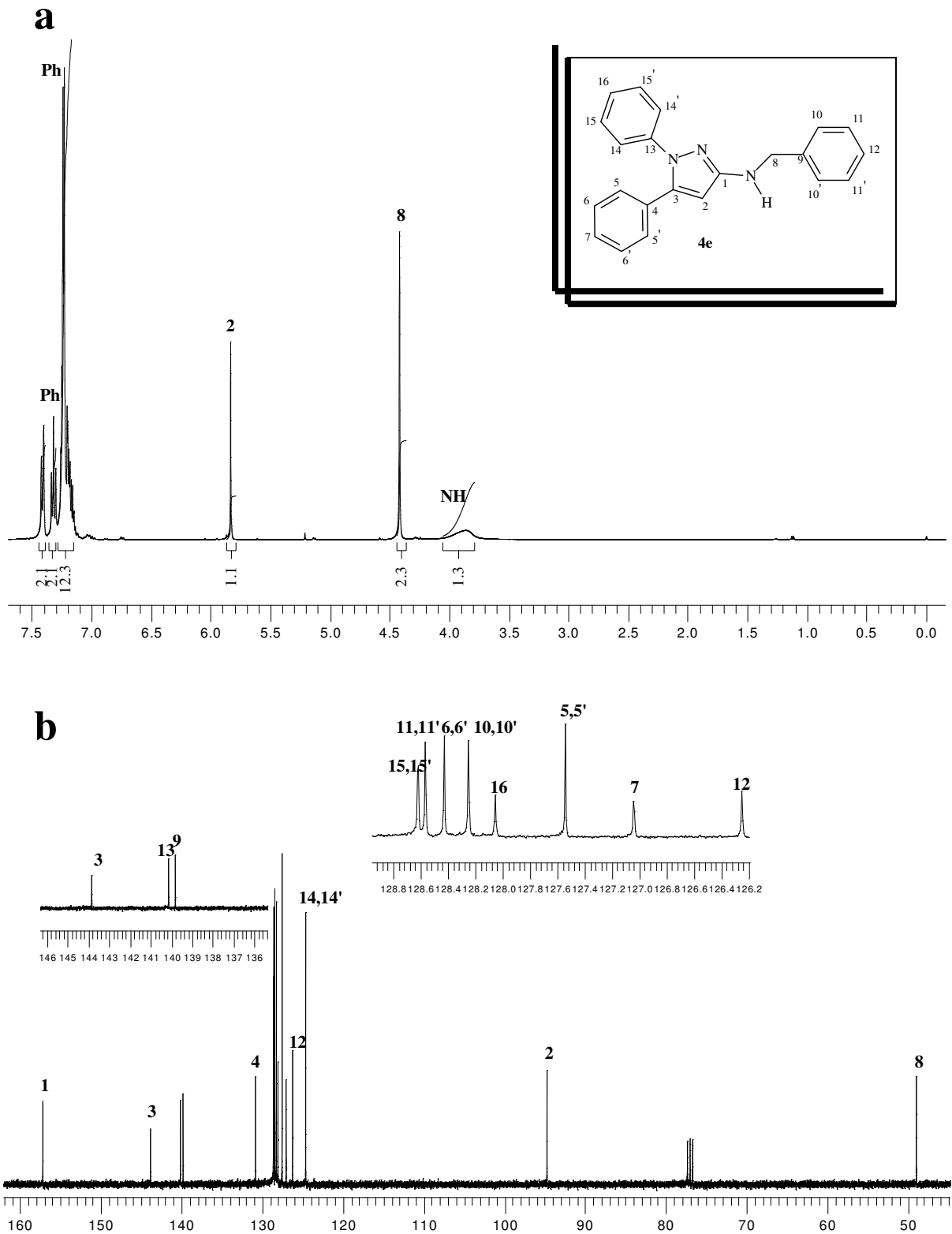


Figura 42- Espectro de RMN de ^1H (a) a 400 MHz e ^{13}C (b) a 100 MHz em CDCl_3 do 1,5-difenil 3-fenilamino pirazol (**4d**).



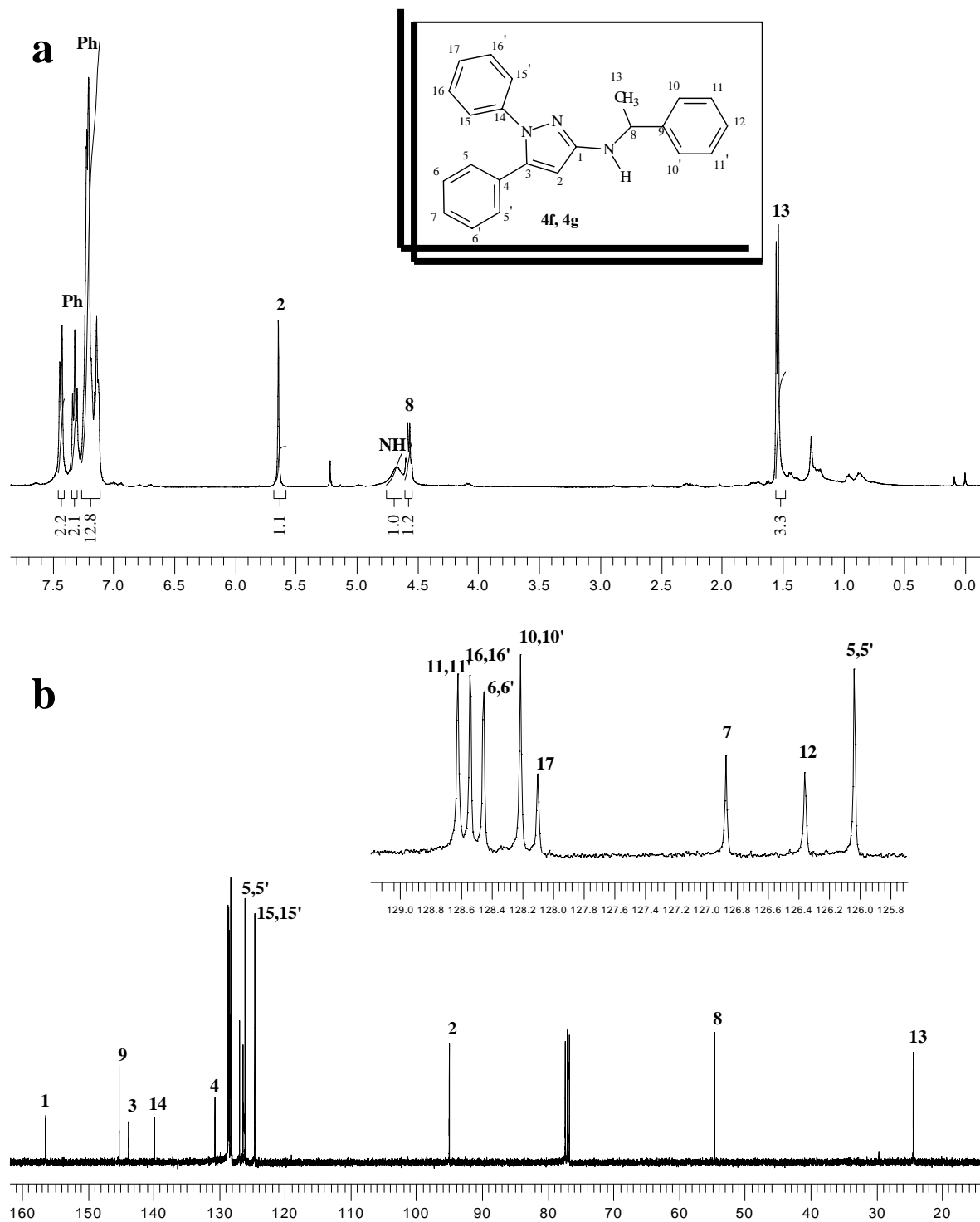


Figura 44- Espectro de RMN de ^1H (a) a 400 MHz e ^{13}C (b) a 100 MHz em CDCl_3 do 3-(R(+)- α -feniletilamino) 1,5-difenil pirazol (4f) e 3-(S(-)- α -feniletilamino) 1,5-difenil pirazol (4g).

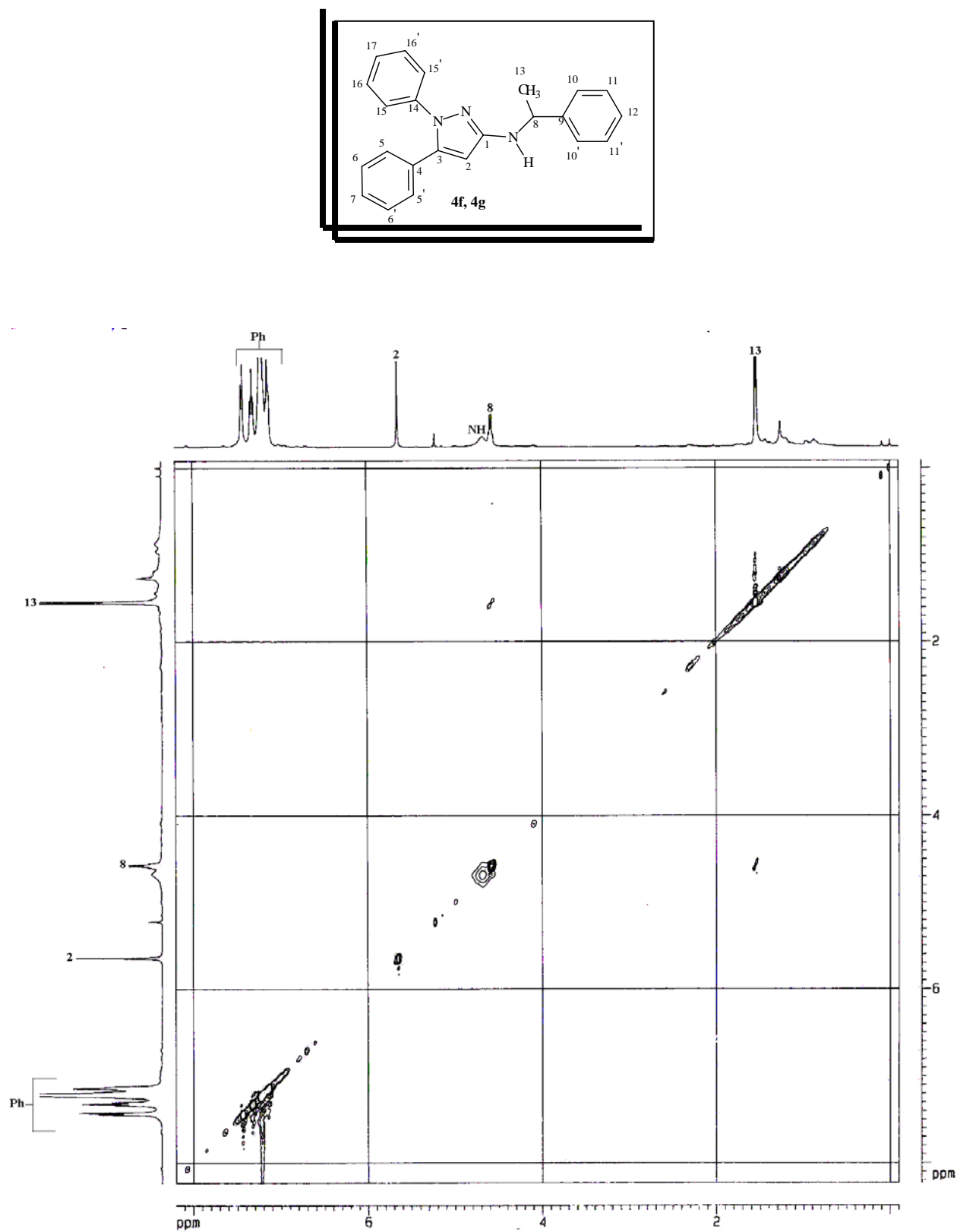


Figura 45- Espectro de RMN de NOESY a 400 MHz em CDCl₃ do 3-(R(+)-α-feniletilamino) 1,5-difenil pirazol (**4f**).

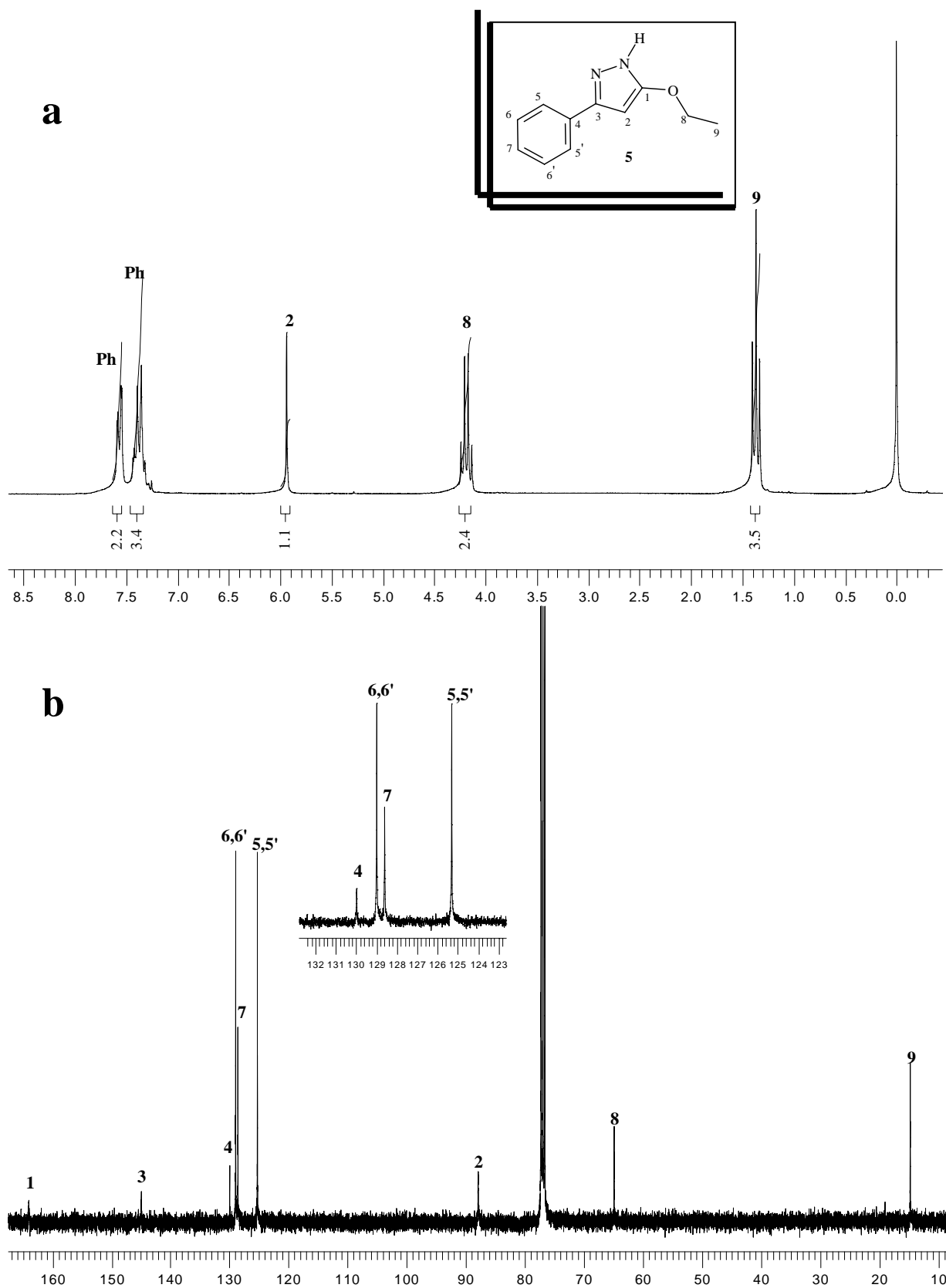


Figura 46- Espectro de RMN de ^1H (a) a 400 MHz e ^{13}C (b) a 100 MHz em CDCl_3 do 5(3)-etóxi 3(5)-fenil 1H-pirazol (5).

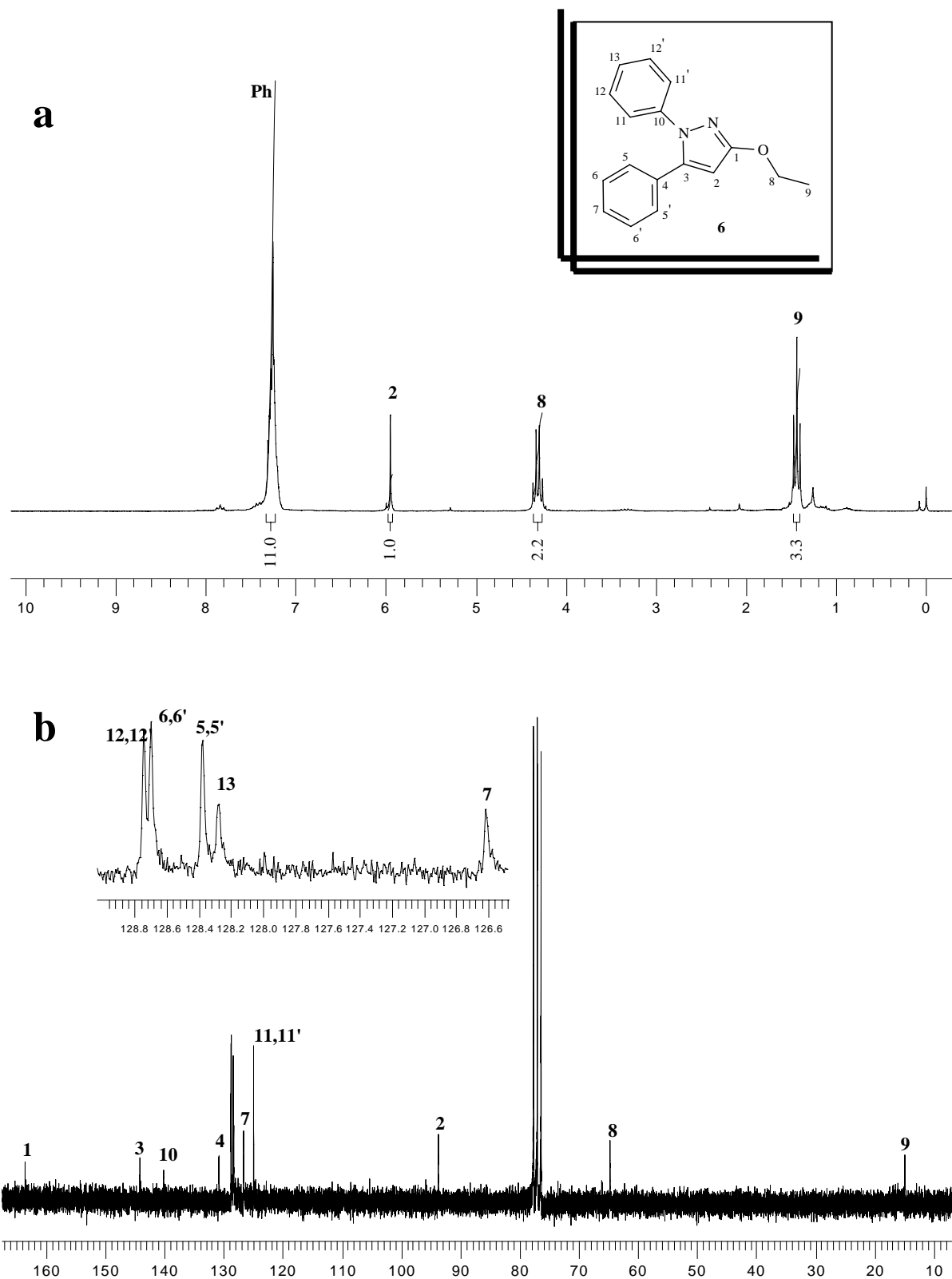


Figura 47- Espectro de RMN de ^1H (a) a 200 MHz e ^{13}C (b) a 50 MHz em CDCl_3 do 1,5-difenil 3-etóxi pirazol (6).

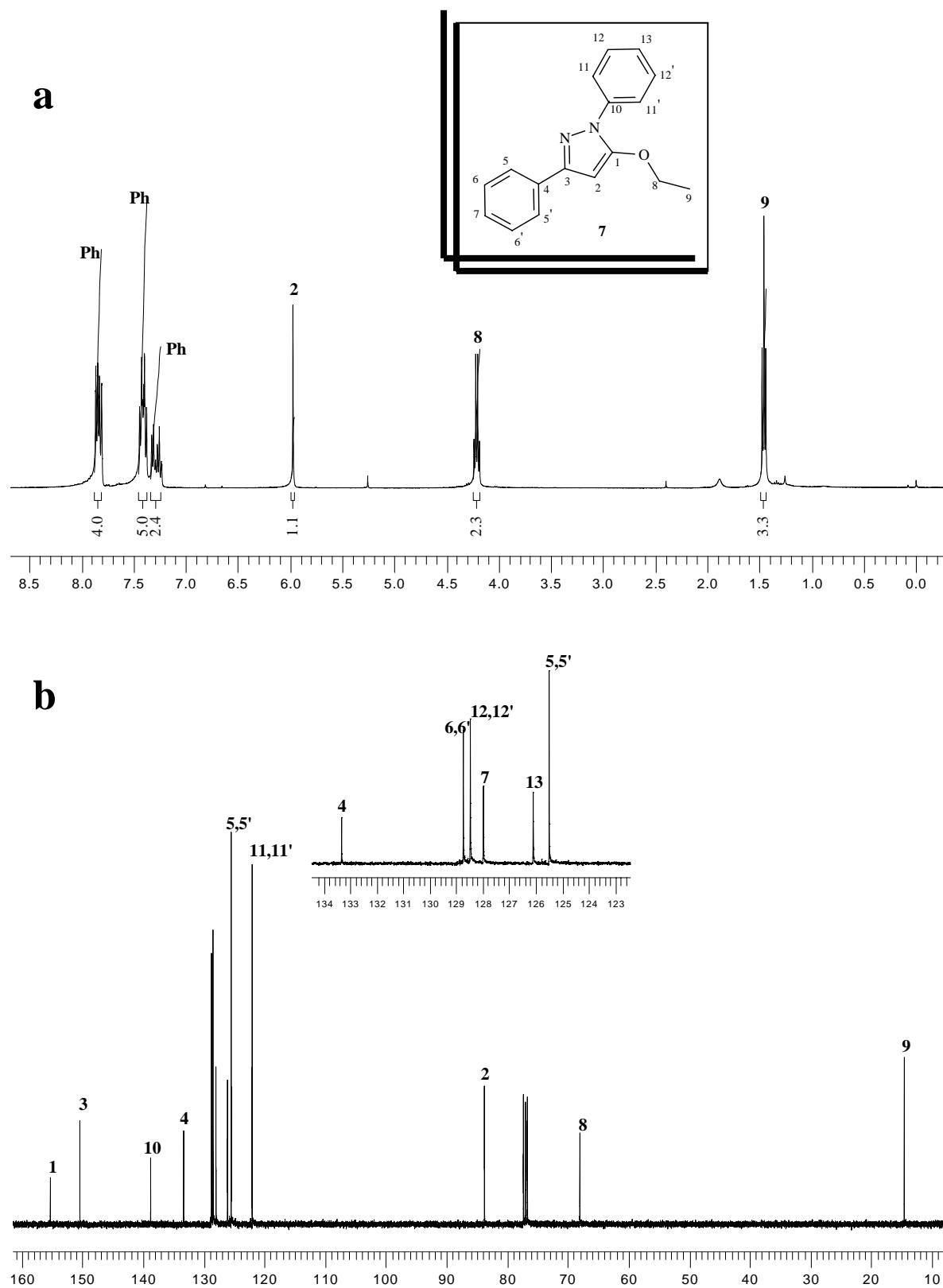


Figura 48- Espectro de RMN de ^1H (a) a 400 MHz e ^{13}C (b) a 100 MHz em CDCl_3 do 1,3-difenil 5-etóxi pirazol (7).

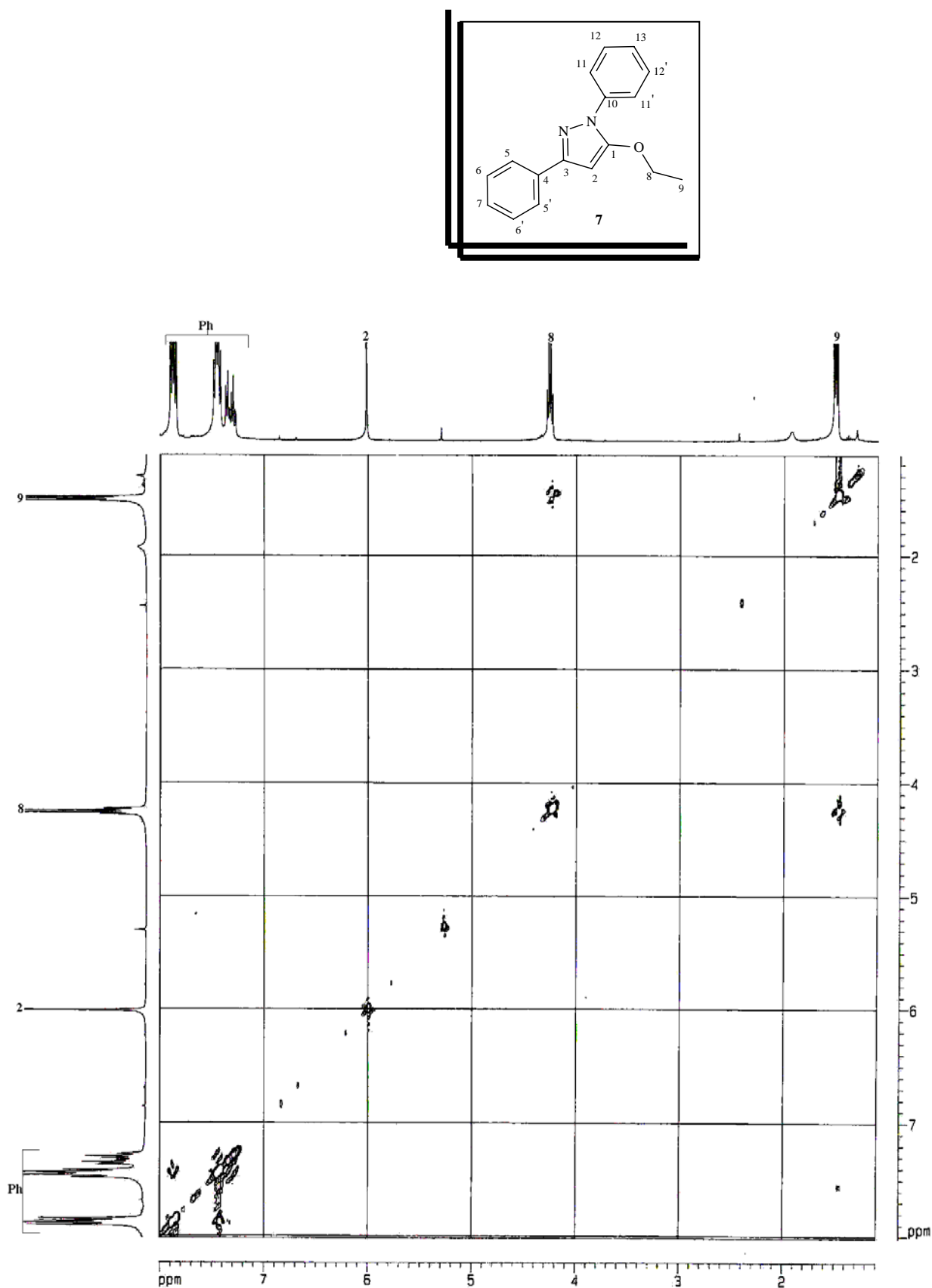


Figura 49- Espectro de RMN de NOESY a 400 MHz em CDCl₃ do 1,3-difenil 5-etóxi pirazol (7).

ANEXO I

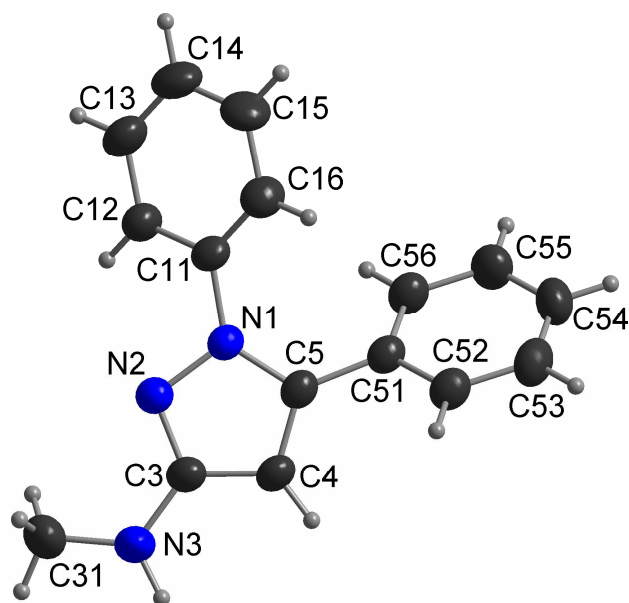


Figura 50- Estrutura de raio-X do composto 1,5-difenil 3-metilamino pirazol **4b**.

Tabela 8- Dados da determinação da estrutura 1,5-difenil 3-metilamino pirazol (4b), desvio padrão entre parênteses.

Fórmula molecular	$C_{16}H_{15}N_3$
Peso molecular	249,31
Temperatura (K)	294 (2)
Radiação, λ (Å)	0,71073
Sistema cristalino	Ortorrômbico
Grupo espacial	Pbca
Dimensões da célula unitária (Å)	$a = 8,5449 (5) \quad \alpha = 90^\circ$ $b = 12,2609 (9) \quad \beta = 90^\circ$ $c = 26,0609 (17) \quad \gamma = 90^\circ$
Volume (Å ³), Z	2730,4 (3), 8
Densidade calculada (Mg/m ³)	1,213
Coefficiente de absorção (mm ⁻¹)	0,074
F(000)	1056
Dimensão do cristal (mm ³)	0,25 x 0,20 x 0,05
Região de varredura de θ	3,01 a 29,61
Índices limitantes	$-11 \leq h \leq 11; -13 \leq k \leq 16; -36 \leq l \leq 16$.
Reflexões medidas	15574
Reflexões independentes	3785 [R (int)= 0,0521]
Perfeição para $2\theta = 29,61^\circ$	98,6%
Correção de absorção	Semi-empírica
Máximo e mínimo de transmissão	1,0 e 0,8904
Método de refinamento	Full-matrix least-squares on F ²
Data/ restraints/ parâmetros	3785/ 0/ 174
Goodness-of-fit on F ²	0,905
Final R indices [$I > 2\sigma(I)$]	$R_1 = 0,0429, wR_2 = 0,102$
R indices (all data)	$R_1 = 0,1018, wR_2 = 0,1175$
Densidade eletrônica residual (e. Å ⁻³)	0,138 e -0,201

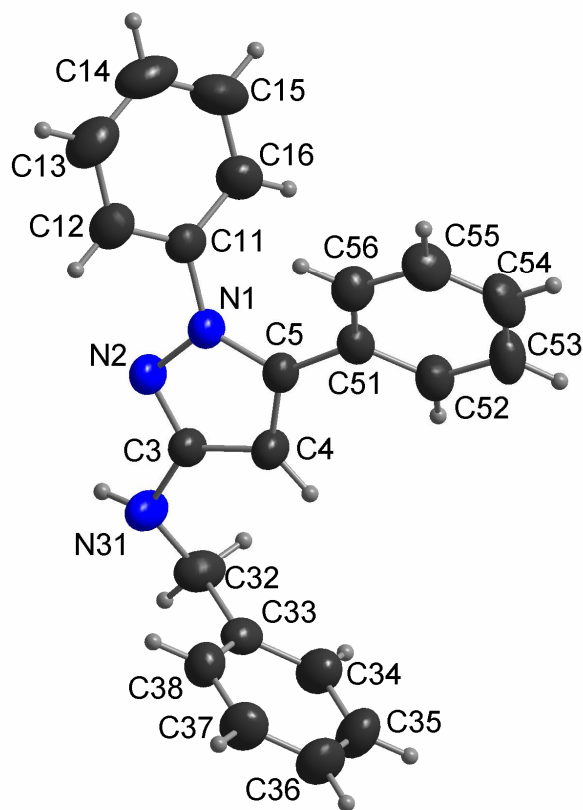


Figura 51- Estrutura de raio-X do composto 3-benzilamino 1,5-difenil pirazol **4e**.

Tabela 9- Dados da determinação da estrutura, 3-benzilamino 1,5-difenil pirazol (4e), desvio padrão entre parênteses.

Fórmula molecular	C ₂₂ H ₁₉ N ₃
Peso molecular	325,41
Temperatura (K)	294 (2)
Radiação, λ (Å)	0,71073
Sistema cristalino	Monoclínico
Grupo espacial	P2(1)/c
Dimensões da célula unitária (Å)	$a= 5,6704 (2) \quad \alpha=90^\circ$ $b= 19,0708 (8) \quad \beta=98,942 (2)^\circ$ $c= 16,5995 (12) \quad \gamma=90^\circ$
Volume (Å ³), Z	1773,24 (12), 4
Densidade calculada (Mg/m ³)	1,219
Coefficiente de absorção (mm ⁻¹)	0,073
F(000)	688
Dimensão do cristal (mm ³)	0,45 x 0,35 x 0,3
Região de varredura de θ	3,44 a 29,74
Índices limitantes	-7<=h<=7; -26<=h<=26; -22<=h<=23.
Reflexões medidas	20995
Reflexões independentes	5020 [R (int)= 0,0299]
Perfeição para 2theta=29,74°	99,7%
Correção de absorção	Semi-empírica
Máximo e mínimo de transmissão	1,0 e 0,889
Método de refinamento	Full-matrix least-squares on F ²
Data/ restraints/ paraments	5020/ 0/ 227
Goodness-of-fit on F ²	1,013
Final R indices [I>2sigma(I)]	R ₁ = 0,0444, wR ₂ = 0,1204
R indices (all data)	R ₁ = 0,0792, wR ₂ = 0,1406
Densidade eletrônica residual (e. Å ⁻³)	0,192 e -0,189

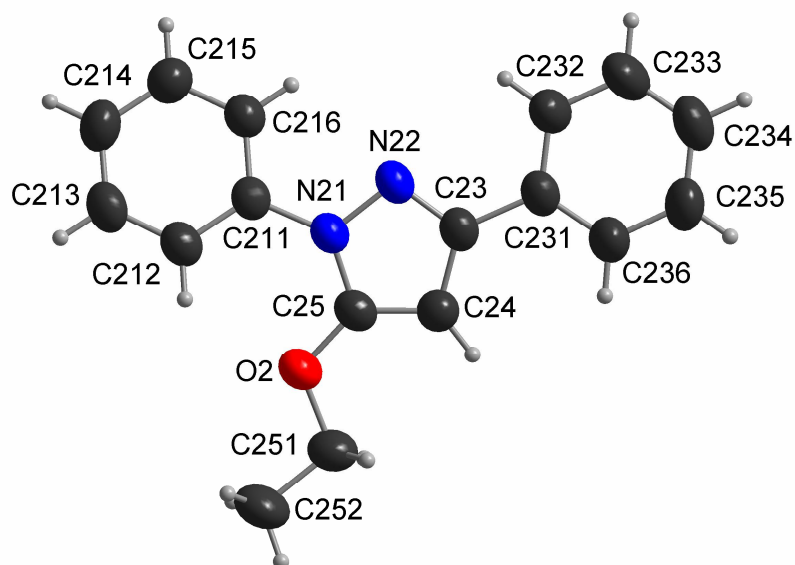


Figura 52- Estrutura de raio-X do composto 1,3-difenil 5-etóxi pirazol 7 .

Tabela 10- Dados da determinação da estrutura 1,3-difenil 5-etóxi pirazol (7), desvio padrão entre parênteses.

Fórmula molecular	$C_{17}H_{16}N_2O$
Peso molecular	264,32
Temperatura (K)	295(2)
Radiação, λ (Å)	0,71073
Sistema cristalino	Triclínico
Grupo espacial	P-1
Dimensões da célula unitária (Å)	$a= 9,7703$ (2) $\alpha=90^\circ$ $b= 9,7746$ (2) $\beta=98,942$ (2) $^\circ$ $c= 15,3970$ (3) $\gamma=90^\circ$
Volume (Å ³),	1445,06 (5), 4
Densidade calculada (Mg/m ³)	1,215
Coefficiente de absorção (mm ⁻¹)	0,077
F(000)	560
Dimensão do cristal (mm ³)	0,43 x 0,27 x 0,18
Região de varredura de θ	1,34 a 30,07
Índices limitantes	-13 $\leq h \leq$ 13; -13 $\leq k \leq$ 13; -21 $\leq l \leq$ 21
Reflexões medidas	63439
Reflexões independentes	8442 [R (int)= 0,0291]
Perfeição para $2\theta= 30,07^\circ$	99,8%
Correção de absorção	Semi-empírica
Máximo e mínimo de transmissão	1 e 0,913
Método de refinamento	Full-matrix least-squares on F ²
Data/ restraints/ paraments	8442/ 0/ 364
Goodness-of-fit on F ²	1,042
Final R indices [I>2sigma(I)]	R ₁ = 0,0425 wR ₂ = 0,1186
R indices (all data)	R ₁ = 0,0676 wR ₂ = 0,1314
Densidade eletrônica residual (e. Å ⁻³)	0,145 e -0,156