

Patrícia Devantier Neuenfeldt

**Planejamento, Síntese e Avaliação Biológica de Derivados
Pirazolínicos e Bis-chalconas Simétricas: Estudos de Correlação
Estrutura/Atividade.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Química da Universidade Federal de Santa
Catarina (SC) como requisito parcial para
obtenção do título de **Doutor em Química.**

Orientador: Prof. Dr. Ricardo José Nunes

Co-orientador: Prof. Dr. Wilson Cunico

Florianópolis

2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Neuenfeldt, Patricia Devantier

Planejamento, Síntese e Avaliação Biológica de Derivados Pirazolinicos e Bis-chalconas Simétricas: Estudos de Correlação Estrutura/Atividade. / Patricia Devantier Neuenfeldt ; orientador, Ricardo José Nunes ; coorientador, Wilson Cunico. - Florianópolis, SC, 2015. 345 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas. Programa de Pós-Graduação em Química.

Inclui referências

1. Química. 2. Química medicinal. 3. Síntese Orgânica. I. Nunes, Ricardo José . II. Cunico, Wilson. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Química. IV. Título.

Patrícia Devantier Neuenfeldt

**Planejamento, Síntese e Avaliação Biológica de Derivados
Pirazolínicos e Bis-chalconas Simétricas: Estudos de Correlação
Estrutura/Atividade.**

Esta tese de Doutorado foi julgada e aprovada para a obtenção do título de Doutor em Química no Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 05 de março de 2015.

Prof. Dr. Hugo Gallardo

Coordenador do Programa de Pós Graduação em Química

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Ricardo José Nunes
Orientador

Prof. Dr. Bruno Silveira de Souza
(QMC-UFSC)

Prof. Dr. Edesio Luiz Simionatto
(FURB)

Prof. Dr. Fábio Zazyki Galetto
(QMC-UFSC)

Profa. Dra. Fátima de Campos
Buzzi
(UNIVALI, Relatora)

Prof. Dra. Maria da Graça
Nascimento
(QMC-UFSC)

*Aos meus pais em retribuição
ao amor e incentivo incondicional.*

AGRADECIMENTOS

- Aos meus pais, Clever e Neuza, para os quais dedico essa tese, por todo o amor, apoio, incentivo durante toda a minha vida.

- A minha família, em especial, ao meu namorado Joscelito pelo companheirismo e paciência e aos meus irmãos Rafael, Gabriele e Samuel por estarem sempre perto mesmo estando longe;

- Ao meu orientador, Prof. Dr. Ricardo José Nunes pela orientação, ensinamentos, conversas acompanhadas de um bom chimarrão, confiança em mim e no meu trabalho e por ter me acolhido no LEAT fazendo eu me sentir em casa.

- Ao Prof. Dr. Wilson Cunico pela co-orientação, amizade, confiança e incentivo durante esses anos de trabalho envolvendo o final de graduação, mestrado e doutorado.

- As minhas amigas, colegas e “co-co”-orientadoras Alessandra e Louise pelas ideias compartilhadas, sínteses realizadas, artigos publicados, leitura da tese (no calor de janeiro, hehe) e acima de tudo a amizade que construímos ao longo desses quatro anos.

- A minha amiga Dalila Venzke por todos esses anos de amizade e pela parceria em todos os momentos dessa caminhada, do ensino médio aos concursos prestados.

- A minha amiga, colega de laboratório, Maria Cláudia (Mary Jane), pela amizade, cumplicidade, confiança, conversas, discussões científicas, risadas e manhãs de chimarrão.

- Ao amigo e colega Luíz Felipe (Best) pela amizade e paciência com todos os meus chilikues nesses 4 anos;

- Aos demais colegas do LEAT, Menina Jéssica, Single, Jess Two, Cristinita, Aldo Sena, Viu e Gili boy pela parceria de todas as horas.

- Aos professores Dr. Hernán Terenzi, Dra. Tânia Beatriz Creczynski-Pasa, Dr. Attilio Di Pietro, Prof. Dr. Bruno Botta e respectivos grupos de pesquisa pela colaboração nesse trabalho.

- Aos professores da banca examinadora Dr. Bruno Silveira de Souza, Dr. Edesio Luiz Simionatto, Dr. Fábio Zazyki Galetto, Dra. Fátima de Campos Buzzi e Dra. Maria da Graça Nascimento, por todas as contribuições.

- Ao Departamento de Química da UFSC e a Central de Análises do mesmo departamento pelas análises espectroscópicas.

- Ao CNPq pelo suporte financeiro.

- A todos que não foram citados que contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão desse trabalho.
- E, acima de tudo, a Deus por ter me dado saúde.

RESUMO

Planejamento, Síntese e Avaliação Biológica de Derivados Pirazolínicos e Bis-chalconas Simétricas: Estudos de Correlação Estrutura/Atividade.

Esta tese apresenta o planejamento e a síntese de moléculas bioativas baseadas na estrutura de moléculas que já tiveram sua atividade comprovada e está subdividida em dois capítulos, de acordo com a classe de compostos e patologia-alvo. No capítulo 1, foram planejadas e sintetizadas trinta e três bis-chalconas simétricas (com substituintes estratégicos que já mostraram atividade anteriormente), obtidas com rendimentos entre 59-93%. Os compostos foram planejados no intuito da obtenção de potenciais inibidores da proteína ABCG2. Esta proteína está relacionada com a resistência a múltiplos fármacos, um dos principais obstáculos para a quimioterapia contra o câncer. Os resultados obtidos mostraram que dentre os compostos sintetizados, dois deles, o (2*E*,2'*E*)-1,1'-(1,4-fenileno)bis(3-(2,6-dimetoxifenil)prop-2-en-1-ona) **3p** ($EC_{50} = 0,2 \pm 0,04\mu\text{M}$) e o (2*E*,2'*E*)-3,3'-(1,4-fenileno)bis(1-(3,5-dimetoxifenil)prop-2-en-1-ona) **6i** ($EC_{50} = 0,5 \pm 0,3\mu\text{M}$) mostraram a mais pronunciada atividade e são promissores para o estudo de inibidores de ABCG2. No capítulo 2, foram planejadas e sintetizadas quarenta e oito pirazolinas a partir das chalconas previamente sintetizadas, que foram obtidas com rendimentos entre 60 e 98% e mostraram atividade inibitória considerável frente à PtpA e PtpB de *Mycobacterium tuberculosis* e YopH de *Yersinia enterocolitica*. Estas proteínas são essenciais para a sobrevivência das respectivas bactérias no hospedeiro e sua inibição surge como uma forma de combate às patologias relacionadas com cada proteína. Os resultados obtidos mostraram uma maior atividade dos compostos frente à YopH de *Y. enterocolitica* e dois compostos, o 1-fenil-3-(3,4-dimetóxfenil)-5-(naftalen-2-il)-4,5-dihidro-1*H*-pirazol **8c** ($8,8 \pm 2,6 \mu\text{M}$) e 1-fenil-3-(2,5-dimetoxifenil)-5-(naftalen-1-il)-4,5-dihidro-1*H*-pirazol **8p** ($8,9 \pm 0,8 \mu\text{M}$) foram os inibidores mais potentes. Estudos de modelagem molecular e de cinética enzimática mostram que esses são inibidores não competitivos, que ligam-se a um sítio alostérico da YopH.

Palavras-chave: pirazolinas; bis-chalconas; inibidores.

ABSTRACT

Desing, Synthesis and Biological Evaluation of Pyrazolines derivatives and Symmetrical Bis-Chalcones: Structure/Activity Relationships.

This thesis describes the design and synthesis of bioactive molecules based on known molecules by their activities already described in the literature. This work is subdivided into two chapters, according to the class of compounds and target disease. In Chapter 1, thirty-three symmetrical bis-chalcones were designed and synthesized (with strategic substituents that have shown activity previously), with yields between 59-93%. The compounds were designed in order to obtain potential inhibitors of ABCG2 protein. This protein is an efflux transporter that have been shown to be associated with multi-drug resistance, a major obstacle to successful cancer chemotherapy. The results showed that among the compounds synthesized, (2*E*,2'*E*)-1,1'-(1,4-phenylene)bis(3-(2,6-dimethoxyphenyl)prop-2-en-1-one) **3p** ($EC_{50} = 0.2 \pm 0,04\mu\text{M}$) and (2*E*,2'*E*)-3,3'-(1,4-phenylene)bis(1-(3,5-dimethoxyphenyl)prop-2-en-1-one) **6i** ($EC_{50} = 0.5 \pm 0,3\mu\text{M}$) showed the most pronounced activities and are promising ABCG2 inhibitors. In chapter 2, were designed and synthesized forty-eight 1,3,5-triaryl-2-pyrazolines (obtained in yields between 60 and 98%) derived from chalcones that had already shown activity as inhibitors of PtpA and PtpB from *Mycobacterium tuberculosis* or of YopH from *Yersinia enterocolitica*. Previous studies have revealed that the action of phosphatases, especially PTPs, is crucial in determining the pathogenicity of bacteria. The results obtained show a higher activity of compounds against the *YopH* from *Y. enterocolitica* and compounds 3-(3,4-dimethoxyphenyl)-5-(naphthalen-2-yl)-1-phenyl-4,5-dihydro-1H-pyrazole **8c** ($8.8 \pm 2.6 \text{ mM}$) and 3-(2,5-dimethoxyphenyl)-5-(naphthalen-1-yl)-1-phenyl-4,5-dihydro-1H-pyrazole **8p** ($8.9 \pm 0.8 \text{ mM}$) were the most potent inhibitors. Molecular modeling and enzyme kinetics studies showed that both compounds are non-competitive inhibitors and may bind to an allosteric site.

Keywords: pirazolynes; bis-chalcones; inhibitors.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Nomenclatura das bis-chalconas sintetizadas.	61
Tabela 2. Efeito das bis-chalconas na inibição de ABCG2.	74
Tabela 3. Valores de CC ₅₀ e índice terapêutico (IT) induzidos pelas bis-chalconas 3p e 6i .	78
Tabela 4. Nomenclatura das pirazolininas sintetizadas.	99
Tabela 5. Atividade inibitória das pirazolininas 8a-x a 25µM.	117
Tabela 6. Valores de IC ₅₀ das chalconas (7a-x) e pirazolininas (8a-x) frente a YopH de <i>Yersinia enterocolitica</i> , PtpA e PtpB de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .	118
Tabela 7. Valores de inibição e IC ₅₀ das 1-acetil-3,5-diaril-2-pirazolininas (9a-x) frente à YopH de <i>Yersinia enterocolitica</i> , PtpA and PtpB from <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .	122
Tabela 8. Valores de K _i dos inibidores frente YopH de <i>Y. enterocolitica</i> e PTP1B humana.	126

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Árvore cronológica da descoberta de fármacos. Fonte: adaptado de Barreiro e Fraga, 2015.	35
Figura 2. Estrutura do AAS e do apixabano.	36
Figura 3. Estrutura das cetonas α,β -insaturadas - chalconas	37
Figura 4. Estrutura das proteínas de resistência MRP1, ABCG2 e P-gp. Fonte: Adaptado de Vautier et al., 2006.	46
Figura 5. Mecanismo de ação dos transportadores ABC. Fonte: Adaptado de Kawai et al., 2011.	48
Figura 6. Estrutura química dos inibidores FTC e GF120918.	49
Figura 7. Estrutura química do inibidor Ko143.	50
Figura 8. Estruturas químicas dos inibidores A, B e C.	51
Figura 9. Relação estrutura-atividade dos compostos do estudo de Juvale e colaboradores.	53
Figura 10. Melhores inibidores do estudo de Valdameri e colaboradores.	53
Figura 11. Chalconas com potencial inibição frente a ABCG2.	54
Figura 12. Estrutura geral das chalconas	56
Figura 13. Espectro de RMN de ^1H do composto 3q .	67
Figura 14. Ampliação do espectro de RMN de ^1H do composto 3q .	68
Figura 15. Espectro de RMN de ^{13}C do composto 3q .	68
Figura 16. Espectro de RMN de ^1H do composto 6b .	69
Figura 17. Ampliação do espectro de RMN de ^1H do composto 6b .	70
Figura 18. Espectro de RMN de ^{13}C do composto 6b .	71
Figura 19. Espectro de massas de alta resolução do composto 3q .	72
Figura 20. Estimativa de casos incidentes de TB no mundo em 2013. Fonte: WHO.	82
Figura 21. Estimativa de HIV em novos casos de TB no mundo em 2013. Fonte: WHO.	82
Figura 22. Fármacos de primeira escolha utilizados no tratamento da tuberculose.	83
Figura 23. Fármacos de segunda escolha utilizados no tratamento da tuberculose.	84

Figura 24. Mecanismo de catálise das proteínas tirosina fosfatase. Fonte: Adaptado de Aoyama et al., 2003.	85
Figura 25. Inibidores da PtpA de Mtb: (a) análogo da estevastelina, (b) análogo da roseofilina, (c) análogo da nonilprodigiosina.	87
Figura 26. Inibidores seletivos de PtpB de Mtb: (a) OMTS, (b) derivado indólico, (c) indol [2,3- α]quinolizidina, (d) sulfonamida, (e) tiazolidinona fusionada com indolinona e (f) derivado isoxazólico.	88
Figura 27. Chalconas ativas em PtpA.	88
Figura 28. Inibidores da YopH de <i>Yersinia</i> spp.: (a) tripeptídeo, (b) e (c) furanilsalicilatos, (d) composto orgânico com grupo oxalil e (e) ligação bivalente.	91
Figura 29. Chalconas ativas em YopH.	91
Figura 30. Estrutura geral das pirazolinas.	92
Figura 31. Pirazolinas com diferentes atividades biológicas.	96
Figura 32. Degradação das amostras em CDCl_3 .	108
Figura 33. Espectro de RMN de ^1H do composto 8k .	109
Figura 34. Ampliação do espectro de RMN de ^1H do composto 8k .	109
Figura 35. Ampliação do espectro de RMN de ^1H do composto 8k .	110
Figura 36. Espetro de RMN de ^{13}C do composto 8k .	111
Figura 37. Espectro de RMN de ^1H do composto 9k .	112
Figura 38. Ampliação do espectro de RMN de ^1H do composto 9k .	113
Figura 39. Espectro de RMN de ^{13}C do composto 9k .	113
Figura 40. Espectro de massas de alta resolução do composto 8k .	114
Figura 41. Espectro de massas de alta resolução do composto 9k .	115
Figura 42. Perfil de inibição do compostos 8b , 8c , 8f , 8j , 8p e 8w frente à YopH de <i>Yersinia enterocolitica</i> . Os experimentos	125

cinéticos foram conduzidos com concentração crescente dos inibidores: 0 μM (\circ), 4 μM (\blacklozenge), 10 μM (\blacksquare), 12 μM (\square), 15 μM (\diamond), 20 μM (\triangle), 25 μM (\blacktriangle), 30 μM (\bullet), 35 μM (\times); *p*NPP foi utilizado como substrato em todos os experimentos. As análises foram feitas em duplicata em pelo menos cinco experimentos independentes.

Figura 43. Perfil de inibição dos compostos **8c** e **8p** frente à PTP1B humana. Os experimentos cinéticos foram conduzidos com concentração crescente dos inibidores: 0 μM (\circ), 4 μM (\blacklozenge), 10 μM (\blacksquare), 12 μM (\square), 15 μM (\diamond), 20 μM (\triangle), 25 μM (\blacktriangle), 30 μM (\bullet), 35 μM (\times); *p*NPP foi utilizado como substrato em todos os experimentos. As análises foram feitas em duplicata em pelo menos cinco experimentos independentes. 126

Figura 44. Modo de ligação dos compostos **8c** e **8p** dentro do sítio alostérico da PTP1B, proposto por *docking* molecular. A proteína está representada pelo desenho verde. Os resíduos com 6 Å de distância de **8c** e **8p** estão representados por traços verdes. A proteína é mantida com a mesma orientação em ambas as figuras. A) **(R)-8p** está representada por traços amarelos, **(S)-8p** traços laranjas. B) **(R)-8c** está representado por traços ciano, **(S)-8c** traços magenta. Hidrogênios não polares foram omitidos para maior clareza da representação. 128

Figura 45. Modo de ligação dos compostos **8c** e **8p** dentro do sítio alostérico de YopH, proposto por *docking* molecular. A proteína está representada pelo desenho verde. Os resíduos com 6 Å de distância de **8c** e **8p** estão representados por traços verdes. A proteína é mantida com a mesma orientação em ambas as figuras. A) **(R)-8p** está representada por traços amarelos, **(S)-8p** traços laranjas. B) **(R)-8c** está representado por traços ciano, **(S)-8c** traços magenta. Ligações de hidrogênio são representadas por linhas pretas. Hidrogênios não polares foram omitidos para maior clareza da representação. 130

Figura 46. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto **3a**. 215

Figura 47. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto **3b**. 216

Figura 48. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto **3c**. 217

Figura 49. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto **3d**. 218

Figura 50. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto **3e**. 219

Figura 51. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto **3f**. 220

Figura 52. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto **3g**. 221

Figura 53. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto **3h**. 222

Figura 54. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto **3i**. 223

Figura 55. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto 3j .	224
Figura 56. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto 3k .	225
Figura 57. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto 3l .	226
Figura 58. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto 3m .	227
Figura 59. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto 3n .	228
Figura 60. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto 3o .	229
Figura 61. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto 3p .	230
Figura 62. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto 3q .	231
Figura 63. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto 6a .	232
Figura 64. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto 6b .	233
Figura 65. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto 6c .	234
Figura 66. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto 6d .	235
Figura 67. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto 6e .	236
Figura 68. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto 6f .	237
Figura 69. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto 6g .	238
Figura 70. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto 6h .	239
Figura 71. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto 6i .	240
Figura 72. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto 6j .	241
Figura 73. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto 6k .	242
Figura 74. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto 6l .	243
Figura 75. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto 6m .	244
Figura 76. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto 6n .	245
Figura 77. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto 6o .	246
Figura 78. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto 6p .	247
Figura 79. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto 8a .	248
Figura 80. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto 8b .	249
Figura 81. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto 8c .	250
Figura 82. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto 8d .	251
Figura 83. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto 8e .	252
Figura 84. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto 8f .	253
Figura 85. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto 8g .	254
Figura 86. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto 8h .	255
Figura 87. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto 8i .	256
Figura 88. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto 8j .	257
Figura 89. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto 8k .	258
Figura 90. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto 8l .	259
Figura 91. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto 8m .	260
Figura 92. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto 8n .	261
Figura 93. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto 8o .	262
Figura 94. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto 8p .	263
Figura 95. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto 8q .	264

Figura 96. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto 8r.	265
Figura 97. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto 8s.	266
Figura 98. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto 8t.	267
Figura 99. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto 8u.	268
Figura 100. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto 8v.	269
Figura 101. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto 8w.	270
Figura 102. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto 8x.	271
Figura 103. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto 9a.	272
Figura 104. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto 9b.	273
Figura 105. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto 9c.	274
Figura 106. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto 9d.	275
Figura 107. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto 9e.	276
Figura 108. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto 9f.	277
Figura 109. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto 9g.	278
Figura 110. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto 9h.	279
Figura 111. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto 9i.	280
Figura 112. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto 9j.	281
Figura 113. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto 9k.	282
Figura 114. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto 9l.	283
Figura 115. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto 9m.	284
Figura 116. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto 9n.	285
Figura 117. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto 9o.	286
Figura 118. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto 9p.	287
Figura 119. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto 9q.	288
Figura 120. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto 9r.	289
Figura 121. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto 9s.	290
Figura 122. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto 9t.	291
Figura 123. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto 9u.	292
Figura 124. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto 9v.	293
Figura 125. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto 9w.	294
Figura 126. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto 9x.	295
Figura 127. Espectro de massas de alta resolução do composto 3a.	299
Figura 128. Espectro de massas de alta resolução do composto 3b.	299
Figura 129. Espectro de massas de alta resolução do composto 3c.	300
Figura 130. Espectro de massas de alta resolução do composto 3d.	300
Figura 131. Espectro de massas de alta resolução do composto 3e.	301

Figura 132. Espectro de massas de alta resolução do composto 3f.	301
Figura 133. Espectro de massas de alta resolução do composto 3g.	302
Figura 134. Espectro de massas de alta resolução do composto 3h.	302
Figura 135. Espectro de massas de alta resolução do composto 3i.	303
Figura 136. Espectro de massas de alta resolução do composto 3j.	303
Figura 137. Espectro de massas de alta resolução do composto 3k.	304
Figura 138. Espectro de massas de alta resolução do composto 3l.	304
Figura 139. Espectro de massas de alta resolução do composto 3m.	305
Figura 140. Espectro de massas de alta resolução do composto 3n.	305
Figura 141. Espectro de massas de alta resolução do composto 3o.	306
Figura 142. Espectro de massas de alta resolução do composto 3p.	306
Figura 143. Espectro de massas de alta resolução do composto 3q.	307
Figura 144. Espectro de massas de alta resolução do composto 6a.	307
Figura 145. Espectro de massas de alta resolução do composto 6b.	308
Figura 146. Espectro de massas de alta resolução do composto 6c.	308
Figura 147. Espectro de massas de alta resolução do composto 6d.	309
Figura 148. Espectro de massas de alta resolução do composto 6e.	309
Figura 149. Espectro de massas de alta resolução do composto 6f.	310
Figura 150. Espectro de massas de alta resolução do composto 6g.	310
Figura 151. Espectro de massas de alta resolução do composto 6h.	311

Figura 152. Espectro de massas de alta resolução do composto 6i.	311
Figura 153. Espectro de massas de alta resolução do composto 6j.	312
Figura 154. Espectro de massas de alta resolução do composto 6k.	312
Figura 155. Espectro de massas de alta resolução do composto 6l.	313
Figura 156. Espectro de massas de alta resolução do composto 6m.	313
Figura 157. Espectro de massas de alta resolução do composto 6n.	314
Figura 158. Espectro de massas de alta resolução do composto 6o.	314
Figura 159. Espectro de massas de alta resolução do composto 6p.	315
Figura 160. Espectro de massas de alta resolução do composto 8a.	315
Figura 161. Espectro de massas de alta resolução do composto 8b.	316
Figura 162. Espectro de massas de alta resolução do composto 8c.	316
Figura 163. Espectro de massas de alta resolução do composto 8d.	317
Figura 164. Espectro de massas de alta resolução do composto 8e.	317
Figura 165. Espectro de massas de alta resolução do composto 8f.	318
Figura 166. Espectro de massas de alta resolução do composto 8g.	318
Figura 167. Espectro de massas de alta resolução do composto 8h.	319
Figura 168. Espectro de massas de alta resolução do composto 8i.	319
Figura 169. Espectro de massas de alta resolução do composto 8j.	320
Figura 170. Espectro de massas de alta resolução do composto 8k.	320
Figura 171. Espectro de massas de alta resolução do composto 8l.	321

Figura 172. Espectro de massas de alta resolução do composto 8m.	321
Figura 173. Espectro de massas de alta resolução do composto 8n.	322
Figura 174. Espectro de massas de alta resolução do composto 8o.	322
Figura 175. Espectro de massas de alta resolução do composto 8p.	323
Figura 176. Espectro de massas de alta resolução do composto 8q.	323
Figura 177. Espectro de massas de alta resolução do composto 8r.	324
Figura 178. Espectro de massas de alta resolução do composto 8s.	324
Figura 179. Espectro de massas de alta resolução do composto 8t.	325
Figura 180. Espectro de massas de alta resolução do composto 8u.	325
Figura 181. Espectro de massas de alta resolução do composto 8v.	326
Figura 182. Espectro de massas de alta resolução do composto 8w.	326
Figura 183. Espectro de massas de alta resolução do composto 8x.	327
Figura 184. Espectro de massas de alta resolução do composto 9a.	327
Figura 185. Espectro de massas de alta resolução do composto 9b.	328
Figura 186. Espectro de massas de alta resolução do composto 9c.	328
Figura 187. Espectro de massas de alta resolução do composto 9d.	329
Figura 188. Espectro de massas de alta resolução do composto 9e.	329
Figura 189. Espectro de massas de alta resolução do composto 9f.	330
Figura 190. Espectro de massas de alta resolução do composto 9g.	330
Figura 191. Espectro de massas de alta resolução do composto 9h.	331

Figura 192. Espectro de massas de alta resolução do composto 9i.	331
Figura 193. Espectro de massas de alta resolução do composto 9j.	332
Figura 194. Espectro de massas de alta resolução do composto 9k.	332
Figura 195. Espectro de massas de alta resolução do composto 9l.	333
Figura 196. Espectro de massas de alta resolução do composto 9m.	333
Figura 197. Espectro de massas de alta resolução do composto 9n.	334
Figura 198. Espectro de massas de alta resolução do composto 9o.	334
Figura 199. Espectro de massas de alta resolução do composto 9p.	335
Figura 200. Espectro de massas de alta resolução do composto 9q.	335
Figura 201. Espectro de massas de alta resolução do composto 9r.	336
Figura 202. Espectro de massas de alta resolução do composto 9s.	336
Figura 203. Espectro de massas de alta resolução do composto 9t.	337
Figura 204. Espectro de massas de alta resolução do composto 9u.	337
Figura 205. Espectro de massas de alta resolução do composto 9v.	338
Figura 206. Espectro de massas de alta resolução do composto 9w.	338
Figura 207. Espectro de massas de alta resolução do composto 9x.	339

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Síntese de análogos do FTC proposta por Loevezijn e colaboradores.	49
Esquema 2. Relação estrutura-atividade do estudo de Belkacem e colaboradores.	50
Esquema 3. Síntese de chalconas inibidoras de ABCG2 de Juvale e colaboradores.	52
Esquema 4. Chalconas derivadas do anel quinoxalínico potenciais inibidores de ABCG2.	55
Esquema 5. Cromonas potenciais inibidores de ABCG2.	55
Esquema 6. Síntese de chalconas – Condensação de Claisen-Schmidt.	57
Esquema 7. Bis-chalconas sintetizadas por Mobinikhaledi e colaboradores.	58
Esquema 8. Bis-chalconas sintetizadas por Nagaraj e Sanjeeva Reddy.	58
Esquema 9. Bis-chalconas sintetizadas por Modzelewska e colaboradores.	59
Esquema 10. Síntese das bis-chalconas 3a-q e 6a-p . a) KOH 50% p/v, etanol, t.a., 16 h;	64
Esquema 11. Mecanismo proposto para a síntese de chalconas.	73
Esquema 12. Chalconas potenciais inibidores de PtpA e PtpB e Mtb.	89
Esquema 13. Síntese de pirazolininas utilizando K_2CO_3 .	93
Esquema 14. Síntese de pirazolininas utilizando micro-ondas.	94
Esquema 15. Síntese de pirazolininas sob irradiação de luz de tungstênio.	95
Esquema 16. Pirazolininas com atividade tuberculostática.	97
Esquema 17. Síntese das 1,3,5-triaril-2-pirazolininas 8a-x . a) KOH 50% p/v, metanol, r.t., 24 h; b) fenil-hidrazina, ácido acético, refluxo, 3h.	103
Esquema 18. Síntese das 1-acetil-3,5-diaril-2-pirazolininas 9a-x . a) KOH 50% p/v, metanol, r.t., 24 h; b) hidrato de hidrazina, ácido acético, refluxo, 3h.	106
Esquema 19. Mecanismo proposto para a síntese de pirazolininas.	116

LISTA DE ABREVIATURAS

δ	Deslocamento químico
3D-QSAR	Do inglês, <i>Three-dimensional quantitative activity relationships</i>
AAS	Ácido acetilsalicílico
ABC	Do inglês <i>ATP-binding cassette</i>
ABCB1	Do inglês <i>ATP-binding cassette sub-family B member 1</i>
ABCC1	Do inglês <i>ATP-binding cassette sub-family C member 1</i>
ABCG2	Do inglês <i>ATP-binding cassette sub-family G member 2</i>
ABCP	Do inglês, <i>placenta-specific ATP-binding cassette</i>
AcOH	Ácido acético
ADP	Adenosina difosfato
Ala	Alanina
APPI	Do inglês, <i>Atmospheric pressure photoionization</i>
Arg	Arginina
Asp	Ácido aspártico
ATP	Adenosina trifosfato
BCG	Bacilo de Calmette-Guérin
BCRP	Do inglês, <i>Breast cancer resistance protein</i>
BOP-Cl	Do inglês, <i>Bis(2-oxo-3-oxazolidinyl)phosphonic chloride</i>
CC ₅₀	Concentração citotóxica de 50%
CCF	Cromatografia de camada fina
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
CEBIME	Centro de biologia molecular e estrutural
COX	Ciclo-oxigenase
d	Dupleto
dd	Dupleto de dupleto
DIPEA	Diisopropiletilamina
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Desvio padrão
DTT	DL-ditiotreitól
EC ₅₀	Concentração efetiva de 50%
EDTA	Do inglês, <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
ESI-MS	Do inglês, <i>Electrospray ionization-mass spectrometry</i>
F-moc	9-fluorenilmetiloxicarbonil

FTC	Fumitremorgina C
GF1209918	Inibidor da proteína ABCG2
Glu	Ácido glutâmico
Gly	Glicina
HEK293	Do inglês, <i>Human embryonic kidney 293 cells</i>
HIV	Do inglês, <i>Human immunodeficiency virus</i>
HRMS	Do inglês, <i>High resolution mass spectrometry</i>
Hz	Hertz
IBCP	<i>Institut de Biologie et Biochimie des Protéines</i>
IC ₅₀	Concentração inibitória de 50%
Ile	Isoleucina
IMAC	Do inglês, <i>Immobilized-metal affinity chromatography</i>
Incub.	Incubação
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo
IS	Índice de seletividade
IT	Índice terapêutico
<i>J</i>	Constante de acoplamento
KDa	Quilo Dalton
<i>K</i> _{Mapp}	Constante de Michaelis-Menten aparente
Ko143	Inibidor da proteína ABCG2
LB	Luria-Bertani
Leu	Leucina
LMW PTP	Do inglês, <i>Low molecular weight protein tyrosine phosphatases</i>
<i>m</i>	Múltiplo
MCF7	Do inglês, <i>Michigan cancer foundation-7</i>
MDR	Do inglês, <i>Multidrug resistance</i>
MDR1	Do inglês, <i>Multidrug resistance 1</i>
Met	Metionina
min	Minutos
MRP1	Do inglês, <i>Multidrug resistance protein 1</i>
Mtb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolona
MXR	Do inglês, <i>Mitoxantrone-resistant</i>
MW	micro-ondas
NBD	Do inglês, <i>Nucleotide binding domain</i>
NMP	<i>N</i> -metil-2-pirrolidona
OMTS	(oxalilamino-metileno)-tiofeno sulfonamida
PDB	Do inglês, <i>protein data bank</i>
P-gp	Do inglês, <i>P-glycoprotein</i>

pH	Potencial hidrogeniônico
Phe	Fenilalanina
Pi	Fósforo inorgânico
PMSF	Do inglês, <i>Phenylmethylsulfonyl fluoride</i>
pNPP	<i>p</i> -nitrofenilfosfato
ppm	Partes por milhão
Pro	Prolina
PTP	Proteína tirosina fosfatase
PTP1B	Proteína tirosina fosfatase 1B
PtpA	Proteína tirosina fosfatase A (de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>)
PtpB	Proteína tirosina fosfatase B (de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>)
p/v	Peso/volume
Py	Piridina
RMN	Ressonância magnética nuclear
s	Simpleto
SDS-PAGE	Do inglês, <i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SN38	Substrato de ABCG2
t.a.	Temperatura ambiente
TB	Tuberculose
TFA	Ácido trifluoracético
THF	Tetrahidrofurano
Thr	Treonina
TMS	Tetrametilsilano
TNF- α	Do inglês, <i>Tumor necrosis factor alpha</i>
Tyr	Tirosina
UV-VIS	Ultravioleta visível
Val	Valina
V_{\max}	Velocidade máxima
VPS33B	Do inglês, <i>Vacuolar protein sorting 33B</i> . Regulador de membrana de fusão, substrato da PtpA de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .
v/v	Volume/volume
WHO	Do inglês <i>World Health Organization</i>
YopH	PTP de <i>Yersinia</i> spp.

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	35
1.1.Química medicinal e fármacos sintéticos	35
1.2. Câncer, resistência a múltiplos fármacos e inibidores de ABCG2	36
1.3. Tuberculose, peste, infecções entéricas e enzimas tirosina fosfatase	37
2.OBJETIVOS	41
2.1.Objetivos gerais	41
2.1.1. Objetivos específicos	41
CAPÍTULO 1	43
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	45
3.1 Aspectos gerais sobre câncer	45
3.2. Resistência a múltiplos fármacos (MDR) e inibidores de ABCG2	45
3.3. Chalconas e bis-chalconas	56
4. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	61
4.1. Apresentação dos compostos	61
4.1.1. Numeração e nomenclatura dos compostos	61
4.2. Síntese das bis-chalconas	63
4.3. Identificação das bis-chalconas	66
4.3.1. Espectroscopia de RMN ¹ H e ¹³ C dos compostos 3a-q e 6a-p	66
4.3.2. Espectrometria de massas de alta resolução dos compostos 3a-q e 6a-p	71
4.4. Mecanismo proposto para a síntese das bis-chalconas	72
4.5. Atividade biológica	73
4.5.1. Relação estrutura-atividade dos compostos 3a-q e 6a-p frente à proteína ABCG2	76
4.5.2. Citotoxicidade das bis-chalconas 3p e 6i em células normais	78
CAPITULO 2	79
5. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	81
5.1.Tuberculose	81
5.2.Enzimas tirosina-fosfatase: PtpA e PtpB de <i>M. tuberculosis</i>	85
5.3. Peste, infecções entéricas e YopH	89
5.4. Pirazolinias	92
5.4.1. Síntese de pirazolinias	92
5.4.2. Pirazolinias e atividade biológica	95

5.4.2.1. Pirazolinás como potenciais agentes tuberculostáticos	96
6. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	99
6.1. Apresentação dos compostos	99
6.1.1. Síntese das chalconas	99
6.1.2. Numeração e nomenclatura dos compostos	99
6.2. Síntese das pirazolinás	102
6.2.1. Identificação dos compostos obtidos	107
6.2.1.1. Espectroscopia de RMN ¹ H e ¹³ C dos compostos 8a-x e 9a-x	107
6.2.1.2. Espectrometria de massas de alta resolução dos compostos 8a-x e 9a-x	114
6.2.2. Mecanismo proposto para a síntese das pirazolinás	115
6.3. Atividade biológica	116
6.3.1. Cinética enzimática	124
6.4. Modelagem molecular	127
6.4.1. <i>Docking</i> molecular das 1,3,5-triaril-2-pirazolinás com PTP1B	127
6.4.2. <i>Docking</i> molecular das 1,3,5-triaril-2-pirazolinás com YopH	129
7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	131
8. PARTE EXPERIMENTAL	133
8.1. Capítulo 1	133
8.1.1. Preparação e caracterização dos compostos 3a-q e 6a-p	133
8.1.1.1. Procedimento geral para a síntese de chalconas 3a-p	133
8.1.1.2. Procedimento geral para a síntese de chalconas 6a-q	144
8.1.2. Atividade biológica	154
8.1.2.1. Avaliação da atividade inibitória de ABCG2	154
8.1.2.2. Viabilidade celular	155
8.2. Capítulo 2	155
8.2.1. Preparação e caracterização das pirazolinás 8a-x e 9a-x	155
8.2.1.1. Procedimento geral para a síntese de chalconas 7a-x	156
8.2.1.2. Procedimento geral para a síntese de pirazolinás 8a-x	156
8.2.1.3. Procedimento geral para a síntese de pirazolinás 9a-x	175
8.2.2. Atividade biológica	192
8.2.2.1. YopH: expressão e purificação	192
8.2.2.2. PtpA: expressão e purificação	193
8.2.2.3. PtpB: expressão e purificação	194
8.2.2.4. PTP1B: expressão e purificação	194

8.2.2.5. Avaliação da atividade residual das enzimas PtpA, PtpB, YopH e PTP1B	195
8.2.2.6. Determinação dos valores de IC ₅₀ das pirazolinas	196
8.2.2.7. Cinética Enzimática	196
8.2.3. Modelagem Molecular	196
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	199
APÊNDICE I	213
APÊNDICE II	297
APÊNDICE III	341

1. INTRODUÇÃO

1.1. Química medicinal e fármacos sintéticos

A química medicinal se dedica a estudar as bases moleculares da ação dos fármacos, a relação entre a estrutura química e a atividade farmacológica, incluindo o planejamento e o desenho estrutural de novas substâncias que possuam propriedades farmacoterapêuticas úteis, capazes de constituírem novos fármacos.¹

De maneira geral, os fármacos disponíveis na terapêutica moderna são de origem sintética (cerca de 85%). Se considerarmos ainda aqueles oriundos de semi-síntese, este percentual supera os 85% mencionados em um mercado que totalizou 895 bilhões de dólares em 2012, correspondendo ao montante de US\$ 760,7 bilhões em fármacos de origem sintética. A síntese de fármacos é uma atividade bastante valiosa em termos de mercado¹

Em um breve retrospecto da cronologia da descoberta dos fármacos (Figura 1), desde o ácido acetilsalicílico (AAS, Aspirina®), primeiro fármaco sintético desenvolvido em 1889, até o apixabano, lançado em 2012 nos EUA, novo agente antitrombótico (Figura 2), observa-se que a maioria esmagadora das inovações terapêuticas compreende ou relaciona-se a fármacos de origem sintética.¹

Figura 1. Árvore cronológica da descoberta de fármacos. Fonte: adaptado de Barreiro e Fraga, 2015.

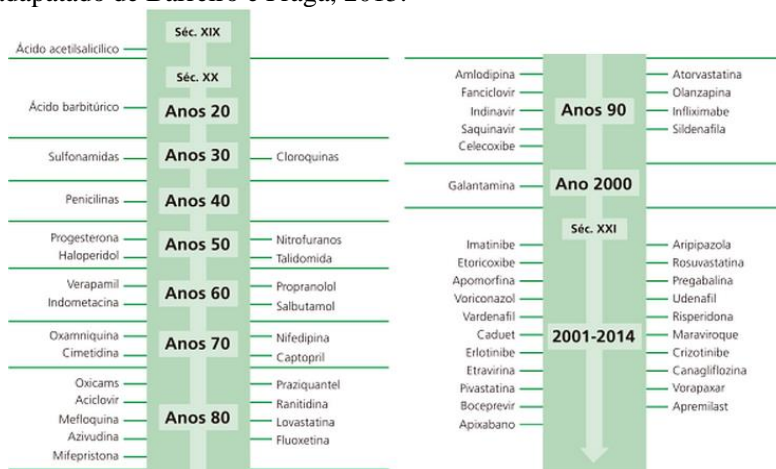
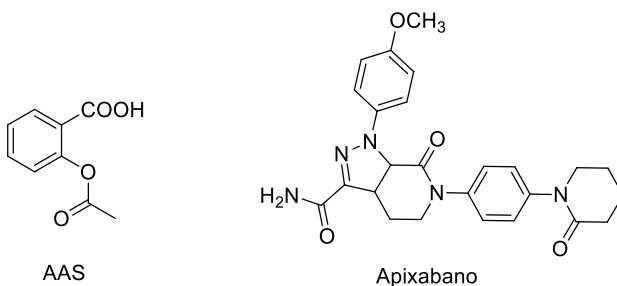


Figura 2. Estrutura do AAS e do apixabano.

O desenvolvimento de moléculas que possam ser protótipos de fármacos eficientes e seguros, com menores efeitos colaterais que os disponíveis no mercado, que possam ser administrados preferencialmente por via oral e com custos reduzidos para o tratamento das mais diversas patologias, têm motivado a pesquisa científica em Química Medicinal. Nesta perspectiva, o estudo de novas estruturas químicas pode contribuir significativamente para a descoberta de tratamentos mais seguros e efetivos.

Na maioria das vezes, os fármacos são aquirais e possuem mais de um heteroátomo, sendo eles nitrogênio, enxofre e oxigênio, predominantemente, além de cloro e flúor. Se os classificarmos pelo mecanismo de ação, em sua maioria são substâncias sintéticas com propriedades inibidoras de enzimas e antagonistas de receptores seletivos, sendo menos numerosos aqueles que atuam como agonistas de receptores, e ainda em menor número, aqueles que atuam ao nível de canais iônicos. Estima-se que os fármacos atuais atuem em aproximadamente 482 alvos terapêuticos, em sua maioria enzimas.¹

Os compostos heterocíclicos sintéticos possuem uma grande importância devido à sua aplicabilidade nos mais diversos campos da química moderna, incluindo a química medicinal. Dos 85% dos fármacos sintéticos, 62% são heterociclos contendo em seu núcleo base 91% de nitrogênio, 24% de enxofre e 16% de oxigênio.¹

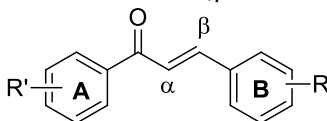
1.2. Câncer, resistência a múltiplos fármacos e inibidores de ABCG2

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças, que têm em comum o crescimento desordenado de células que invadem os

tecidos e órgãos, podendo espalhar-se para outras regiões do corpo, processo conhecido como metástase.² As células cancerígenas possuem uma forte capacidade de adquirir resistência a fármacos antitumorais, o que contribui para a baixa eficácia da quimioterapia.^{3,4} O aumento do efluxo dos fármacos do meio intracelular para o meio extracelular tem sendo visto como a principal causa dessa resistência a múltiplos fármacos que consiste principalmente na presença dos transportadores ABC (do inglês *ATP-binding cassette*).⁵ A proteína ABCG2 é um exemplo de transportador ABC e desempenha um papel importante na resistência a múltiplos fármacos de células cancerígenas, e sua inibição surge como uma das estratégias para combater esses tumores resistentes. A combinação de inibidores com fármacos antitumorais deve causar um aumento na concentração dos fármacos no interior da célula.⁶⁻⁸

Chalconas são cetonas α,β -insaturadas que apresentam o núcleo 1,3-diarilprop-2-en-1-ona, contendo o anel A ligado à carbonila e o anel B ligado ao carbono β (Figura 3).^{9,10}

Figura 3. Estrutura das cetonas α,β -insaturadas - chalconas.



São relatadas na literatura diversas atividades biológicas relacionadas a esses compostos¹¹⁻²¹, inclusive como inibidores da proteína ABCG2.²²⁻²⁵ Com isso surge a primeira proposta desse trabalho, que consiste na síntese de bis-chalconas simétricas com potencial atividade inibitória frente a proteína ABCG2.

1.3. Tuberculose, peste, infecções entéricas e enzimas tirosina fosfatase

Além de representarem graves problemas de saúde pública, as bactérias causadoras da tuberculose, da peste e de infecções entéricas têm em comum enzimas tirosina fosfatase como fatores de virulência.

A tuberculose (TB) é uma infecção grave, transmitida pelo ar e causada pela bactéria *Mycobacterium tuberculosis*. Nos últimos anos, o aparecimento de cepas multirresistentes colocou a tuberculose novamente em destaque entre as doenças infecto-contagiosas. Estima-se que um terço da população mundial esteja infectada pelo bacilo da TB e que destes, 30 milhões de pessoas morrerão nos próximos 10 anos.²⁶⁻²⁸ Na última

década, demonstrou-se que duas enzimas tirosina fosfatases, PtpA e PtpB, são secretadas pelo *M. tuberculosis* em macrófagos humanos infectados,²⁹ e estão envolvidas em sua sobrevivência no hospedeiro.³⁰

Infeções entéricas humanas, caracterizadas por febre, dor abdominal, ulcerações e inflamação do intestino, podem ser causadas por duas bactérias do gênero *Yersinia*: *Y. enterocolitica* e *Y. pseudotuberculosis*.³¹ Outra bactéria do mesmo gênero, a *Y. pestis* é o agente causador das pestes bubônica, pneumônica e septicêmica. Apesar dos esforços para erradicar a peste, reservatórios naturais da *Y. pestis* ainda existem em ratos silvestres e outras populações de roedores em partes da África, sul da Ásia e sudoeste dos Estados Unidos,³² e aproximadamente 2000 casos de peste em humanos ainda ocorrem todos os anos.³³ A YopH, uma proteína tirosina fosfatase, é um dos fatores de virulência das espécies patogênicas de *Yersinia*. Ao invadir as células fagocitárias do hospedeiro, a YopH causa inibição da resposta inflamatória à bactéria através de um processo que envolve quebra de adesões focais, inibição da fagocitose, liberação de fator de necrose tumoral α (TNF- α) e resposta oxidativa. A YopH também impede a função dos linfócitos B e T, prevenindo a resposta imune adaptativa, o que é crucial para a sobrevivência da bactéria nos nódulos linfáticos do hospedeiro.³⁴⁻³⁶

Recentemente, nosso grupo de pesquisas observou importante inibição da PtpA, e da PtpB de *M. tuberculosis*, e da YopH de *Y. enterocolitica*, provocada por chalconas sintéticas. Desta forma, este trabalho tem focado na obtenção de moléculas sintéticas com potencial atividade inibitória dessas proteínas.³⁷⁻⁴⁰

Pirazolinas são heterociclos com cinco membros, que podem ser obtidos através da ciclização de chalconas. São relatadas na literatura diversas aplicações destas moléculas no campo da química medicinal.⁴¹⁻⁴⁷ Assim, a segunda proposta do presente trabalho é a ciclização das chalconas mais ativas nos trabalhos anteriores do grupo,³⁷⁻⁴⁰ às pirazolinas correspondentes, e investigação da atividade inibitória dos novos heterociclos frente às mesmas enzimas.

Com o intuito de facilitar a leitura e manter a organização dos resultados, esta tese está dividida em dois capítulos que apresentam as estratégias sintéticas para a obtenção das moléculas de acordo com cada patologia-alvo: Capítulo 1 – Síntese de bis-chalconas simétricas e avaliação inibitória frente à proteína ABCG2, e Capítulo 2 – Síntese de pirazolinas e avaliação frente às proteínas PtpA e PtpB de *Mtb* e YopH de *Y. enterocolitica*.

Deste modo, a partir desta seção, são expostos os objetivos do trabalho seguidos pelos capítulos 1 e 2. Na sequência é apresentada a parte experimental, onde estão descritas as metodologias de síntese e dos testes biológicos realizados. Finalmente, apresentam-se as conclusões, perspectivas, referências bibliográficas e os apêndices. Os apêndices incluem os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e de carbono dos compostos deste trabalho, e os artigos publicados ou em fase de submissão referentes a esta Tese.

2. Objetivos

2.1. Objetivos gerais

Esta pesquisa tem como objetivo geral o planejamento racional, a síntese de bis-chalconas simétricas e derivados pirazolínicos e a avaliação de sua atividade biológica, a fim de encontrar moléculas bioativas protótipos de fármacos de importância terapêutica.

2.1.1. Objetivos específicos

CAPITULO 1:

- Planejamento de bis-chalconas baseadas nas estruturas de chalconas já publicadas;
- Síntese, purificação e caracterização de uma série de bis-chalconas simétricas;
- Estudo da ação inibitória das moléculas obtidas frente a proteína ABCG2.
- Estabelecer uma correlação estrutura-atividade para todas as moléculas propostas;

CAPITULO 2:

- Planejamento de pirazolinas baseadas nas estruturas de chalconas já publicadas;
- Síntese, purificação e caracterização de uma série de pirazolinas, a partir da ciclização das chalconas com atividade biológica previamente determinada pelo grupo de pesquisas;
- Estudo da ação inibitória das moléculas obtidas frente às proteínas tirosinas fosfatases PtpA e PtpB de *M. tuberculosis* e YopH de *Y. enterocolitica*.
- Estabelecer uma correlação estrutura-atividade para todas as moléculas propostas;

CAPÍTULO 1

No capítulo 1, foram planejadas e sintetizadas trinta e três bis-chalconas simétricas (com substituintes estratégicos que já mostraram atividade anteriormente), obtidas com rendimentos entre 59-93%. Os compostos foram planejados no intuito da obtenção de potenciais inibidores da proteína ABCG2. Esta proteína está relacionada com a resistência a múltiplos fármacos, um dos principais obstáculos para a quimioterapia contra o câncer. Os resultados obtidos mostraram que dentre os compostos sintetizados, dois deles, o (2E,2'E)-1,1'-(1,4-fenileno)bis(3-(2,6-dimetoxifenil)prop-2-en-1-ona) **3p** ($EC_{50} = 0,2 \pm 0,04\mu M$) e o (2E,2'E)-3,3'-(1,4-fenileno)bis(1-(3,5-dimetoxifenil)prop-2-en-1-ona) **6i** ($EC_{50} = 0,5 \pm 0,3\mu M$) mostraram as mais pronunciadas atividades e são promissoras para o estudo de inibidores de ABCG2.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Aspectos gerais sobre câncer

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado (maligno) de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se (metástase) para outras regiões do corpo.²

Dividindo-se rapidamente, estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores (acúmulo de células cancerosas) ou neoplasias malignas. Por outro lado, um tumor benigno significa simplesmente uma massa localizada de células que se multiplicam vagarosamente e se assemelham ao seu tecido original, raramente constituindo risco de vida.²

Muitos dos tumores decorrentes resultam de alterações celulares hereditárias, mas a maioria dos casos (cerca de 80%) está relacionada ao grande número de fatores riscos que se encontram no meio ambiente.⁴⁸ Os principais fatores externos envolvidos são: radiação ultravioleta e ionizante, produtos químicos, aflatoxinas, arsênio, tabaco, alguns vírus, bactérias e parasitas.⁴⁹

Estudos estimam que cerca de 40% dos casos de câncer poderiam ser prevenidos com um melhor estilo de vida. Os principais fatores de risco envolvidos no desenvolvimento do câncer são: uso do tabaco, álcool, obesidade, sedentarismo, poluição do ar, sexo não seguro e dieta.⁵⁰

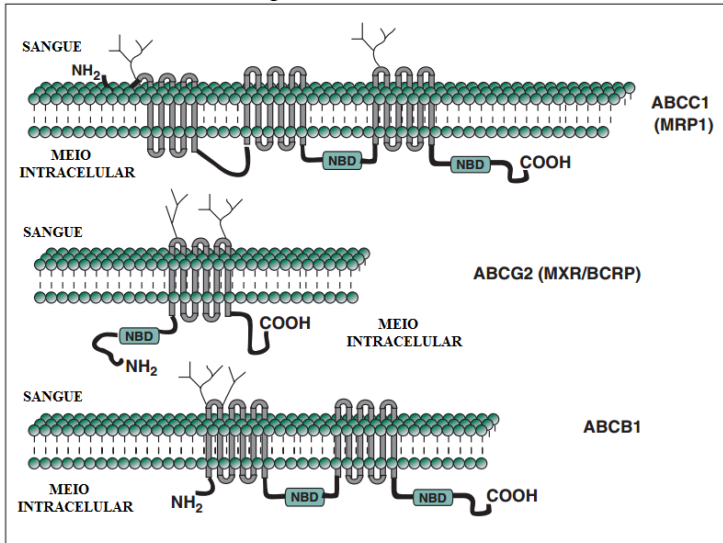
3.2. Resistência a múltiplos fármacos (MDR) e inibidores de ABCG2

As células cancerígenas possuem uma forte capacidade de adquirir resistência a fármacos antitumorais e esse é um dos maiores obstáculos para o tratamento quimioterápico de um grande número de tumores. Essa resistência a múltiplos fármacos, é conhecida como “*multidrug resistance*” ou MDR. São vários os fatores causadores dessa resistência, pode-se citar: 1) alteração na expressão do receptor de membrana do quimioterápico, 2) mutação das proteínas-alvo dos quimioterápicos, 3) modificações no metabolismo do fármaco, 4) alterações na via apoptótica, 5) alterações nos pontos de checagem do ciclo celular, 6) compartimentalização intracelular do fármaco, 7) aumento do efluxo dos fármacos, entre outros.^{3,4}

Estudos mostram que o aumento do efluxo dos fármacos do meio intracelular para o meio extracelular vem sendo visto como a principal causa dessa resistência a múltiplos fármacos, que consiste principalmente na presença dos transportadores ABC (do inglês *ATP-binding cassette*). Estes transportadores são proteínas transmembranares que possuem basicamente 3 regiões: porção extracelular, porção transmembrana e sítio de ligação de nucleotídeos (NBD). Essas três regiões são comuns a todos os membros da família dos transportadores ABC, no entanto essas regiões podem estar organizadas de maneiras diferentes com dois ou três domínios transmembrana e dois sítios de ligação de ATP (por exemplo a P-gp, glicoproteína-P, e a MRP1, respectivamente) ou ainda apenas um domínio transmembrana e um sítio de ligação de ATP (por exemplo a ABCG2) (Figura 4). Para que ocorra o efluxo dos fármacos são necessários pelo menos dois sítios de ligação de ATP, portanto a proteína ABCG2 é considerada um meio transportador e precisa estar associada a uma segunda proteína para formar um dímero e realizar o efluxo de moléculas.⁵

Figura 4. Estrutura das proteínas de resistência MRP1, ABCG2 e P-gp.

Fonte: Adaptado de Vautier et al., 2006.



Três destas proteínas apresentam uma forte relevância clínica em pacientes com câncer. São elas a ABCB1 também conhecida como P-gp

ou MDR1; ABCC1 também conhecida como MRP1, e ABCG2 também conhecida como BCRP ou MXR.⁵¹

A primeira proteína a ser descoberta foi a a glicoproteína-P (P-gp) e é a única que já possui a estrutura elucidada. Em 1976 Juliano e Ling⁵² demonstraram a presença deste transportador em células tumorais resistentes a vários quimioterápicos.

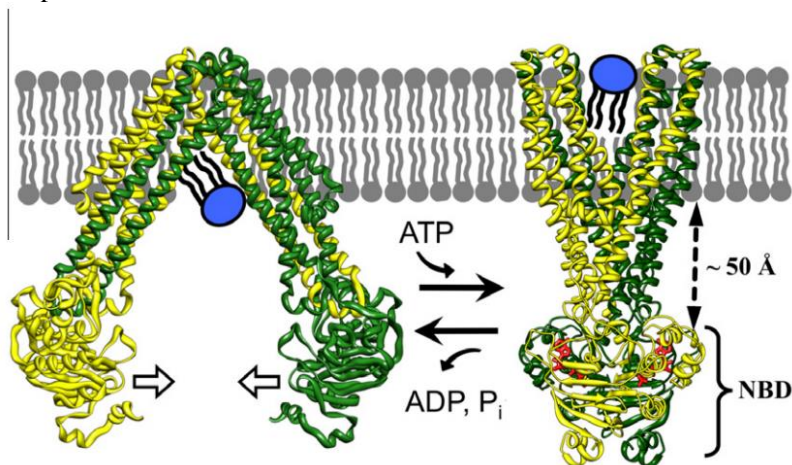
A segunda proteína envolvida na resistência em células tumorais é chamada de MRP1 e foi identificada em 1992.⁵³ A presença da proteína MRP1 confere resistência a diversos quimioterápicos como antraciclinas, alcalóides da vinca e camptotecina. Mesmo apresentando substratos em comum com outros transportadores como P-gp, poucos inibidores desta proteína existem até o momento.⁵⁴

A última proteína a ser descoberta e estudada foi a ABCG2. Três grupos foram responsáveis por identificá-la e nomeá-la de acordo com o modelo utilizado na sua descoberta. Em 1998, Doyle e colaboradores⁵⁵ identificaram a presença desta proteína em células de câncer de mama (MCF7) tratadas com adriamicina e por isso este grupo nomeou esta proteína de BCRP (*breast cancer resistance protein*). Esta proteína também é conhecida com MXR, pois o grupo a identificou em células resistentes a mitoxantrona⁵⁶, e o terceiro grupo nomeou esta proteína como ABCP (*placenta-specific ATP-binding cassette*) devido à sua presença na placenta.⁵⁷

A proteína ABCG2 está presente na placenta (função relacionada à proteção do feto), fígado, rins, intestino, glândulas mamárias, testículos, entre outros. Ela possui 655 aminoácidos e uma massa de aproximadamente 72 kDa.⁵⁸ Esta proteína também está relacionada aos vários tipos de câncer, incluindo câncer de mama, pulmão, pâncreas, cólon, esôfago, estômago, cérebro e em tumores hematológicos.⁵⁹ Para realizar o transporte de substratos, como todos os transportadores ABC, possui como fonte de energia a hidrólise de ATP.

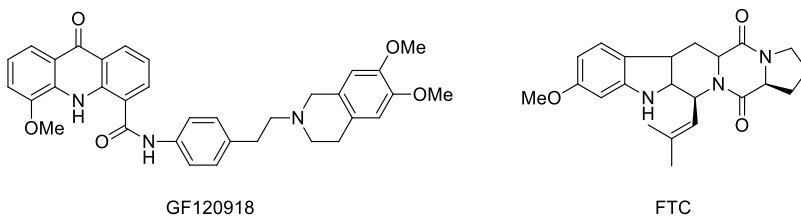
O mecanismo de efluxo dos transportadores ABC tem como ponto central a hidrólise de ATP que favorece o fechamento dos domínios NBDs e a abertura dos domínios transmembranares para o meio extracelular. Após a hidrólise do ATP em ADP + Pi ocorre a abertura dos domínios NBDs e o transportador volta para a posição inicial. Na ABCG2 duas regiões NBD são necessárias para que a hidrólise de ATP aconteça e por esta razão, duas proteínas são necessárias para formar uma unidade funcional (Figura 5).⁶⁰

Figura 5. Mecanismo de ação dos transportadores ABC. **Fonte:** Adaptado de Kawai et al., 2011.



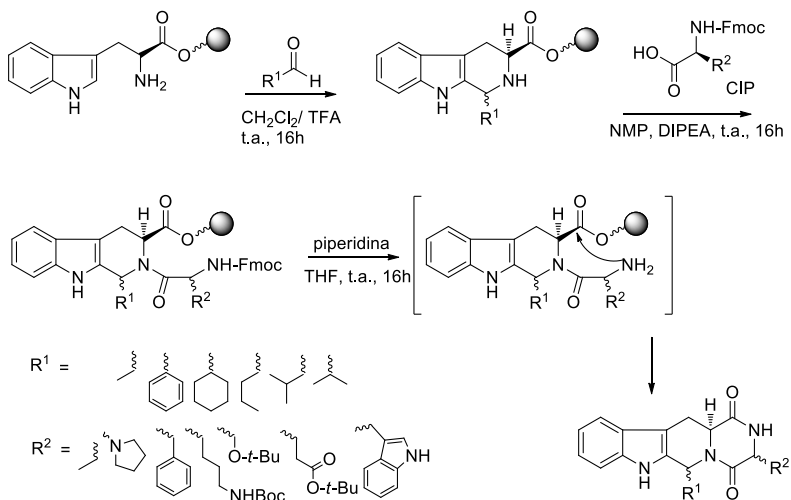
Uma das estratégias para combater esses tumores resistentes é utilizar inibidores dos transportadores ABC. A combinação de inibidores com fármacos antitumorais deve causar um aumento na concentração dos fármacos no interior da célula. *In vitro*, um número de inibidores P-gp foram otimizados até a terceira ou quarta geração de compostos, mas sua intrínseca toxicidade e baixa atividade *in vivo* vêm impedindo a finalização de ensaios clínicos.⁶⁻⁸

Os inibidores da proteína ABCG2 foram estudados mais recentemente e podem ser divididos em inibidores não específicos, como o elacridar, que inibem também a P-gp, e inibidores específicos como a fumitremorgina C (FTC) (Figura 6), a qual foi o primeiro inibidor de ABCG2 identificado. Apesar da especificidade, a FTC apresentou muitos efeitos neurotóxicos e a eficácia do fármaco nem chegou a ser testada em ensaios clínicos.⁶¹ Outro potente inibidor é o GF120918 (Figura 6), conhecido por ser um modulador de P-gp, que confere um perfil de resistência cruzada de ABCG2 para doxorubicina, mitoxantrona e outras drogas.⁶²

Figura 6. Estrutura química dos inibidores FTC e GF120918.

Com base na estrutura da FTC, novos inibidores sintéticos foram desenvolvidos por Loevezijn e colaboradores⁶³ através da síntese em fase sólida utilizando uma estratégia de ciclização/clivagem. O primeiro passo da reação é o ataque do nitrogênio ao aldeído, formando uma imina que é posteriormente ciclizado, formando um nitrogênio secundário que acopla com a carboxila do aminoácido *N*-protegido. O próximo passo é a desproteção. Com o grupo NH_2 livre, ocorre uma ciclização intramolecular formando os produtos desejados com rendimentos de 50-99% (Esquema 1).

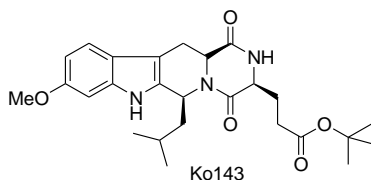
Esquema 1. Síntese de análogos do FTC proposta por Loevezijn e colaboradores.



Foram sintetizados 42 compostos (com misturas diastereoisoméricas), e entre eles se destaca o Ko143 (Figura 7) que

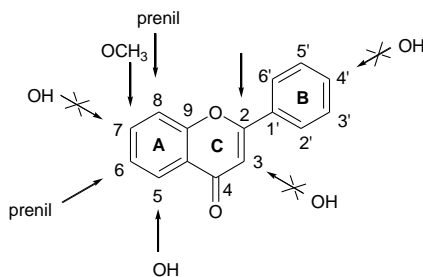
apresentou menos efeitos tóxicos e tem sido um dos inibidores mais utilizados em modelos celulares.^{64,65}

Figura 7. Estrutura química do inibidor Ko143.



Belkacem e colaboradores⁶⁶ estudaram diferentes classes de flavonoides como inibidores de ABCG2. As flavonas estudadas mostraram os melhores resultados de inibição comparados aos flavonóis, isoflavonas e flavanonas. Flavonas substituídas com o grupo OH na posição 5 mostraram-se mais efetivas quando comparadas com as posições 3 e 7. Um grupo metoxila na posição 7 da tectocrisina teve um efeito levemente positivo enquanto a prenilação na posição 6 mostrou um efeito bem maior de inibição. A potência de 6-prenilcrisina foi comparável com a do GF120918 ($IC_{50} = 0,3$ mmol/L). Ambos, 6-prenilcrisina e tectocrisina foram específicos para ABCG2 porque nenhuma interação foi vista frente a P-gp ou MRP1. Com base nesses resultados, os autores mostraram a relação estrutura atividade dessas flavonas (Esquema 2).

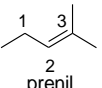
Esquema 2. Relação estrutura-atividade do estudo de Belkacem e colaboradores.




Substituintes	IC_{50} (μ M)	
	BCRP-R482	BCRP-T482
Flavona	$2,8 \pm 0,6$	$1,7 \pm 0,4$
3-OH-flavona	$8,1 \pm 1,9$	$4,9 \pm 0,1$

Esquema 2. Relação estrutura-atividade do estudo de Belkacem e colaboradores (*continuação*).

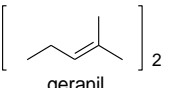
7-OH-flavona	$7,1 \pm 0,3$	$13,9 \pm 1,51$
Crisina (5,7-diOH-flavona)	$4,6 \pm 0,5$	$4,5 \pm 0,8$
Tectocrisina (5-OH, 7-OCH ₃ -flavona)	$3,0 \pm 0,9$	$1,9 \pm 0,3$
6-Prenilcrisina	$0,29 \pm 0,06$	$3,6 \pm 1,9$
6-(1,1-dimetilalil)crisina	$0,79 \pm 0,15$	>10
8-Prenilcrisina	$0,89 \pm 0,31$	>10
8-(1,1-dimetilalil)crisina	$1,4 \pm 0,5$	>10
6-Geranilcrisina	$1,0 \pm 0,4$	ND
6-Farnesilcrisina	>10	ND
6,8-Digeranilcrisina	$2,1 \pm 0,5$	ND
GF120918	$0,31 \pm 0,14$	$6,9 \pm 2,6$



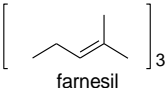
prenil



1,1-dimetilalil



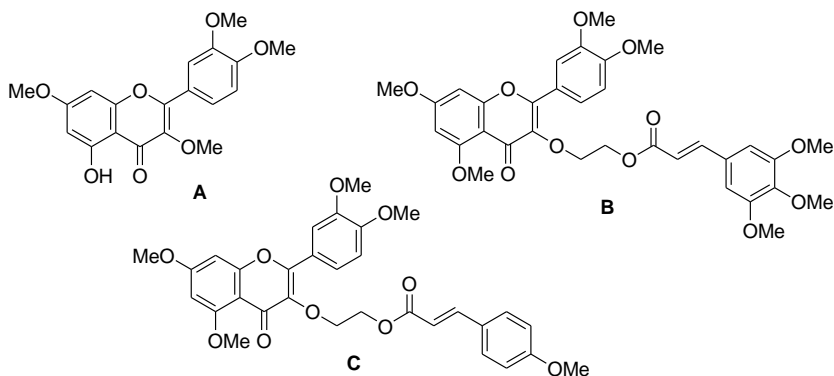
geranyl



farnesil

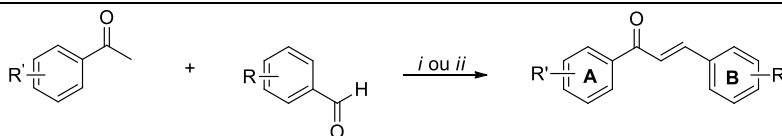
Yuan e colaboradores⁶⁷ estudaram análogos sintéticos da quercitina, eles obtiveram três derivados A, B e C (Figura 8) que exibiram promissora atividade frente a ABCG2. Curiosamente, o composto C foi ativo também para P-gp. É importante ressaltar que estes derivados não apresentaram toxicidade inerente para as linhagens celulares de câncer ou linhagens celulares de fibroblastos de ratos normais.

Figura 8. Estruturas químicas dos inibidores A, B e C.



Juvale e colaboradores²² estudaram chalconas sintéticas como inibidores de ABCG2. Os autores sintetizaram vários derivados multi-substituídos e investigaram o efeito de diferentes substituintes no anel A e B das chalconas. As chalconas foram sintetizadas pela condensação de Claisen-Schmidt em etanol e NaOH como catalisador ou por banho ultrassônico, de 1-5 horas, utilizando metanol como solvente e LiOH como catalisador (Esquema 3). Os compostos obtidos foram avaliados frente a ABCG2 em linhagens celulares MCF-7 MX e MDCK BCRP. A seletividade foi verificada através dos testes de inibição em P-gp e MRP1. Os testes foram feitos associando os compostos com mitoxantrona e SN-38 (substrato de ABCG2, metabólito ativo do quimioterápico irinotecano). A substituição no anel A na posição 2' e 4' foi considerado essencial para a atividade. No anel B, a presença do 3,4-dimetóxi produziu um efeito inibitório máximo em ABCG2, a presença de 2-cloro ou 4-cloro no anel B também mostrou uma inibição interessante.

Esquema 3. Síntese e avaliação da atividade de chalconas inibidoras de ABCG2 de Juvale e colaboradores.

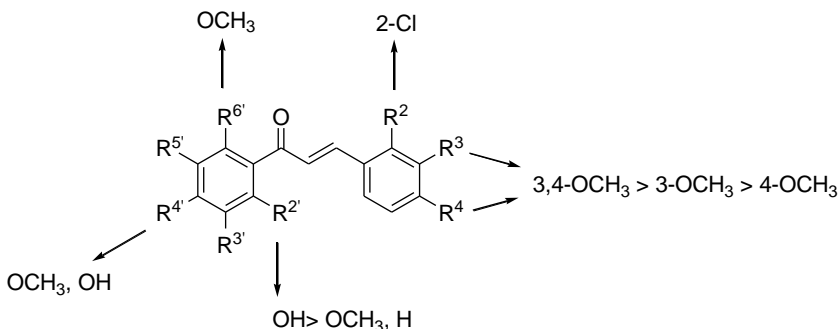


i. Etanol, NaOH, t.a. 24-72h; *ii.* MeOH, LiOH, Banho ultrassônico, 1-5h

R'	R	MCF-7 IC ₅₀ ± DP (μM)	MX DP	MDCK BCRP IC ₅₀ ± DP (μM)
2',4'-OH	3,4-OCH ₃	0,93 ± 0,03		0,85 ± 0,13
2'-OH,4',6'-OCH ₃	3,4-OCH ₃	0,75 ± 0,03		0,53 ± 0,22
3',4'-OCH ₃	4-OCH ₃	2,19 ± 0,43		1,16 ± 0,34
3',4'-OCH ₃	4-Cl	2,72 ± 0,42		1,73 ± 0,13
2',4'-OCH ₃	3,4-OCH ₃	2,20 ± 0,40		1,03 ± 0,29
2',4'-OCH ₃	4-OCH ₃	2,34 ± 0,62		1,91 ± 0,78
2'-OH	3,4-OCH ₃	1,84 ± 0,87		0,74 ± 0,14
2'-OH	3-OCH ₃	1,93 ± 0,15		1,93 ± 0,15
2',4'-OCH ₃	2-Cl	3,13 ± 0,57		2,63 ± 0,29
Ko143		0,33 ± 0,05		0,26 ± 0,02

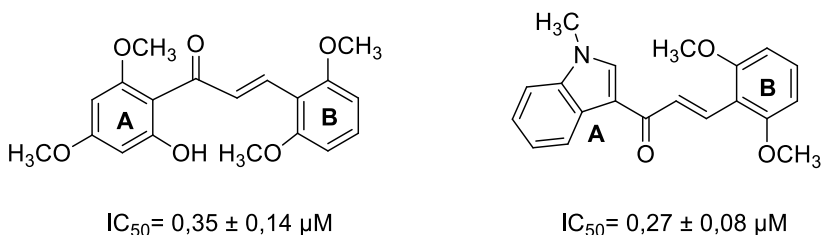
Os efeitos dos diferentes substituintes nas chalconas para potencial inibição de ABCG2 está exemplificado na Figura 9.

Figura 9. Relação estrutura-atividade dos compostos do estudo de Juvale e colaboradores.



Valdameri e colaboradores²³ também estudaram a ação de chalconas sintéticas frente a ABCG2. Os autores sintetizaram, também pela condensação de Claisen-Schmidt, chalconas e *like* chalconas, indolfenilpropenonas. O efeito inibidor da série de 44 compostos foi avaliado através da mitoxantrona, um substrato conhecido de ABCG2. Seis compostos inibiram com valores de IC_{50} inferiores a $0,5\mu M$ e alta seletividade para ABCG2. O número e posição de substituintes metóxi foi determinante para a inibição e citotoxicidade. Os melhores compostos, com potente inibição e baixa toxicidade continham um *N*-metil-1-indolil ou 6'-hidroxi-2',4'-dimetoxi-1-fenil (anel A) e dois substituintes metoxilas nas posições 2 e 6 no esqueleto fenílico do anel B (Figura 10).

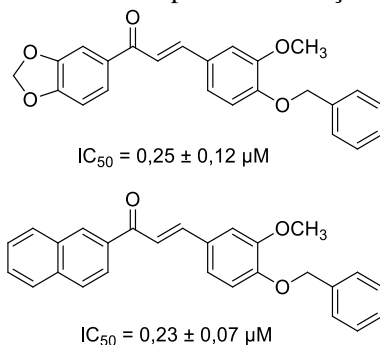
Figura 10. Melhores inibidores do estudo de Valdameri e colaboradores.



Os autores concluíram que seus derivados são promissores inibidores de ABCG2. A facilidade de síntese, sua alta atividade inibitória e especificidade são pré-requisitos fundamentais para os ensaios pré-clínicos. Os dois compostos citados acima, sem o OCH₃ na posição 4, possuem uma alta seletividade e são candidatos para os ensaios clínicos.

Em um trabalho recente do nosso grupo de pesquisas foram analisadas 54 chalconas contra o efluxo de mitoxantrona mediada por ABCG2. Os melhores resultados mostraram que os substituintes 2'-OH-4',6'-dimetoxi fenil no anel A podem ser eficientemente substituídos por um grupo 2'-naftila ou 3',4'-metilenodioxifenil (Figura 11). Tal variabilidade estrutural indica uma poliespecificidade para inibidores de transportador multirresistente. Pelo menos dois grupos metoxilas são necessários no anel B para otimizar a atividade inibitória, mas a substituição na posição 3, 4, 5 induziu citotoxicidade. A presença de um substituinte volumoso, como o *O*-benzil na posição 4 e 2'-naftila no anel A diminui consideravelmente a citotoxicidade, requisito fundamental para futuros ensaios *in vivo*.²⁴

Figura 11. Chalconas com potencial inibição frente a ABCG2.

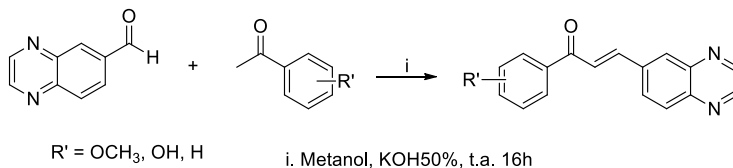


Os dois compostos demonstrados na figura acima foram os melhores do estudo, com excelente atividade inibitória frente à proteína ABCG2 e baixa citotoxicidade. Esses dados, bastante interessantes, são o primeiro passo para o desenvolvimento de testes, direcionado a farmacocinética e farmacodinâmica *in vivo*.²⁴

Chalconas derivadas do anel quinoxalínico também foram estudadas recentemente. Os melhores derivados são as chalconas com R = 2'-4'-diOCH₃ e R = 2',4',5'-triOCH₃ com IC₅₀ de 1,4 ± 1,0 μM. Chalconas monosubstituídas com o grupo metóxi (2'-OCH₃, 3'-OCH₃ e 4'-OCH₃) apresentaram atividades moderadas de 5,0 a 14,0 μM. Uma

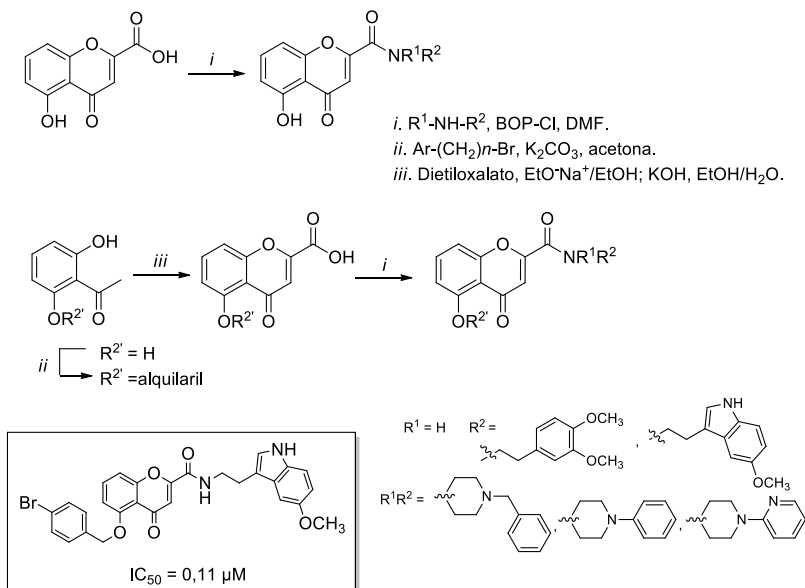
atividade análoga foi observada para os compostos com $R = 2',5'$ -diOCH₃, $R = 3',4'$ -diOCH₃, $R = 3',4',5'$ -triOCH₃ e $R = 3',5'$ -diOCH₃.²⁵

Esquema 4. Chalconas derivadas do anel quinoxalínico, potenciais inibidores de ABCG2.



Outra série de inibidores sintéticos estudados foram cromonas dissustituídas (Esquema 5). Dois tipos de substituintes, um de cada lado da estrutura geral contribuíram para a potente inibição da ABCG2 e baixa citotoxicidade. O melhor composto, 5-(4-bromobeziloxi)-2-(2-(5-metoxiindol)etil)-1-carbonil-4H-cromon-4-ona, apresentou inibição elevada ($\text{IC}_{50} = 0,11 \mu\text{M}$), baixa toxicidade e seletividade frente à ABCG2 quando comparada com outros transportadores multirresistentes ABC. O composto é altamente promissor.⁶⁸

Esquema 5. Cromonas potenciais inibidores de ABCG2.

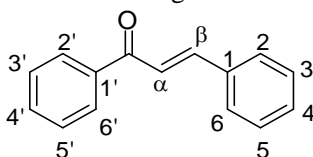


Foram sintetizadas duas séries de cromonas; na primeira série o ácido carboxílico α,β -insaturado é condensado com aminas na presença de BOP-Cl (cloreto bis(2-oxo-3-oxazolidinil) fosfônico) e DMF. Na segunda série, a dihidroxiacetofenona reage com um haleto de aquila na presença de K_2CO_3 em acetona, proporcionando o derivado monoalquilado. Este último é condensado com dietiloxalato utilizando etóxido de sódio como base para gerar o éster desejado, o qual foi hidrolisado formando o ácido carboxílico correspondente. Na última etapa, o composto formado, é então condensado com alquil/aryl aminas formando as cromonas.^{68,69}

3.3. Chalconas e bis-chalconas

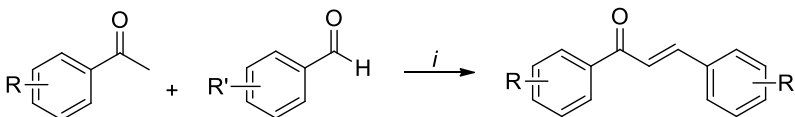
Chalconas (Figura 12) são cetonas α,β -insaturadas, que apresentam o núcleo 1,3-diarilprop-2-en-1-ona e o esqueleto $C_6-C_3-C_6$, considerado privilegiado no desenho de fármacos.^{9,10} São compostos precursores da via de biossíntese dos flavonóides, encontradas largamente nos vegetais, principalmente nas pétalas das flores, onde tem um importante papel na polinização das plantas, pois sua cor amarela atrai insetos e pássaros.⁷⁰

Figura 12. Estrutura geral das chalconas



Diversos métodos de síntese de chalconas são descritos na literatura, porém a metodologia mais utilizada é a condensação de Claisen-Schmidt.^{71,72} Neste método, realiza-se a condensação de um benzaldeído com uma cetona apropriada em um solvente polar como metanol ou etanol, com o uso de uma base forte como catalisador (Esquema 6). É um método bastante versátil e conveniente, que confere rendimentos muito variados.⁷¹⁻⁷⁵

Esquema 6. Síntese de chalconas via condensação de Claisen-Schmidt.



i. EtOH ou MeOH, NaOH ou KOH, t.a., agitação magnética

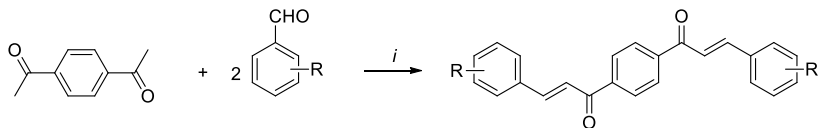
São reportados na literatura diversas atividades biológicas relacionadas com chalconas. Entre elas, podemos citar antibacteriana,¹¹⁻¹³ anti-inflamatória,^{14,15} antileucêmica,¹⁶ antimalárica,¹⁷ inibidores de tubulina,¹⁸ inibidoras da tirosina fosfatase A de *Mycobacterium tuberculosis*,³⁷⁻³⁹ antifúngica,¹⁹ anti-leishmania,^{20,21} entre outras. Esta vasta gama de atividades é, em grande parte, atribuída às inúmeras possibilidades de substituições nos anéis aromáticos, pois a metodologia de síntese destes compostos possibilita a obtenção de uma grande variedade estrutural, uma vez que existem inúmeros benzaldeídos e acetofenonas que podem ser combinados.^{74,75}

Nosso grupo de pesquisa vem se dedicando ao estudo de diferentes séries de chalconas bioativas em diferentes áreas da química medicinal, como por exemplo, atividade antiprion⁷⁶, atividade antileucêmica,⁷⁷ inibição de biofilme bacteriano,⁷⁸ atividade antibacteriana,⁷⁹ atividade antileishmânia,⁸⁰ inibidores de cruzaína,⁸¹ atividade antihiperlipidêmica⁸², inibidores da proteína ABCG2^{24,25,83} e inibidores de enzimas tirosina fosfatases de *Mycobacterium tuberculosis* e *Yersinia enterocolitica*^{37,38,39} (esses últimos serão detalhados no segundo capítulo desta tese).

Assim como as chalconas, as bis-chalconas são facilmente preparadas pela condensação de Claisen-Schmidt. Os precursores para esses compostos são cetonas contendo dois carbonos com hidrogênios α à carbonila ou dialdeídos.

Uma série de bis-chalconas foi sintetizada por Mobinikhaledi e colaboradores⁸⁴ em excelentes rendimentos pela reação de condensação do 1,4-diacetilbenzeno com vários aldeídos em etanol 96% e NaOH aquoso à temperatura ambiente. A atividade antimicrobiana dos compostos sintetizados foi avaliada contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*.

Esquema 7. Bis-chalconas sintetizadas por Mobinikhaledi e colaboradores.



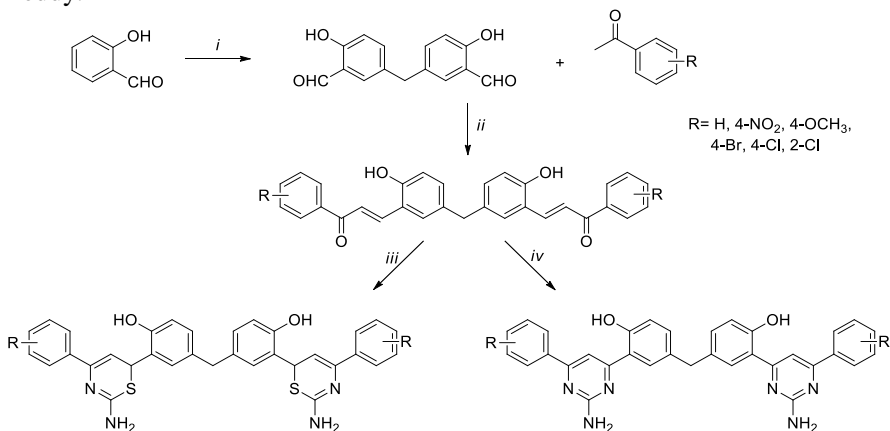
i. NaOH, EtOH, t.a.

R= H, Cl, NO₂, OMe, Br, OH

Os compostos sintetizados foram mais ativos inibindo a bactéria *Escherichia coli* e não apresentaram nenhuma atividade antifúngica. O melhor composto, com R = 2-NO₂ apresentou alta atividade frente às três cepas estudadas.⁸⁴

Nagaraj e Sanjeeva Reddy⁸⁵ estudaram uma série de bis-chalconas que foram preparadas através da reação do 5,5'-metileno-bis-salicilaldeído com diferentes acetofenonas. As bis-chalconas foram posteriormente ciclizadas com tiouréia e guanidina formando as bis-tiazinas e bis-pirimidinas em bons rendimentos. Os compostos tiveram sua atividade antibacteriana, antifúngica e anti-inflamatória avaliadas.

Esquema 8. Bis-chalconas sintetizadas por Nagaraj e Sanjeeva Reddy.

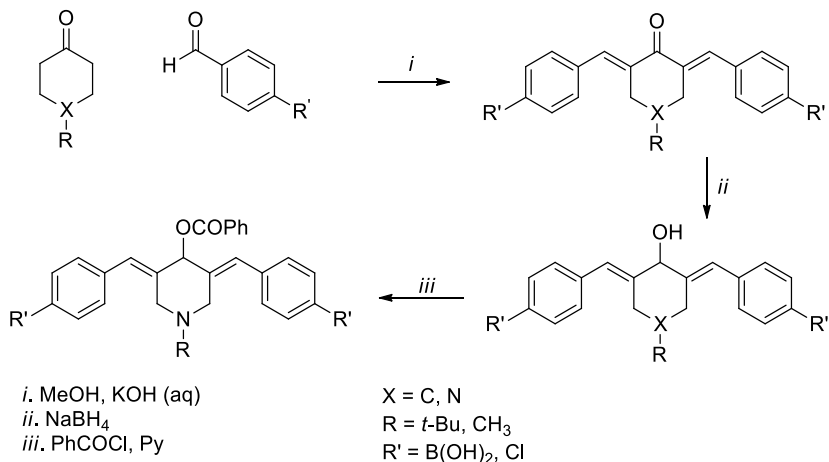


i. Trioxano, H₂SO₄ ii. KOH, EtOH iii. NH₂CSNH₂, KOH, EtOH iv. NH₂CNHNH₂, NaOH/H₂O

Modzelewska e colaboradores⁸⁶ sintetizaram chalconas e bis-chalconas contendo o ácido borônico na estrutura. As bis-chalconas estão

representadas no Esquema 9. Os autores reduziram a carbonila e depois a hidroxila formada foi acilada. A bis-chalcona com $X=N$, $R=Me$ e $R'=B(OH)_2$ mostrou potente inibição em células cancerígenas de cólon, com $IC_{50} = 0,35 \mu M$ em duas linhagens celulares.

Esquema 9. Bis-chalconas sintetizadas por Modzelewska e colaboradores.



Baseado no que foi exposto, planejou-se a síntese de bis-chalconas simétricas, com substituintes que já mostraram uma atividade interessante frente a ABCG2²²⁻²⁵ e avaliar sua potencial atividade inibitória frente a essa proteína.

4. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Será apresentado, inicialmente, a numeração e a nomenclatura dos compostos sintetizados nesse capítulo do trabalho. Em seguida, será apresentado a metodologia sintética, onde serão discutidas as condições reacionais, purificação e caracterização das moléculas propostas. Por fim, serão apresentados os resultados dos testes de atividade biológica. Todos os resultados serão apresentados, na forma de tabelas e esquemas.

4.1. Apresentação dos compostos

4.1.1. Numeração e nomenclatura dos compostos

A nomenclatura dos compostos sintetizados segue as regras designadas pelo *Chemical Abstracts* e está descrita na Tabela 1, assim como a numeração adotada ao longo da tese.

Tabela 1. Nomenclatura das bis-chalconas sintetizadas.

Nomenclatura	
3a	(2 <i>E</i> ,2' <i>E</i>)-1,1'-(1,4-fenileno)bis(3-(4-metoxifenil)prop-2-en-1-ona)
3b	(2 <i>E</i> ,2' <i>E</i>)-1,1'-(1,4-fenileno)bis(3-(3,4,5-trimetoxifenil)prop-2-en-1-ona)
3c	(2 <i>E</i> ,2' <i>E</i>)-1,1'-(1,4-fenileno)bis(3-(3,4-dimetoxifenil)prop-2-en-1-ona)
3d	(2 <i>E</i> ,2' <i>E</i>)-1,1'-(1,4-fenileno)bis(3-(benzo[<i>d</i>][1,3]dioxol-5il)prop-2-en-1-ona)
3e	(2 <i>E</i> ,2' <i>E</i>)-1,1'-(1,4-fenileno)bis(3-(2,5-dimetoxifenil)prop-2-en-1-ona)
3f	(2 <i>E</i> ,2' <i>E</i>)-1,1'-(1,4-fenileno)bis(3-(naftalen-2-il)prop-2-en-1-ona)
3g	(2 <i>E</i> ,2' <i>E</i>)-1,1'-(1,4-fenileno)bis(3-(naftalen-1-il)prop-2-en-1-ona)

Tabela 1. Nomenclatura das bis-chalconas sintetizadas
(*continuação*).

3h	(2 <i>E</i> ,2' <i>E</i>)-1,1'-(1,4-fenileno)bis(3-fenilprop-2-en-1-ona)
3i	(2 <i>E</i> ,2' <i>E</i>)-1,1'-(1,4-fenileno)bis(3-(2,4,5-trimetoxifenil)prop-2-en-1-ona)
3j	(2 <i>E</i> ,2' <i>E</i>)-1,1'-(1,4-fenileno)bis(3-(4-carboxifenil)prop-2-en-1-ona)
3k	(2 <i>E</i> ,2' <i>E</i>)-1,1'-(1,4-fenileno)bis(3-(2,4,6-trimetoxifenil)prop-2-en-1-ona)
3l	(2 <i>E</i> ,2' <i>E</i>)-1,1'-(1,4-fenileno)bis(3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)prop-2-en-1-ona)
3m	(2 <i>E</i> ,2' <i>E</i>)-1,1'-(1,4-fenileno)bis(3-(quinoxalin-6-il)prop-2-en-1-ona)
3n	(2 <i>E</i> ,2' <i>E</i>)-1,1'-(1,4-fenileno)bis(3-(4-(dimetilamino)fenil)prop-2-en-1-ona)
3o	(2 <i>E</i> ,2' <i>E</i>)-1,1'-(1,4-fenileno)bis(3-(4-(dimetilamino)naftalen-1-il)prop-2-en-1-ona)
3p	(2 <i>E</i> ,2' <i>E</i>)-1,1'-(1,4-fenileno)bis(3-(2,6-dimetoxifenil)prop-2-en-1-ona)
3q	(2 <i>E</i> ,2' <i>E</i>)-1,1'-(1,4-fenileno)bis(3-(2,3,4-trimetoxifenil)prop-2-en-1-ona)
6a	(2 <i>E</i> ,2' <i>E</i>)-3,3'-(1,4-fenileno)bis(1-(4-metoxifenil)prop-2-en-1-ona)
6b	(2 <i>E</i> ,2' <i>E</i>)-3,3'-(1,4-fenileno)bis(1-(3,4,5-trimetoxifenil)prop-2-en-1-ona)
6c	(2 <i>E</i> ,2' <i>E</i>)-3,3'-(1,4-fenileno)bis(1-(3-metoxifenil)prop-2-en-1-ona)
6d	(2 <i>E</i> ,2' <i>E</i>)-3,3'-(1,4-fenileno)bis(1-(3,4-dimetoxifenil)prop-2-en-1-ona)
6e	(2 <i>E</i> ,2' <i>E</i>)-3,3'-(1,4-fenileno)bis(1-(2,4-dimetoxifenil)prop-2-en-1-ona)
6f	(2 <i>E</i> ,2' <i>E</i>)-3,3'-(1,4-fenileno)bis(1-(benzo[<i>d</i>][1,3]dioxol-5-il)prop-2-en-1-ona)

Tabela 1. Nomenclatura das bis-chalconas sintetizadas
(*continuação*).

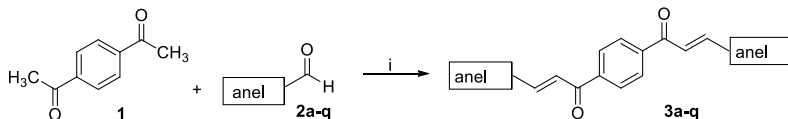
6g	(2 <i>E</i> ,2' <i>E</i>)-3,3'-(1,4-fenileno)bis(1-(2,5-dimetoxifenil)prop-2-en-1-ona)
6h	(2 <i>E</i> ,2' <i>E</i>)-3,3'-(1,4-fenileno)bis(1-(naftalen-2-il)prop-2-en-1-ona)
6i	(2 <i>E</i> ,2' <i>E</i>)-3,3'-(1,4-fenileno)bis(1-(3,5-dimetoxifenil)prop-2-en-1-ona)
6j	(2 <i>E</i> ,2' <i>E</i>)-3,3'-(1,4-fenileno)bis(1-(naftalen-1-il)prop-2-en-1-ona)
6k	(2 <i>E</i> ,2' <i>E</i>)-3,3'-(1,4-fenileno)bis(-fenilprop-2-en-1-ona)
6l	(2 <i>E</i> ,2' <i>E</i>)-3,3'-(1,4-fenileno)bis(1-(2-metoxifenil)prop-2-en-1-ona)
6m	(2 <i>E</i> ,2' <i>E</i>)-3,3'-(1,4-fenileno)bis(1-(2,4,5-trimetoxifenil)prop-2-en-1-ona)
6n	(2 <i>E</i> ,2' <i>E</i>)-3,3'-(1,4-fenileno)bis(1-(4-carboxifenil)prop-2-en-1-ona)
6o	(2 <i>E</i> ,2' <i>E</i>)-3,3'-(1,4-fenileno)bis(1-(2,4,6-trimetoxifenil)prop-2-en-1-ona)
6p	(2 <i>E</i> ,2' <i>E</i>)-3,3'-(1,4-fenileno)bis(1-(4-hidroxi-3-metoxifenil)prop-2-en-1-ona)

4.2. Síntese das bis-chalconas

As bis-chalconas foram sintetizadas seguindo o “*know how*” do grupo, que se baseia na condensação aldólica entre aldeídos e acetofenonas decrita por Vogel em 1989.⁸⁷ A reação ocorreu entre o diacetabenzeno ou teraftaldeído com benzaldeídos ou acetofenonas substituídas em etanol utilizando KOH 50% como catalisador e agitação magnética à temperatura ambiente, por 16h. Após esse tempo, o produto bruto foi vertido em água destilada, neutralizado com HCl 10% e o precipitado formado foi filtrado a vácuo. Todos os compostos foram recristalizados em etanol. Foram obtidas 33 bis-chalconas sendo 18 inéditas, os compostos **3a**, **3c**, **3f**, **3h**, **3k**, **3l**, **3n**, **6a**, **6d**, **6e**, **6h**, **6j**, **6k**, **6o**

e **6p** já foram publicados na literatura.⁸⁸⁻⁹⁵ Os produtos foram obtidos com bons rendimentos, variando de 59 a 93%.

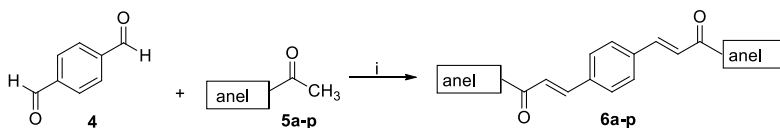
Esquema 10. Síntese das bis-chalconas **3a-q** e **6a-p**. i) KOH 50% p/v, etanol, t.a., 16 h;



Bis-Chalcona	Anel	Rendimento (%)	Ponto de fusão (°C)
3a	4-OCH ₃ -fenila	79	210-210,5
3b	3,4,5-triOCH ₃ -fenila	82	223-224
3c	3,4-diOCH ₃ -fenila	84	176,5-177
3d	3,4-OCH ₂ O-fenila	76	268-269
3e	2,5-diOCH ₃ -fenila	82	170-170,5
3f	2-naftila	80	248-249
3g	1-naftila	81	230-231
3h	Fenila	92	200-201
3i	2,4,5-triOCH ₃ - fenila	90	224,5-225
3j	4-COOH-fenila	61	>350
3k	2,4,6-triOCH ₃ - fenila	83	278-279
3l	3-OCH ₃ , 4-OH-fenila	60	140-141,5

Esquema 10. Síntese das bis-chalconas **3a-q** e **6a-p**. i) KOH 50% p/v, etanol, t.a., 16 h (*continuação*).

3m	2-quinoxalina	89	>350
3n	4-N(CH ₃) ₂ -fenila	62	204-205
3o	4-N(CH ₃) ₂ -1-naftila	59	159-160
3p	2,6-diOCH ₃ -fenila	91	253-254
3q	2,3,4-triOCH ₃ -fenila	93	178-179



Bis-Chalcona	Anel	Rendimento (%)	Ponto de fusão (°C)
6a	4-OCH ₃ -fenila	83	248-249
6b	3,4,5-triOCH ₃ -fenila	80	190-190,5
6c	3-OCH ₃ -fenila	87	176-177
6d	3,4-diOCH ₃ -fenila	91	198-199
6e	2,4-diOCH ₃ -fenila	83	182,5-183
6f	3,4-OCH ₂ O-fenila	78	274-275
6g	2,5-diOCH ₃ -fenila	84	160-161

Esquema 10. Síntese das bis-chalconas **3a-q** e **6a-p**. i) KOH 50% p/v, etanol, t.a., 16 h (*continuação*).

6h	2-naftila	89	229-230
6i	3,5-diOCH ₃ -fenila	92	178-179
6j	1-naftila	69	162-163
6k	Fenila	90	190-190,5
6l	2-OCH ₃ -fenila	75	146-147
6m	2,4,5-triOCH ₃ - fenila	81	222,5-223
6n	4-COOH-fenila	69	>350
6o	2,4,6-triOCH ₃ - fenila	88	205-206
6p	3-OCH ₃ , 4-OH-fenila	62	220-220,5

4.3. Identificação das bis-chalconas

Todas as bis-chalconas foram submetidas à análise de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ¹H e ¹³C e espectroscopia de massas de alta resolução para confirmação das estruturas.

4.3.1. Espectroscopia de RMN ¹H e ¹³C dos compostos 3a-q e 6a-p

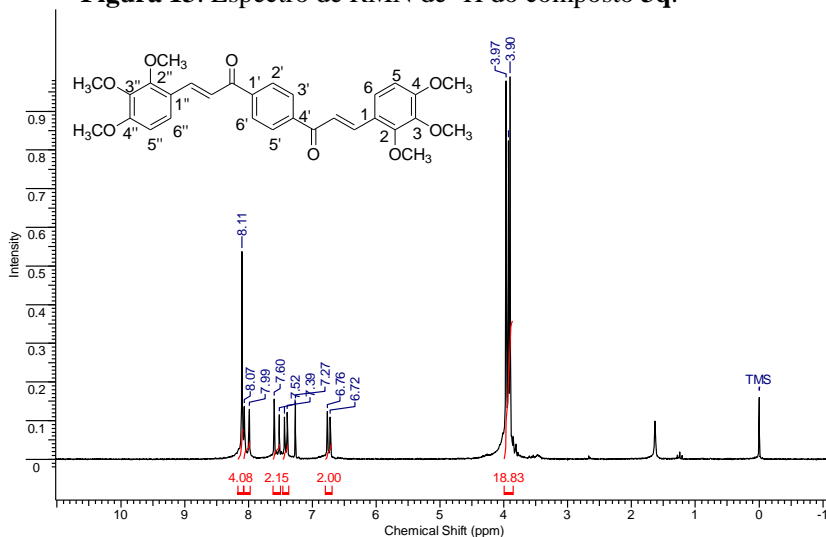
Os espectros de RMN de ¹H e ¹³C dos compostos foram obtidos em dimetilsulfóxido (DMSO-*d*₆) e em clorofórmio deuterado (CDCl₃), em tubos de 5mm, utilizando tetrametilsilano como referência interna. Os parâmetros de aquisição dos espectros estão descritos na Parte Experimental. Os dados de RMN de ¹H e ¹³C dos compostos estão apresentados na parte experimental e os espectros no Apêndice I.

Todos os espectros de RMN analisados mostram claramente a formação do produto, observada pela presença dos dois dupletos característicos dos H_α e H_β dessas moléculas. O composto **3q** foi

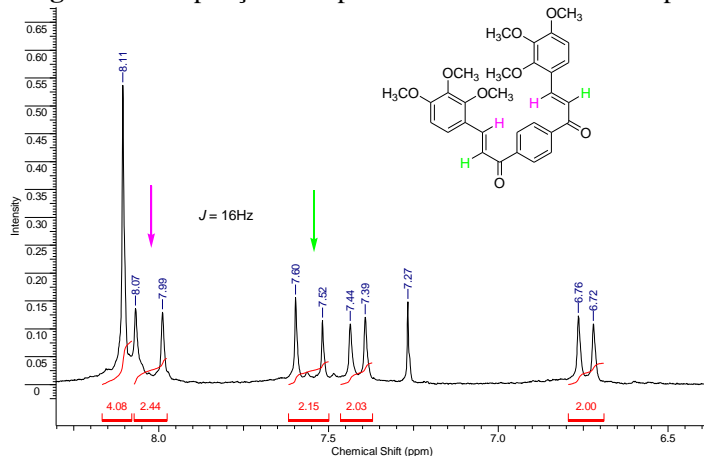
escolhido para exemplificar a série derivada do diacetilbenzeno **1** com numeração atribuída aleatoriamente apenas para identificação dos sinais.

No espectro de RMN de ^1H (Figura 13) observam-se os sinais dos hidrogênios aromáticos na faixa de 6,72 à 8,11 ppm. O singlete em 8,11 ppm, característico de todos os compostos dessa série, é referente aos quatro hidrogênios simétricos do anel central ($\text{H}2'$, $\text{H}3'$, $\text{H}5'$, $\text{H}6'$).

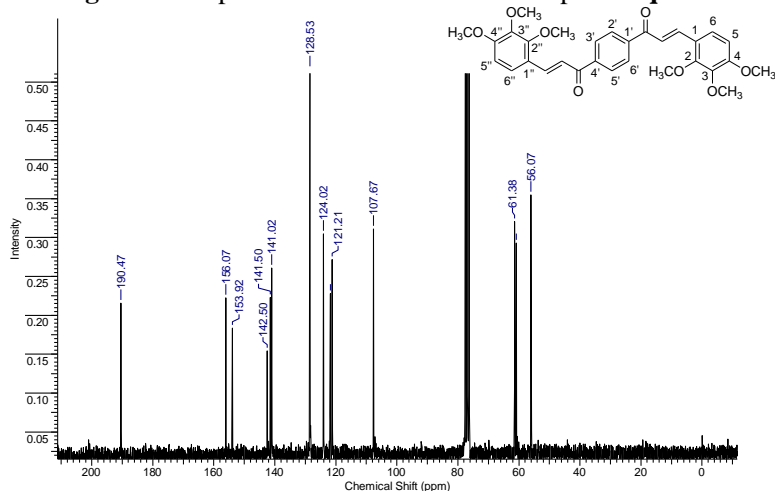
Figura 13. Espectro de RMN de ^1H do composto **3q**.



O sinal em 8,03 ppm é referente ao hidrogênio β , dupletto com $J = 16\text{Hz}$, característico de chalconas com isomeria *E*, acoplamento esse feito com o outro hidrogênio vinílico, o hidrogênio α que aparece como um dupletto com $J = 16\text{Hz}$ em 7,56 ppm. Integrando esses sinais, podemos ver a presença de dois hidrogênios em cada dupletto devido à presença de duas α,β -insaturações. Os singletos em 3,90 à 3,97 ppm são referentes às metoxilas dos dois anéis (Figura 14).

Figura 14. Ampliação do espectro de RMN de ^1H do composto **3q**.

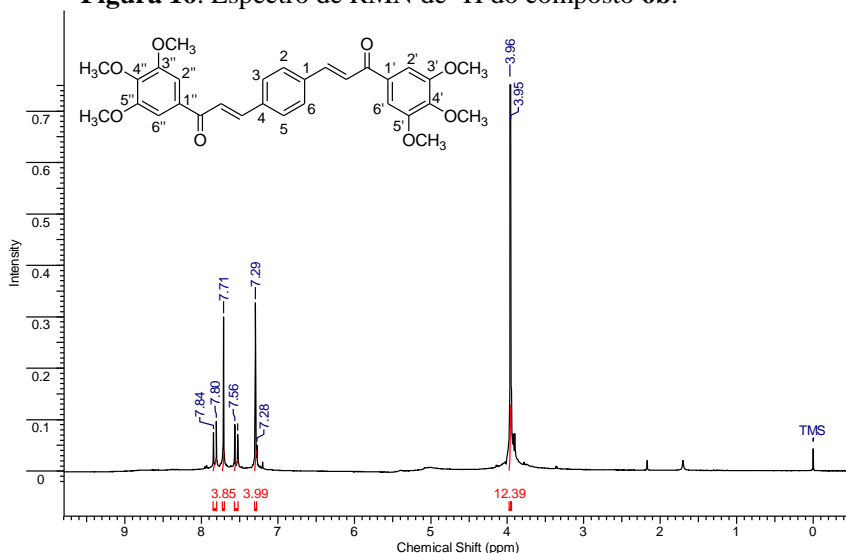
No espectro de RMN de ^{13}C do composto **3q** (Figura 15) observa-se em 190,5 ppm a carbonila da bis-chalcona, em 142,5 ppm o carbono β , em 121,7 ppm o carbono α , sinais esses característicos de cetonas α,β -insaturadas. O sinal de maior intensidade, em 128,5 ppm é referente aos carbonos simétricos do anel central ($\text{C}2'$, $\text{C}3'$, $\text{C}5'$, $\text{C}6'$). Os sinais de 107,7 à 156,1 ppm são referentes aos carbonos dos anéis aromáticos. Por último, os sinais mais blindados, em 61,3 ppm, 60,8 ppm e 56,0 ppm são característicos de metoxilas.

Figura 15. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **3q**.

O composto **6b** foi escolhido para exemplificar a série derivada do teraftaldeído **4** com numeração atribuída aleatoriamente apenas para identificação dos sinais.

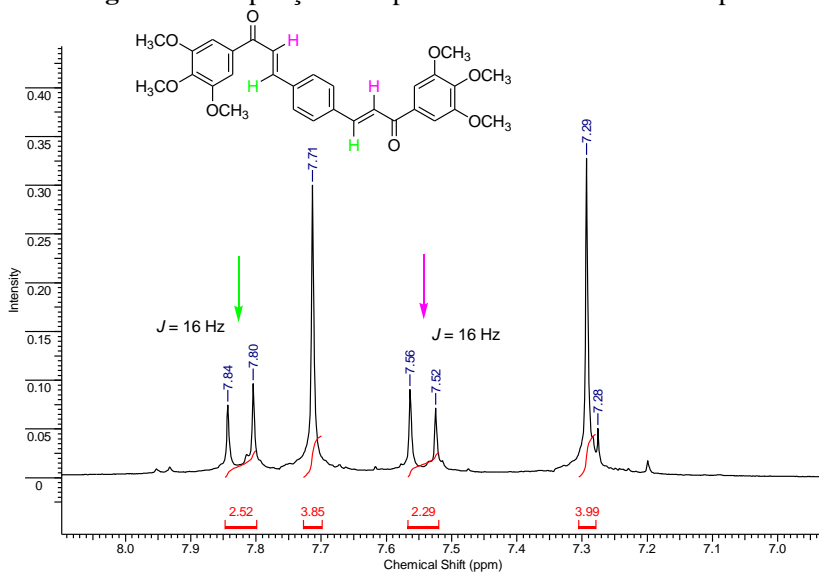
No espectro de RMN de ^1H (Figura 16) observam-se os sinais dos hidrogênios aromáticos H2', H6', H2'' e H6'' no singlete em 7,29 ppm. O simpleto em 7,71 ppm, característico de todos os compostos dessa série, é referente aos quatro hidrogênios simétricos do anel central (H2, H3, H5, H6).

Figura 16. Espectro de RMN de ^1H do composto **6b**.



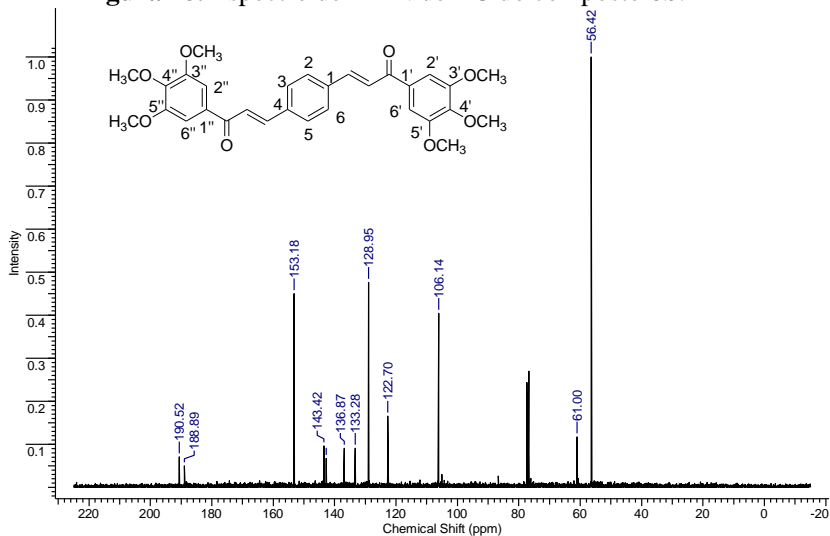
Na ampliação do espectro de ^1H (Figura 17) pode-se ver o sinal em 7,82 ppm referente ao hidrogênio β , duplete com $J = 16\text{Hz}$, característico de chalconas com isomeria *E*, acoplamento esse feito com o outro hidrogênio vinílico, o hidrogênio α que aparece como um duplete com $J = 16\text{Hz}$ em 7,54 ppm. Integrando esses sinais, podemos ver a presença de dois hidrogênios em cada duplete devido à presença de duas α,β -insaturações. Os simpletos em 3,95 e 3,96 ppm são referentes às metoxilas dos dois anéis com integração de 12 e 6 hidrogênios, somando 18, condizente com as três metoxilas nas posições 3, 4 e 5 dos anéis.

Figura 17. Ampliação do espectro de RMN de ^1H do composto **6b**.



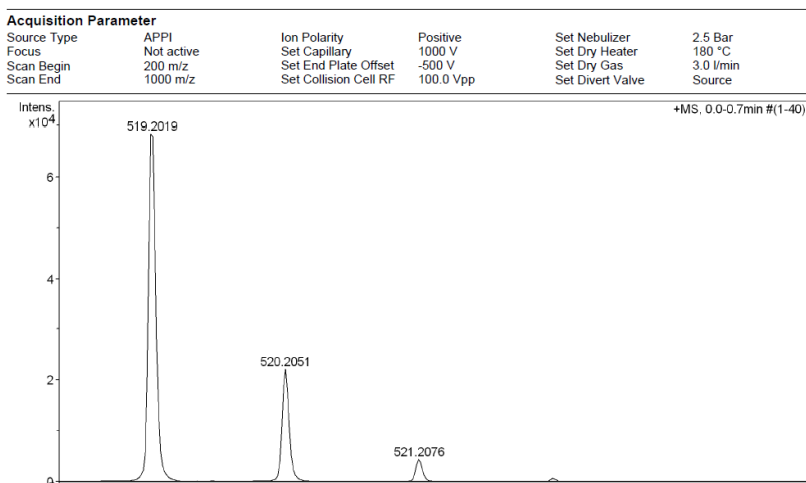
No espectro de RMN de ^{13}C do composto **6b** (Figura 18) observa-se em 190,5 e 188,8 ppm as carbonilas da bis-chalcona, em 142,8 ppm o carbono β , em 122,7 ppm o carbono α , sinais esses característicos de cetonas α,β -insaturadas. O sinal de maior intensidade, em 128,9 ppm é referente aos carbonos simétricos do anel central (C2, C3, C4, C5). Os sinais de 106,1 a 153,1 ppm são referentes aos carbonos dos anéis aromáticos. Por último, os sinais mais blindados, em 56,4 ppm e 61,0 ppm são característicos de metoxilas.

Figura 18. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **6b**.



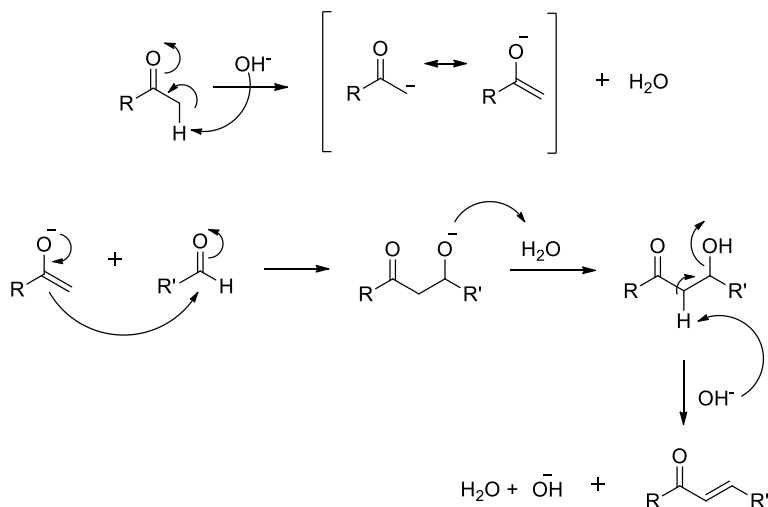
4.3.2. Espectrometria de massas de alta resolução dos compostos **3a-q** e **6a-p**

Todos os compostos foram caracterizados também por análise de espectrometria de massas de alta resolução (HRMS), utilizando fonte de fotoionização (APPI). O íon molecular dos compostos foi obtido com adição de um próton, sendo que, para exemplificar, o composto **3q** (Figura 19), com fórmula $\text{C}_{30}\text{H}_{30}\text{O}_8$ o $[\text{M}+\text{H}]$ encontrado foi de 519,2019, e o valor teórico calculado é de 519,2013.

Figura 19. Espectro de massas de alta resolução do composto **3q**.

4.4. Mecanismo proposto para a síntese das bis-chalconas

O mecanismo da síntese das bis-chalconas é conhecido como condensação aldólica de Claisen-Schmidt. A reação se inicia quando uma base remove um próton ácido alfa à carbonila formando um carbânion que é estabilizado por ressonância. O carbânion nucleofílico ataca o carbono carbonílico do aldeído, formando um íon alcóxido. A protonação do alcóxido forma o intermediário enol que é posteriormente desidratado formando a chalcona e regenerando o catalisador básico (Esquema 11).⁹⁶ Para a série de bis-chalconas **3a-q** ocorre a formação de um bis-carbânion que ataca duas moléculas de aldeído. Para a série de bis-chalconas **6a-p**, duas moléculas de acetofenona formam dois carbânions iguais que atacam as duas carbonilas do teraftaldeído.

Esquema 11. Mecanismo proposto para a síntese de chalconas.

4.5. Atividade biológica

Os testes biológicos das bis-chalconas foram realizados pela Dra. Evelyn Winter durante seu estágio de doutoramento em Lyon (França) no laboratório “*Mécanisme et Modulation de la Résistance aux Médicaments*” do *Institut de Biologie et Biochimie des Protéines* (IBCP), sob orientação do Dr. Attilio Di Pietro.

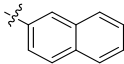
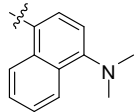
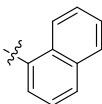
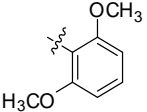

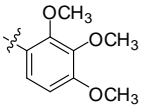
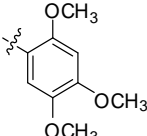
Testou-se a atividade das 17 bis-chalconas derivadas do 1,4-diacetilbenzeno e 16 bis-chalconas derivadas do tereftaldeído. Inicialmente realizou-se um *screening* no qual avaliou-se a atividade inibitória de ABCG2 com 5 μ M de cada composto. Para os compostos que induziram inibição maior que 60% calculou-se o valor de EC_{50} (concentração efetiva 50%). Na Tabela 2 estão descritos os resultados de inibição de ABCG2 obtidos com cada uma das bis-chalconas.

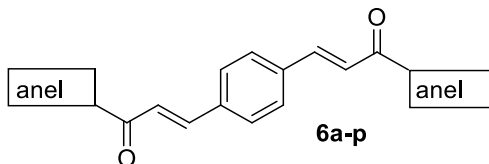
Tabela 2. Efeito das bis-chalconas na inibição de ABCG2.

3a-q

	Anel	Inibição a 5 μ M (%) ^a	EC ₅₀ (μ M) ^b		Anel	Inibição a 5 μ M (%) ^a	EC ₅₀ (μ M) ^b
3a		18 \pm 5	Nd	3j*		2 \pm 2	Nd
3b*		43 \pm 17	Nd	3k		92 \pm 8	0,40 \pm 0,02
3c		63 \pm 7	2,1 \pm 0,4	3l		0 \pm 3	Nd
3d*		11 \pm 2	Nd	3m*		18 \pm 2	Nd
3e*		96 \pm 7	0,70 \pm 0,02	3n		34 \pm 1	Nd

Tabela 2. Efeito das bis-chalconas na inibição de ABCG2 (*continuação*).

3f		7 ± 6	Nd	3o*		17 ± 7	Nd
3g*		13 ± 1	Nd	3p*		100 ± 1	$0,20 \pm 0,04$
3h		13 ± 1	Nd	3q*		86 ± 1	$1,4 \pm 0,6$
3i*		96 ± 5	$0,30 \pm 0,07$				



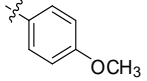
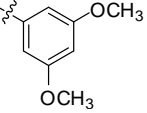
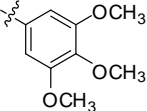
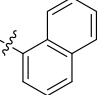
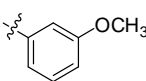

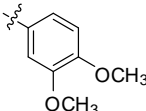
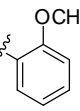
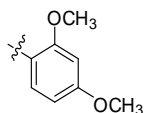
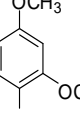
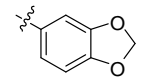

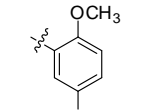
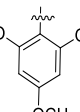
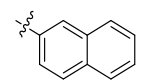

	Anel	Inibição a 5 μM (%) ^a	EC ₅₀ (μM) ^b		Anel	Inibição a 5 μM (%) ^a	EC ₅₀ (μM) ^b
6a		27 ± 4	Nd	6i*		78 ± 4	$0,5 \pm 0,3$
6b*		73 ± 15	$1,1 \pm 0,1$	6j		23 ± 3	Nd

Tabela 2. Efeito das bis-chalconas na inibição de ABCG2 (*continuação*).

6c*		73 ± 5	2,3 ± 0,2	6k		25 ± 3	Nd
6d		97 ± 19	0,8 ± 0,3	6l*		95 ± 15	1,1 ± 0,1
6e		86 ± 18	0,9 ± 0,1	6m*		41 ± 5	Nd
6f*		19 ± 1	Nd	6n*		0 ± 1	Nd
6g*		74 ± 1	1,3 ± 0,2	6o		66 ± 15	1,8 ± 0,4
6h		45 ± 2	Nd	6p		28 ± 7	Nd

Nd = não determinado. (*) Compostos inéditos. ^a O efluxo de mitoxantrona foi determinado medindo a acumulação celular por citometria de fluxo, relativo ao controle negativo (sem ABCG2). Para os compostos com elevada afinidade, a inibição máxima foi observada à 5µM. ^b Valores de EC₅₀ foram calculados com GraphPad Prism5. Os dados são apresentados com a média ± DP de, pelo menos, três experiências independentes.

4.5.1. Relação estrutura-atividade dos compostos 3a-q e 6a-p frente à proteína ABCG2

Através da análise dos resultados esboçados na Tabela 2, podemos confirmar a importância das metoxilas para a atividade inibitória de

ABCG2. Assim como nos resultados obtidos com as chalconas, as bis-chalconas que apresentaram pelo menos uma metoxila foram as mais ativas.

As 33 bis-chalconas simétricas das duas séries, que diferem pela posição da carbonila e da insaturação, foram analisadas quanto à sua capacidade de inibir o efluxo da mitoxantrona e, em seguida, aumentar sua concentração em células HEK293 transfectadas com a proteína ABCG2. A proximidade da carbonila ao anel fenílico central parece ser mais favorável para a inibição quando comparamos **3i** (96% de inibição a 5 μ M, EC_{50} = 0,3 μ M) com **6m** (inibição de 41%), **3k** (92% de inibição, EC_{50} = 0,4 μ M) com **6o** (66% de inibição, EC_{50} = 1,8 μ M), e **3e** (96% de inibição, EC_{50} = 0,7 μ M) com **6g** (74% de inibição, EC_{50} = 1,3 μ M). No entanto, um efeito oposto foi observado em **3b** (43% de inibição) comparado com **6b** (inibição de 73%) e em **3c** (63% de inibição, EC_{50} = 2,1 μ M) comparado ao **6d** (97% de inibição, EC_{50} = 0,8 μ M), o que sugere que a dependência da posição da carbonila foi modulada pelos substituintes presentes nos anéis A e B das bis-chalconas. Em ambas as séries a inibição foi altamente influenciada pelos substituintes metóxi, visto que os 14 compostos mais ativos, que tiveram seu EC_{50} determinados, continham um (**6c** e **6l**), dois (**3c**, **3e**, **3p**, **6d**, **6e**, **6g**, e **6i**), ou três (**3i**, **3k**, **3q**, **6b**, e **6o**) grupos metoxi. Isso é observado novamente com a baixa eficiência na ausência dos grupos metoxi (compostos **3d**, **3f**, **3g**, **3h**, **3j**, **3m**, **3n**, **3o**, **6f**, **6h**, **6j**, **6k** e **6n**). Outro fator que influencia na atividade é a posição dos substituintes metoxi, observam-se as seguintes preferências: posição 2 (**6l**, 95% de inibição, EC_{50} = 1,1 μ M) > 3 (**6c**, 73% de inibição, EC_{50} = 2,3 μ M) > 4 (**6a**, 27% de inibição). Compostos com apenas um grupo metoxi na posição 4 (**6a** e **3a**) não apresentaram atividade significativa. Além disso, a substituição de um grupo metoxila por outro substituinte mais hidrofílico, como o grupo hidroxila na posição 4 resultou claramente num efeito negativo na atividade quando comparados **6p** (apenas 28% de inibição) e **3l** (nenhuma inibição) com **6d** (97% inibição) e **3c** (63% de inibição). Grupos metoxilas nas posições 5' e 6' foram igualmente favoráveis, uma vez que o inibidor que representa cada uma das série foram **3p** (2,6-dimetoxi, EC_{50} = 0,2 μ M) e **6i** (3,5-dimetoxi, EC_{50} = 0,5 μ M). Dentro da série **6a-p**, exceto para o **6l**, os substituintes metoxila na posição meta (3 e 5) mostraram a melhor inibição (em **6b**, **6c**, **6d**, **6g** e **6i**) em contraste com a série **3a-q** onde as posições orto (2 e 6) foram melhores (**3e**, **3i**, **3k**, **3p** e **3q**).

4.5.2. Citotoxicidade das bis-chalconas **3p** e **6i** em células normais

A fim de avaliar a citotoxicidade dos compostos **3p** e **6i**, utilizaram-se células HEK293 normais e calcularam-se os respectivos valores de concentração citotóxica 50% (CC₅₀) e índice terapêutico (IT) (Tabela 3).

Tabela 3. Valores de CC₅₀ e índice terapêutico (IT) induzidos pelas bis-chalconas **3p** e **6i**.

Composto 3p		Composto 6i	
CC ₅₀ (μM)	IT	CC ₅₀ (μM)	IT
1,2	6	2,5	5

Apesar de apresentarem alta toxicidade, estes compostos apresentam um índice terapêutico maior que 1. Na concentração equivalente à EC₅₀ (0,2 μM para **3p** e 0,5μM para **6i**) esses compostos não induziram nenhuma toxicidade em células normais.

CAPÍTULO 2

No capítulo 2, foram planejadas e sintetizadas quarenta e oito pirazolinas a partir das chalconas previamente sintetizadas, que foram obtidas com rendimentos entre 60 e 98% e mostraram atividade inibitória considerável frente à PtpA e PtpB de *Mycobacterium tuberculosis* e YopH de *Yersinia enterocolitica*. Estas proteínas são essenciais para a sobrevivência das respectivas bactérias no hospedeiro e sua inibição surge como uma forma de combate às patologias relacionadas com cada proteína. Os resultados obtidos mostraram uma maior atividade dos compostos frente à YopH de *Y. enterocolitica* e dois compostos, o 1-fenil-3-(3,4-dimetóxilfenil)-5-(naftalen-2-il)-4,5-dihidro-1H-pirazol **8c** ($8,8 \pm 2,6 \mu\text{M}$) e 1-fenil-3-(2,5-dimetoxifenil)-5-(naftalen-1-il)-4,5-dihidro-1H-pirazol **8p** ($8,9 \pm 0,8 \mu\text{M}$) foram os inibidores mais potentes. Estudos de modelagem molecular e de cinética enzimática mostram que esses são inibidores não competitivos, que ligam-se a um sítio alostérico da YopH.

5. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

5.1. Tuberculose

A tuberculose (TB) é uma doença infecciosa, muitas vezes fatal, causada pelo *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) em humanos. Atinge os pulmões, mas também pode afetar outras áreas do corpo, sendo transmitida pelo ar, pela tosse, espirro ou saliva de pessoas contaminadas pela doença.^{27,28}

Estima-se que um terço da população mundial será infectada pelo *M. tuberculosis* e novas infecções ocorrem a uma taxa de uma contaminação por segundo.^{27,28} De acordo com a Organização Mundial de Saúde, em 2013 a estimativa era de 8,7 milhões de casos incidentes de TB no mundo todo, o equivalente a 125 casos a cada 100.000 habitantes, a maioria ocorrendo na Ásia e África (Figura 20). Dos 9 milhões de casos incidentes, 0,5 milhão eram crianças, 2,9 milhões eram mulheres e 1,0-1,2 milhão eram pessoas infectadas com o vírus HIV (Figura 21). A proporção de casos de tuberculose em pacientes co-infectados com o HIV é maior nos países da região africana; em geral, 39% dos pacientes com TB na região africana são portadores do vírus HIV, e 79% no restante do mundo, o que mostra a prevalência da doença em pessoas com o sistema imunológico comprometido.²⁶

A quimioterapia antituberculose enfrenta diversos obstáculos, tais como a longa duração do tratamento, a falta de informação e de acompanhamento, e os diversos efeitos colaterais dos medicamentos utilizados (náuseas, vômitos, asma, alterações visuais, cegueira, entre outros). Como consequência tem-se a não adesão ao tratamento por parte dos pacientes. Além disso, os medicamentos disponíveis não asseguram a eliminação total da bactéria, sendo possível que, apesar da cura clínica, o bacilo permaneça em estado latente dentro de macrófagos, originando assim cepas multi-resistentes.²⁷

Figura 20. Estimativa de casos incidentes de TB no mundo em 2013.
Fonte: WHO.

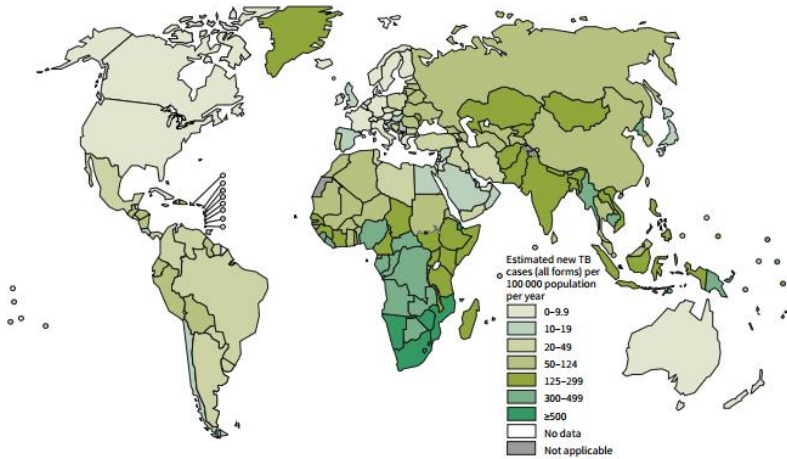
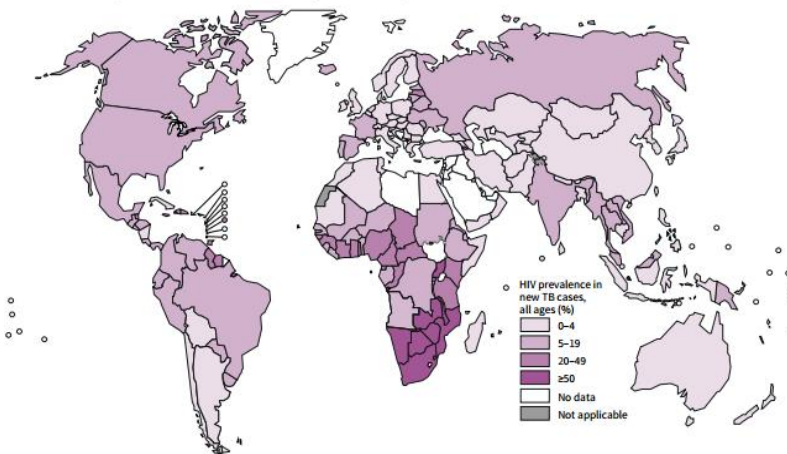


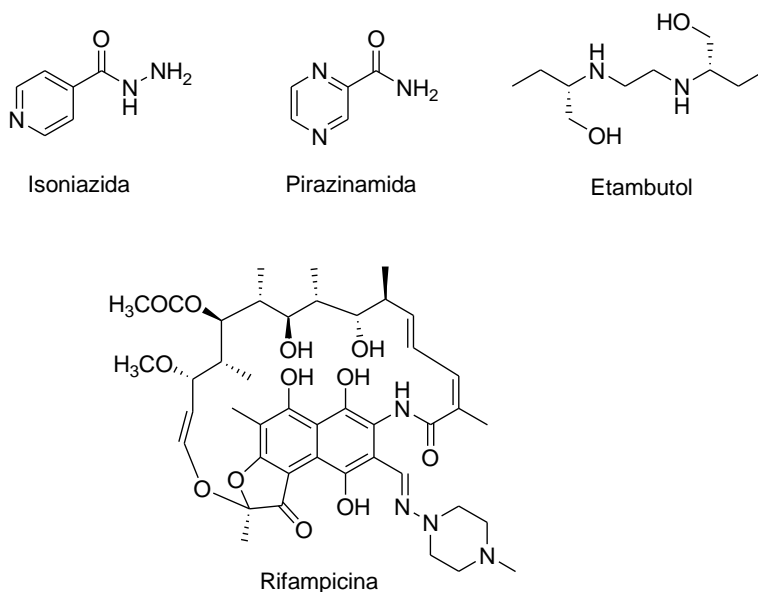
Figura 21. Estimativa de HIV em novos casos de TB no mundo em 2013. Fonte: WHO.



Na terapia atual, a TB nunca é tratada com um único agente antimicrobiano. Os fármacos disponíveis para o tratamento podem ser divididos em duas grandes categorias, com base em sua segurança e efetividade: os agentes de primeira escolha e os agentes de segunda escolha.²⁸

Os agentes de primeira escolha, que associam alto nível de eficácia a um grau aceitável de toxicidade, incluem a isoniazida, a rifampicina, o etambutol e a pirazinamida (Figura 22). Estes fármacos representam custo relativamente baixo que varia de US\$ 10 a 20, para um período de seis meses de tratamento.²⁸

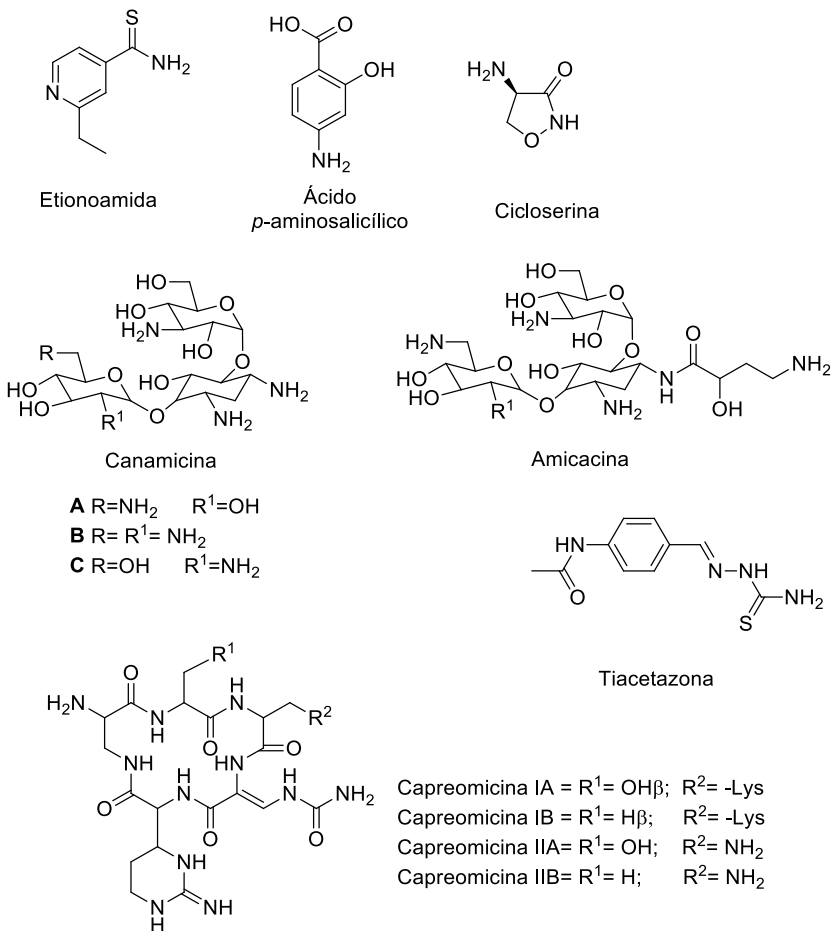
Figura 22. Fármacos de primeira escolha utilizados no tratamento da tuberculose.



Os fármacos de segunda escolha, utilizados em casos de resistência aos medicamentos anteriormente citados, incluem a amicacina, capreomicina, ciprofloxacino, cicloserina, etionamida, canamicina, ofloxacino, ácido *p*-aminosalicílico e protionamida (Figura 23). No entanto, a utilização desses fármacos também apresenta desvantagens,

como maiores efeitos colaterais, maior duração no tratamento (que varia de 18 e 24 meses), e um alto custo em relação aos medicamentos de primeira escolha (varia entre US\$ 1500 e 3000).²⁸

Figura 23. Fármacos de segunda escolha utilizados no tratamento da tuberculose.



O entendimento dos processos metabólicos e intracelulares do Mtb têm demonstrado que a virulência do Mtb está associada ao seu

Estudos com bactérias patogênicas revelaram que a ação de fosfatases, em particular PTPs, tem um importante papel na determinação da patogenicidade das micobactérias, interferindo na sinalização celular do macrófago mediada por fosforilação/desfosforilação de fosfotirosinas.⁹⁹⁻¹⁰¹

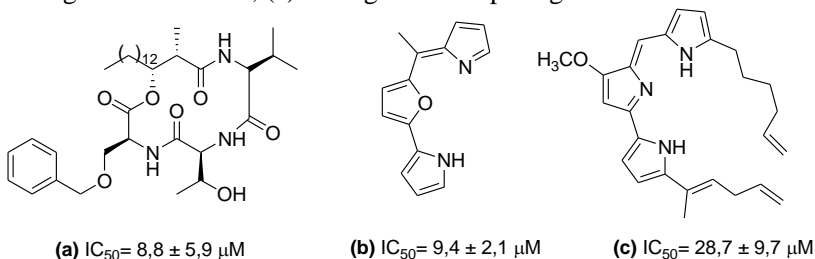
Um dos maiores problemas relacionados ao Mtb é que, ao ser fagocitado pelos macrófagos humanos, ele é capaz de sobreviver no interior dos mesmos.¹⁰² Estudos mostram que a virulência do Mtb está associada ao seu mecanismo de invasão no hospedeiro, e que a intercomunicação entre a bactéria e o macrófago é essencial para sua sobrevivência.³⁰

A publicação da sequência genômica do Mtb permitiu a identificação da presença de genes de duas proteínas tirosina fosfatase: PtpA e PtpB.²⁹ A PtpA é classificada como uma proteína de baixo peso molecular (LMW PTP),¹⁰³ que desfosforila especificamente resíduos de tirosina,¹⁰⁴ enquanto a PtpB se enquadra como uma fosfatase com tripla especificidade (TSP), que catalisa a desfosforilação de resíduos tirosina, serina/treonina e fosfoinosítídeos.^{105,106} Demonstrou-se que essas duas enzimas são secretadas pelo Mtb em macrófagos humanos infectados, e estão envolvidas em sua sobrevivência no hospedeiro.^{99, 107}

A proteína citoplasmática VPS33B foi identificada como substrato da PtpA. A PtpA é internalizada no hospedeiro, onde desfosforila a VPS33B, inibindo a maturação de fagossomos, e impedindo a fusão destes com lisossomos, mecanismo pelo qual os macrófagos promovem sua atividade microbicida. A VPS33B fosforilada promove a fusão dos fagossomos infectados com os lisossomos, como resposta ao processo infeccioso. Assim, a PtpA é reconhecida como essencial para a persistência intracelular bacteriana, sugerindo que a inativação desta enzima atenua o crescimento do *M. tuberculosis* em macrófagos humanos.¹⁰⁸

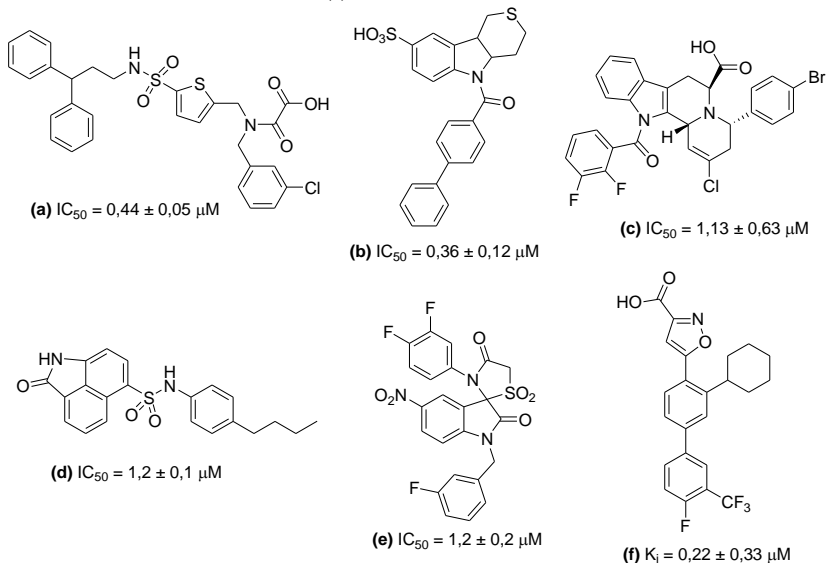
Os primeiros inibidores da PtpA foram descritos na literatura por Manger e colaboradores, que identificaram análogos dos produtos naturais estevastelinas, roseofilinas e prodigiosinas, com valores de IC₅₀ entre 8,8 e 28,7 µM (Figura 25).¹⁰⁹

Figura 25. Inibidores da PtpA de Mtb: (a) análogo da estevastelina, (b) análogo da roseofilina, (c) análogo da nonilprodigiosina.



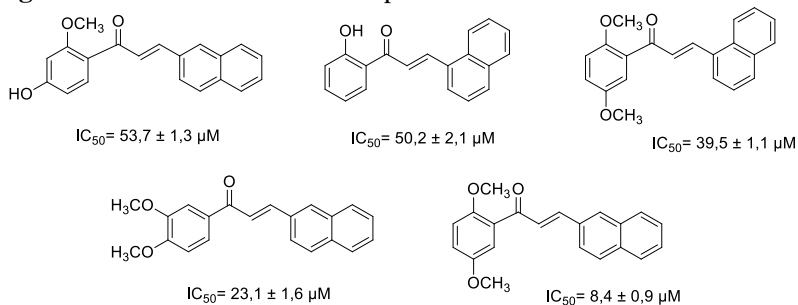
No que diz respeito aos inibidores da PtpB, Grundner e colaboradores¹¹⁰ descreveram a síntese da (oxalilamino-metileno)-tiofeno sulfonamida (OMTS), que apresentou especificidade e seletividade para esta proteína em comparação com outras PTPs, com IC_{50} de $0,44 \mu M$. A estrutura cristalina do complexo OMTS-PtpB mostra que a enzima sofre uma alteração conformacional, permitindo que o inibidor se ligue no fundo do sítio ativo, na forma de dímeros. Também foram identificados derivados indol[2,3- α]quinolizidinas,¹¹¹ outras sulfonamidas¹¹² e tiazolidinonas fusionadas com indolinonas¹¹³ como inibidores seletivos desta proteína. Derivados isoxazólicos também apresentaram inibição competitiva da PtpB,¹¹⁴ entre eles o inibidor mais potente descrito na literatura atual (Figura 26).¹¹⁵

Figura 26. Inibidores seletivos de PtpB de Mtb: (a) OMTS, (b) derivado indólico, (c) indol [2,3- α]quinolizidina, (d) sulfonamida, (e) tiazolidinona fusionada com indolinona e (f) derivado isoxazólico.



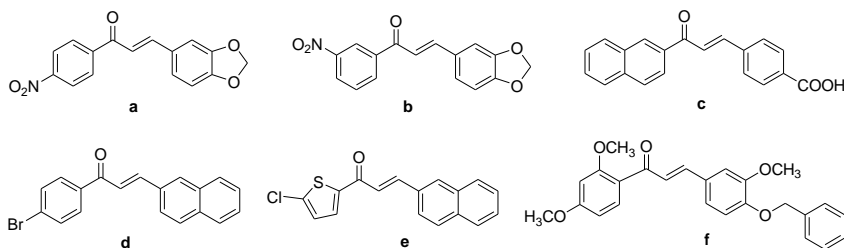
Recentemente, nosso grupo de pesquisas observou importante inibição da PtpA provocada por chalconas sintéticas derivadas do 1- e do 2-naftaldeído (Figura 27), com valores de IC_{50} de até $8,4 \mu M$,³⁸ que foram identificadas como inibidores competitivos e seletivos para esta proteína.³⁷ Estudos da relação estrutura-atividade revelaram que a presença de um anel B hidrofóbico e de grupos que possam fazer ligações hidrogênio com resíduos de aminoácidos da enzima no anel A parecem ser essenciais para a atividade destes compostos.³⁸

Figura 27. Chalconas ativas em PtpA.



No mais recente trabalho do grupo, foi avaliada uma biblioteca de 100 chalconas, que levou à identificação de pequenas séries como inibidores competitivos da PtpA (**b**, **e** e **f**) e da PtpB (**a**, **c** e **d**). Os inibidores de PtpA não foram melhores que os anteriormente publicados,^{37,38} porém identificou-se um inibidor potente e seletivo (**c**) para PtpB, quando comparado à PTP1B humana (Esquema 12).³⁹

Esquema 12. Chalconas potenciais inibidores de PtpA e PtpB e Mtb.



	PtpA IC ₅₀ (μM)	PtpB IC ₅₀ (μM)	PTP1B IC ₅₀ (μM)	IS
a	>100	51± 8	23± 2	0,5
b	45± 6	>100	107± 2	2,4
c	>100	12± 2	3090± 168	258
d	>50	25 ± 6	29± 2	1,2
e	32± 4	>50	100± 5	3,1
f	15± 4	>100	263± 3	18

5.3. Peste, infecções entéricas e YopH

Três espécies de bactérias do gênero *Yersinia* provocam doenças em humanos, *Y. enterocolitica* e *Y. pseudotuberculosis* causam infecções entéricas, caracterizadas por febre, diarreia, dor abdominal, ulcerações e inflamação do intestino.³¹ *Y. pestis* é o agente causador das pestes bubônica, pneumônica e septicêmica, onde as bactérias se espalham pelo sistema linfático, pela corrente sanguínea, e assim, para todos os órgãos.^{116,117} Se o paciente não for tratado com altas doses de antibióticos (estreptomicina ou tetraciclina) durante os cinco primeiros dias da infecção, desenvolve-se uma septicemia, que é frequentemente fatal.¹¹⁸ Apesar de existirem vacinas,^{119,120} e *Yersinia* geralmente ser sensível aos

antibióticos, a forma pneumônica da doença é difícil de diagnosticar, causando morte em muitos casos.¹²¹

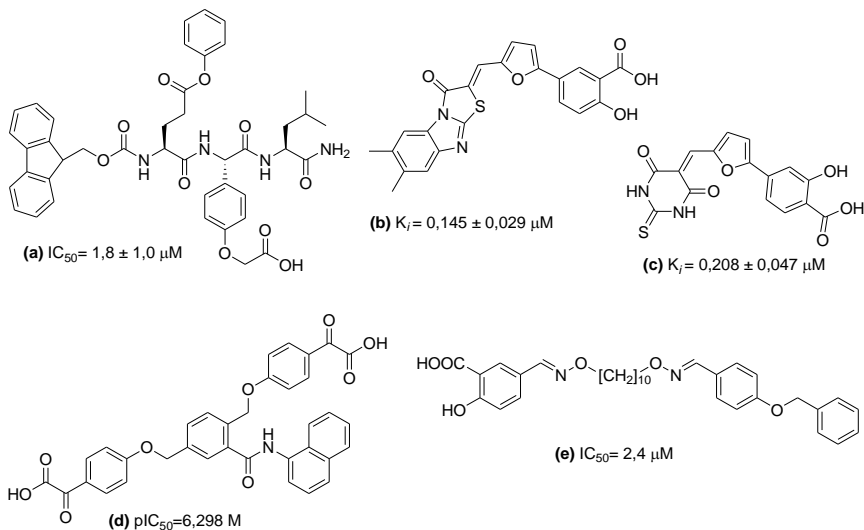
Reservatórios naturais da *Y. pestis* ainda existem em ratos silvestres e outras populações de roedores em partes da África, sul da Ásia e sudoeste dos Estados Unidos,³² e aproximadamente 2000 casos de peste em humanos ainda ocorrem todos os anos.³³ Fica evidente, assim, que novas abordagens para combater esta doença são necessárias.

A proteína tirosina fosfatase YopH está presente nas três espécies de *Yersinia* patogênicas para o homem. A introdução desta enzima em células fagocitárias do hospedeiro causa a inibição da resposta inflamatória à bactéria, através de um processo que envolve a quebra de adesões focais, inibição da fagocitose, liberação de fator de necrose tumoral α (TNF- α) e resposta oxidativa. A YopH também impede a função dos linfócitos B e T prevenindo a resposta imune adaptativa, que é crucial para a sobrevivência da bactéria nos nódulos linfáticos do hospedeiro.¹²²

Poucos estudos da atividade de compostos como inibidores da YopH de *Yersinia* spp. são encontrados na literatura (Figura 28). Tripeptídeos^{123,124} e derivados do furanil-salicilato apresentaram importante atividade inibitória desta enzima, sendo identificados como inibidores competitivos.³³ Hu e Stebbins¹²⁵ construíram modelos de interação YopH-inibidor e estudaram relações de 3D-QSAR com compostos orgânicos contendo o grupo oxalil, e mais recentemente, foram construídos modelos de interação com oximas como ligantes bivalentes no sítio ativo da YopH.¹²⁶

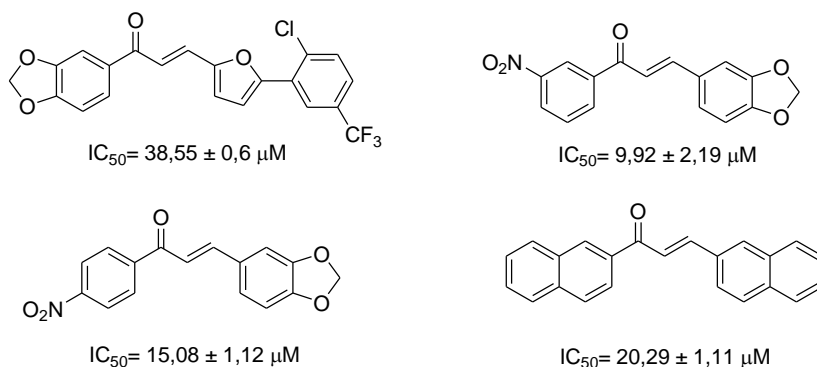
Devido à patogenicidade de *Yersinia* spp. estar estreitamente relacionada à atividade da YopH, esta enzima aparece como um alvo promissor para intervenções terapêuticas contra bactérias deste gênero.

Figura 28. Inibidores da YopH de *Yersinia* spp.: (a) tripeptídeo, (b) e (c) furanilsalicilatos, (d) composto orgânico com grupo oxalil e (e) ligação bivalente.



Nosso grupo observou importante inibição competitiva da proteína YopH conferida por quatro chalconas sintéticas, com IC_{50} variando de 9,92 a 38,55 μM (Figura 29).⁴⁰

Figura 29. Chalconas ativas em YopH.

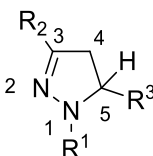


5.4. Pirazolinas

Existem inúmeras moléculas biologicamente ativas com anéis de cinco membros contendo dois heteroátomos. Pirazolinas são exemplos importantes que podem ser associadas a várias atividades biológicas.⁴¹

As pirazolinas são heterocíclicas que têm um átomo de nitrogênio na posição 1, um átomo de nitrogênio na posição 2 e uma dupla ligação entre o nitrogênio 2 e o carbono 3 (Figura 30).¹²⁷

Figura 30. Estrutura geral das pirazolinas.

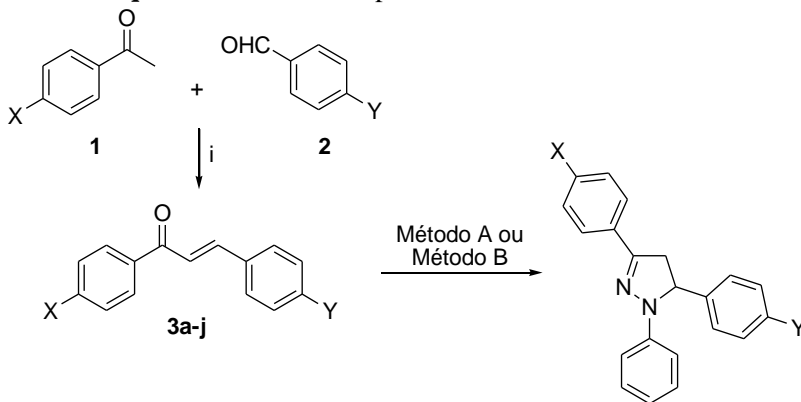


Estes compostos apresentam forte fluorescência, devido às características fotoelétricas do anel pirazolínico. No sistema conjugado (-N1-N2-C3-) do anel pirazolínico, o átomo de nitrogênio da posição 1 e o átomo de carbono da posição 3 são, respectivamente, eletrodoador e eletroretirador, sistema esse altamente eficiente na transferência intramolecular de elétrons, característica esta responsável pela fluorescência observada.¹²⁸

5.4.1. Síntese de pirazolinas

A reação de chalconas α,β -insaturadas com fenilhidrazinas em ácido acético e refluxo, tornou-se o método de preparação mais usual para a síntese de derivados 2-pirazolínicos, porém, na literatura são descritas outras metodologias utilizadas na síntese desses heterociclos.

Estudos realizados por Safaei-Ghomi¹²⁹ mostram a síntese de 10 pirazolinas utilizando K_2CO_3 10% (método B) no lugar do ácido acético comumente utilizado (método A). Foram obtidos maiores rendimentos utilizando o método B quando comparados com o método A. Os autores explicam que ocorre o aumento da polaridade das moléculas na presença de K_2CO_3 em solvente polar prótico, levando assim a uma maior reatividade do nucleófilo na reação de adição de Michael. Isso é consistente com o mecanismo da reação que envolve um estado de transição polar estabilizado por solventes polares próticos (Esquema 13).¹²⁹

Esquema 13. Síntese de pirazolinas utilizando K_2CO_3 .

i. NaOH, EtOH, t.a.

Método A: Fenilhidrazina, Ácido Acético, Refluxo

Método B: Fenilhidrazina, K_2CO_3 , EtOH, Refluxo

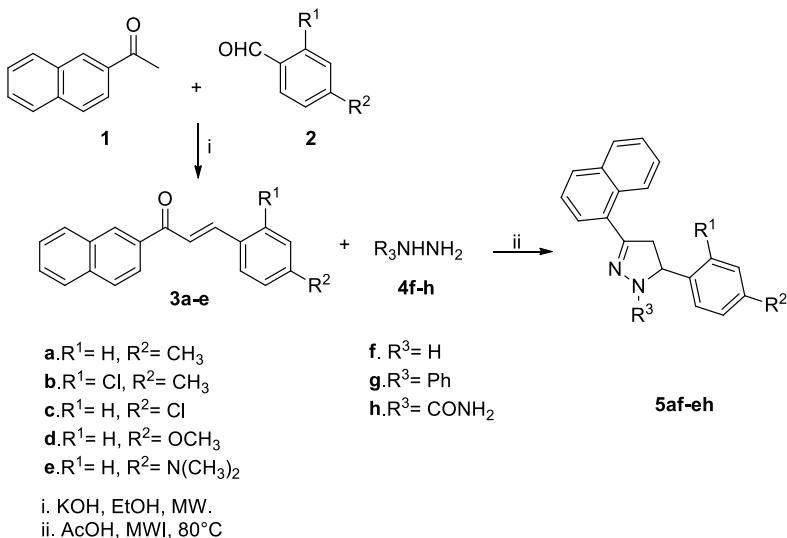
X	Y	Método A		Método B		
		Tempo (min)	Rendimento (%)	Tempo (min)	Rendimento (%)	
4a	H	H	110	65	80	80
4b	Cl	H	45	65	14	85
4c	H	Cl	40	58	12	80
4d	Cl	Cl	30	87	5	95
4e	H	Br	45	70	15	90
4f	Cl	Br	38	78	10	93
4g	H	CH ₃	140	43	100	64
4h	Cl	CH ₃	87	53	60	76
4i	H	N(CH ₃) ₂	155	28	120	45
4j	Cl	N(CH ₃) ₂	105	53	70	70

Li e colaboradores¹³⁰ descreveram em 2007 a síntese de pirazolinas utilizando radiação ultrassônica. Os autores realizaram um estudo comparativo entre a síntese convencional e a síntese com o uso de ultrassom. Utilizando a metodologia convencional, foi necessária temperatura de 108°C e tempo de 4h e se obteve um rendimento de 76%. Já com a metodologia ultrassônica a reação ocorreu em 2h, à temperatura ambiente, proporcionando rendimento de 96%.

Azarifar e Ghasemnejad¹³¹ descreveram a síntese “one-pot” de pirazolinas derivadas do 2-acetilnaftaleno utilizando micro-ondas

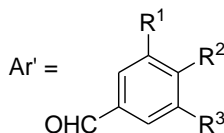
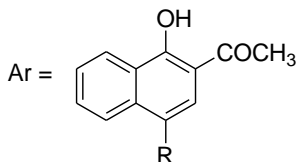
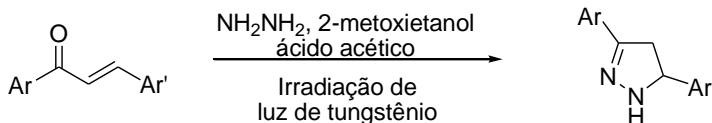
(esquema 14). A reação entre o 2-acetilnaftaleno e benzaldeídos substituídos ocorreu na presença de $\text{KOC}_2\text{H}_5/\text{EtOH}$, formando as chalconas intermediárias, que sofreram ciclização rápida com hidrazinas à 80°C em 2-12 minutos, sendo obtidas com rendimentos variáveis entre 82 e 99%.

Esquema 14. Síntese de pirazolinas utilizando micro-ondas.



Zangade e colaboradores¹³² relataram uma reação simples e verde entre 2-hidroxicalconas e hidrato de hidrazina em 2-metoxietanol, na presença de quantidade catalítica de ácido acético, sob irradiação de luz de tungstênio, para a formação de pirazolinas (Esquema 15). Esta metodologia permitiu a formação de produtos em um curto intervalo de tempo, com bons rendimentos, mostrando-se altamente econômica e eficiente.

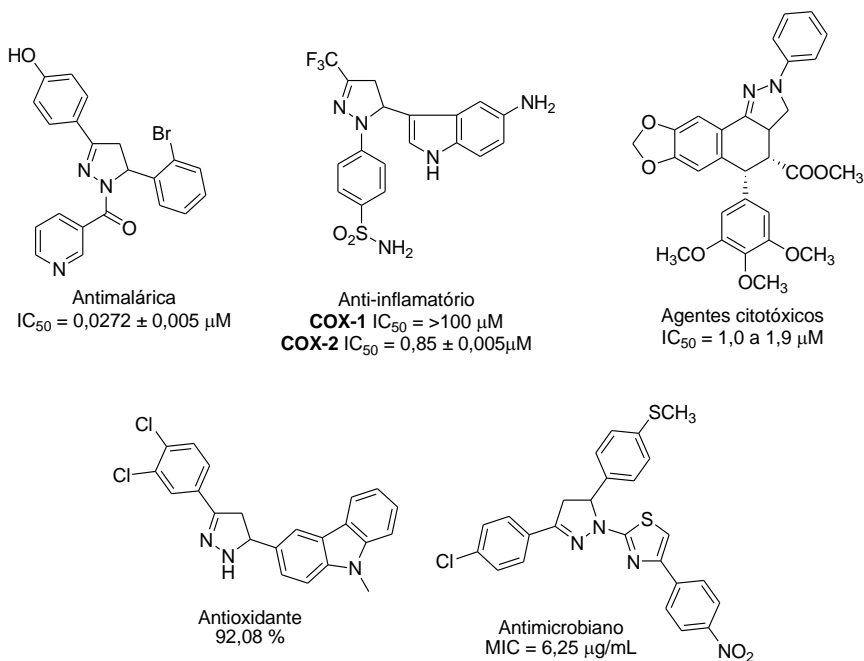
Esquema 15. Síntese de pirazolinas sob irradiação de luz de tungstênio.



R	R ¹	R ²	R ³	Tempo (min)	Rendimento (%)
H	H	OCH ₃	H	32	82
H	OCH ₃	OCH ₃	Br	28	86
Br	OCH ₃	OCH ₃	Br	25	92
I	H	OCH ₃	H	30	84
H	H	F	H	28	88
H	H	Cl	H	30	85
I	OCH ₃	OCH ₃	Br	26	90

5.4.2. Pirazolinas e atividade biológica

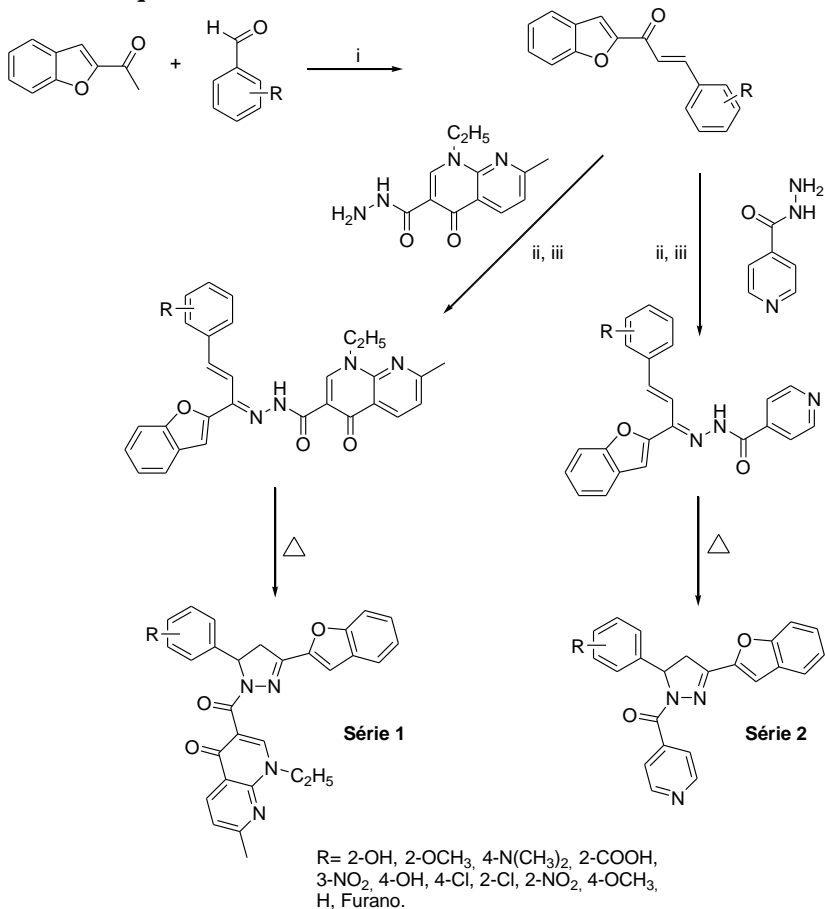
São descritas na literatura diversas atividades biológicas envolvendo pirazolinas, como por exemplo antimalárica,⁴² anti-inflamatória (seletiva para COX-2),⁴⁷ antitumoral,⁴³ antioxidante⁴⁵ e antimicrobiana (Figura 31).⁴⁶

Figura 31. Pirazolinas com diferentes atividades biológicas.

5.4.2.1. Pirazolinas como potenciais agentes tuberculostáticos

Manna e colaboradores⁴⁴ sintetizaram diferentes pirazolinas derivadas de benzofuranos, contendo anéis piridínicos e quinolínicos, e avaliaram sua atividade tuberculostática *in vitro* e *in vivo* (Esquema 16). Os compostos sintetizados são uma ótima combinação heterocíclica de pirazolina, benzofurano e piridina ou quinolina. A molécula contendo R = 2-COOH da série 2 foi a mais ativa frente a cepas multirresistentes de *M. tuberculosis*, com valor de 3,2 μg/mL.

Esquema 16. Pirazolinas com atividade tuberculostática.



Considerando o que foi exposto, e dando continuidade ao trabalho desenvolvido por nosso grupo de pesquisas, foi proposta a ciclização das chalconas mais ativas frente às proteínas tirosina fosfatase (PtpA, PtpB e YopH) obtidas anteriormente,³⁷⁻⁴⁰ a fim de encontrar inibidores ainda mais potentes e seletivos para essas proteínas.

6. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Será apresentado, inicialmente, a numeração e a nomenclatura dos compostos sintetizados nesse capítulo do trabalho. Em seguida, será apresentada a metodologia sintética, onde serão discutidas as condições reacionais, purificação e caracterização das moléculas propostas. Por fim, serão apresentados os resultados dos testes biológicos. Todos os resultados serão apresentados, na forma de tabelas e esquemas.

6.1. Apresentação dos compostos

6.1.1. Síntese das chalconas

As chalconas que foram ciclizadas fizeram parte de trabalhos já publicados, e também da Dissertação de Mestrado da Dra. Alessandra Mascarello e da Tese de Doutorado da Dra. Louise Domeneghini Chiaradia Delatorre. A síntese das chalconas foi realizada seguindo o “*know how*” do grupo de pesquisas, que se baseia na condensação aldólica entre aldeídos e acetofenonas, metodologia descrita por Vogel em 1989.⁸⁷

6.1.2. Numeração e nomenclatura dos compostos

A nomenclatura dos compostos sintetizados segue as regras designadas pelo *Chemical Abstracts* e está descrita na Tabela 4 assim como a numeração adotada ao longo da tese.

Tabela 4. Nomenclatura das pirazolininas sintetizadas.

Nomenclatura	
8a	1-fenil-3-(2,5-dimetóxfenil)-5-(naftalen-2-il)-4,5-dihidro-1 <i>H</i> -pirazol
8b	4-(1-fenil-5-(naftalen-2-il)-4,5-dihidro-1 <i>H</i> -pirazol-3-il)-2-metóxfenol
8c	1-fenil-3-(3,4-dimetóxfenil)-5-(naftalen-2-il)-4,5-dihidro-1 <i>H</i> -pirazol

Tabela 4. Nomenclatura das pirazolinas sintetizadas (*continuação*).

8d	3-(5-clorotiofen-2-il)-1-fenil-5-(naftalen-2-il)-4,5-dihidro-1 <i>H</i> -pirazol
8e	3-(4-bromofenil)-1-fenil-5-(naftalen-2-il)-4,5-dihidro-1 <i>H</i> -pirazol
8f	1-fenil-3,5-di(naftalen-2-il)-4,5-dihidro-1 <i>H</i> -pirazol
8g	5-(benzo[<i>d</i>][1,3]dioxol-5-il)-1-fenil-3-(3-nitrofenil)-4,5-dihidro-1 <i>H</i> -pirazol
8h	5-(benzo[<i>d</i>][1,3]dioxol-5-il)-1-fenil-3-(4-nitrofenil)-4,5-dihidro-1 <i>H</i> -pirazol
8i	1-fenil-3-(3,4,5-trimetóxiifenil)-5-(naftalen-2-il)-4,5-dihidro-1 <i>H</i> -pirazol
8j	1-fenil-3-(naftalen-2-il)-5-(3-nitrofenil)-4,5-dihidro-1 <i>H</i> -pirazol
8k	1-fenil-5-(3-(trifluorometil)fenil)-3-(naftalen-2-il)-4,5-dihidro-1 <i>H</i> -pirazol
8l	5-(3-clorofenil)-1-fenil-3-(naftalen-2-il)-4,5-dihidro-1 <i>H</i> -pirazol
8m	1,5-difenil-3-(naftalen-2-il)-4,5-dihidro-1 <i>H</i> -pirazol
8n	5-(4-cloro-3-(trifluorometil)fenil)-1-fenil-3-(naftalen-2-il)-4,5-dihidro-1 <i>H</i> -pirazol
8o	5-(4-(benziloxi)-3-metoxifenil)-1-fenil-3-(2,4-dimetóxiifenil)-4,5-dihidro-1 <i>H</i> -pirazol
8p	1-fenil-3-(2,5-dimetoxifenil)-5-(naftalen-1-il)-4,5-dihidro-1 <i>H</i> -pirazol
8q	3-(benzo[<i>d</i>][1,3]dioxol-5-il)-5-(5-(2-cloro-5-(trifluorometil)fenil) furan-2-il)-1-fenil-4,5-dihidro-1 <i>H</i> -pirazol
8r	1-fenil-3,5-dimetóxi-2-(5-(3-nitrofenil)-4,5-dihidro-1 <i>H</i> -pirazol-3-il)fenol
8s	Ácido 1-fenil-4-(3-(naftalen-2-il)-4,5-dihidro-1 <i>H</i> -pirazol-5-il)benzóico

Tabela 4. Nomenclatura das pirazolinas sintetizadas
(*continuação*).

8t	1-fenil-3-(3,4-dimetóxfenil)-5-(3,4,5-trimetóxfenil)-4,5-dihidro-1 <i>H</i> -pirazol
8u	5-(benzo[<i>d</i>][1,3]dioxol-5-il)-1-fenil-3-(3,4,5-trimetóxfenil)-4,5-dihidro-1 <i>H</i> -pirazol
8v	1-fenil-3-(3,4-dimetoxifenil)-5-(2,3,4-trimetóxfenil)-4,5-dihidro-1 <i>H</i> -pirazol
8w	1-fenil-3-(5-(naftalen-1-il)-4,5-dihidro-1 <i>H</i> -pirazol-3-il)fenol
8x	1-fenil-3-(3,4,5-trimetoxifenil)-5-(naftalen-1-il)-4,5-dihidro-1 <i>H</i> -pirazol
9a	1-(3-(2,5-dimetoxifenil)-5-(naftalen-2-il)-4,5-dihidro-1 <i>H</i> -pirazol-1-il)etanona
9b	1-(3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-5-(naftalen-2-il)-4,5-dihidro-1 <i>H</i> -pirazol-1-il)etanona
9c	1-(3-(3,4-dimetoxifenil)-5-(naftalen-2-il)-4,5-dihidro-1 <i>H</i> -pirazol-1-il)etanona
9d	1-(3-(5-clorotiofen-2il)-5-(naftalen-2-il)-4,5-dihidro-1 <i>H</i> -pirazol-1-il)etanona
9e	1-(3-(4-bromofenil)-5-(naftalen-2-il)-4,5-dihidro-1 <i>H</i> -pirazol-1-il)etanona
9f	1-(3,5-di(naftalen-2-il)-4,5-dihidro-1 <i>H</i> -pirazol-1-il)etanona
9g	1-(5-(benzo[<i>d</i>][1,3]dioxol-5-il)-3-(3-nitrofenil)-4,5-dihidro-1 <i>H</i> -pirazol-1-il)etanona
9h	1-(5-(benzo[<i>d</i>][1,3]dioxol-5-il)-3-(4-nitrofenil)-4,5-dihidro-1 <i>H</i> -pirazol-1-il)etanona
9i	1-(3-(3,4,5-trimetoxifenil)-5-(naftalen-2-il)-4,5-dihidro-1 <i>H</i> -pirazol-1-il)etanona
9j	1-(3-(naftalen-2-il)-5-(3-nitrofenil)-4,5-dihidro-1 <i>H</i> -pirazol-1-il)etanona
9k	1-(5-(3-trifluormetil)fenil)-3-(naftalen-2-il)-4,5-dihidro-1 <i>H</i> -pirazol-1-il)etanona

Tabela 4. Nomenclatura das pirazolinias sintetizadas (*continuação*).

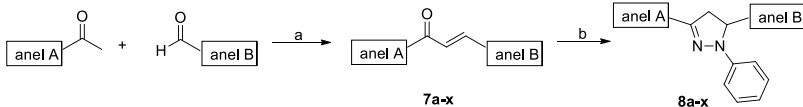
9l	1-(5-(3-clorofenil)-3-(naftalen-2-il)-4,5-dihidro-1 <i>H</i> -pirazol-1-il)etanona
9m	1-(5-fenil)-(3-naftalen-2-il)-4,5-dihidro-1 <i>H</i> -pirazol-1-il)etanona
9n	1-(5-(4-cloro-3-(trifluormetil)fenil)-3-(naftalen-2-il)-4,5-dihidro-1 <i>H</i> -pirazol-1-il)etanona
9o	1-(5-(4-(benziloxi)-3-metoxifenil)-3-(2,4-dimetoxifenil)-4,5-dihidro-1 <i>H</i> -pirazol-1-il)etanona
9p	1-(3-(2,5-dimetoxifenil)-5-(naftalen-1-il)-4,5-dihidro-1 <i>H</i> -pirazol-1-il)etanona
9q	1-(3-(benzo[<i>d</i>][1,3]dioxol-5-il)-5-(5-(2-cloro-5-(trifluormetil)fenil) furan-2-il)-dihidro-1 <i>H</i> -pirazol-1-il)etanona
9r	1-(3-(2-hidroxi-4,6-dimetoxifenil)-5-(3-nitrofenil)-4,5-dihidro-1 <i>H</i> -pirazol-1-il)etanona
9s	Ácido-4-(1-acetil-3-(naftalen-2-il)-4,5-dihidro-1 <i>H</i> -pirazol-5-il) benzóico
9t	1-(3-(3,4-dimetoxifenil)-5-(3,4,5-trimetoxifenil)-4,5-dihidro-1 <i>H</i> -pirazol-1-il)etanona
9u	1-(5-(benzo[<i>d</i>][1,3]dioxol-5-il)-3-(3,4,5-trimetoxifenil)-4,5-dihidro-1 <i>H</i> -pirazol-1-il)etanona
9v	1-(3-(3,4-dimetoxifenil)-5-(2,3,4-trimetoxifenil)-4,5-dihidro-1 <i>H</i> -pirazol-1-il)etanona
9w	1-(3-(2-hidroxifenil)-5-(naftalen-1-il)-4,5-dihidro-1 <i>H</i> -pirazol-1-il)etanona
9x	1-(3-(3,4,5-trimetoxifenil)-5-(naftalen-1-il)-4,5-dihidro-1 <i>H</i> -pirazol-1-il)etanona

6.2. Síntese das pirazolinias

As 1,3,5-triaril-2-pirazolinias obtidas nesta pesquisa foram sintetizadas seguindo a metodologia de Lévai e Jekő.¹³³ A reação ocorreu entre a chalcona e a fenilhidrazina, em proporção 1:3, em refluxo de ácido acético por 3 horas. Após esse tempo de reação, o produto bruto foi vertido no gelo, e o precipitado formado filtrado a vácuo. Todos os compostos foram recristalizados em etanol. Foram obtidas 24 1,3,5-

triaril-2-pirazolinas (Esquema 17), sendo 20 inéditas. Os compostos **8e**, **8f**, **8m** e **8t** foram previamente citados na literatura.¹³⁴⁻¹³⁶ Os compostos foram obtidos em bons rendimentos, variando de 63 a 98%.

Esquema 17. Síntese das 1,3,5-triaril-2-pirazolinas **8a-x**. a) KOH 50% p/v, metanol, r.t., 24 h; b) fenil-hidrazina, ácido acético, refluxo, 3h.



Pirazolina	Anel A	Anel B	Rendimento (%)	Ponto de fusão (°C)
8a	2,5-diOCH ₃ -fenila	2-naftila	93	147-148
8b	3-OCH ₃ , 4-OH-fenila	2-naftila	89	166-166,5
8c	3,4-diOCH ₃ -fenila	2-naftila	76	168-169
8d	2-Cl-tiofen-2-ila	2-naftila	64	148-150
8e	4-Br-fenila	2-naftila	71	197-198
8f	2-naftila	2-naftila	98	192-192,5
8g	3-NO ₂ -fenila	3,4-OCH ₂ O-fenila	79	177-180
8h	4-NO ₂ -fenila	3,4-OCH ₂ O-fenila	63	186-187

Esquema 17. Síntese das 1,3,5-triaril-2-pirazolinas **8a-x**. a) KOH 50% p/v, metanol, r.t., 24 h; b) fenil-hidrazina, ácido acético, refluxo, 3h (*continuação*).

8i	3,4,5- triOCH ₃ - fenila	2-naftila	91	189-190
8j	2-naftila	3-NO ₂ - fenila	79	188-189,5
8k	2-naftila	3-CF ₃ - fenila	76	143,5-144
8l	2-naftila	3-Cl- fenila	91	181,5-182
8m	2-naftila	Fenila	93	222-222,5
8n	2-naftila	3-CF ₃ -4- Cl-fenila	71	139-140
8o	2,4-diOCH ₃ - fenila	3-OCH ₃ ,4- Obenzil- fenila	86	147,5-148,5
8p	2,5-diOCH ₃ - fenila	1-naftila	92	185,5-186
8q	3,4-OCH ₂ O- fenila	(2-Cl-5- CF ₃ - fenil)- furan-2-ila	84	188-189

Esquema 17. Síntese das 1,3,5-triaril-2-pirazolinas **8a-x**. a) KOH 50% p/v, metanol, r.t., 24 h; b) fenil-hidrazina, ácido acético, refluxo, 3h (*continuação*).

8r	2-OH-4,6-diOCH ₃ -fenila	3-NO ₂ -fenila	76	189-191
8s	2-naftila	4-COOH-fenila	86	199-200
8t	3,4-diOCH ₃ -fenila	3,4,5-triOCH ₃ -fenila	73	128,5-129
8u	3,4,5-triOCH ₃ -fenila	3,4-OCH ₂ O-fenila	68	145-146
8v	3,4-diOCH ₃ -fenila	2,3,4-triOCH ₃ -fenila	86	191-191,5
8w	2-OH-fenila	1-naftila	76	179-180
8x	3,4,5-triOCH ₃ -fenila	1-naftila	83	207-208

De maneira análoga, foram sintetizadas vinte e quatro 1-acetil-3,5-diaril-2-pirazolinas seguindo também a metodologia de Lévai e de Lévai e Jekő.¹³³ A reação ocorreu entre a chalcona e o hidrato de hidrazina, em proporção 1:3, em refluxo de ácido acético por 3 horas. Após esse tempo de reação, o produto bruto foi vertido sobre gelo, e o precipitado formado filtrado a vácuo. Quando necessário, os compostos foram recristalizados em etanol. Foram obtidas 24 1-acetil-3,5-diaril-2-pirazolinas (Esquema 18), sendo 16 inéditas e **9e**, **9f**, **9g**, **9h**, **9j**, **9m**, **9r** e **9t** já publicadas na literatura.¹³⁷⁻¹⁴⁰ Os compostos foram obtidos em bons rendimentos, variando de 60 a 94%.

Esquema 18. Síntese das 1-acetil-3,5-diaril-2-pirazolinas **9a-x**. a) KOH 50% p/v, metanol, r.t., 24 h; b) hidrato de hidrazina, ácido acético, refluxo, 3h (*continuação*).

9p	2,5-diOCH ₃ - fenila	1-naftila	90	182-183
9q	3,4-OCH ₂ O- fenila	(2-Cl-5-CF ₃ - fenil)-furan-2- ila	81	168-170
9r	2-OH-4,6- diOCH ₃ -fenila	3-NO ₂ -fenila	60	227-228
9s	2-naftila	4-COOH-fenila	62	240-241
9t	3,4-diOCH ₃ - fenila	3,4,5-triOCH ₃ - fenila	83	197-198
9u	3,4,5-triOCH ₃ - fenila	3,4-OCH ₂ O- fenila	91	161-162
9v	3,4-diOCH ₃ - fenila	2,3,4-triOCH ₃ - fenila	90	145-146
9w	2-OH-fenila	1-naftila	86	198-199
9x	3,4,5-triOCH ₃ - fenila	1-naftila	75	178-179

6.2.1. Identificação dos compostos obtidos

Todas as pirazolinas foram submetidas à análise de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ¹H e ¹³C e espectroscopia de massas de alta resolução para confirmação das estruturas.

6.2.1.1. Espectroscopia de RMN ¹H e ¹³C dos compostos **8a-x** e **9a-x**

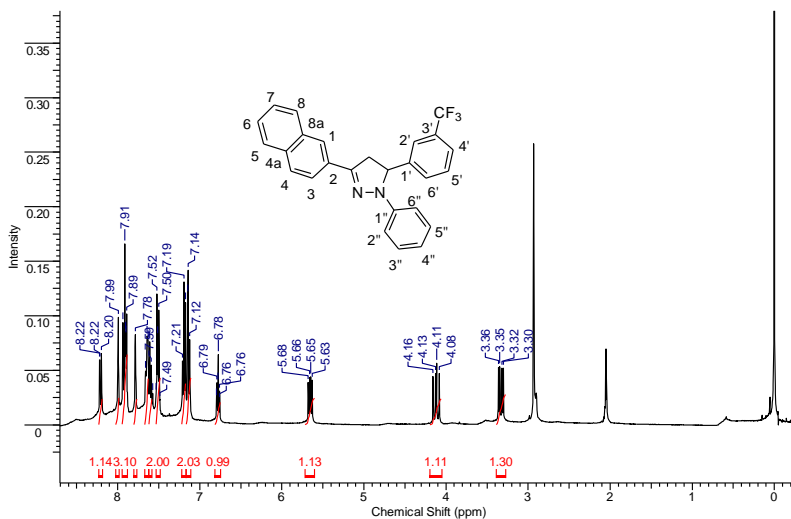
Primeiramente, devido à melhor solubilidade, as análises dos compostos **8a-x** de RMN foram realizadas utilizando clorofórmio deuterado (CDCl₃) como solvente. Entretanto, foi observado uma alta integração (cerca de 40 hidrogênios) entre 6-8 ppm (aromáticos) nos espectros. Observou-se também a alteração da cor da solução dos tubos de RMN, inicialmente amarelo esverdeado (tubo 1, Figura 32), passando para tons escuros (tubos 2a e 2b, Figura 32), indicando a possível degradação destes heterociclos nesse solvente.

Figura 32. Degradação das amostras em CDCl_3 .

Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C dos compostos **8a-x** foram obtidos, então, em dimetilsulfóxido ($\text{DMSO}-d_6$) ou em acetona deuterada, em tubos de 5 mm, utilizando tetrametilsilano como referência interna. Os compostos **9a-x** não degradaram em CDCl_3 e foram obtidos em CDCl_3 ou $\text{DMSO}-d_6$. Os parâmetros de aquisição dos espectros estão descritos na Parte Experimental. Os dados de RMN ^1H e ^{13}C dos compostos estão apresentados na parte experimental.

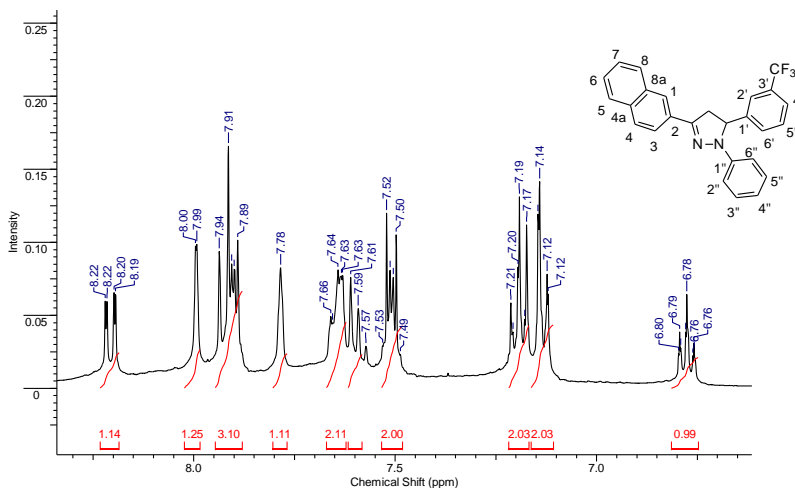
Todos os espectros de RMN analisados mostram claramente a formação do produto, observada pela presença de três dupletos de dupletos característicos dessas moléculas. No espectro de RMN ^1H do composto **8k** (Figura 33) podemos observar os sinais dos hidrogênios aromáticos característicos na faixa de 6,76 a 8,22 ppm. Os três dupletos de dupletos, característicos do anel pirazolínico, que comprovam a formação do produto, aparecem em 5,66, 4,12 e 3,33 ppm.

Figura 33. Espectro de RMN de ^1H do composto **8k**.



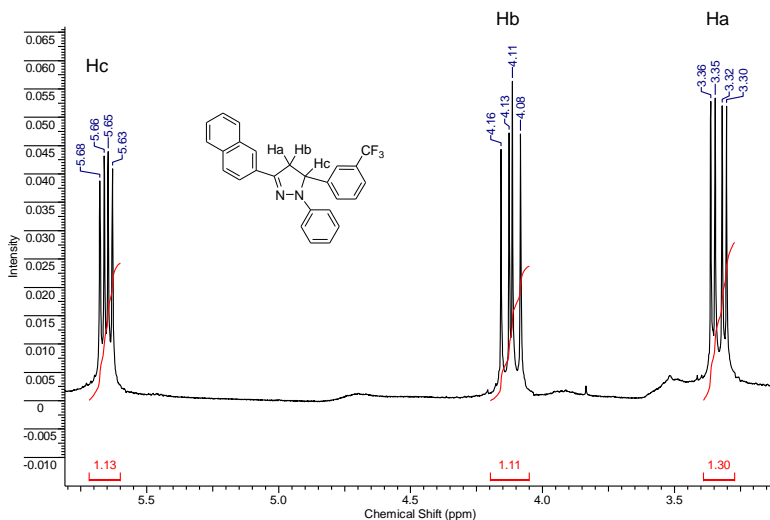
Os hidrogênios aromáticos do composto **8k** podem ser melhor visualizados na Figura 34, que mostra uma ampliação da região onde se encontram estes sinais.

Figura 34. Ampliação do espectro de RMN de ^1H do composto **8k**.



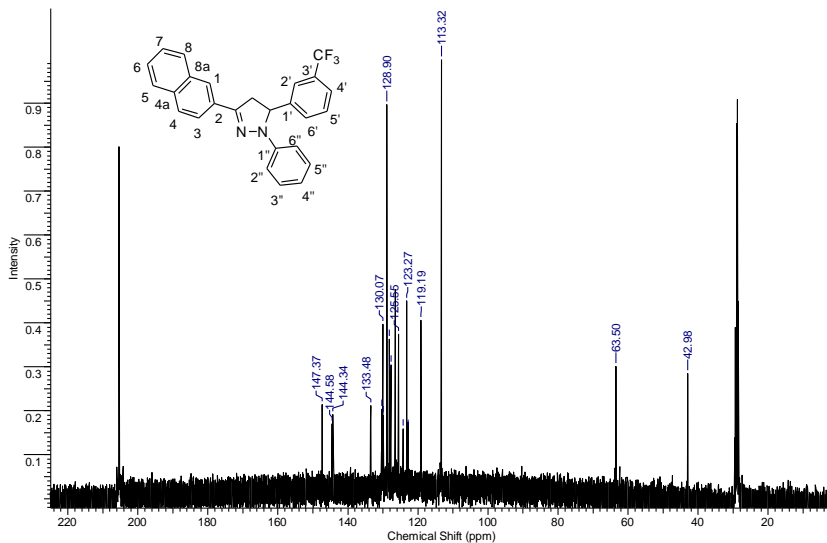
Analisando a região dos hidrogênios Ha, Hb e Hc, que está ampliada na Figura 35, verifica-se que o primeiro sinal, em 5,66 ppm é referente ao Hc, com constantes de acoplamento características de $J_{cb} = 12,0$ Hz e $J_{ca} = 6,0$ Hz que mostram o acoplamento desse hidrogênio com os dois hidrogênios diastereotópicos (Ha e Hb, respectivamente). O próximo sinal, em 4,12 ppm, é referente ao Hb, com $J_{ba} = 17,1$ Hz do acoplamento com Ha e $J_{bc} = 12,0$ Hz do acoplamento com Hc. O sinal em 3,33 ppm representa o hidrogênio metilênico Ha, que acopla com outro hidrogênio metilênico Hb com um $J_{ab} = 17,1$ Hz, e com o hidrogênio Hc com $J_{ac} = 6,0$ Hz (figura 35).

Figura 35. Ampliação do espectro de RMN de ^1H do composto **8k**.



No espectro de RMN de ^{13}C do composto **8k** podem-se observar os sinais do metileno em 42,9 ppm, do metino em 63,5 ppm, os carbonos aromáticos na região entre 113-145 ppm, e o carbono quaternário do anel pirazolínico mais deslocado em 147,3 ppm (Figura 36).

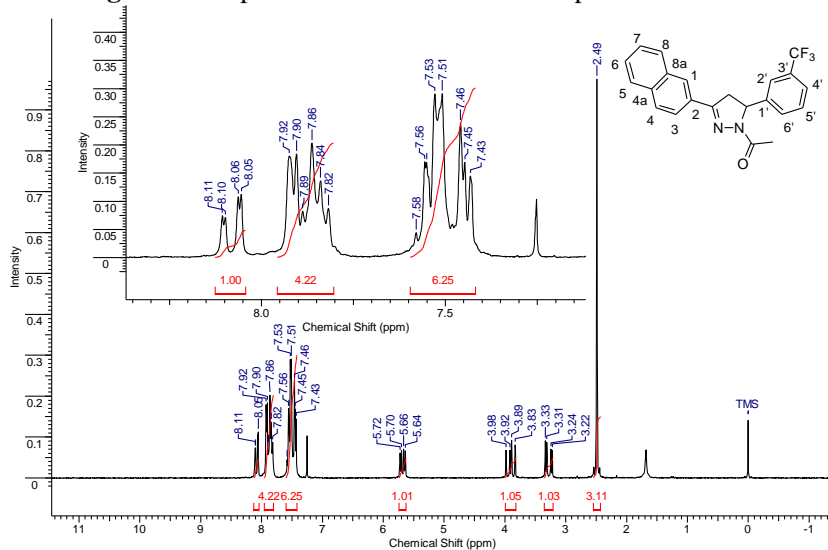
Figura 36. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **8k**.



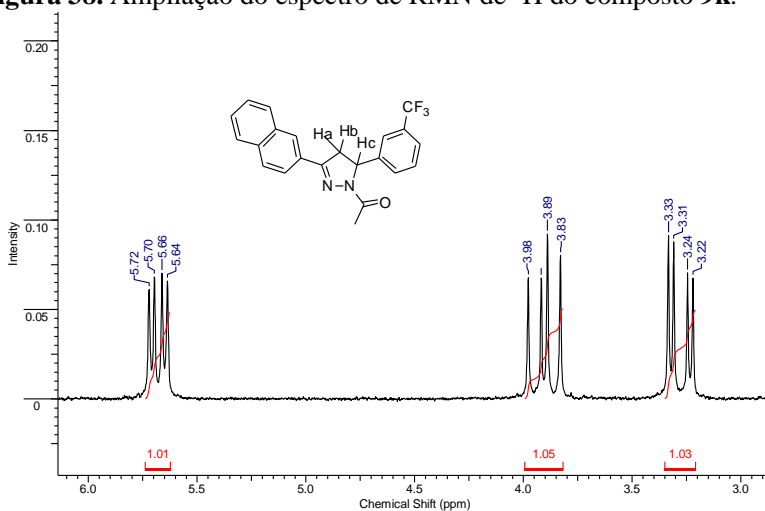
Os espectros de ^1H e ^{13}C das acetil-pirazolinas **9a-x** mostram um padrão similar. Os três dupletos de dupletos confirmam a formação das pirazolinas.

No espectro de RMN ^1H do composto **9k** (Figura 37) podemos observar os sinais dos hidrogênios aromáticos característicos na faixa de 7,43 a 8,11 ppm. Os três dupletos de dupletos, característicos do anel pirazolinico, que comprovam a ciclização, aparecem em 5,68, 3,90 e 3,28 ppm. Por fim, em 2,49 ppm o simpleto característico da metila do grupo acetil.

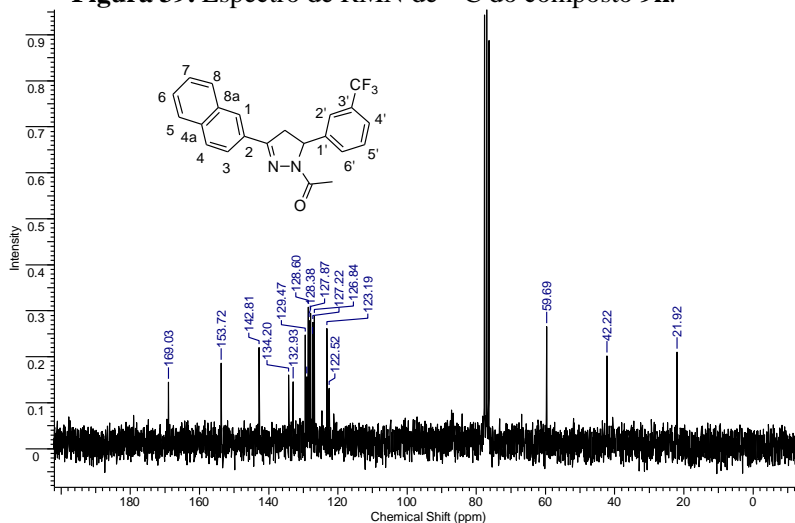
Figura 37. Espectro de RMN de ^1H do composto **9k**.



Analisando a região dos hidrogênios Ha, Hb e Hc, que está ampliada na Figura 38, verifica-se que o primeiro sinal, em 5,68 ppm é referente ao Hc, com constantes de acoplamento características de $J_{cb} = 12,0$ Hz e $J_{ca} = 4,9$ Hz que mostram o acoplamento desse hidrogênio com os dois hidrogênios diastereotópicos (Hb e Ha, respectivamente). O próximo sinal, em 3,90 ppm, é referente ao Hb, com $J_{ba} = 17,6$ Hz do acoplamento com Ha e $J_{bc} = 12,0$ Hz do acoplamento com Hc. O sinal em 3,28 ppm representa o hidrogênio metilênico Ha, que acopla com outro hidrogênio metilênico Hb com um $J_{ab} = 17,6$ Hz, e com o hidrogênio Hc com $J_{ac} = 4,9$ Hz (figura 38).

Figura 38. Ampliação do espectro de RMN de ^1H do composto **9k**.

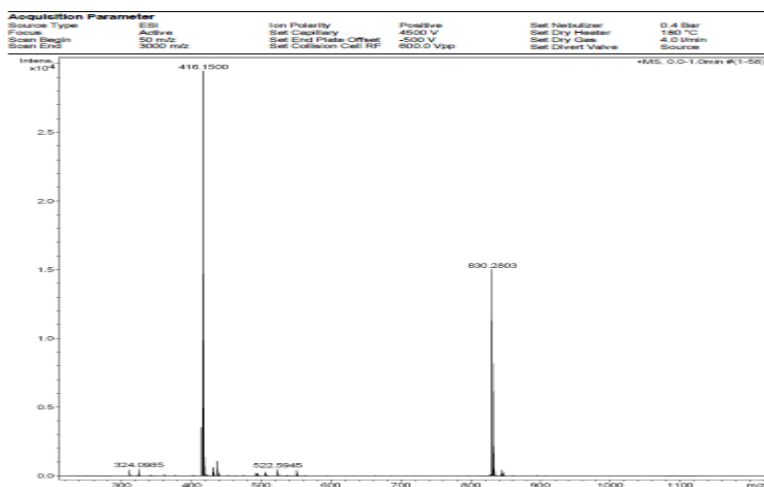
No espectro de RMN de ^{13}C do composto **9k** (Figura 39) podem-se observar os sinais da metila do grupo acetil em 21,9 ppm, do metileno em 42,2 ppm e do metino em 59,6 ppm. Os carbonos aromáticos na região entre 122-153 ppm, o carbono quaternário do anel pirazolínico mais deslocado em 153,7 ppm e a carbonila em 169,0 ppm (Figura 39).

Figura 39. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **9k**.

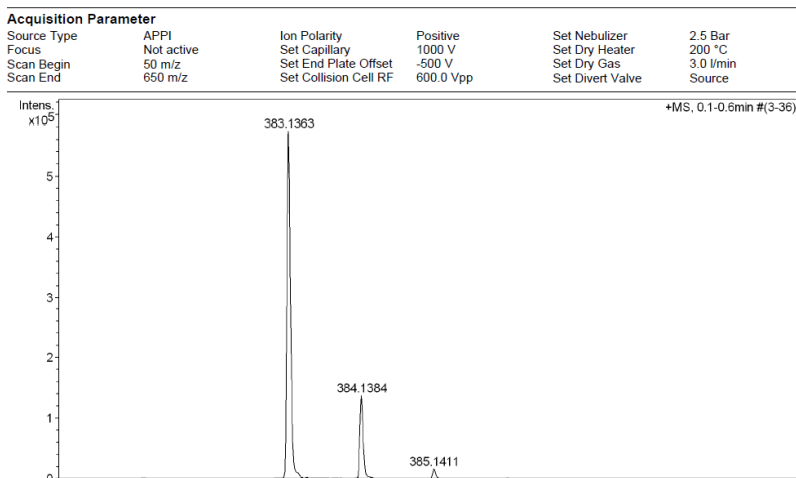
6.2.1.2. Espectroscopia de massas de alta resolução dos compostos **8a-x** e **9a-x**

Todos os compostos foram caracterizados também por análise de espectrometria de massas de alta resolução (HRMS). Para a série **8a-x** foi utilizado fonte de ionização eletrospray (EPI), o íon molecular dos compostos foi obtido como cátion, sendo que, para exemplificar, o composto **8k**, com fórmula molecular $C_{26}H_{19}F_3N_2$ o $[M^+]$ calculado foi 416,1494 e o encontrado, 416,1500 (Figura 40).

Figura 40. Espectro de massas de alta resolução do composto **8k**.



Para a série **9a-x** foi utilizado fonte de fotoionização (APPI), o íon molecular dos compostos foi obtido com adição de um próton, sendo que, para exemplificar, o composto **9k**, com fórmula $C_{22}H_{17}F_3N_2O$ o $[M+H]$ encontrado foi de 383,1363, e o valor teórico calculado é de 383,1366 (Figura 41).

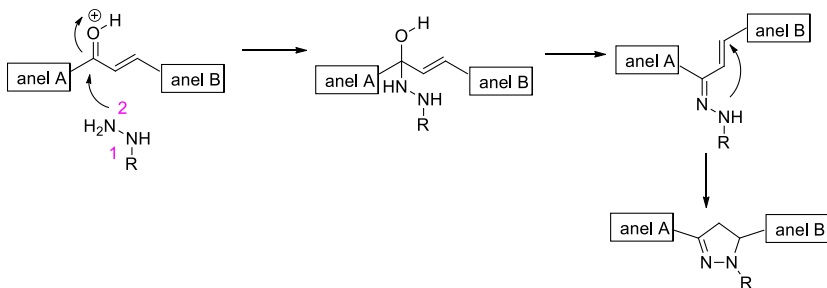
Figura 41. Espectro de massas de alta resolução do composto **9k**.

6.2.2. Mecanismos propostos para a síntese das pirazolinas

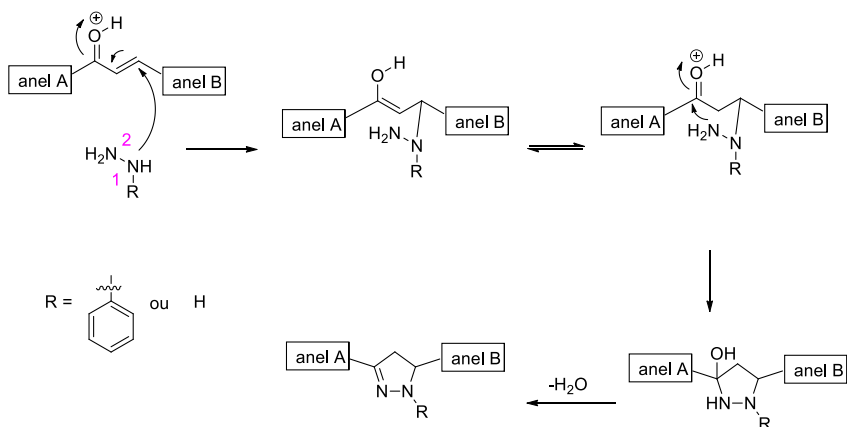
Existem duas propostas para o mecanismo de formação das pirazolinas (Esquema 19). Na primeira proposta a hidrazina é adicionada primeiramente ao carbono carbonílico formando uma hidrazona que sofre ataque do nitrogênio 1 ao carbono β . A segunda propõe que ocorra inicialmente o ataque nucleofílico do nitrogênio 1 da hidrazina ao carbono β da chalcona. Em seguida, ocorre ciclização através do ataque do nitrogênio 2 à carbonila, seguida da eliminação de uma molécula de água, formando o anel de cinco membros. No caso das acetilpirazolinas ocorre acetilação (solvente ácido acético) formando $N(C=O)CH_3$.¹⁴¹

Esquema 19. Mecanismo proposto para a síntese de pirazolinas.

Mecanismo 1: Adição à carbonila (Adição 1,2)



Mecanismo 2: Adição de Michael (Adição 1,4)



6.3. Atividade biológica

A atividade inibitória das 1,3,5-triaril-2-pirazolininas **8a-x** e **9a-x** foi avaliada *in vitro* frente à PtpA e PtpB de Mtb e YopH de *Yersinia enterocolitica*. Os testes biológicos foram realizados no CEBIME, coordenado pelo Prof. Dr. Hernán Terenzi, e fizeram parte das Teses de Doutorado da Dra. Angela Camila Orbem Menegatti e Dra. Priscila Graziela Alves Martins e da pesquisa de Pós-Doutorado da Dra. Louise Domeneghini Chiaradia.

A proteína tirosina fosfatase 1B (PTP1B) desempenha um papel crítico na regulação da homeostase glicêmica e do peso corporal por sua

ação chave como reguladora de caminhos de sinalização de insulina e leptina.¹⁴² Esta proteína, por ser humana, foi utilizada para ensaios de seletividade dos compostos.

A porcentagem de inibição foi calculada em uma única concentração (25 μ M) para cada composto usando *p*-nitrofenilfosfato (*p*NPP) como substrato (Tabela 5).

Tabela 5. Atividade inibitória das pirazolininas **8a-x** a 25 μ M.

Pirazolina	PtpB c/ incub	PtpA c/ incub	YopH c/ incub
8a	96,12 \pm 11,81	102,02 \pm 11,16	101,88 \pm 16,87
8b	58,81 \pm 4,42	68,87 \pm 11,35	45,67 \pm 0,35
8c	31,91 \pm 3,08	40,45 \pm 6,41	12,97 \pm 1,14
8d	40,83 \pm 3,66	74,32 \pm 12,09	69,55 \pm 3,27
8e	45,95 \pm 0,57	113,81 \pm 5,77	40,04 \pm 6,80
8f	35,21 \pm 1,29	65,10 \pm 10,56	20,95 \pm 5,83
8g	55,29 \pm 4,26	102,75 \pm 2,80	69,51 \pm 4,41
8h	77,29 \pm 0,47	84,02 \pm 13,46	69,32 \pm 5,45
8i	58,22 \pm 3,44	85,59 \pm 10,19	48,13 \pm 6,04
8j	36,88 \pm 3,23	53,96 \pm 3,87	39,69 \pm 5,64
8k	76,86 \pm 7,09	92,07 \pm 9,08	67,5 \pm 8,79
8l	72,03 \pm 2,75	93,01 \pm 7,38	70,64 \pm 2,93
8m	76,39 \pm 8,99	80,92 \pm 14,62	59,78 \pm 6,88
8n	74,40 \pm 10,15	86,50 \pm 10,60	63,98 \pm 1,44
8o	79,63 \pm 6,13	94,56 \pm 12,03	89,90 \pm 3,97
8p	41,63 \pm 8,80	56,53 \pm 0,83	29,90 \pm 7,09
8q	54,10 \pm 4,12	64,94 \pm 3,91	63,53 \pm 2,26
8r	88,69 \pm 4,76	76,18 \pm 1,69	70,69 \pm 7,91
8s	88,50 \pm 10,92	38,57 \pm 0,91	69,28 \pm 6,57
8t	86,72 \pm 5,37	82,04 \pm 2,48	122,35 \pm 9,20
8u	102,99 \pm 14,94	82,52 \pm 1,37	105,67 \pm 3,23
8v	93,40 \pm 7,80	85,10 \pm 0,63	90,00 \pm 2,95
8w	73,66 \pm 8,86	69,02 \pm 8,13	46,17 \pm 5,63
8x	82,74 \pm 7,33	83,16 \pm 3,50	84,78 \pm 2,10

Os resultados são apresentados como média \pm DP (desvio padrão) de pelo menos três experimentos independentes.

Baseando-se no *screening* inicial, foram determinados os valores de IC₅₀ frente às proteínas PtpA e PtpB de Mtb e YopH de *Y. enterocolitica* para os compostos que apresentaram inibição \geq 30%, quando comparados com o controle, usando ao menos sete diferentes concentrações de cada composto e *p*NPP como substrato (Tabela 6).

Tabela 6. Valores de IC₅₀ das chalconas (**7a-x**) e pirazolininas (**8a-x**) frente a YopH de *Yersinia enterocolitica*, PtpA e PtpB de *Mycobacterium tuberculosis*.

Chalcona	IC ₅₀ YopH μM ± DP	IC ₅₀ PtpB μM ± DP	IC ₅₀ PtpA μM ± DP	IC ₅₀ PTP1B μM ± SD	Pirazolina	IC ₅₀ YopH μM ± DP	IC ₅₀ PtpB μM ± DP	IC ₅₀ PtpA μM ± DP	IC ₅₀ PTP1B μM ± SD
7a	>100	>100*	8,4 ± 0,9*	144,5 ± 5,1*	8a	58,4 ± 8,6	nd	>100	nd
7b	>100	>100*	53,7 ± 1,3*	123,0 ± 3,0*	8b	21,8 ± 3,9	63,2 ± 0,8	58,4 ± 9,5	28,1 ± 7,9
7c	>100	>100*	23,1 ± 1,6*	>1000*	8c	8,8 ± 2,6	17,1 ± 6,1	37,6 ± 3,3	12,1 ± 1,0
7d	>100	57,2 ± 4,5 [†]	32,1 ± 4,0 [†]	100,0 ± 4,8 [†]	8d	27,3 ± 0,8	19,1 ± 10,1	>100	25,1 ± 2,2
7e	nd	25,2 ± 6,0 [†]	>50 [†]	28,8 ± 2,1 [†]	8e	31,8 ± 1,6	23,9 ± 1,6	66,7 ± 11,9	21,3 ± 4,0
7f	20,3 ± 1,1 ^{&}	nd [†]	93,3 ± 5,7 [†]	nd	8f	13,1 ± 0,9	13,7 ± 3,1	36,5 ± 5,3	21,8 ± 3,7
7g	9,9 ± 2,2 ^{&}	>100 [†]	44,7 ± 6,5 [†]	107,2 ± 2,4 [†]	8g	41,2 ± 0,7	39,2 ± 1,5	71,7 ± 8,2	27,9 ± 0,7
7h	15,1 ± 1,1 ^{&}	51,4 ± 8,2 [†]	61,7 ± 8,9 [†]	23,4 ± 2,4 [†]	8h	33,0 ± 1,9	46,1 ± 4,8	>100	35,8 ± 1,9
7i	nd	nd	nd	nd	8i	28,2 ± 2,7	25,0 ± 4,0	97,9 ± 4,3	20,0 ± 2,1
7j	122,2 ± 1,7 ^{&}	>100	nd	72,4 ± 2,6	8j	17,2 ± 0,9	16,4 ± 0,1	37,9 ± 5,6	17,6 ± 3,1
7k	nd	nd	nd	nd	8k	35,9 ± 4,4	nd	nd	45,9 ± 0,5

Tabela 6. Valores de IC₅₀ das chalconas (**7a-x**) e pirazolinas (**8a-x**) frente a YopH de *Yersinia enterocolitica*, PtpA e PtpB de *Mycobacterium tuberculosis* (continuação).

7l	nd	nd	nd	239.3 ± 1.4	8l	53,7 ± 2,4	86,8 ± 3,3	nd	42.8 ± 1.6
7m	245,6 ± 5,6 ^{&}	nd	nd	nd	8m	39,1 ± 5,3	Nd	nd	39.9 ± 3.3
7n	nd	nd	nd	nd	8n	32,1 ± 3,9	87,2 ± 3,5	nd	47.5 ± 1.2
7o	>100	>100 [†]	15,1 ± 4,2 [†]	263.0 ± 3.0 [†]	8o	54,9 ± 2,6	Nd	>100	nd
7p	32,8 ± 6,4	>100*	39,5 ± 1,1*	213.8 ± 8.5*	8p	8,9 ± 0,8	25,1 ± 0,8	22,0 ± 1,9	15.6 ± 1.0
7q	38,6 ± 0,6 ^{&}	nd [†]	173,8 ± 35,9 [†]	52.5 ± 12.9	8q	39,5 ± 0,7	35,2 ± 4,7	35,2 ± 0,6	25.4 ± 4.0
7r	nd	nd	nd	nd	8r	49,8 ± 0,7	Nd	nd	nd
7s	>100	11,9 ± 1,6 [†]	>100 [†]	3090.3 ± 168.0 [†]	8s	36,8 ± 1,8	63,7 ± 0,8	26,9 ± 2,7	36.8 ± 1.4
7t	>100	nd	nd	nd	8t	nd	Nd	nd	nd
7u	nd	nd	nd	nd	8u	nd	Nd	nd	nd
7v	nd	nd [†]	83,2 ± 17,2 [†]	nd	8v	nd	Nd	nd	nd
7w	>100	>100*	50,2 ± 2,1*	158.5 ± 5.3*	8w	20,0 ± 3,3	36,2 ± 7,0	45,2 ± 3,5	26.2 ± 0.4
7x	nd	nd	nd	nd	8x	>100	Nd	nd	nd

Os resultados são apresentados como média ± DP (desvio padrão) de pelo menos três experimentos independentes; nd = não determinado (não mostraram inibição da fosfatase ≥30% a 25 µM); *mostrado anteriormente nas referências 37 e 38; † mostrado anteriormente na referência 39; & mostrado anteriormente na referência 40. nd = não determinado.

Comparando os valores de IC_{50} das chalconas previamente obtidas com os valores de IC_{50} das pirazolininas pode-se observar:

No que diz respeito à PtpA de Mtb, as chalconas com melhores atividades foram **7a**, **7c**, **7d** e **7o** ($IC_{50} = 8,4-32,1 \mu M$). Entre as correspondentes 1,3,5-triarilpirazolininas, **8a**, **8c**, **8d** e **8o** nenhuma apresentou inibição superior às chalconas ($IC_{50} = 37,6$ a $>100 \mu M$). Entre todas as pirazolininas avaliadas, **8f** ($IC_{50} = 36,5 \mu M$), **8p** ($IC_{50} = 22,0 \mu M$), **8q** ($IC_{50} = 35,2 \mu M$), **8s** ($IC_{50} = 26,9 \mu M$) e **8w** ($IC_{50} = 45,2 \mu M$) foram mais ativos que as chalconas correspondentes.

Frente à PtpB de Mtb, as chalconas com melhor atividade inibitória foram **7e** ($IC_{50} = 25,2 \mu M$) e **7s** ($IC_{50} = 11,9 \mu M$), ambas com o grupo 2-naftila em um dos anéis. Suas 1,3,5-triarilpirazolininas correspondentes, **8e** e **8s**, não mostraram atividade inibitória significativamente melhor do que as chalconas ($IC_{50} = 23,9 \mu M$ e $63,7 \mu M$, respectivamente). Analisando todas as pirazolininas, **8c** ($IC_{50} = 13,7 \mu M$), **8d** ($IC_{50} = 16,4 \mu M$), **8f** ($IC_{50} = 17,1 \mu M$) e **8j** ($IC_{50} = 19,1 \mu M$) mostraram os melhores resultados de inibição. É interessante notar que essas quatro moléculas também possuem o grupo 2-naftila em comum em um dos anéis, de forma semelhante às chalconas mais ativas. No entanto, suas chalconas correspondentes, **7c**, **7d**, **7f** e **7j**, apresentaram inibição da PtpB moderada ou menos significativa ($IC_{50} = 57,2 \mu M$ a $>100 \mu M$).

Frente a YopH de *Yersinia enterocolitica*, os compostos com melhor atividade inibitória entre as chalconas foram **7f** ($IC_{50} = 20,3 \mu M$), **7g** ($IC_{50} = 9,9 \mu M$) e **7h** ($IC_{50} = 15,4 \mu M$). Entre as 1,3,5-triarilpirazolininas correspondentes, **8f** ($IC_{50} = 13,1 \mu M$), **8g** ($IC_{50} = 41,2 \mu M$) e **8h** ($IC_{50} = 33,0 \mu M$), apenas **8f**, que têm o grupo 2-naftila em ambos os anéis, apresentou atividade inibitória melhor que sua chalcona correspondente **7f**. Dentre todas as pirazolininas avaliadas frente à YopH, os compostos **8b**, **8c**, **8f**, **8j**, **8p** e **8w** apresentaram os melhores resultados ($IC_{50} = 8,8-21,8 \mu M$). É interessante observar que as chalconas correspondentes **7b**, **7c**, **7j**, **7w** não apresentaram inibição significativa frente a YopH ($IC_{50} = 50 > 100 \mu M$), apenas **7f** e **7p** mostraram atividade moderada ($IC_{50} = 20,3 \mu M$ e $32,8 \mu M$, respectivamente).

As 1,3,5-triaril-2-pirazolininas, **8d**, **8e**, **8g**, **8h**, **8i**, **8k**, **8l**, **8m**, **8n**, **8o**, **8q**, **8r** e **8s** apresentaram atividade inibitória moderada frente à YopH ($IC_{50} = 27,3-58,4 \mu M$), enquanto **8t**, **8u**, **8v** e **8x** não mostraram atividade significativa.

Estes resultados mostram que as pirazolininas sintetizadas, de modo geral, foram mais ativas como inibidores de PTPs que as chalconas, mostrando uma preferência por YopH de *Y. enterocolitica*. Assim, com

base nos resultados de IC₅₀ das pirazolininas frente à YopH, foi feito um estudo comparativo com a intenção de estabelecer as características estruturais que são importantes para a atividade inibitória das moléculas testadas.

Entre as 1,3,5-triaril-2-pirazolininas que mostraram melhor atividade inibitória frente à YopH (**8b**, **8c**, **8f**, **8j**, **8p** e **8w**, IC₅₀ = 8,8-21,8 µM), todas têm o grupo naftila na posição 1 ou 2. A maioria das moléculas possui o grupo naftila no anel B, só **8j** tem o grupo naftila no anel A e **8f** tem o grupo 2-naftila em ambos os anéis.

As pirazolininas com o grupo 3,4-metilenodioxifenil no anel A ou B (**8g**, **8h** e **8q**) apresentaram atividade moderada (IC₅₀ = 33,0 - 41,2 µM) ou não significativa (**8t**, **8u** e **8v**).

As pirazolininas **8b**, **8c**, **8p** e **8w** possuem grupos doadores de elétrons no anel A, que aumentam a densidade eletrônica, acompanhado do grupo naftila no anel B. As demais pirazolininas com esta mesma característica eletrônica no anel mostraram atividade moderada (**8a** e **8i**, IC₅₀ = 58,4 µM e 28,7 µM, respectivamente) ou não significativa (**8x**, IC₅₀ = >100 µM).

As pirazolininas com o grupo naftila em um dos anéis, acompanhado por grupos retiradores de elétrons (que reduzem a densidade eletrônica) no outro anel, apresentaram, em geral, atividade inibitória moderada (**8d**, **8e**, **8k**, **8l**, **8n** e **8s**, IC₅₀ = 27,3 - 53,7 µM), exceto **8j** (IC₅₀ = 17,2 µM), que mostrou boa atividade. Os compostos **8m**, **8o** e **8r** (IC₅₀ = 39,1 - 54,9 µM) também apresentaram atividade moderada.

Através das discussões da relação estrutura-atividade, percebe-se que a presença do grupo naftila é bastante importante para a atividade inibitória da YopH. É importante notar também que a substituição de grupos doadores de elétrons por grupos retiradores de elétrons é bem tolerada. Pode-se observar que a modificação estrutural das chalconas ativas como inibidores de PtpA e/ou PtpB de Mtb e de YopH de *Y. enterocolitica*, o qual tem uma estrutura flexível e plana, para uma estrutura mais rígida como a das pirazolininas, provocou perda da atividade, quando comparada aos compostos correspondentes. Porém, foram identificadas novas pirazolininas que mostraram atividade inibitória significativa frente às Ptps, principalmente para YopH de *Y. enterocolitica* (**8b**, **8c**, **8f**, **8j**, **8p** e **8w**).

Para analisar o efeito do anel *N*-fenil na atividade inibitória, foram sintetizados análogos dos melhores inibidores de YopH (**8c**, **8f**, **8j**, **8p** e **8w**): as 1-acetil-3,5-diaril-2-pirazolininas **9c**, **9f**, **9j**, **9p** e **9w**. Esses compostos foram testados *in vitro* frente à PtpA e PtpB de Mtb e frente a YopH de *Y. enterocolitica*. Os compostos **9c**, **9f**, **9p** e **9w**, sem o anel *N*-

fenil, não mostraram inibição $\geq 30\%$ frente as fosfatases. Esses resultados sugerem que o anel *N*-fenil é importante para a atividade inibitória. No entanto, o composto **9j**, que possui um grupo retirador (NO_2) no anel B, mostrou uma inibição $>$ que 40% e um valor de IC_{50} de $25,5 \pm 0,7 \mu\text{M}$.

Devido a este último resultado, foram sintetizadas e avaliadas as atividades de todos os análogos de 1-acetil-3,5-diaril-2-pirazolinas (**9a**, **9b**, **9d**, **9e**, **9g**, **9h**, **9i**, **9k**, **9l**, **9m**, **9n**, **9o**, **9t**, **9r**, **9s**, **9t**, **9u**, **9v** e **9x**, Tabela 7). Dentre estes, cinco compostos (**9e**, **9k**, **9l**, **9n** e **9q**) mostraram uma atividade moderada frente à YopH ($\text{IC}_{50} = 21,0\text{-}30,3 \mu\text{M}$), mas não para PtpA, PtpB e PTP1B, indicando que, em alguns casos, o anel *N*-fenil não é essencial para a atividade frente a YopH, mas limita a atividade. No caso dos compostos **9e**, **9k**, **9l**, **9n** e **9q**, a ausência de anel de *N*-fenil aumentou a atividade frente à YopH quando comparado com os seus análogos **8e**, **8k**, **8l**, **8n** e **8q** (Tabela 6). Coincidentemente, as 1-acetil-3,5-diaril-2-pirazolinas **9e**, **9k**, **9l**, **9n** e **9q**, bem como **9j**, possuem grupos retiradores de elétrons nos anéis B (**9k**, **9j**, **9l**, **9n** e **9q**) ou A (**9e**), diferente dos compostos **9b**, **9c**, **9f**, **9p** e **9w**, que possuem grupos doadores de elétrons, o que pode ser uma explicação para a diferença nas atividades. No entanto, alguns compostos com grupos retiradores de elétrons em um dos anéis não se mostraram ativos frente a YopH (**9d**, **9g**, **9h** e **9r**).

Mas, de maneira geral, as 1-acetil-3,5-diaril-2-pirazolinas se mostraram menos ativas frente à PtpA e PtpB de *Mtb* e à YopH de *Y. enterocolitica*.

Tabela 7. Valores de inibição e IC_{50} das 1-acetil-3,5-diaril-2-pirazolinas (**9a-x**) frente à YopH de *Yersinia enterocolitica*, PtpA and PtpB from *Mycobacterium tuberculosis*.

	YopH Inibição % \pm DP	IC_{50} YopH $\mu\text{M} \pm$ DP	PtpB inibição % \pm DP	IC_{50} PtpB $\mu\text{M} \pm$ DP	PtpA inibição % \pm DP	IC_{50} PtpA $\mu\text{M} \pm$ DP
9a	0	nd	0	nd	0	Nd
9b	0	nd	$23.3 \pm$ 1.9	nd	9.5 ± 6.2	Nd
9c	0	nd	9.0 ± 2.8	nd	8.1 ± 3.6	Nd
9d	25.5 ± 2.9	nd	0	nd	0	Nd

Tabela 7. Valores de inibição e IC₅₀ das 1-acetil-3,5-diaril-2-pirazolinias (**9a-x**) frente à YopH de *Yersinia enterocolitica*, PtpA and PtpB from *Mycobacterium tuberculosis*.

9e	55.2 ± 5.5	29.2 ± 0.2	0	nd	0	Nd
9f	10.5 ± 6.3	nd	0	nd	11.1 ± 3.6	Nd
9g	18.8 ± 13.5	>100	0	nd	0	Nd
9h	6.1 ± 4.9	nd	0	nd	0	Nd
9i	19.3 ± 2.6	nd	0	nd	0	Nd
9j	41.6 ± 1.1	25.5 ± 0.9	0	nd	15.1 ± 6.6	Nd
9k	36.4 ± 2.1	27.5 ± 8.3	0	nd	10.2 ± 4.0	Nd
9l	39.2 ± 14.0	30.3 ± 0.3	0	nd	0	Nd
9m	80.3 ± 1.1	nd	0	nd	7.5 ± 6.9	Nd
9n	54.3 ± 11.9	26.6 ± 1.8	10.6 ± 3.8	nd	14.8 ± 1.5	Nd
9o	16.4 ± 8.7	nd	27.4 ± 2.3	nd	13.8 ± 7.1	Nd
9p	15.1 ± 1.7	nd	0	nd	14.3 ± 2.7	Nd
9q	51.5 ± 2.3	21.0 ± 3.1	27.7 ± 1.8	nd	24.6 ± 9.0	Nd
9r	0	nd	0	nd	0	Nd
9s	5.8 ± 4.0	nd	0	nd	0	Nd
9t	4.1 ± 3.9	nd	0	nd	0	Nd
9u	7.6 ± 1.7	nd	0	nd	0	Nd
9v	8.2 ± 5.1	nd	0	nd	0	Nd
9w	11.5 ± 6.4	nd	0	nd	11.0 ± 3.4	Nd
9x	7.4 ± 4.3	nd	0	nd	0	Nd

nd = não determinado. Os resultados são apresentados como média ± DP (desvio padrão) de pelo menos três experimentos independentes; nd = não determinado (não apresentaram inibição ≥ 30% à 25 µM).

Como as pirazolinias **9a-x** não apresentaram atividade significativa, não foram realizados os testes frente à proteína PTP1B humana.

6.3.1. Cinética enzimática

Estudos de cinética enzimática são frequentemente empregados para determinação das propriedades de um inibidor. Os inibidores podem afetar uma reação enzimática de duas formas: (i) inibidor reversível – pode ligar-se à enzima e ser liberado em seguida, deixando-a em sua condição original; e (ii) inibidor irreversível – reage com a enzima resultando em uma modificação que a torna enzimaticamente inativa, de tal forma que sua atividade original não pode ser regenerada, ou é regenerada muito lentamente.¹⁴³

Dentre os inibidores reversíveis, duas classes podem ser diferenciadas com base na enzima à qual se ligam, os inibidores competitivos e os não-competitivos. Os primeiros podem ligar-se ao sítio ativo e bloqueiam o acesso do substrato à ele. A segunda classe inclui inibidores que se ligam à enzima em um sítio diferente do ativo e provocam mudança na estrutura da enzima; assim o substrato ainda pode ligar-se ao sítio ativo, mas a enzima não pode catalisar a reação.¹⁴⁴

Com base nos valores de IC_{50} , foi investigado o mecanismo de inibição dos seis compostos mais potentes (**8b**, **8c**, **8f**, **8j**, **8p** e **8w**) frente YopH de *Y. enterocolitica*, utilizando diferentes concentrações de pNPP como substrato. Os gráficos de Lineweaver-Burk (Figura 42) foram obtidos com três concentrações diferentes de inibidor: todas as linhas convergem para o eixo x ($1/K_{Mapp}$), enquanto no eixo y ($1/V_{max}$) a interceptação varia com a concentração de inibidor. O valor constante de K_{Mapp} e o aumento dos valores de $1/V_{max}$ (proporcional ao aumento da concentração do inibidor) indicam que estes compostos são inibidores não competitivos, com afinidade pela enzima livre e pelo complexo enzima-substrato. Os valores de K_i (interação proteína-inibidor) obtidos variam de 2,7-15,8 μ M (Tabela 8).

Os compostos **8c** e **8p** foram também os mais ativos em PTP1B humana. Então, os parâmetros cinéticos foram também determinados para essa enzima (Tabela 8). Assim como para YopH, ambos os compostos exibiram inibição não-competitiva frente à PTP1B (Figura 43), com valores de K_i de 8,5 e 10,2 μ M, respectivamente.

Figura 42. Perfil de inibição do compostos **8b**, **8c**, **8f**, **8j**, **8p** e **8w** frente à YopH de *Yersinia enterocolitica*. Os experimentos cinéticos foram conduzidos com concentração crescente dos inibidores: 0 μM (\circ), 4 μM (\blacklozenge), 10 μM (\blacksquare), 12 μM (\square), 15 μM (\diamond), 20 μM (\triangle), 25 μM (\blacktriangle), 30 μM (\bullet), 35 μM (\times); pNPP foi utilizado como substrato em todos os experimentos (μM). As análises foram feitas em duplicata em pelo menos cinco experimentos independentes.

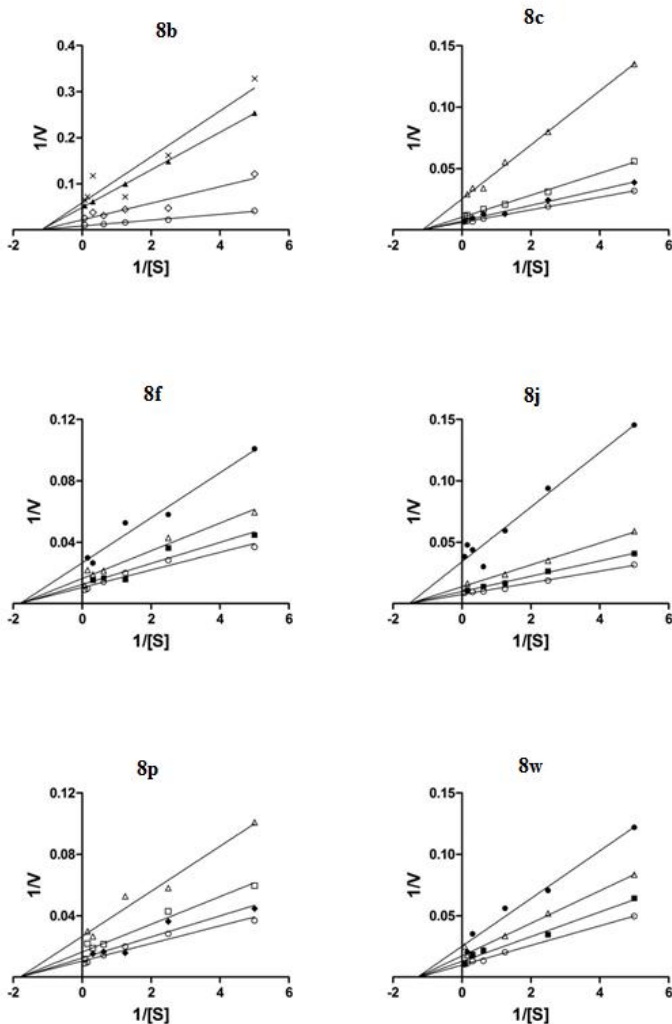
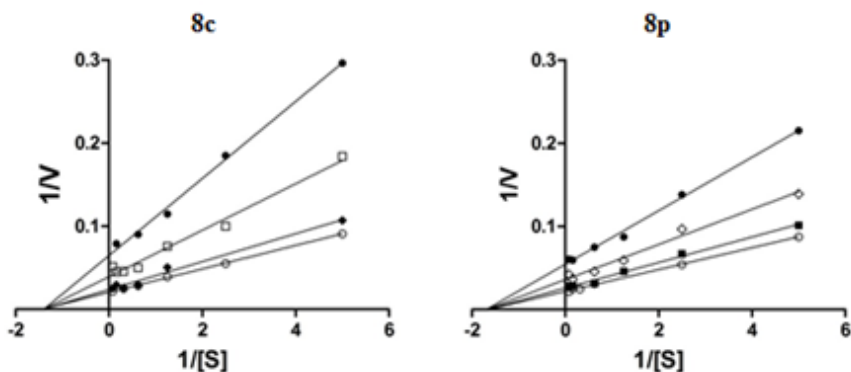


Tabela 8. Valores de K_i dos inibidores frente YopH de *Y. enterocolitica* e PTP1B humana.

Composto	Anel A	Anel B	K_i YopH $\mu\text{M} \pm \text{DP}$	K_i PTP1B $\mu\text{M} \pm \text{DP}$
8b	3 -OCH ₃ ,4-OH- fenila	2-naftila	6.5 ± 2.7	nd
8c	3,4-OCH ₃ -fenila	2-naftila	4.5 ± 0.7	8.5 ± 1.1
8f	2-naftila	2-naftila	2.7 ± 1.1	nd
8j	2-naftila	3-NO ₂ - fenila	3.7 ± 1.1	nd
8p	2,5-OCH ₃ -fenila	1-naftila	9.8 ± 3.8	10.2 ± 1.6
8w	2-OH-fenila	1-naftila	15.8 ± 3.0	Nd

Os resultados são apresentados como média \pm DP (desvio padrão) de pelo menos três experimentos independentes; nd = não determinado.

Figura 43. Perfil de inibição dos compostos **8c** e **8p** frente à PTP1B humana. Os experimentos cinéticos foram conduzidos com concentração crescente dos inibidores: 0 μM (○), 4 μM (◆), 10 μM (■), 12 μM (□), 15 μM (◇), 20 μM (△), 25 μM (▲), 30 μM (●), 35 μM (×); *p*NPP foi utilizado como substrato em todos os experimentos. As análises foram feitas em duplicate em pelo menos cinco experimentos independentes.



6.4. Modelagem molecular

A modelagem molecular foi realizada pelo Dr. Mattia Mori e Dra. Alessandra Mascarello na Università La Sapienza, em Roma-Itália, coordenado pelo Prof. Dr. Bruno Botta.

As 1,3,5-triaril-2-pirazolinas mais ativas, **8c** e **8p**, foram avaliadas por *docking* molecular usando uma estrutura cristalográfica da PTP1B humana¹⁴⁵ e YopH¹⁴⁶ de *Yersinia* depositadas no PDB. Uma vez que cada molécula foi testada *in vitro* como mistura racêmica, foram considerados para o *docking* os enantiômeros R e S. Com base em previsões de pKa e valores de pH fisiológicos, **8p** e **8c** foram modelados na sua forma neutra não-protonada. Um experimento de *docking* preliminar foi realizado com o programa AutoDock4 para identificar o local de ligação mais adequado para estas moléculas sobre toda a superfície dos alvos receptores. Então **8p** e **8c** foram modelados dentro do possível sítio de ligação por meio dos programas AutoDock4, Gold e Fred.

Os complexos enzima-ligante tiveram as suas energias minimizadas considerando água como solvente. Uma vez que todos os programas de *docking* geraram posições muito similares, selecionamos os resultados do programa Fred, pelo fato deste ser mais rápido entre todos os programas testados.

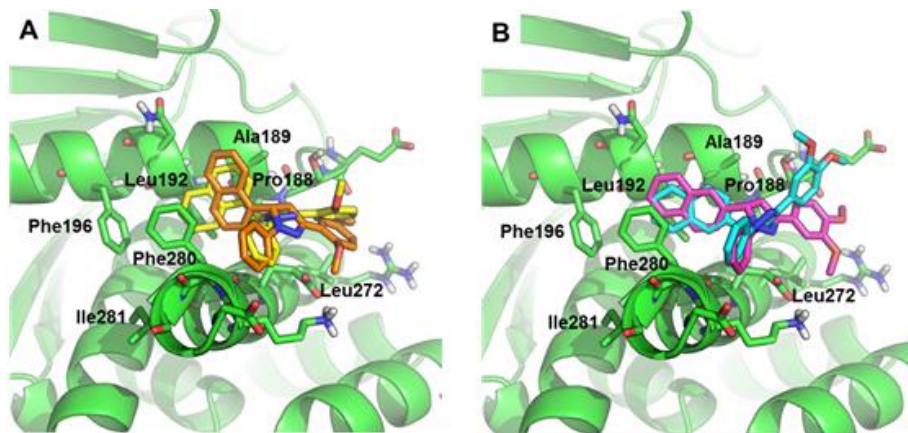
6.4.1. *Docking* molecular das 1,3,5-triaril-2-pirazolinas com PTP1B

No experimento de *docking* dos compostos em PTP1B, foi identificado um sítio de ligação para **8c** e **8p** próximo aos resíduos Ala189 e Phe280 (numeração dos resíduos segue o esquema da estrutura cristalográfica), que é cerca de 20 Å de distância do sítio catalítico. A ligação de moléculas pequenas a este sítio já foi mostrada com inibidores alostéricos da atividade catalítica de PTP1B¹⁴⁵, e do mesmo modo, nossos estudos cinéticos na PTP1B com as pirazolinas **8c** e **8p** revelaram este padrão, e isso comprova a confiabilidade das previsões feitas por *docking*.

Ambos os enantiômeros de **8p** e **8c** foram docados dentro do sítio alostérico da PTP1B utilizando os dados de maior precisão de cada programa de *docking*. Em geral, a ligação dessas pirazolinas parece ser dirigida principalmente por interações hidrofóbicas. O anel naftila se encaixa perfeitamente dentro de um bolsão hidrofóbico delimitado por resíduos de Pro188, Ala189, Leu192, Phe196, Leu232, Leu272, Gly277, Phe280 e Ile281 formando uma espécie de “sanduíche” através de interações do tipo π - π com Phe280 e Phe196, respectivamente (Figura

44). Phe280 também interage com o anel *N*-fenil de **8c** e **8p**. O anel fenílico substituído por metoxilas parece não participar na ligação à proteína. Este modo de ligação, o qual é comum a ambos os enantiômeros, bem como em ambas as pirazolinas, sugere que a configuração estereoquímica de **8c** e **8p** pode não ser relevante para a inibição da PTP1B. Por fim, uma boa sobreposição entre os anéis naftilas de **8c** e **8p** e o esqueleto benzofurano do inibidor alostérico da estrutura cristalográfica enfatiza a relevância dos grupos hidrofóbicos/aromáticos das pirazolinas para a ligação com a PTP1B.

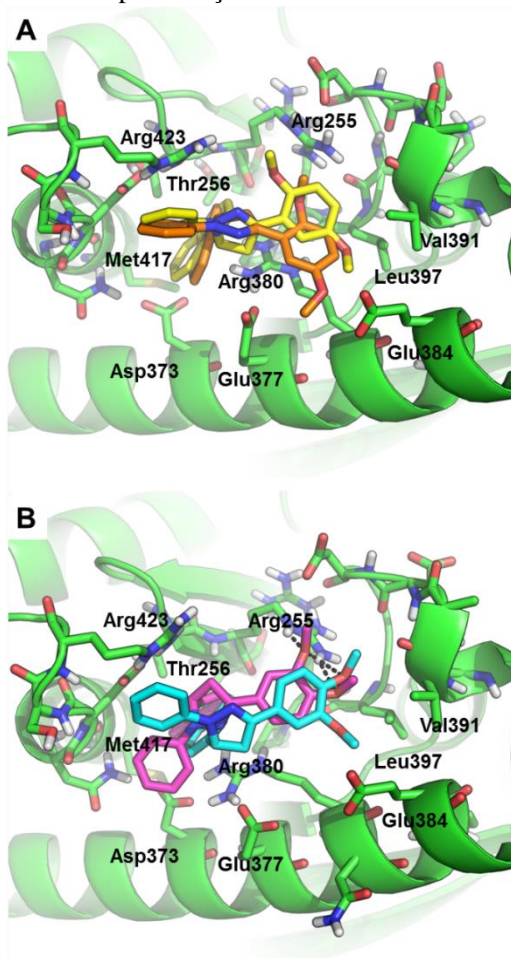
Figura 44. Modo de ligação dos compostos **8c** e **8p** dentro do sítio alostérico da PTP1B, proposto por *docking* molecular. A proteína está representada pelo desenho verde. Os resíduos com 6 Å de distância de **8c** e **8p** estão representados por traços verdes. A proteína é mantida com a mesma orientação em ambas as figuras. A) **(R)-8p** está representada por traços amarelos, **(S)-8p** traços laranjas. B) **(R)-8c** está representado por traços azuis, **(S)-8c** traços magenta. Hidrogênios não polares foram omitidos para maior clareza da representação.



6.4.2. *Docking* molecular das 1,3,5-triaril-2-pirazolinas com YopH

Ao contrário da PTP1B, o *docking* da estrutura cristalina da YopH revelou dois possíveis sítios de ligação para as pirazolinas. No entanto, a energia prevista por AutoDock para **8p** e **8c** é significativamente menor para um dos sítios de ligação analisados nos experimentos de *docking*. Este sítio está localizado dentro de um bolsão hidrofóbico formado por resíduos de Thr254, Thr256, Val372, Ala376, Tyr383, Val391, Leu397, Pro399, Leu413 e Met417 a cerca de 25 Å do sítio catalítico. As possibilidades das pirazolinas se ligarem a um sítio alostérico corroboram com o mecanismo de inibição não-competitivo observado *in vitro*. Os resíduos polares de Arg255, Asp373, Glu377, Arg380, Glu384, Asp394 e Arg423 completam o sítio de ligação na área acessível ao solvente. Os resultados de *docking* mostram que os compostos se ligam de maneira muito semelhante. Como observado na PTP1B é provável que a ligação de **8p** e **8c** na YopH seja impulsionada principalmente pelas forças lipofílicas, com o anel naftila se encaixando muito bem no bolsão hidrofóbico próximo aos resíduos de Pro399, Thr256, Thr256 e Met417 promovendo uma interação cátion- π com a cadeia lateral de Arg380 (Figura 45). O anel *N*-fenila é exposto ao solvente e bem estabilizado por uma interação cátion- π com a cadeia lateral de Arg423 (apenas o anel *N*-fenil de (**S**)-**8c** parece ter uma orientação desfavorável para este tipo de interação do tipo catiôn π). O anel fenila contendo os substituintes metoxilas são incluídos em uma “sub-bolsa” formada por Leu397, Val391 e Arg255. Os grupos metoxilas de **8c** fazem ligações de H com a cadeia lateral da Arg255 (linhas tracejadas na Figura 45), enquanto que os de **8p** não, proporcionando assim uma possível explicação estrutural para a maior atividade inibidora *in vitro* de **8c** em relação à **8p**.

Figura 45. Modo de ligação dos compostos **8c** e **8p** dentro do sítio alostérico de YopH, proposto por *docking* molecular. A proteína está representada pelo desenho verde. Os resíduos com 6 Å de distância de **8c** e **8p** estão representados por traços verdes. A proteína é mantida com a mesma orientação em ambas as figuras. A) **(R)-8p** está representada por traços amarelos, **(S)-8p** traços laranjas. B) **(R)-8c** está representado por traços azuis, **(S)-8c** traços magenta. Ligações de hidrogênio são representadas por linhas pretas. Hidrogênios não polares foram omitidos para maior clareza da representação.



7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Capítulo 1:

Explorando o planejamento, síntese e avaliação biológica, este trabalho conduziu a identificação de uma série de trinta e três bis-chalconas simétricas (dezoito inéditas), como inibidores da proteína ABCG2. Foram identificados dois inibidores da proteína ABCG2, **3p** e **6i**, ambos contendo dois grupos metoxilas como substituintes em cada anel das extremidades das bis-chalconas, confirmando assim o que já estava sendo observado nos trabalhos anteriores: grupos metoxilas em posições estratégicas são essenciais para a atividade.

Baseados nestes resultados e nos trabalhos já publicados anteriormente, como perspectivas desse trabalho, propõe-se a síntese de novas moléculas que possam conferir melhor atividade inibitória frente a proteína ABCG2 e ao mesmo tempo, que não apresentem toxicidade para o ser humano.

Capítulo 2:

Explorando o planejamento, síntese e avaliação biológica, este trabalho conduziu a identificação de uma série de vinte e quatro 1,3,5-triaril-2-pirazolinas (vinte inéditas) e uma série de vinte e quatro 1-acetil-3,5-diaril-2-pirazolinas (dezesesseis inéditas), como inibidores de PTPs, que, de um modo geral, foram mais ativas do que as suas chalconas precursoras, principalmente frente à proteína YopH de *Yersinia enterocolitica*. Foram identificados dois inibidores de PTPs promissores (**8c** e **8p**), que podem auxiliar na busca de agentes para o tratamento de infecções provocadas por *Yersinia sp.* ou Mtb. Determinou-se também o mecanismo de ação destes inibidores em YopH através de estudos cinéticos e modelagem molecular, concluindo-se que são inibidores não competitivos, que atuam em um sítio alostérico da proteína. Como perspectiva do trabalho, pretende-se identificar o sítio alostérico da YopH, separar os enantiômeros *R* e *S* dos inibidores **8c** e **8p** e avaliar sua atividade inibitória frente a proteína YopH.

8. PARTE EXPERIMENTAL

8.1. Capítulo 1

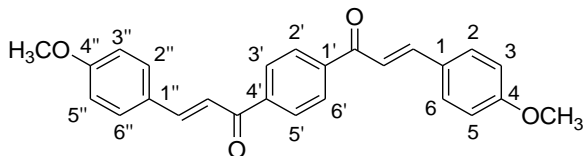
8.1.1. Preparação e caracterização dos compostos 3a-q e 6a-p

As reações foram monitoradas por cromatografia de camada fina (CCF), utilizando placas de alumínio com sílica gel 60GF 254 da Merck, visualização em luz ultravioleta ($\lambda = 254$ e 366 nm) e revelação com pulverização de vanilina sulfúrica (3g de vanilina, 3 mL de ácido sulfúrico em 100 mL de etanol).

Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H (400 MHz e 200MHz) e de ^{13}C (100 MHz e 50MHz) foram realizados em equipamento VARIAN OXFORD AS-400 e Bruker Ac-200F, tendo como referência interna o tetrametilsilano (TMS). Foram utilizados clorofórmio (CDCl_3), dimetilsulfóxido ($\text{DMSO-}d_6$) e acetona deuterados como solvente nas análises. Os pontos de fusão não corrigidos dos compostos foram determinados em aparelho digital de ponto de fusão, MGAPH-301, Microquímica Equipamentos Ltda. Os reagentes e solventes utilizados nesta pesquisa foram das marcas comerciais: Aldrich, Merck, Sigma, Fluka e Vetec. Os dados de espectro de massa de alta resolução (HRMS) foram coletados em espectrômetro de massa Bruker micrOTOF-QII, com fotoionização à pressão atmosférica (APPI-MS) no modo positivo. Todas as estruturas foram desenhadas no programa ChemBioDraw Ultra e os espectros tratados no programa ACD/SpecManager.

8.1.1.1. Procedimento geral para a síntese de chalconas 3a-p

Em um balão de fundo redondo, de 50 mL e 1 boca, foram adicionados 1 mmol do 1,4-diacetilbenzeno, 2 mmol do benzaldeído correspondente em 20 mL de etanol. Após a solubilização dos reagentes, sob agitação magnética, adicionou-se de 20 a 60 gotas de KOH 50% p/v. A reação ficou sob agitação magnética e temperatura ambiente por 24 horas. Após este período foi adicionado ao meio reacional água destilada para a precipitação do produto, neutralizou-se o meio com solução de HCl 10% v/v, e o precipitado foi filtrado a vácuo em funil de Büchner. Os produtos foram recristalizados em etanol.



Nomenclatura: (2*E*,2'*E*)-1,1'-(1,4-fenileno)bis(3-(4-metoxifenil)prop-2-en-1-ona) **3a**.

Fórmula Molecular: C₂₆H₂₂O₄

Aspecto físico: Sólido amarelo

Peso Molecular: 398,45 g/mol

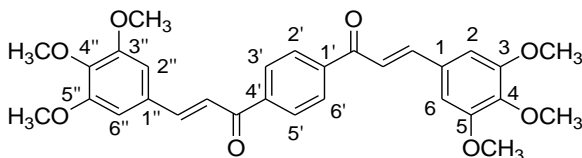
Rendimento: 79%

Ponto de fusão: 210-210,5°C

HRMS (APPI+) m/z: calculado para C₂₆H₂₂O₄ [M+H]⁺: 399,1591 encontrado, 399,1594.

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 8,10 (s, 4H, H2', H3', H5', H6'), 7,88 (d, 2H, Hβ, Hβ''), *J* = 15,5 Hz), 7,63 (d, 4H, H2, H2'', H6, H6''), *J* = 8,8 Hz), 7,41 (d, 2H, Hα, Hα''), *J* = 15,6 Hz), 6,96 (d, 4H, H3, H3'', H5, H5''), *J* = 8,8 Hz), 3,87 (s, 6H, *p*-OCH₃).

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 190,1 (C=O), 161,9 (C4, C4''), 145,5 (Cβ, Cβ''), 141,4 (C1', C4'), 130,7 (C2, C2'', C6, C6''), 128,5 (C2', C3', C5', C6'), 127,4 (C1, C1''), 119,6 (Cα, Cα''), 111,4 (C3, C3'', C5, C5''), 55,4 (*p*-OCH₃).



Nomenclatura: (2*E*,2'*E*)-1,1'-(1,4-fenileno)bis(3-(3,4,5-trimetoxifenil)prop-2-en-1-ona) **3b**.

Fórmula Molecular: C₃₀H₃₀O₈

Aspecto físico: Sólido amarelo

Peso Molecular: 518,55 g/mol

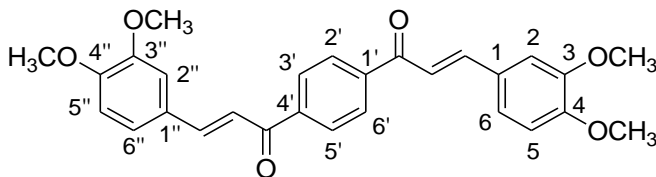
Rendimento: 82%

Ponto de fusão: 223-224°C

HRMS (APPI+) m/z: calculado para C₃₀H₃₀O₈ [M+H]⁺: 519,2013 encontrado, 519,2019.

RMN ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 8,12 (s, 4H, H2', H3', H5', H6'), 7,75 (d, 2H, Hβ, Hβ''), *J* = 15,6 Hz), 7,40 (d, 2H, Hα, Hα''), *J* = 15,6 Hz), 6,89 (s, 4H, H2, H2'', H6, H6''), 3,94 (s, 12H, *m*-OCH₃), 3,92 (s, 6H, *p*-OCH₃).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ/ppm : 190,1 (C=O), 153,5 (C3, C3''), C5, C5''), 146,0 (C β , C β ''), 141,3 (C1', C4'), 130,0 (C4, C4''), 128,6 (C2', C3', C5', C6'), 121,2 (C α , C α ''), 105,8 (C2, C2'', C6, C6''), 104,9 (C1, C1''), 61,0 (*p*-OCH₃), 58,2 (*m*-OCH₃).



Nomenclatura: (2*E*,2'*E*)-1,1'-(1,4-fenileno)bis(3-(3,4-dimetoxifenil)prop-2-en-1-ona) **3c**.

Fórmula Molecular: C₂₈H₂₆O₆

Aspecto físico: Sólido amarelo

Peso Molecular: 458,50 g/mol

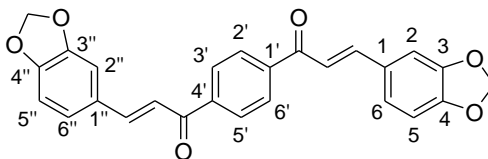
Rendimento: 84%

Ponto de fusão: 176,5-177°C

HRMS (APPI+) m/z: calculado para C₂₈H₂₆O₆ [M+H]⁺: 459,1802 encontrado, 459,1808.

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ/ppm : 8,11 (s, 4H, H2', H3', H5', H6'), 7,79 (d, 2H, H β , H β '', *J* = 15,6 Hz), 7,39 (d, 2H, H α , H α '', *J* = 15,6 Hz), 7,27 (dd, 2H, H6, H6''), *J* = 8,2 Hz, *J* = 1,9 Hz), 7,18 (d, 2H, H2, H2''), *J* = 1,9 Hz), 6,92 (d, 2H, H5, H5''), *J* = 8,2 Hz), 3,97 (s, 6H, *m*-OCH₃), 3,95 (s, 6H, *p*-OCH₃).

RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) δ/ppm : 190,1 (C=O), 151,7 (C3, C3''), 149,3 (C4, C4''), 145,9 (C β , C β ''), 141,4 (C1', C4'), 128,5 (C2', C3', C5', C6'), 127,6 (C1, C1''), 123,4 (C α , C α ''), 119,8 (C6, C6''), 111,1 (C2, C2''), 110,2 (C5, C5''), 55,9 (*m*-OCH₃, *p*-OCH₃).



Nomenclatura: (2*E*,2'*E*)-1,1'-(1,4-fenileno)bis(3-(benzo[d][1,3]dioxol-5il)prop-2-en-1-ona) **3d**.

Fórmula Molecular: C₂₆H₁₈O₆

Aspecto físico: Sólido amarelo

Peso Molecular: 426,42 g/mol

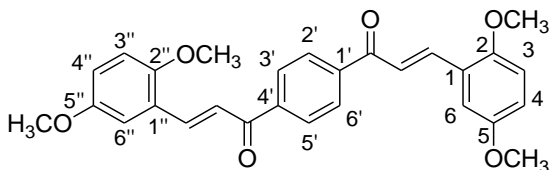
Rendimento: 76%

Ponto de fusão: 268-269°C

HRMS (APPI+) m/z: calculado para C₂₆H₁₈O₆ [M+H]⁺: 427,11761 encontrado, 427,11758.

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 8,29 (s, 4H, H₂', H₃', H₅', H₆'), 7,85 (m, 4H, H_β, H_β'', H_α, H_α''), 7,70 (s, 2H, H₂, H₂''), 7,37 (d, 2H, H₆, H₆'', *J* = 8,0 Hz), 7,02 (d, 2H, H₅, H₅'', *J* = 7,9 Hz), 6,13 (s, 4H, CH₂, CH₂'').

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 189,1 (C=O), 150,2 (C₃, C₃''), 148,5 (C₄, C₄''). 145,3 (C_β, C_β''), 141,2 (C₁', C₄'), 129,5 (C₁, C₁''), 129,1 (C₂', C₃', C₅', C₆'), 126,7 (C_α, C_α''), 120,4 (C₆, C₆''), 109,0 (C₅, C₅''), 107,5 (C₂, C₂''), 102,1 (CH₂, CH₂'').



Nomenclatura: (2*E*,2'*E*)-1,1'-(1,4-fenileno)bis(3-(2,5-dimetoxifenil)prop-2-en-1-ona) **3e**.

Fórmula Molecular: C₂₈H₂₆O₆

Aspecto físico: Sólido amarelo

Peso Molecular: 458,50 g/mol

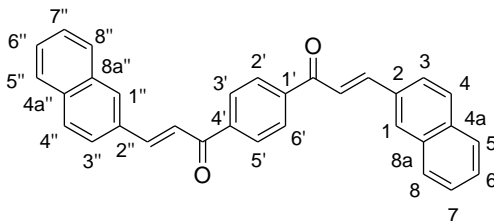
Rendimento: 82%

Ponto de fusão: 170-170,5°C

HRMS (APPI+) m/z: calculado para C₂₈H₂₆O₆ [M+H]⁺: 459,18022 encontrado, 459,18016.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 8,10 (d, 2H, H_β, H_β'', *J* = 16,0 Hz), 8,10 (s, 4H, H₂', H₃', H₅', H₆'), 7,59 (d, 2H, H_α, H_α'', *J* = 15,6 Hz), 7,18 (d, 2H, H₂, H₂'', *J* = 3,0 Hz), 6,97 (dd, 2H, H₄, H₄'', *J* = 8,9 Hz, *J* = 3,0 Hz), 6,89 (d, 2H, H₅, H₅'', *J* = 8,9 Hz), 3,88 (s, 6H, *o*-OCH₃), 3,83 (s, 6H, *m*-OCH₃).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 190,7 (C=O), 153,4 (C₆, C₆''), 141,3 (C_β, C_β''), 141,1 (C₁', C₄'), 128,6 (C₂', C₃', C₅', C₆'), 124,1 (C_α, C_α''), 122,9 (C₁, C₁''), 117,6 (C₅, C₅''), 113,8 (C₄, C₄''), 112,4 (C₂, C₂''), 56,1 (*o*-OCH₃), 55,8 (*m*-OCH₃).



Nomenclatura: (2*E*,2'*E*)-1,1'-(1,4-fenileno)bis(3-(naftalen-2-il)prop-2-en-1-ona) **3f**.

Fórmula Molecular: C₃₂H₂₂O₂

Aspecto físico: Sólido creme

Peso Molecular: 438,52 g/mol

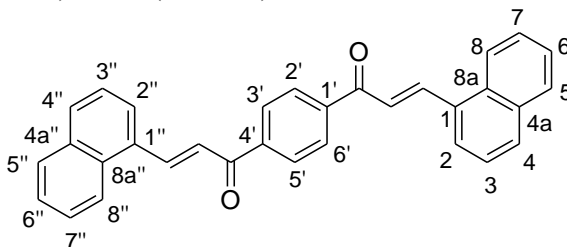
Rendimento: 80%

Ponto de fusão: 248-249°C

HRMS (APPI+) m/z: calculado for C₃₂H₂₂O₂ [M+H]⁺: 439,1693 encontrado, 439,1689

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 8,11 (s, 4H, H_{2'}, H_{3'}, H_{5'}, H_{6'}), 8,00 (d, 2H, H_β, H_{β''}, *J* = 15,9 Hz), 7,62 (d, 2H, H_α, H_{α''}, *J* = 15,7 Hz), 7,90-7,52 (m, 14H, anel naftila).

RMN ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 189,9 (C=O), 145,9 (C_β, C_{β''}), 141,7 (C_{1'}, C_{4'}), 139,8 (C₂, C_{2''}), 134,5 (C₄, C_{4''}), 133,3 (C_{4a}, C_{4a''}), 132,0 (C_{8a}, C_{8a''}), 130,9 (C₈, C_{8''}), 128,8 (C₅, C_{5''}), 128,6 (C_{2'}, C_{3'}, C_{5'}, C_{6'}), 127,8 (C₇, C_{7''}), 127,5 (C₆, C_{6''}), 126,8 (C₁, C_{1''}), 123,5 (C₃, C_{3''}), 121,9 (C_α, C_{α''}).



Nomenclatura: (2*E*,2'*E*)-1,1'-(1,4-fenileno)bis(3-(naftalen-1-il)prop-2-en-1-ona) **3g**.

Fórmula Molecular: C₃₂H₂₂O₂

Aspecto físico: Sólido amarelo

Peso Molecular: 438,52 g/mol

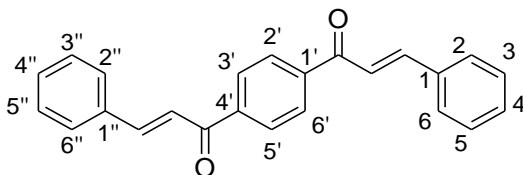
Rendimento: 81%

Ponto de fusão: 230-231°C

HRMS (APPI+) m/z: calculado para $C_{32}H_{22}O_2$ $[M+H]^+$: 439,1693 encontrado, 439,1699.

RMN 1H (200 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm : 8,72 (d, 2H, $H\beta$, $H\beta''$, $J = 15,4$ Hz), 8,21 (s, 4H, $H2'$, $H3'$, $H5'$, $H6'$), 7,65 (d, 2H, $H\alpha$, $H\alpha''$, $J = 15,5$ Hz), 8,29-7,55 (m, 14H, anel naftila).

RMN ^{13}C (50, MHz, $CDCl_3$) δ/ppm : 189,8 (C=O), 142,6 ($C\beta$, $C\beta''$), 141,3 ($C1'$, $C4'$), 133,7 ($C1$, $C1''$), 132,0 ($C4a$, $C4a''$), 131,7 ($C8a$, $C8a''$), 128,7 ($C2'$, $C3'$, $C4'$, $C6'$), 127,0 ($C4$, $C4''$), 126,3 ($C7$, $C7''$), 125,4 ($C3$, $C3''$), 125,2 ($C8$, $C8''$), 124,4 ($C\alpha$, $C\alpha''$), 123,3 ($C2$, $C2''$).



Nomenclatura: (2E,2'E)-1,1'-(1,4-fenileno)bis(3-fenilprop-2-en-1-ona) 3h.

Fórmula Molecular: $C_{24}H_{18}O_2$

Aspecto físico: Sólido creme

Peso Molecular: 338,40 g/mol

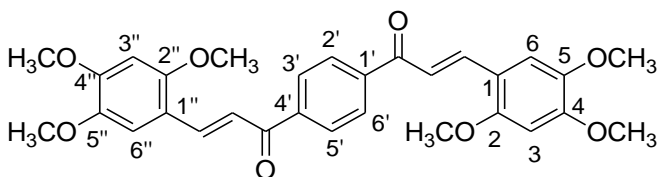
Rendimento: 92%

Ponto de fusão: 200-201°C

HRMS (APPI+) m/z: calculado para $C_{24}H_{18}O_2$ $[M+H]^+$: 339.1380 encontrado, 339.1376.

RMN 1H (200 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm : 8,12 (s, 4H, $H2'$, $H3'$, $H5'$, $H6'$), 7,85 (d, 2H, $H\beta$, $H\beta''$, $J = 15,6$ Hz), 7,67 m, 4H, $H2$, $H2''$, $H6$, $H6''$), 7,53 (d, 2H, $H\alpha$, $H\alpha''$, $J = 15,6$ Hz), 7,46 (m, 6H, $H3$, $H3''$, $H4$, $H4''$, $H5$, $H5''$).

RMN ^{13}C (50 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm : 190,0 (C=O), 145,8 ($C\beta$, $C\beta''$), 141,3 ($C1'$, $C4'$), 134,6 ($C1$, $C1''$), 130,8 ($C4$, $C4''$), 129,0 ($C2$, $C2''$, $C6$, $C6''$), 128,6 ($C2'$, $C3'$, $C5'$, $C6'$), 128,5 ($C3$, $C3''$, $C5$, $C5''$), 121,9 ($C\alpha$, $C\alpha''$).



Nomenclatura: (2*E*,2'*E*)-1,1'-(1,4-fenileno)bis(3-(2,4,5-trimetoxifenil)prop-2-en-1-ona) **3i**.

Fórmula Molecular: C₃₀H₃₀O₈

Aspecto físico: Sólido amarelo

Peso Molecular: 518,55 g/mol

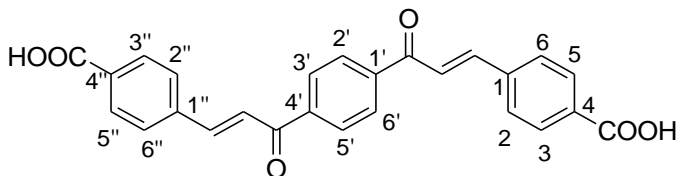
Rendimento: 90%

Ponto de fusão: 224,5-225°C

HRMS (APPI+) m/z: calculado para C₃₀H₃₀O₈ [M+H]⁺: 519.2013 encontrado, 519.2011.

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 8,09 (s, 4H, H₂', H₃', H₅', H₆'), 8,12 (d, 2H, H_β, H_β'', *J* = 15,6 Hz), 7,46 (d, 2H, H_α, H_α'', *J* = 15,6 Hz), 7,14 (s, 2H, H₆, H₆''), 6,53 (s, 2H, H₃, H₃''), 3,96 (s, 6H, *p*-OCH₃), 3,92 (s, 12H, *o*-CH₃, *m*-OCH₃).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 190,8 (C=O), 154,8 (C₂, C₂''), 152,8 (C₄, C₄''), 143,2 (C₅, C₅''), 141,6 (C₁, C₁''), 141,0 (C₁', C₄'), 128,5 (C₂', C₃', C₅', C₆'), 120,1 (C_α, C_α''), 111,3 (C₆, C₆''), 96,6 (C₃, C₃''), 56,5 (*p*-OCH₃), 56,0 (*o*-OCH₃, *m*-OCH₃).



Nomenclatura: (2*E*,2'*E*)-1,1'-(1,4-fenileno)bis(3-(4-carboxifenil)prop-2-en-1-ona) **3j**.

Fórmula Molecular: C₂₆H₁₈O₆

Aspecto físico: Sólido creme

Peso Molecular: 426,42 g/mol

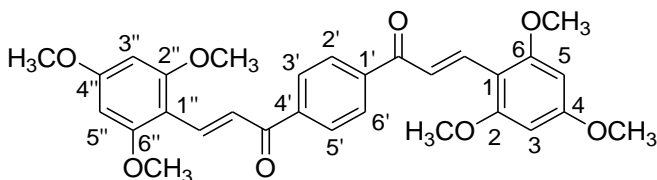
Rendimento: 61%

Ponto de fusão: >350°C

HRMS (APPI+) m/z: calculado para C₂₆H₁₈O₆ [M+H]⁺: 425.1020 encontrado, 425.1023.

RMN ¹H (200 MHz, DMSO-*d*₆) δ/ppm: 8,33 (s, 2H, COOH), 8,29 (d, 4H, H₂, H₂'', H₆, H₆'', *J* = 8,4 Hz), 8,12 (d, 4H, H₃, H₃'', H₅, H₅'', *J* = 8,5 Hz), 8,05 (m, 2H, H_β, H_β''), 8,03 (s, 4H, H₂', H₃', H₅', H₆'), 7,84 (d, 2H, H_α, H_α'', *J* = 15,6 Hz).

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ/ppm: 189,4 (C=O), 167,2 (COOH), 143,7 (C_β, C_β''), 141,0 (C₁', C₄'), 139,0 (C₁, C₁''), 132,7 (C₄, C₄''), 130,1 (C₂', C₃', C₅', C₆'), 129,4 (C₃, C₃'', C₅, C₅''), 128,9 (C₂, C₂'', C₆, C₆''), 124,6 (C_α, C_α'').



Nomenclatura: (2*E*,2'*E*)-1,1'-(1,4-fenileno)bis(3-(2,4,6-trimetoxifenil)prop-2-en-1-ona) **3k**.

Fórmula Molecular: C₃₀H₃₀O₈

Aspecto físico: Sólido amarelo

Peso Molecular: 518,55 g/mol

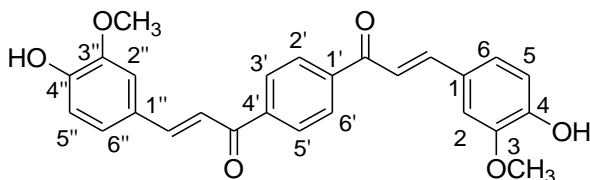
Rendimento: 83%

Ponto de fusão: 278-279°C

HRMS (APPI+) m/z: calculado para C₃₀H₃₀O₈ [M+H]⁺: 519.2013 encontrado, 519.2009

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 8.28 (d, 2H, H_β, H_{β'}, *J* = 15.9 Hz), 8.07 (s, 4H, H_{2'}, H_{3'}, H_{5'}, H_{6'}), 7.87 (d, 2H, H_α, H_{α'}, *J* = 15.8 Hz), 6.15 (s, 4H, H₃, H_{3''}, H₅, H_{5''}), 3.92 (s, 12H, *o*-OCH₃), 3.87 (s, 6H, *p*-OCH₃).

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 191.8 (C=O), 161.8 (C₂, C_{2''}, C₆, C_{6''}), 158.4 (C₄, C_{4''}), 142.1 (C_β, C_{β''}), 136.8 (C_{1'}, C_{4'}), 128.4 (C_{2'}, C_{3'}, C_{5'}, C_{6'}), 125.9 (C_α, C_{α''}), 106.6 (C₁, C_{1''}), 90.5 (C₃, C_{3''}, C₅, C_{5''}), 55.7 (*o*-OCH₃), 55.2 (*o*-OCH₃).



Nomenclatura: (2*E*,2'*E*)-1,1'-(1,4-fenileno)bis(3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)prop-2-en-1-ona) **3l**.

Fórmula Molecular: C₂₆H₂₂O₆

Aspecto físico: Sólido marrom

Peso Molecular: 430,45 g/mol

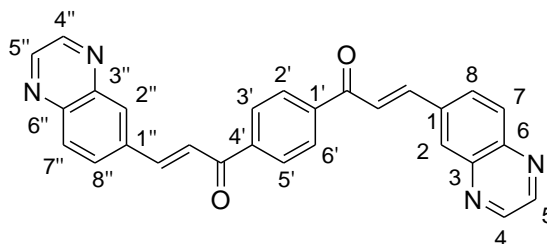
Rendimento: 60%

Ponto de fusão: 140-141,5°C

HRMS (APPI+) m/z: calculado for C₂₆H₂₂O₆ [M+H]⁺: 431,1489 encontrado, 431,1483

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 8,07 (s, 4H, H₂' , H₃' , H₅' , H₆'), 7,77 (d, 2H, H_β, H_β'', *J* = 15,6 Hz), 7,35 (d, 2H, H_α, H_α'', *J* = 15,6 Hz), 7,24 (dd, 2H, H₆, H₆'', *J* = 8,2 Hz, *J* = 1,9 Hz), 7,15 (d, 2H, H₂, H₂'', *J* = 1,8 Hz), 6,97 (d, 2H, H₅, H₅'', *J* = 8,2 Hz), 3,98 (s, 6H, *m*-OCH₃).

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 190,1 (C=O), 148,6 (C₃, C₃''), 146,8 (C₄, C₄''), 146,2 (C_β, C_β''), 142,0 (C₁' , C₄'), 128,5 (C₂' , C₃' , C₅' , C₆'), 127,1 (C₁, C₁''), 123,6 (C_α, C_α''), 119,5 (C₆, C₆''), 114,9 (C₅, C₅''), 110,1 (C₂, C₂''), 56,0 (*m*-OCH₃).



Nomenclatura: (2*E*,2'*E*)-1,1'-(1,4-fenileno)bis(3-(quinoxalin-6-il)prop-2-en-1-ona) **3m**.

Fórmula Molecular: C₂₈H₁₈N₄O₂

Aspecto físico: Sólido creme

Peso Molecular: 442,47 g/mol

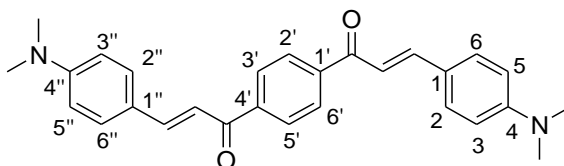
Rendimento: 89%

Ponto de fusão: > 350°C

HRMS (APPI+) m/z: calculado para C₂₈H₁₈N₄O₂ [M+H]⁺: 443,1503 encontrado, 443,1501.

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 8,90 (m, 4H, H₄, H₄' , H₅, H₅''), 8,37 (d, 2H, H₂, H₂'', *J* = 1,5 Hz), 8,22 (s, 4H, H₂' , H₃' , H₅' , H₆'), 8,14 (m, 4H, H₇, H₇'', H₈, H₈''), 8,07 (d, 2H, H_β, H_β'', *J* = 15,7 Hz), 7,76 (d, 2H, H_α, H_α'', *J* = 15,6 Hz).

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 189,2 (C=O), 146,0 (C_β, C_β''), 145,6 (C₄, C₄''), 144,0 (C₅, C₅''), 143,7 (C₃, C₃''), 143,0 (C₆, C₆''), 141,1 (C₁' , C₄'), 136,3 (C₁, C₁''), 130,8 (C₇, C₇''), 130,2 (C₂, C₂''), 128,9 (C₂' , C₃' , C₅' , C₆'), 128,4 (C₈, C₈''), 124,0 (C_α, C_α'').



Nomenclatura: (2*E*,2'*E*)-1,1'-(1,4-fenileno)bis(3-(4-(dimetilamino)fenil)prop-2-en-1-ona) **3n**.

Fórmula Molecular: C₂₈H₂₈N₂O₂

Aspecto físico: Sólido vermelho

Peso Molecular: 424,53 g/mol

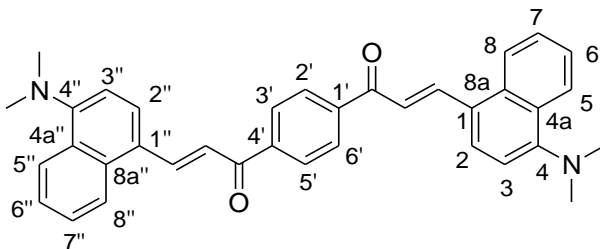
Rendimento: 62%

Ponto de fusão: 204-205°C

HRMS (APPI+) m/z: calculado para C₂₈H₂₈N₂O₂ [M+H]⁺: 425,2224 encontrado, 425,2218.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 8,07 (s, 4H, H₂', H₃', H₅', H₆'), 7,81 (d, 2H, H_β, H_β'', *J* = 15,2 Hz), 7,55 (d, 4H, H₂, H₂'', H₆, H₆'', *J* = 8,6 Hz), 7,33 (d, 2H, H_α, H_α'', *J* = 15,6 Hz), 6,69 (d, 4H, H₃, H₃'', H₅, H₅'', *J* = 8,9 Hz), 3,04 (s, 12H, N(CH₃)₂).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 190,1 (C=O), 152,1 (C₄, C₄''), 146,6 (C_β, C_β''), 141,7 (C₁', C₄'), 130,6 (C₆, C₆''), 128,3 (C₂', C₃', C₅', C₆'), 122,3 (C_α, C_α''), 116,6 (C₁, C₁''), 111,8 (C₅, C₅''), 40,1 (N(CH₃)₂).



Nomenclatura: (2*E*,2'*E*)-1,1'-(1,4-fenileno)bis(3-(4-(dimetilamino)naftalen-1-il)prop-2-en-1-ona) **3o**.

Fórmula Molecular: C₃₆H₃₂N₂O₂

Aspecto físico: Sólido vermelho

Peso Molecular: 424,65 g/mol

Rendimento: 59%

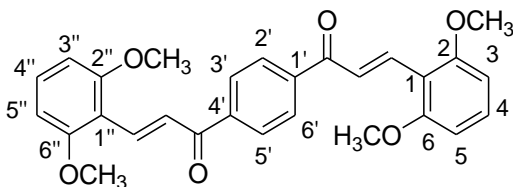
Ponto de fusão: 159-160°C

HRMS (APPI+) m/z: calculado para C₃₆H₃₂N₂O₂ [M+H]⁺: 525,2537 encontrado, 525,2534

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 8,20 (d, 2H, H_β, H_β'', *J* = 15,4 Hz), 8,07 (s, 4H, H₂', H₃', H₅', H₆'), 7,52 (d, 2H, H_α, H_α'', *J* = 15,4 Hz), 8,27 – 7,05 (m, 12H, anel naftila), 2,98 (s, 6H, N(CH₃)₂), 2,84 (s, 6H, N(CH₃)₂).

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 198,3 (C=O), 154,0 (C₄, C₄''), 142,8 (C_β, C_β''), 139,5 (C₁', C₄'), 133,2 (C_{8a}, C_{8a}''), 128,5 (C_{4a},

C4 α ''), 128,3 (C2', C3', C5', C6'), 126,9 (C1, C1''), 126,0 (C7, C7''), 125,2 (C6, C6''), 125,1 (C5, C5''), 124,9 (C8, C8''), 123,6 (C α , C α ''), 121,7 (C2, C2''), 113,2 (C3, C3''), 45,1(N-(CH₃)₂), 44,8 (N-(CH₃)₂).



Nomenclatura: (2*E*,2'*E*)-1,1'-(1,4-fenileno)bis(3-(2,6-dimetoxifenil)prop-2-en-1-ona) **3p**.

Fórmula Molecular: C₂₈H₂₆O₆

Aspecto físico: Sólido amarelo

Peso Molecular: 458,50 g/mol

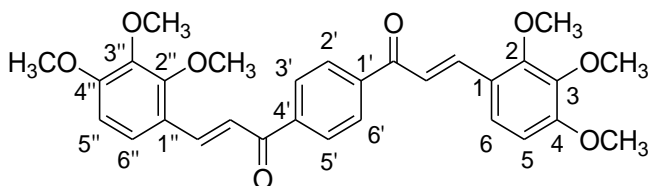
Rendimento: 91%

Ponto de fusão: 253-254°C

HRMS (APPI+) m/z: calculado para C₂₈H₂₆O₆ [M+H]⁺: 459.1802 encontrado, 459.1808.

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 8,30 (d, 2H, H β , H β '', J = 16,0 Hz), 8,10 (s, 4H, H2', H3', H5', H6'), 8,00 (d, 2H, H α , H α '', J = 15,9 Hz), 7,33 (dd, 2H, H4, H4''), J = 8,4 Hz, J = 8,3 Hz), 6,61 (d, 4H, H3, H3'', H5, H5''), J = 8,4 Hz), 3,93 (s, 12H, *o*-OCH₃).

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 191,8 (C=O), 160,4 (C2, C2'', C6, C6''), 141,6 (C β , C β ''), 136,5 (C1', C4'), 131,8 (C4, C4''), 128,5 (C2', C3', C5', C6'), 124,7 (C α , C α ''), 112,6 (C1, C1''), 103,7 (C3, C3'', C5, C5''), 55,8 (*o*-OCH₃).



Nomenclatura: (2*E*,2'*E*)-1,1'-(1,4-fenileno)bis(3-(2,3,4-trimetoxifenil)prop-2-en-1-ona) **3q**.

Fórmula Molecular: C₃₀H₃₀O₈

Aspecto físico: Sólido amarelo

Peso Molecular: 518,55 g/mol

Rendimento: 93%

Ponto de fusão: 178-179°C

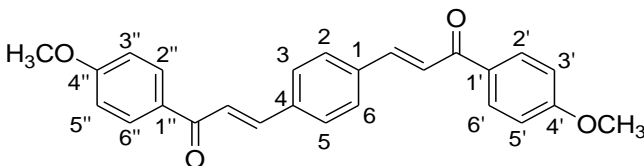
HRMS (APPI+) m/z: calculado para C₃₀H₃₀O₈ [M+H]⁺: 519,2013 encontrado, 519,2019.

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 8,11 (s, 4H, H_{2'}, H_{3'}, H_{5'}, H_{6'}), 8,03 (d, 2H, H_β, H_{β''}, *J* = 15,9 Hz), 7,56 (d, 2H, H_α, H_{α''}, *J* = 15,7 Hz), 7,42 (d, 2H, H₆, H_{6''}, *J* = 8,8 Hz), 6,74 (d, 2H, H₅, H_{5''}, *J* = 8,8 Hz), 3,97 (s, 6H, *o*-OCH₃), 3,93 (s, 6H, *p*-OCH₃), 3,90 (s, 3H, *m*-OCH₃).

RMN ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 190,4 (C=O), 156,0 (C₄, C_{4''}), 153,9 (C₂, C_{2''}), 142,5 (C_β, C_{β''}), 141,5 (C₃, C_{3''}), 141,0 (C_{1'}, C_{4'}), 128,5 (C_{2'}, C_{3'}, C_{5'}, C_{6'}), 124,0 (C₁, C_{1''}), 121,7 (C_α, C_{α''}), 121,2 (C₆, C_{6''}), 107,6 (C₅, C_{5''}), 61,3 (*p*-OCH₃), 60,8 (*m*-OCH₃), 56,0 (*o*-OCH₃).

8.1.1.2. Procedimento geral para a síntese de chalconas 6a-q

Em um balão de fundo redondo, de 50 mL e 1 boca, foram adicionados 1 mmol do teraftaldeído, 2 mmol da acetofenona correspondente em 20 mL de etanol. Após a solubilização dos reagentes, sob agitação magnética, adicionou-se de 20 gotas de KOH 50% p/v. A reação ficou sob agitação magnética e temperatura ambiente por 16 horas. Após este período foi adicionado ao meio reacional água destilada para a precipitação do produto, neutralizou-se o meio com solução de HCl 10% v/v, e o precipitado foi filtrado a vácuo em funil de Büchner. Os produtos foram recristalizados em etanol.



Nomenclatura: (2*E*,2'*E*)-3,3'-(1,4-fenileno)bis(1-(4-metoxifenil)prop-2-en-1-ona) **6a**.

Fórmula Molecular: C₂₆H₂₂O₄

Aspecto físico: Sólido amarelo

Peso Molecular: 398,45 g/mol

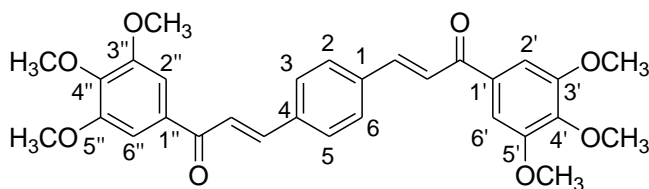
Rendimento: 83%

Ponto de fusão: 248-249°C

HRMS (APPI+) m/z: C₂₆H₂₂O₄ [M+H]⁺: calculado para 399,1591 encontrado, 399,1596.

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 8,06 (d, 4H, H2', H2'', H6', H6'', $J = 8,9$ Hz), 7,81 (d, 2H, Hβ', Hβ'', $J = 15,6$ Hz), 7,69 (s, 4H, H2, H3, H5, H6), 7,59 (d, 2H, Hα', Hα'', $J = 15,6$ Hz), 7,00 (d, 4H, H3', H3'', H5', H5'', $J = 8,9$ Hz), 3,91 (s, 6H, *p*-OCH₃).

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 188,4 (C=O), 163,5 (C4', C4''), 142,7 (Cβ', Cβ''), 136,9 (C1, C4), 130,8 (C2', C2'', C6', C6''), 130,6 (C1', C1''), 128,8 (C2, C3, C5, C6), 122,8 (Cα', Cα''), 113,9 (C3', C3'', C5', C5''), 55,4 (*p*-OCH₃).



Nomenclatura: (2*E*,2'*E*)-3,3'-(1,4-fenileno)bis(1-(3,4,5-trimetoxifenil)prop-2-en-1-ona) **6b**.

Fórmula Molecular: C₃₀H₃₀O₈

Aspecto físico: Sólido amarelo

Peso Molecular: 518,55 g/mol

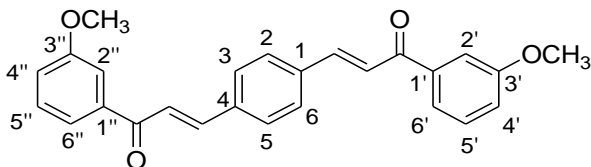
Rendimento: 80%

Ponto de fusão: 190-190,5°C

HRMS (APPI+) m/z: calculado para C₃₀H₃₀O₈ [M+H]⁺: 519,2013 encontrado, 519,2017.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 7,82 (d, 2H, Hβ', Hβ'', $J = 15,6$ Hz), 7,71 (s, 4H, H2, H3, H5, H6), 7,54 (d, 2H, Hα', Hα'', $J = 15,6$ Hz), 7,29 (s, 4H, H2', H2'', H6', H6''), 3,96 (s, 12H, *m*-OCH₃), 3,95 (s, 6H, *p*-OCH₃).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 190,5 (C=O), 188,8 (C=O'), 153,1 (C3', C5', C3'', C5''), 143,4 (C4', C4''), 142,8 (Cβ', Cβ''), 136,8 (C1, C4), 133,2 (C1', C1''), 128,9 (C2, C3, C5, C6), 122,7 (Cα', Cα''), 106,1 (C2', C6', C2'', C6''), 61,0 (*p*-OCH₃), 56,4 (*m*-OCH₃).



Nomenclatura: (2*E*,2'*E*)-3,3'-(1,4-fenileno)bis(1-(3-metoxifenil)prop-2-en-1-ona) **6c**.

Fórmula Molecular: C₂₆H₂₂O₄

Aspecto físico: Sólido amarelo

Peso Molecular: 398,45 g/mol

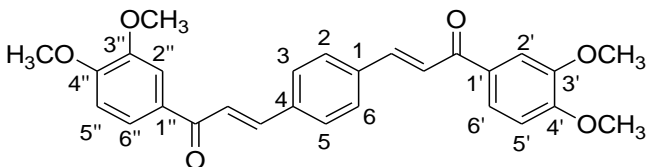
Rendimento: 87%

Ponto de fusão: 176-177°C

HRMS (APPI+) m/z: calculado para C₂₆H₂₂O₄ [M+H]⁺: 399,1591 encontrado, 399,1585.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 7,81 (d, 2H, Hβ', Hβ''), *J* = 15,6 Hz), 7,69 (s, 4H, H2, H3, H5, H6), 7,62 (d, 2H, H6', H6''), *J* = 7,8 Hz), 7,56 (d, 2H, Hα', Hα''), *J* = 15,6 Hz), 7,55 (d, 2H, H2', H2''), *J* = 1,5 Hz), 7,43 (dd, 2H, H5', H5''), *J* = 8,2 Hz, *J* = 7,8 Hz), 7,15 (dd, 2H, H4', H4''), *J* = 8,2 Hz, *J* = 2,7 Hz), 3,89 (s, 6H, *m*-OCH₃).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 189,9 (C=O), 159,9 (C3', C3''), 143,5 (Cβ', Cβ''), 139,4 (C1', C1''), 136,8 (C1, C4), 129,6 (C5', C5''), 128,9 (C2, C3, C5, C6), 123,0 (Cα', Cα''), 121,0 (C6', C6''), 119,4 (C4', C4''), 112,8 (C2', C2''), 55,5 (*m*-OCH₃).



Nomenclatura: (2*E*,2'*E*)-3,3'-(1,4-fenileno)bis(1-(3,4-dimetoxifenil)prop-2-en-1-ona) **6d**.

Fórmula Molecular: C₂₈H₂₆O₆

Aspecto físico: Sólido amarelo

Peso Molecular: 458,50 g/mol

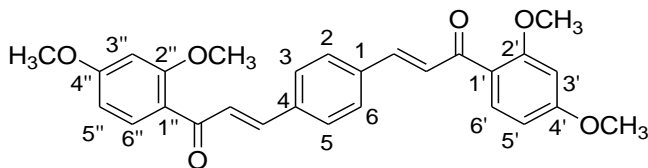
Rendimento: 91%

Ponto de fusão: 198-199°C

HRMS (APPI+) m/z: calculado para C₂₈H₂₆O₆ [M+H]⁺: 459,1802 encontrado, 459,1804

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 7,81 (d, 2H, Hβ', Hβ''), *J* = 15,6 Hz), 7,71 (m, 2H, H6', H6''), 7,70 (s, 4H, H2, H3, H5, H6), 7,64 (m, 2H, H2', H2''), 7,61 (d, 2H, Hα', Hα''), *J* = 15,6 Hz), 6,95 (d, 2H, H5, H5''), *J* = 8,20 Hz), 3,98 (s, 12H, *m*-OCH₃, *p*-OCH₃).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 183,5 (C=O), 149,9 (C4', C4''), 149,3 (C3', C3''), 142,7 (Cβ', Cβ''), 136,8 (C1, C4), 131,5 (C6', C6''), 130,1 (C1', C1''), 128,8 (C2, C3, C5, C6), 122,5 (Cα', Cα''), 110,7 (C5', C5''), 109,9 (C2', C2''), 56,0 (*m*-OCH₃, *p*-OCH₃).



Nomenclatura: (2*E*,2'*E*)-3,3'-(1,4-fenileno)bis(1-(2,4-dimetoxifenil)prop-2-en-1-ona) **6e**.

Fórmula Molecular: C₂₈H₂₆O₆

Aspecto físico: Sólido amarelo

Peso Molecular: 458,50 g/mol

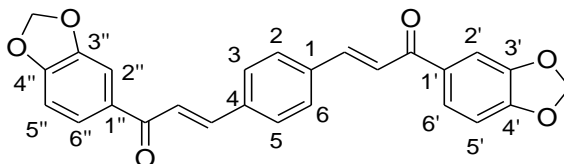
Rendimento: 83%

Ponto de fusão: 182,5-183°C

HRMS (APPI+) m/z: calculado for C₂₈H₂₆O₆ [M+H]⁺: 459,1802 encontrado, 459,1807

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 7,78 (d, 2H, H3', H3'', *J* = 8,5 Hz), 7,68 (d, 2H, Hβ', Hβ'', *J* = 15,6 Hz), 7,61 (s, 4H, H2, H3, H5, H6), 7,58 (d, 2H, Hα', Hα'', *J* = 15,6 Hz), 6,58 (dd, 2H, H4', H4'', *J* = 8,5 Hz, *J* = 2,3 Hz), 6,51 (d, 2H, H6', H6'', *J* = 2,3 Hz), 3,92 (s, 3H, *o*-OCH₃), 3,92 (s, 3H, *o*-OCH₃).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 190,1 (C=O), 164,3 (C2', C2''), 160,4 (C5', C5''), 140,8 (Cβ', Cβ''), 137,0 (C1, C4), 130,1 (C1', C1''), 128,7 (C2, C3, C5, C6), 127,8 (C4', C4''), 122,0 (Cα', Cα''), 105,2 (C3', C3''), 98,6 (C6', C6''), 55,7 (*o*-OCH₃, *p*-OCH₃).



Nomenclatura: (2*E*,2'*E*)-3,3'-(1,4-fenileno)bis(1-(benzo[*d*][1,3]dioxol-5-il)prop-2-en-1-ona) **6f**.

Fórmula Molecular: C₂₆H₁₈O₆

Aspecto físico: Sólido creme

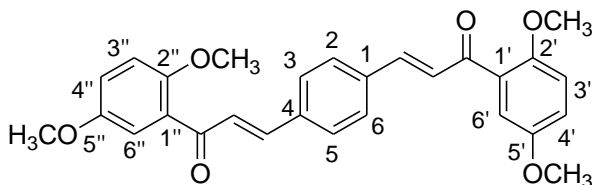
Peso Molecular: 426,42g/mol

Rendimento: 78%

Ponto de fusão: 274-275°C

HRMS (APPI+) m/z: calculado para C₂₆H₁₈O₆ [M+H]⁺: 427,1176 encontrado, 427,1177.

RMN ^1H (200 MHz, DMSO- d_6) δ /ppm: 7,97 (s, 4H, H2, H3, H5, H6); 7,96 (m, 6H, H β '', H β '', H2'', H2'', H6', H6''), 7,72 (d, 2H, H α '', H α '', J = 15,5 Hz), 7,10 (d, 2H, H5', H5'', J = 8,2 Hz), 6,17 (s, 4H, CH $_2$ '', CH $_2$ '').
RMN ^{13}C (50 MHz, DMSO- d_6) δ /ppm: 190,0 (C=O), 152,0 (C4', C4''), 148,4 (C3', C3''), 142,9 (C β '', C β ''), 137,1 (C1, C4), 129,7 (C2, C3, C5, C6), 125,6 (C α '', C α ''), 125,1 (C1', C1''), 118,8 (C6', C6''), 108,4 (C5', C5''), 104,1 (C2', C2''), 102,5 (CH $_2$ '', CH $_2$ '').



Nomenclatura: (2*E*,2'*E*)-3,3'-(1,4-fenileno)bis(1-(2,5-dimetoxifenil)prop-2-en-1-ona) **6g**.

Fórmula Molecular: C $_{28}$ H $_{26}$ O $_6$

Aspecto físico: Sólido amarelo

Peso Molecular: 458,50 g/mol

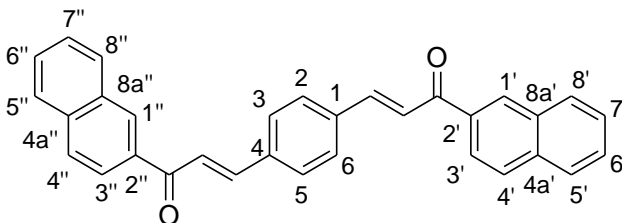
Rendimento: 84%

Ponto de fusão: 160-161°C

HRMS (APPI+) m/z : calculado para C $_{28}$ H $_{26}$ O $_6$ [M+H] $^+$: 459,1802 encontrado, 459,1798.

RMN ^1H (200 MHz, CDCl $_3$) δ /ppm: 7,67 (d, 2H, H β '', H β '', J = 15,7 Hz), 7,62 (s, 4H, H2, H3, H5, H6), 7,46 (d, 2H, H α '', H α '', J = 15,7 Hz), 7,21 (d, 2H, H6', H6''), J = 3,0 Hz), 7,05 (dd, 2H, H4', H4'', J = 9,0 Hz, J = 3,0 Hz), 6,95 (d, 2H, H3', H3'', J = 9,0 Hz), 3,88 (s, 6H, *o*-OCH $_3$, *m*-OCH $_3$).

RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl $_3$) δ /ppm: 190,5 (C=O), 153,6 (C5', C5''), 152,6 (C2', C2''), 141,8 (C β '', C β ''), 136,9 (C1, C4), 129,4 (C1', C1''), 128,8 (C2, C3, C5, C6), 127,6 (C α '', C α ''), 119,4 (C4', C4''), 114,4 (C6', C6''), 113,3 (C3', C3''), 56,4 (*m*-OCH $_3$), 55,8 (*o*-OCH $_3$).



Nomenclatura: (2*E*,2'*E*)-3,3'-(1,4-fenileno)bis(1-(naftalen-2-il)prop-2-en-1-ona) **6h**.

Fórmula Molecular: C₃₂H₂₂O₂

Aspecto físico: Sólido creme

Peso Molecular: 438,52g/mol

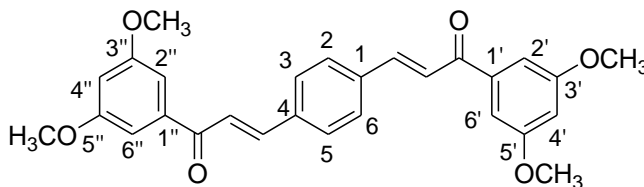
Rendimento: 89%

Ponto de fusão: 229-230°C

HRMS (APPI+) m/z: calculado para C₃₂H₂₂O₂ [M+H]⁺: 439,1693 encontrado, 439,1692.

RMN ¹H (200 MHz, DMSO-*d*₆) δ/ppm: 7,91 (d, 2H, Hβ', Hβ''), *J* = 15,5 Hz), 7,77 (s, 4H, H2, H3, H5, H6), 7,76 (d, 2H, Hα', Hα''), *J* = 15,5 Hz), 8,56-7,55 (m, 14H, anel naftila).

RMN ¹³C (50 MHz, DMSO-*d*₆) δ/ppm: 189,3 (C=O), 148,7 (Cβ', Cβ''), 144,2 (C2', C2''), 135,4 (C1, C4), 134,7 (C4a', C4a''), 132,7 (C8a', C8a''), 130,8 (C1', C1''), 130,0 (C8', C8''), 129,2 (C2, C3, C5, C6), 129,1 (C6', C6''), 128,9 (C4', C4''), 128,0 (C5', C5''), 127,0 (C7', C7''), 124,5 (C3', C3''), 122,0 (Cα', Cα'').



Nomenclatura: (2*E*,2'*E*)-3,3'-(1,4-fenileno)bis(1-(3,5-dimetoxifenil)prop-2-en-1-ona) **6i**.

Fórmula Molecular: C₂₈H₂₆O₆

Aspecto físico: Sólido amarelo

Peso Molecular: 458,50 g/mol

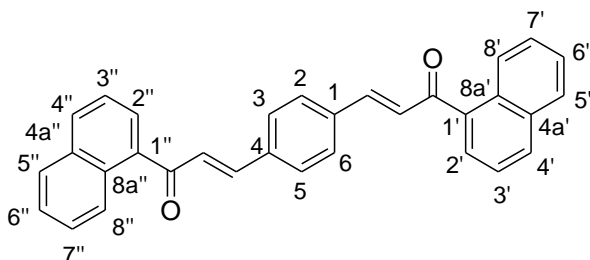
Rendimento: 92%

Ponto de fusão: 178-179°C

HRMS (APPI+) m/z: calculado para C₂₈H₂₆O₆ [M+H]⁺: 459,1802 encontrado, 459,1806

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 7,81 (d, 2H, Hβ', Hβ''), *J* = 15,6 Hz), 7,69 (s, 4H, H2, H3, H5, H6), 7,52 (d, 2H, Hα', Hα''), *J* = 15,6 Hz), 7,16 (d, 4H, H2', H6', H2'', H6''), *J* = 2,3 Hz), 6,69 (dd, 2H, H4', H4''), *J* = 2,3 Hz, *J* = 2,3 Hz), 3,87 (s, 12H, *m*-OCH₃).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 189,7 (C=O), 160,9 (C3', C3''), C5', C5''), 143,5 (Cβ', Cβ''), 139,9 (C1', C1''), 136,8 (C1, C4), 128,9 (C2, C3, C5, C6), 122,9 (Cα', Cα''), 106,3 (C2', C2'', C6', C6''), 105,0 (C4', C4''), 55,6 (*m*-OCH₃).



Nomenclatura: (2*E*,2'*E*)-3,3'-(1,4-fenileno)bis(1-(naftalen-1-il)prop-2-en-1-ona) **6j**.

Fórmula Molecular: C₃₂H₂₂O₂

Aspecto físico: Sólido creme

Peso Molecular: 438,52g/mol

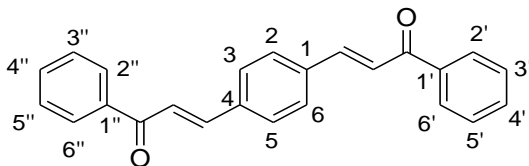
Rendimento: 69%

Ponto de fusão: 162-163°C

HRMS (APPI+) m/z: calculado para C₃₂H₂₂O₂ [M+H]⁺: 439,1693 encontrado, 439,1695.

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 8,35 (m, 2H, H8', H8''), 8,00 (d, 2H, H5', H5''), *J* = 8,2 Hz), 7,91 (m, 2H, H4', H4''), 7,78 (d, 2H, H2', H2''), *J* = 7,0 Hz), 7,58 (s, 4H, H2, H3, H5, H6), 7,56 (m, 8H, Hβ', Hβ'', H3', H3'', H6', H6'', H7', H7''), 7,34 (d, 2H, Hα', Hα''), *J* = 16,0 Hz).

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 195,1 (C=O), 144,3 (Cβ', Cβ''), 136,8 (C1, C4), 136,7 (C1', C1''), 133,8 (C4a', C4a''), 131,8 (C7', C7''), 130,4 (C8a', C8a''), 128,9 (C2, C3, C5, C6), 128,4 (C4', C4''), 127,9 (C5', C5''), 127,5 (C2', C2''), 127,2 (C3', C3''), 126,5 (C6', C6''), 125,5 (C8', C8''), 124,4 (Cα', Cα'').



Nomenclatura: (2*E*,2'*E*)-3,3'-(1,4-fenileno)bis(-fenilprop-2-en-1-ona)
6k.

Fórmula Molecular: C₂₄H₁₈O₂

Aspecto físico: Sólido creme

Peso Molecular: 338,40 g/mol

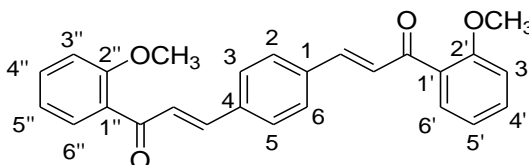
Rendimento: 90%

Ponto de fusão: 190-190,5°C

HRMS (APPI+) m/z: calculado para C₂₄H₁₈O₂ [M+H]⁺: 339,1380 encontrado, 339,1379

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 8,15 (d, 4H, H₂', H₂'', H₆', H₆'', *J* = 7,8 Hz), 8,01 (d, 2H, H_β', H_β'', *J* = 15,6 Hz), 7,96 (s, 4H, H₂, H₃, H₅, H₆), 7,75 (d, 2H, H_α', H_α'', *J* = 15,6 Hz), 7,65 (dd, 2H, H₄', H₄'', *J* = 7,0 Hz, *J* = 7,0 Hz), 7,55 (dd, 4H, H₃', H₃'', H₅', H₅'', *J* = 7,8 Hz, *J* = 7,4 Hz).

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 189,5 (C=O), 143,5 (C_β', C_β''), 137,9 (C₁', C₁''), 137,1 (C₁, C₄), 133,7 (C₄', C₄''), 129,8 (C₂', C₂'', C₆', C₆''), 129,2 (C₃', C₃'', C₅', C₅''), 129,0 (C₂, C₃, C₅, C₆), 123,4 (C_α', C_α'').



Nomenclatura: (2*E*,2'*E*)-3,3'-(1,4-fenileno)bis(1-(2-metoxifenil)prop-2-en-1-ona) **6l.**

Fórmula Molecular: C₂₆H₂₂O₄

Aspecto físico: Sólido dourado

Peso Molecular: 398,45 g/mol

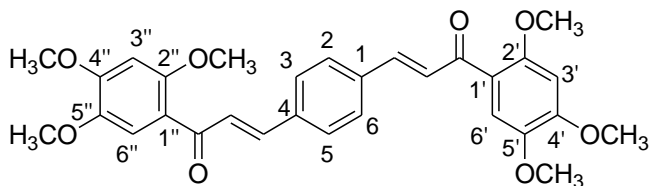
Rendimento: 75%

Ponto de fusão: 146-147°C

HRMS (APPI+) m/z: calculado para C₂₆H₂₂O₄ [M+H]⁺: 399,1591 encontrado, 399,1593.

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 7,65 (dd, 2H, H₆', H₆'', *J* = 7,4 Hz, *J* = 1,5 Hz), 7,63 (d, 2H, H_β', H_β'', *J* = 16,0 Hz), 7,61 (s, 2H, H₂, H₃,

H5, H6), 7,50 (ddd, 2H, H5', H5''), $J = 7,4$ Hz, $J = 7,4$ Hz, $J = 1,5$ Hz), 7,43 (d, 2H, H α' , H α'' , $J = 16,0$ Hz), 7,05 (dd, 2H, H4', H4''), $J = 7,4$ Hz, $J = 7,4$ Hz), 7,01 (d, 2H, H3', H3''), $J = 8,20$ Hz), 3,92 (s, 6H, *o*-OCH₃).
RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ /ppm: 182,6 (C=O), 158,1 (C2', C2''), 141,8 (C β' , C β''), 136,9 (C1, C4), 133,1 (C4', C4''), 130,4 (C5', C5''), 128,8 (C2, C3, C5, C6), 127,8 (C1', C1''), 120,8 (C α' , C α''), 111,6 (C3', C3''), 55,7 (*o*-OCH₃).



Nomenclatura: (2*E*,2'*E*)-3,3'-(1,4-fenileno)bis(1-(2,4,5-trimetoxifenil)prop-2-en-1-ona) **6m**.

Fórmula Molecular: C₃₀H₃₀O₈

Aspecto físico: Sólido amarelo

Peso Molecular: 518,55 g/mol

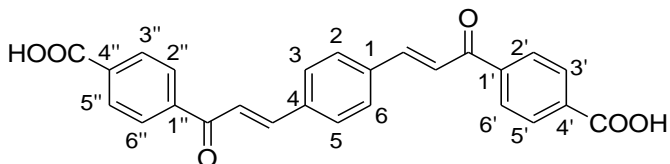
Rendimento: 81%

Ponto de fusão: 222,5-223°C

HRMS (APPI+) m/z : calculado para C₃₀H₃₀O₈ [M+H]⁺: 519,2013 encontrado, 519,2017.

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) δ /ppm: 7,67 (m, 8H, H2, H3, H5, H6, H β' , H β''), 7,41 (s, 2H, H6', H6''), 6,55 (s, 2H, H3', H3''), 3,98 (s, 3H, *m*-OCH₃), 3,95 (s, 3H, *o*-OCH₃), 3,91 (s, 3H, *p*-OCH₃).

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ /ppm: 189,5 (C=O), 154,9 (C4', C4''), 153,8 (C2', C2''), 143,4 (C5', C5''), 140,7 (C β' , C β''), 137,0 (C1, C4), 128,7 (C2, C3, C5, C6), 127,9 (C1', C1''), 120,3 (C α' , C α''), 113,1 (C6', C6''), 97,0 (C3', C3''), 56,8 (*m*-OCH₃), 56,3 (*p*-OCH₃), 56,1 (*o*-OCH₃).



Nomenclatura: (2*E*,2'*E*)-3,3'-(1,4-fenileno)bis(1-(4-carboxifenil)prop-2-en-1-ona) **6n**.

Fórmula Molecular: C₂₆H₁₈O₆

Aspecto físico: Sólido amarelo

Peso Molecular: 426,42 g/mol

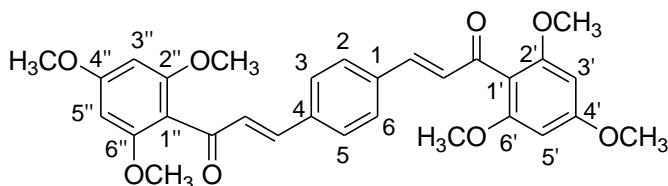
Rendimento: 69%

Ponto de fusão: nd (>350°C)

HRMS (APPI+) m/z: calculado para C₂₆H₁₈O₆ [M+H]⁺: 425,1020 encontrado, 425,1014.

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 10,07 (s, 2H, COOH), 8,28 (d, 4H, H₂', H₂'', H₆', H₆'', *J* = 8,3 Hz), 8,06 (m, 6H, H β ', H β '', H₃', H₃'', H₅', H₅''), 8,02 (s, 4H, H₂, H₃, H₅, H₆), 7,82 (d, 2H, H α ', H α '', *J* = 15,6 Hz).

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 189,4 (C=O), 167,0 (COOH), 144,1 (C β ', C β ''), 141,4 (C₁', C₁''), 137,1 (C₁, C₄), 134,9 (C₄', C₄''), 130,0 (C₂, C₃, C₅, C₆), 129,2 (C₃', C₃'', C₅', C₅''), 129,1 (C₂', C₂'', C₆', C₆''), 123,6 (C α ', C α '').



Nomenclatura: (2*E*,2'*E*)-3,3'-(1,4-fenileno)bis(1-(2,4,6-trimetoxifenil)prop-2-en-1-ona) **60**.

Fórmula Molecular: C₃₀H₃₀O₈

Aspecto físico: Sólido amarelo

Peso Molecular: 518,55 g/mol

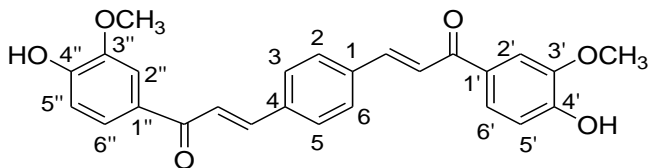
Rendimento: 88%

Ponto de fusão: 205-206°C

HRMS (APPI+) m/z: calculado para C₃₀H₃₀O₈ [M+H]⁺: 519,20134 encontrado, 519,20135.

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 7,52 (s, 4H, H₂, H₃, H₅, H₆), 7,36 (d, 2H, H β ', H β '', *J* = 16,0 Hz), 6,98 (d, 2H, H α ', H α '', *J* = 16,0 Hz), 6,16 (s, 4H, H₃', H₃'', H₅', H₅''), 3,86 (s, 6H, *p*-OCH₃), 3,77 (s, 12H, *o*-OCH₃).

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 193,8 (C=O), 162,5 (C₄', C₄''), 158,9 (C₂', C₂'', C₆', C₆''), 142,6 (C β ', C β ''), 136,7 (C₁, C₄), 129,7 (C α ', C α ''), 128,7 (C₂, C₃, C₅, C₆), 111,7 (C₁', C₁''), 90,7 (C₃', C₃'', C₅', C₅''), 55,9 (*o*-OCH₃), 55,4 (*p*-OCH₃).



Nomenclatura: (2*E*,2'*E*)-3,3'-(1,4-fenileno)bis(1-(4-hidroxi-3-metoxifenil)prop-2-en-1-ona) **6p**.

Fórmula Molecular: C₂₆H₂₂O₆

Aspecto físico: Sólido amarelo

Peso Molecular: 430,45g/mol

Rendimento: 62%

Ponto de fusão: 220-220,5°C

HRMS (APPI+) m/z: calculado para C₂₆H₂₂O₆ [M+H]⁺: 431,1489 encontrado, 431,1491.

RMN ¹H (200 MHz, DMSO-*d*₆) δ/ppm: 9,67 (s, 2H, OH), 7,92 (d, 2H, H2', H2''), *J* = 2,5 Hz), 7,77 (s, 4H, H2, H3, H5, H6), 7,71 (m, 6H, H6', H6'', Hα', Hα'', Hβ', Hβ''), 6,96 (d, 2H, H5', H5''), *J* = 8,2 Hz), 3,95 (s, 3H, *m*-OCH₃).

RMN ¹³C (50 MHz, DMSO-*d*₆) δ/ppm: 187,1 (C=O), 151,7 (C3', C3''), 147,5 (C4', C4''), 141,6 (Cβ', Cβ''), 136,3 (C1, C4), 129,6 (C1', C1''), 128,5 (C2, C3, C5, C6), 123,2 (C6', C6''), 122,4 (Cα', Cα''), 114,6 (C5', C5''), 111,1 (C2', C2''), 55,5 (*m*-OCH₃).

8.1.2. Atividade biológica

Os testes biológicos foram realizados pela Dra. Evelyn Winter durante seu estágio de doutoramento em Lyon (França) no laboratório “*Mécanisme et Modulation de la Résistance aux Médicaments*” do Institut de Biologie et Biochimie des Protéines (IBCP), sob orientação do Dr. Attilio Di Pietro.

8.1.2.1. Avaliação da atividade inibitória de ABCG2

Para o teste de avaliação da atividade inibitória dos compostos testados, as células resistentes e não-resistentes (1,5 x 10⁶) foram dispostas em placas de 24 poços. Após 24 ou 48 horas de adesão, o meio de cultura foi retirado e as células foram incubadas por 30 minutos a 37°C com concentrações específicas dos compostos testados e 5 μM de mitoxantrona utilizada como substrato. Após a incubação, as células foram lavadas, ressuspensas em PBS e mantidas em gelo até a análise por citometria de fluxo. Foram coletados 10.000 eventos de cada amostra. A fluorescência obtida nas células não resistentes (HEK293/*pcDNA3.1*)

tratadas apenas com mitoxantrona foi considerada como 100% de inibição e a inibição causada pelos compostos foi calculada com base neste valor de fluorescência do controle. Como controle induzindo 100% de inibição também foi utilizado o Ko143 (1 μ M). Valores de EC₅₀ (concentração necessária para causar 50% do efeito máximo) foram calculados pelo GraphPad Prisma 5.

8.1.2.2. Viabilidade celular

Para avaliação da viabilidade celular, as células (1×10^4) foram dispostas em placas de 96 poços. Após 24 horas de adesão celular, concentrações crescentes dos compostos foram adicionadas e após 72 horas de incubação foi realizado o teste do MTT (um sal de tetrazólio de cor amarela, que é reduzido a formazan, de cor azulada, pela atividade oxidativa das células, funcionando como um indicador de viabilidade celular). Os controles contendo apenas DMSO foram considerados 100% de viabilidade. A CC₅₀ (concentração citotóxica para 50% das células) foi calculada pelo GraphPad Prisma 5.

8.2. Capítulo 2

8.2.1. Preparação e caracterização das pirazolinas 8a-x e 9a-x

As reações foram monitoradas por cromatografia de camada fina (CCF), utilizando placas de alumínio com sílica gel 60GF 254 da Merck, visualização em luz ultravioleta ($\lambda = 254$ e 366 nm) e revelação com pulverização de vanilina sulfúrica.

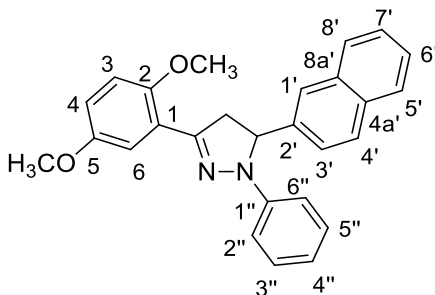
Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) de ¹H (400 MHz e 200MHz) e de ¹³C (100 MHz e 50MHz) foram realizados em equipamento VARIAN OXFORD AS-400 e Bruker Ac-200F, tendo como referência interna o tetrametilsilano (TMS). Foram utilizados clorofórmio (CDCl₃), dimetilsulfóxido (DMSO-*d*₆) e acetona deuterados como solvente nas análises. O ponto de fusão não corrigido dos compostos foi determinado em aparelho digital de ponto de fusão, MGAPH-301, Microquímica Equipamentos Ltda. Os reagentes e solventes utilizados nesta pesquisa foram das marcas comerciais: Aldrich, Merck, Sigma, Fluka e Vetec. Os dados de espectro de massa de alta resolução (HRMS) foram coletados em espectrômetro de massa Bruker micrOTOF-QII, com ionização por eletrospray (ESI-MS) e fotoionização à pressão atmosférica (APPI-MS) no modo positivo.

8.2.1.1. Procedimento geral para a síntese de chalconas 7a-x

Em um balão de fundo redondo, de 50 mL e 1 boca, foram adicionados 5 mmol da acetofenona correspondente, 5 mmol do benzaldeído correspondente em 20 mL de metanol. Após a solubilização dos reagentes, sob agitação magnética, adicionou-se de 20 gotas de KOH 50% p/v. A reação ficou sob agitação magnética e temperatura ambiente por 16 horas. Após este período foi adicionado ao meio reacional água destilada para a precipitação do produto, neutralizou-se o meio com solução de HCl 10% v/v, e o precipitado foi filtrado a vácuo em funil de Büchner. Quando necessário, recristalizou-se os produtos em etanol.

8.2.1.2. Procedimento geral para a síntese de pirazolinas 8a-x

Em um balão de 25 mL e 1 boca, foram adicionados 1 mmol da chalcona correspondente, 3 mmol de fenilhidrazina e 10 mL de ácido acético. A mistura foi refluxada por 3h, sob agitação magnética, depois foi vertida sobre gelo. O precipitado formado foi filtrado a vácuo em funil de Büchner e recristalizado em etanol.



Nomenclatura: 1-fenil-3-(2,5-dimetoxifenil)-5-(naftalen-2-il)-4,5-dihidro-1*H*-pirazol **8a**.

Fórmula Molecular: C₂₇H₂₄N₂O₂

Aspecto físico: Sólido amarelo

Peso Molecular: 408,18 g/mol

Rendimento: 93%

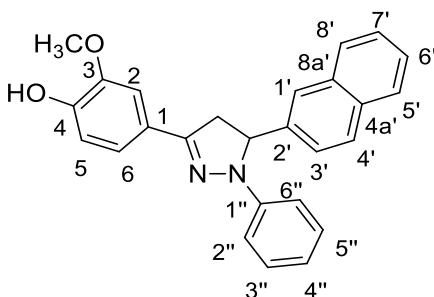
Ponto de fusão: 147-148 °C

HRMS (ESI+) m/z: calculado para C₂₇H₂₄N₂O₂ [M⁺]: 408,1832; encontrado, 408,1833.

RMN ¹H (200 MHz, DMSO-*d*₆) δ/ppm: 7,86 (m, 4H, H1', H4', H5', H8'), 7,47 (m, 3H, H7', H6', H6), 7,40 (dd, 1H, H3', *J* = 8,2/1,5 Hz), 7,10

(m, 2H, H3'', H5''), 7,01 (m, 3H, H3, H2'', H6''), 6,93 (dd, 1H, H4, $J = 9,0/3,0$ Hz), 6,67 (m, 1H, H4''), 5,55 (dd, 1H, Hc, $J = 12,5/7,0$ Hz), 4,03 (dd, 1H, Hb, $J = 17,9/12,5$ Hz), 3,76 (s, 3H, *o*-OCH₃), 3,69 (s, 3H, *m*-OCH₃), 3,23 (dd, 1H, Ha, $J = 17,9/7,0$ Hz),

RMN ¹³C (50 MHz, DMSO-*d*₆) δ/ppm: 153,6 (C5), 152,1 (C2), 146,7 (C=N), 144,9 (C1''), 140,7 (C2'), 133,4 (C8a'), 132,8 (C4a'), 129,4 (C3'), 129,3 (C3'', C5''), 128,1 (C5'), 128,0 (C8'), 126,8 (C4'), 126,4 (C1'), 124,8 (C7'), 124,4 (C6'), 122,3 (C1), 119,0 (C4''), 116,3 (C4), 114,4 (C3); 113,4 (C2'', C6''), 112,9 (H6), 64,0 (Cc), 56,7 (*o*-OCH₃), 55,9 (*m*-OCH₃), 46,6 (Cab).



Nomenclatura: 4-(1-fenil-5-(naftalen-2-il)-4,5-dihidro-1*H*-pirazol-3-il)-2-metóxiifenol **8b**.

Fórmula Molecular: C₂₆H₂₂N₂O₂

Aspecto físico: Sólido amarelo

Peso Molecular: 394,16 g/mol

Rendimento: 89%

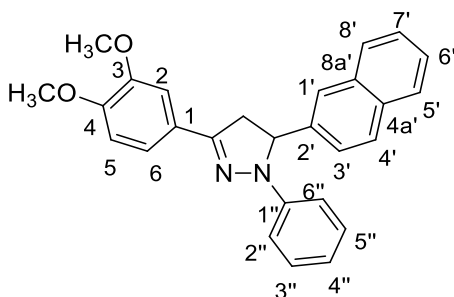
Ponto de fusão: 166-166,5 °C

HRMS (ESI+) m/z: calculado para C₂₆H₂₂N₂O₂ [M⁺]: 394,1675; encontrado, 394,1673.

RMN ¹H (400 MHz, acetona-*d*₆) δ/ppm: 7,96 (s, 1H, H1), 7,87 (m, 4H, H4', H5', H7', H8'), 7,52 (d, 1H, H2, $J = 1,5$ Hz), 7,48 (m, 3H, H3', H3'', H5''), 7,18 (dd, 1H, H6, $J = 8,2$ Hz, 1,9 Hz), 7,10 (m, 3H, H6', H2'', H6''), 6,86 (d, 1H, H5, $J = 8,2$ Hz), 6,66 (m, 1H, H4''), 5,53 (dd, 1H, Hc, $J = 12,5/7,0$ Hz), 3,99 (dd, 1H, Hb, $J = 17,2/12,1$ Hz), 3,91 (s, 3H, *m*-OCH₃), 3,20 (dd, 1H, Ha, $J = 17,2/7,0$ Hz).

RMN ¹³C (100 MHz, acetona-*d*₆) δ/ppm: 148,3 (C3), 147,7 (C=N), 147,5 (C4), 145,3 (C1''), 140,7 (C2'), 133,6 (C8a'), 132,9 (C4a'), 129,0 (C3'), 128,6 (C3'', C5''), 127,7 (C5'), 127,6 (C8'), 126,3 (C4'), 125,8 (C1'), 124,8 (C1), 124,6 (C7'), 124,0 (C6'), 119,6 (C6), 118,3 (C4''),

114,9 (C5), 113,1 (C2'', C6''), 108,7 (C2), 64,2 (Cc), 55,3 (*m*-OCH₃), 43,4 (Cab).



Nomenclatura: 1-fenil-3-(3,4-dimetóxiifenil)-5-(naftalen-2-il)-4,5-dihidro-1H-pirazol **8c**.

Fórmula Molecular: C₂₇H₂₄N₂O₂

Aspecto físico: Sólido amarelo

Peso Molecular: 408,18 g/mol

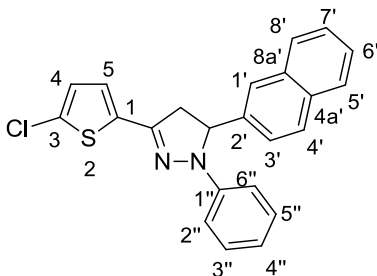
Rendimento: 76%

Ponto de fusão: 168-169 °C

HRMS (ESI⁺) m/z: calculado para C₂₇H₂₄N₂O₂ [M⁺]: 408,1832; encontrado, 408,1836.

RMN ¹H (200 MHz, DMSO-*d*₆) δ/ppm: 7,88 (m, 4H, H1', H4', H5', H8'), 7,44 (m, 4H, H2, H3', H6', H7'), 7,08 (m, 6H, H6, H2'', H3'', H5'', H6'', H5), 6,69 (m, 1H, H4''), 5,55 (dd, 1H, Hc, *J* = 12,1/7,0 Hz), 3,98 (dd, 1H, Hb, *J* = 17,2/12,5 Hz), 3,85 (s, 3H, *p*-OCH₃), 3,79 (s, 3H, *m*-OCH₃), 3,18 (dd, 1H, Ha, *J* = 17,5/7,0 Hz).

RMN ¹³C (50 MHz, DMSO-*d*₆) δ/ppm: 150,2 (C4), 149,3 (C=N), 147,9 (C3), 145,0 (C1''), 140,7 (C2'), 133,4 (C8a'), 132,8 (C4a'), 129,4 (C3'), 129,2 (C3'', C5''), 128,1 (C5'), 128,0 (C8'), 126,8 (C4'), 126,4 (C1'), 125,4 (C1), 124,8 (C7'), 124,4 (C6'), 119,6 (C6), 118,8 (C4''), 113,3 (C2'', C6''), 111,9 (C5), 109,0 (C2), 63,8 (Cc), 55,9 (OCH₃), 55,9 (OCH₃), 43,6 (Cab).



Nomenclatura: 3-(5-clorotiofen-2-il)-1-fenil-5-(naftalen-2-il)-4,5-dihidro-1*H*-pirazol **8d**.

Fórmula Molecular: C₂₃H₁₇ClN₂S

Aspecto físico: Sólido marrom cristalino

Peso Molecular: 388,07g/mol

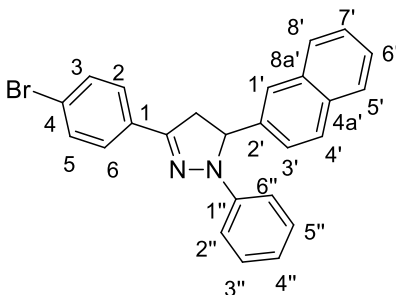
Rendimento: 64%

Ponto de fusão: 148-150 °C

HRMS (ESI+) m/z: calculado para C₂₃H₁₇ClN₂S [M⁺]: 388,0795; encontrado, 388,0798.

RMN ¹H (200 MHz, DMSO-*d*₆) δ/ppm: 7,87 (m, 4H, H1', H4', H5', H8'), 7,47 (m, 3H, H3', H6', H7'), 7,10 (m, 2H, H3'', H5''), 7,06 (d, 2H, H2'', H6'', *J* = 7,8 Hz), 7,02 (d, 1H, H4, *J* = 3,9 Hz), 6,99 (d, 1H, H5, *J* = 3,9 Hz), 6,71 (m, 1H, H4''), 5,63 (dd, 1H, Hc, *J* = 12,5/7,0 Hz), 4,00 (dd, 1H, Hb, *J* = 17,1/12,1 Hz), 3,21 (dd, 1H, Ha, *J* = 17,2/7,0 Hz).

RMN ¹³C (50 MHz, DMSO-*d*₆) δ/ppm: 144,2 (C=N), 143,5 (C1''), 140,0 (C2'), 135,1 (C8a'), 133,3 (C4a'), 132,8 (C3), 129,4 (C1), 129,3 (C3'), 128,1 (C3'', C5''), 128,1 (C5'), 128,0 (C8'), 128,0 (C4), 127,4 (C4'), 127,1 (C5), 126,9 (C1'), 124,9 (C7'), 124,2 (C6'), 119,4 (C4''), 113,4 (C2'', C6''), 64,1 (Cc), 43,4 (Cab).



Nomenclatura: 3-(4-bromofenil)-1-fenil-5-(naftalen-2-il)-4,5-dihidro-1*H*-pirazol **8e**.

Fórmula Molecular: C₂₅H₁₉BrN₂

Aspecto físico: Sólido creme

Peso Molecular: 427,07g/mol

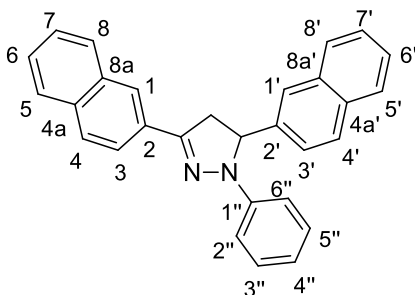
Rendimento: 71%

Ponto de fusão: 197-198°C

HRMS (ESI+) m/z: calculado para C₂₅H₁₉BrN₂ [M⁺]: 428,0708; encontrado, 428,0713.

RMN ¹H (200 MHz, DMSO-*d*₆) δ/ppm: 7,89 (m, 4H, H1', H4', H5', H8'), 7,72 (d, 2H, H2, H6, *J* = 8,2 Hz), 7,62 (d, 2H, H3, H5, *J* = 8,5 Hz), 7,43 (m, 4H, H3', H7', H3'', H5''), 7,11 (m, 3H, H2'', H6'', H6'), 6,71 (m, 1H, H4''), 5,66 (dd, 1H, Hc, *J* = 12,5/7,0 Hz), 3,99 (dd, 1H, Hb, *J* = 17,1/12,5 Hz), 3,20 (dd, 1H, Ha, *J* = 17,2/7,0 Hz).

RMN ¹³C (50 MHz, DMSO-*d*₆) δ/ppm: 146,7 (C=N), 144,5 (C1''), 140,3 (C2'), 133,4 (C8a'), 132,8 (C4a'), 132,0 (C3, C5), 131,9 (C3'), 129,4 (C1), 129,3 (C3'', C5''), 128,1 (C5'), 128,0 (C2, C6), 126,8 (C8'), 126,4 (C4'), 124,9 (C1'), 124,3 (C7'), 122,2 (C6'), 119,3 (C4''), 113,5 (C2'', C6''), 64,0 (Cc), 43,1 (Cab).



Nomenclatura: 1-fenil-3,5-di(naftalen-2-il)-4,5-dihidro-1H-pirazol **8f**.

Fórmula Molecular: C₂₉H₂₂N₂

Aspecto físico: Sólido amarelo esverdeado

Peso Molecular: 398,17g/mol

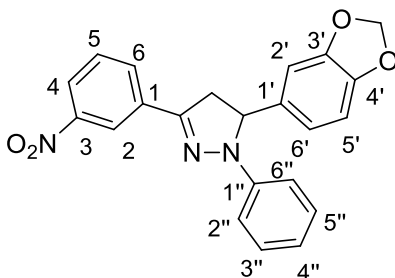
Rendimento: 98%

Ponto de fusão: 192-192,5°C

HRMS (ESI+) m/z: calculado para C₂₉H₂₂N₂ [M⁺]: 398,1777; encontrado, 398,1771.

RMN ¹H (200 MHz, acetona-*d*₆) δ/ppm: 8,25 (m, 1H, H5'), 7,94 (m, 9H, H1', H4', H7', H8', H1, H3, H4, H5, H8), 7,51 (m, 5H, H3', H6, H7, H3'', H5''), 7,17 (m, 3H, H2'', H6'', H6'), 6,73 (m, 1H, H4''), 5,70 (dd, 1H, Hc, *J* = 12,1/6,6 Hz), 4,18 (dd, 1H, Hb, *J* = 17,3/12,3 Hz), 3,39 (dd, 1H, Ha, *J* = 17,5/6,9 Hz).

RMN ^{13}C (50 MHz, acetona- d_6) δ /ppm: 147,2 (C=N), 144,9 (C1''), 140,4 (C2'), 133,6 (C2), 133,5 (C8a, C4a), 133,0 (C4a'), 130,5 (C8a''), 129,1 (C3'), 128,7 (C3'', C5''), 128,1 (C5), 128,0 (C8), 127,8 (C5'), 127,7 (C8'), 127,6 (C4), 126,4 (C4'), 126,3 (C6), 126,3 (C7), 125,9 (C1'), 125,3 (C1), 124,7 (C7'), 123,9 (C6'), 123,3 (C3), 118,8 (C4''), 113,3 (C2'', C6''), 64,3 (Cc), 43,0 (Cab).



Nomenclatura: 5-(benzo[*d*][1,3]dioxol-5-il)-1-fenil-3-(3-nitrofenil)-4,5-dihidro-1*H*-pirazol **8g**.

Fórmula Molecular: C₂₂H₁₇N₃O₄

Aspecto físico: Sólido amarelo

Peso Molecular: 387,12 g/mol

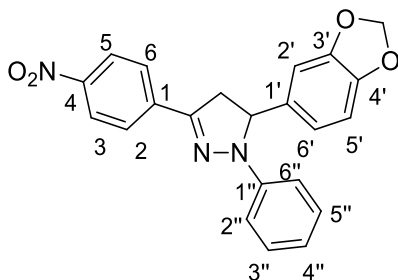
Rendimento: 79%

Ponto de fusão: 177-180 °C

HRMS (ESI+) *m/z*: calculado para C₂₂H₁₇N₃O₄ [M⁺]: 387,1213; encontrado, 387,1211.

RMN ^1H (400 MHz, acetona- d_6) δ /ppm: 8,45 (dd, 1H, H2, $J = 1,9$ Hz, 1,7 Hz), 8,15 (d, 1H, H4, $J = 8,2$ Hz), 8,07 (d, 1H, H6, $J = 7,8$ Hz), 7,55 (dd, 1H, H5, $J = 8,2/7,8$ Hz), 7,22 (dd, 2H, H3'', H5'', $J = 8,7/8,5$ Hz); 7,11 (d, 2H, H2'', H6'', $J = 8,7$ Hz); 6,80 (m, 4H, H2', H5', H6', H4''); 5,94 (d, 1H, CH₂', $J = 4,3$ Hz), 5,93 (d, 1H, CH₂, $J = 3,9$ Hz), 5,29 (dd, 1H, Hc, $J = 12,5/7,0$ Hz), 3,83 (dd, 1H, Hb, $J = 17,2/12,9$ Hz), 3,15 (dd, 1H, Ha, $J = 17,2/7,0$ Hz).

RMN ^{13}C (100 MHz, acetona- d_6) δ /ppm: 148,7 (C3), 148,7 (C=N), 147,4 (C3'), 144,2 (C4'), 144,1 (C1''), 136,0 (C1), 134,8 (C1'), 131,2 (C6), 129,7 (C5), 129,2 (C3'', C5''), 122,9 (C4), 120,4 (C2), 120,1 (C6'), 119,3 (C4''), 113,8 (C2'', C6''), 108,9 (C5'), 106,2 (C2'), 101,4 (OCH₂O), 64,7 (Cc), 43,3 (Cab).



Nomenclatura: 5-(benzo[*d*][1,3]dioxol-5-il)-1-fenil-3-(4-nitrofenil)-4,5-dihidro-1*H*-pirazol **8h**.

Fórmula Molecular: C₂₂H₁₇N₃O₄

Aspecto físico: Sólido vermelho

Peso Molecular: 387,12g/mol

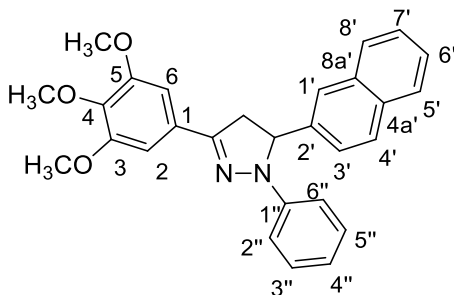
Rendimento: 63%

Ponto de fusão: 186-187 °C

HRMS (ESI+) m/z: calculado para C₂₂H₁₇N₃O₄ [M⁺]: 387,1213; encontrado, 387,1209.

RMN ¹H (200 MHz, DMSO-*d*₆) δ/ppm: 8,25 (d, 2H, H₂, H₆, *J* = 8,9 Hz), 7,94 (d, 2H, H₃, H₅, *J* = 8,9 Hz), 7,17 (m, 4H, H_{2''}, H_{3''}, H_{5''}, H_{6''}), 6,83 (m, 4H, H_{2'}, H_{5'}, H_{6'}, H_{4''}); 5,89 (s, 2H, CH₂), 5,56 (dd, 1H, H_c, *J* = 12,5/6,6 Hz), 3,91 (dd, 1H, H_b, *J* = 17,5/12,5 Hz), 3,17 (dd, 1H, H_a, *J* = 17,2/6,6 Hz).

RMN ¹³C (50 MHz, DMSO-*d*₆) δ/ppm: 148,2 (C₄), 147,0 (C=N), 146,9 (C_{3'}), 145,5 (C_{4'}), 143,6 (C_{1''}), 139,1 (C₁), 136,2 (C_{1'}), 129,4 (C_{3''}, C_{5''}), 126,6 (C₂, C₆), 124,3 (C₃, C₅), 120,1 (C_{6'}), 119,6 (C_{4''}), 113,9 (C_{2''}, C_{6''}), 109,0 (C_{5'}), 106,5 (C_{2'}), 101,5 (OCH₂O), 63,8 (C_c), 42,6 (C_{ab}).



Nomenclatura: 1-fenil-3-(3,4,5-trimetóxilfenil)-5-(naftalen-2-il)-4,5-dihidro-1*H*-pirazol **8i**.

Fórmula Molecular: C₂₈H₂₆N₂O₃

Aspecto físico: Sólido amarelo

Peso Molecular: 438,19 g/mol

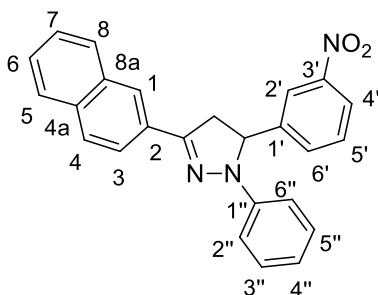
Rendimento: 91%,

Ponto de fusão: 189-190°C

HRMS (ESI+) m/z: calculado para C₂₈H₂₆N₂O₃ [M⁺]: 438.1937; encontrado, 438.1935.

RMN ¹H (200 MHz, DMSO-*d*₆) δ/ppm: 7,90 (m, 4H, H1', H4', H5', H8'), 7,45 (m, 3H, H3', H3'', H5''), 7,09 (m, 6H, H6', H7', H2, H6, H2'', H6''), 6,70 (m, 1H, H4''), 5,64 (dd, 1H, Hc, *J* = 12,5/7,0 Hz), 3,99 (dd, 1H, Hb, *J* = 17,5/12,5 Hz), 3,84 (s, 6H, *m*-OCH₃), 3,69 (s, 3H, *p*-OCH₃), 3,24 (dd, 1H, Ha, *J* = 17,2/7,0 Hz).

RMN ¹³C (50 MHz, DMSO-*d*₆) δ/ppm: 153,4 (C3, C5), 147,8 (C=N), 144,7 (C1''), 140,6 (C2'), 138,7 (C8a'), 133,4 (C4a'), 132,8 (C4), 129,4 (C1), 129,3 (C3'', C5''), 128,2 (C3'), 128,1 (C5'), 128,0 (C8'), 126,8 (C4'), 126,4 (C1'), 124,8 (C7'), 124,3 (C6'), 118,9 (C4''), 113,3 (C2'', C6''), 103,6 (C2, C6), 64,2 (Cc), 59,7 (*p*-OCH₃), 55,5 (*m*-OCH₃), 43,3 (Cab).



Nomenclatura: 1-fenil-3-(naftalen-2-il)-5-(3-nitrofenil)-4,5-dihidro-1H-pirazol **8j**.

Fórmula Molecular: C₂₅H₁₉N₃O₂

Aspecto físico: Sólido laranja

Peso Molecular: 393,14 g/mol

Rendimento: 79%

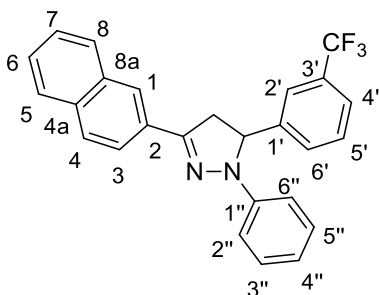
Ponto de fusão: 188-189,5 °C

HRMS (ESI+) m/z: calculado para C₂₅H₁₉N₃O₂ [M⁺]: 393,1471; encontrado, 393,1468.

RMN ¹H (400 MHz, acetona-*d*₆) δ/ppm: 8,30 (s, 1H, H2'), 8,21 (dd, 1H, H5, *J* = 8,5/1,5 Hz), 8,17 (d, 1H, H4', *J* = 8,2 Hz), 8,05 (s, 1H, H1), 7,95 (m, 3H, H3, H4, H8), 7,83 (d, 1H, H6', *J* = 7,8 Hz), 7,69 (dd, 1H, H5', *J*

= 8,2/7,8 Hz), 7,54 (m, 2H, H7, H6), 7,22 (m, 2H, H3'', H5''), 7,15 (m, 2H, H2'', H6''), 6,79 (m, 1H, H4''), 5,82 (dd, 1H, Hc, $J = 12,5/6,2$ Hz), 4,18 (dd, 1H, Hb, $J = 17,2/12,1$ Hz), 3,40 (dd, 1H, Ha, $J = 17,5/6,2$ Hz).

RMN ^{13}C (100 MHz, acetona- d_6) δ/ppm : 147,2 (C=N), 144,7 (C1''), 143,9 (C1'), 133,0 (C4a), 133,0 (C8a), 132,3 (C6'), 130,3 (C5'), 129,7 (C2), 128,7 (C3'', C5''), 127,8 (C5), 127,8 (C8), 127,4 (C4), 126,2 (C6), 126,2 (C7), 125,3 (C1), 123,5 (C3'), 122,9 (C3), 122,1 (C2'), 120,7 (C4'), 118,8 (C4''), 112,9 (C2'', C6''), 62,5 (Cc), 42,4 (Cab).



Nomenclatura: 1-fenil-5-(3-(trifluorometil)fenil)-3-(naftalen-2-il)-4,5-dihidro-1H-pirazol **8k**.

Fórmula Molecular: $\text{C}_{26}\text{H}_{19}\text{F}_3\text{N}_2$

Aspecto físico: Sólido amarelo cristalino

Peso Molecular: 416,14 g/mol

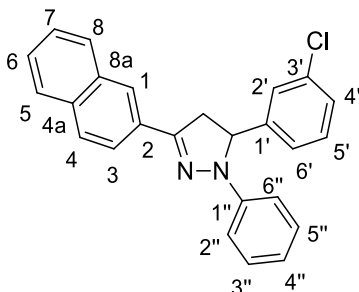
Rendimento: 76%

Ponto de fusão: 143,5-144°C

HRMS (ESI+) m/z : calculado para $\text{C}_{26}\text{H}_{19}\text{F}_3\text{N}_2$ [M^+]: 416,1494; encontrado, 416,1500.

RMN ^1H (400 MHz, acetona- d_6) δ/ppm : 8,21 (dd, 1H, H5, $J = 8,6/1,5$ Hz), 8,00 (dd, 1H, H1, $J = 1,5$ Hz), 7,92 (m, 3H, H3, H4, H8), 7,78 (s, 1H, H2'), 7,65 (m, 2H, H5', H6'), 7,60 (d, 1H, H4', $J = 7,8$ Hz), 7,51 (m, 2H, H6, H7), 7,19 (m, 2H, H3'', H5''), 7,14 (m, 2H, H2'', H6''), 6,78 (m, 1H, H4''), 5,66 (dd, 1H, Hc, $J = 12,5/6,6$ Hz), 4,12 (dd, 1H, Hb, $J = 17,1/12,1$ Hz), 3,33 (dd, 1H, Ha, $J = 17,1/6,6$ Hz).

RMN ^{13}C (100 MHz, acetona- d_6) δ/ppm : 147,3 (C=N), 144,5 (C1''), 144,3 (C1'), 133,5 (C4a), 133,4 (C8a), 130,2 (C2), 130,0 (C6'), 129,9 (C3'), 128,9 (C3'', C5''), 128,1 (C5), 128,1 (C8), 127,7 (C4), 126,5 (C6), 126,4 (C7), 125,5 (C1), 124,3 (CF₃), 124,3 (C5'), 123,2 (C3), 122,8 (C4'), 122,8 (C2'), 119,1 (C4''), 113,3 (C2'', C6''), 63,5 (Cc), 42,9 (Cab).



Nomenclatura: 5-(3-clorofenil)-1-fenil-3-(naftalen-2-il) 4,5-dihidro-1*H*-pirazol **8l**.

Fórmula Molecular: C₂₅H₁₉ClN₂

Aspecto físico: Sólido creme

Peso Molecular: 382,12 g/mol

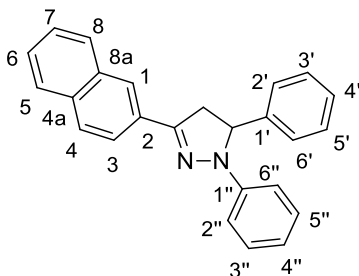
Rendimento: 91%

Ponto de fusão: 181,5-182°C

HRMS (ESI+) m/z: calculado para C₂₅H₁₉ClN₂ [M⁺]: 382,1231; encontrado, 382,1228.

RMN ¹H (400 MHz, acetona-*d*₆) δ/ppm: 8,20 (dd, 1H, H₅, *J* = 8,6/1,5 Hz), 8,05 (s, 1H, H₁), 7,95 (m, 3H, H₃, H₄, H₈), 7,54 (m, 2H, H₆, H₇), 7,44 (m, 1H, H_{4'}), 7,40 (d, 1H, H_{6'}, *J* = 7,8 Hz), 7,34 (m, 2H, H_{2'}, H_{5'}), 7,21 (dd, 2H, H_{3''}, H_{5''}, *J* = 8,6/7,4 Hz), 7,13 (d, 2H, H_{2''}, H_{6''}, *J* = 8,6 Hz), 6,78 (m, 1H, H_{4''}), 5,62 (dd, 1H, H_c, *J* = 12,5/6,2 Hz), 4,12 (dd, 1H, H_b, *J* = 17,5/12,5 Hz), 3,34 (dd, 1H, H_a, *J* = 17,1/6,2 Hz).

RMN ¹³C (50MHz, acetona-*d*₆) δ/ppm: 148,0 (C=N), 145,9 (C_{1'}), 144,9 (C_{1''}), 134,6 (C_{4a}), 133,9 (C_{8a}), 131,4 (C_{3'}), 130,7 (C₂), 129,4 (C_{3''} e C_{5''}), 128,7 (C₅), 128,6 (C₈), 128,3 (C₄), 128,1 (C_{5'}), 127,1 (C₆ e C₇), 127,0 (C_{4'}), 126,5 (C_{2'}), 126,1 (C₁), 125,1 (C_{6''}), 123,7 (C₃), 119,6 (C_{4''}), 113,8 (C_{2''} e C_{6''}), 63,7 (C_c), 43,4 (C_{ab}).



Nomenclatura: 1,5-difenil-3-(naftalen-2-il)-4,5-dihidro-1*H*-pirazol **8m**.

Fórmula Molecular: C₂₅H₂₀N₂

Aspecto físico: Sólido amarelo esverdeado

Peso Molecular: 348,16 g/mol

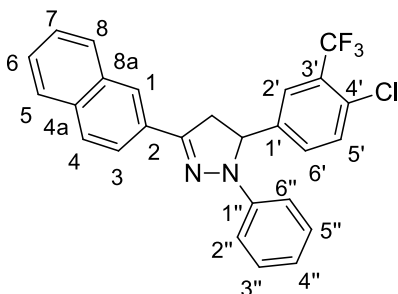
Rendimento: 93%

Ponto de fusão: 222- 222,5 °C

HRMS (ESI+) m/z: calculado para C₂₅H₂₀N₂ [M⁺]: 348,1621; encontrado, 348,1617.

RMN ¹H (200 MHz, DMSO-*d*₆) δ/ppm: 8,14 (d, 1H, H5, *J* = 8,6), 8,04 (s, 1H, H1), 7,94 (m, 3H, H3, H4, H8), 7,53 (m, 2H, H6, H7), 7,35 (m, 4H, H2', H3', H5', H6'), 7,27 (m, 1H, H4'); 7,18 (dd, 2H, H3'', H5'', *J* = 7,8/7,8 Hz), 7,07 (d, 2H, H2'', H6'', *J* = 8,0 Hz), 6,74 (m, 1H, H4''), 5,57 (dd, 1H, Hc, *J* = 12,1/6,2 Hz), 4,50 (dd, 1H, Hb, *J* = 17,5/12,5 Hz), 3,25 (dd, 1H, Ha, *J* = 17,2/6,2 Hz).

RMN ¹³C (50 MHz, DMSO-*d*₆) δ/ppm: 147,2 (C=N), 144,0 (C1''), 142,5 (C1'), 132,9 (C4a), 132,8 (C8a), 129,8 (C2), 128,9 (C3'', C5''), 128,8 (C3', C5'), 128,0 (C4'), 127,6 (C5), 127,3 (C8), 127,1 (C4), 126,5 (C6), 126,4 (C7), 125,7 (C2', C6'), 125,3 (C1), 123,0 (C3), 118,6 (C4''), 112,9 (C2'', C6''), 63,1 (Cc), 42,9 (Cab).



Nomenclatura: 5-(4-cloro-3-(trifluorometil)fenil)-1-fenil-3-(naftalen-2-il)-4,5-dihidro-1*H*-pirazol **8n**.

Fórmula Molecular: C₂₆H₁₈ClF₃N₂

Aspecto físico: Sólido marrom

Peso Molecular: 450,11 g/mol

Rendimento: 71%

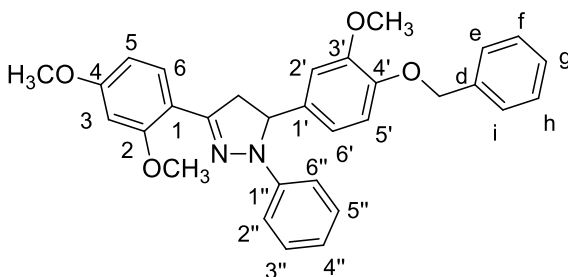
Ponto de fusão: 139-140°C

HRMS (ESI+) m/z: calculado para C₂₆H₁₈ClF₃N₂ [M⁺]: 450,1105; encontrado, 450,1097.

RMN ¹H (400 MHz, acetona-*d*₆) δ/ppm: 8,19 (dd, 1H, H5, *J* = 8,6/1,5 Hz), 7,99 (s, 1H, H1), 7,90 (m, 4H, H2', H3, H4, H8), 7,64 (d, 1H, H5', *J* = 8,2), 7,61 (dd, 1H, H6', *J* = 8,2/1,5 Hz), 7,51 (m, 2H, H6, H7), 7,20

(m, 2H, H3'', H5''), 7,13 (m, 2H, H2'', H6''), 6,79 (m, 1H, H4''), 5,67 (dd, 1H, Hc, $J = 12,5/6,6$ Hz), 4,12 (dd, 1H, Hb, $J = 17,5/12,5$ Hz), 3,37 (dd, 1H, Ha, $J = 17,2/6,6$ Hz).

^{13}C NMR (100 MHz, acetona- d_6) δ/ppm : 148,3 (C=N), 145,2 (C1''), 144,3 (C1'), 134,4 (C4a), 134,3 (C8a), 133,1 (C6'), 132,2 (C3'), 132,2 (C4'), 131,0 (C2) 129,8 (C3'', C5''), 129,0 (C5), 128,9 (C8), 128,6 (C4), 127,4 (C6), 127,3 (C7), 126,6 (C5'), 126,5 (C1), 126,4 (C2'), 124,1 (C3), 120,2 (C4''), 114,2 (C2'', C6''), 63,8 (Cc), 43,6 (Cab).



Nomenclatura: 5-(4-(benziloxi)-3-metoxifenil)-1-fenil-3-(2,4-dimetóxiifenil)-4,5-dihidro-1*H*-pirazol **80**.

Fórmula Molecular: $\text{C}_{31}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_4$

Aspecto físico: Sólido bege

Peso Molecular: 494,22 g/mol

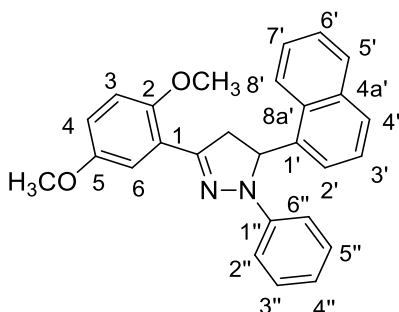
Rendimento: 86%

Ponto de fusão: 147,5-148,5°C

HRMS (ESI+) m/z: calculado para $\text{C}_{31}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_4$ $[\text{M}^+]$: 494,2200; encontrado, 494,2206.

RMN ^1H (400 MHz, acetona- d_6) δ/ppm : 7,94 (d, 1H, H6, $J = 8,2$ Hz); 7,48 (d, 2H, He, Hi, $J = 7,4$ Hz), 7,38 (dd, 2H, Hf, Hh, $J = 7,4/7,4$ Hz), 7,31 (m, 1H, Hg); 7,12 (dd, 2H, H3'', H5'', $J = 8,6/7,0$ Hz), 7,06 (d, 2H, H2'', H6'', $J = 7,8$ Hz), 7,02 (d, 1H, H2', $J = 1,9$ Hz), 6,99 (d, 1H, H5', $J = 8,2$ Hz), 6,85 (dd, 1H, H6', $J = 8,2/1,9$ Hz), 6,69 (m, 1H, H4''), 6,62 (m, 2H, H3, H5), 5,22 (dd, 1H, Hc, $J = 12,1/7,0$ Hz), 5,07 (s, 2H, CH₂), 3,96 (dd, 1H, Hb, $J = 17,9/12,1$ Hz), 3,85 (s, 3H, *o*-OCH₃), 3,84 (s, 3H, *m*-OCH₃), 3,78 (s, 3H, *p*-OCH₃) 3,22 (dd, 1H, Ha, $J = 17,9/7,4$ Hz).

RMN ^{13}C (50 MHz, acetona- d_6) δ/ppm : 161,7 (C4), 158,9 (C2), 149,8 (C3'), 147,4 (C=N), 147,1 (C1''), 145,4 (C4'), 137,5 (Cd), 136,1 (C1'), 129,5 (C6), 129,1 (C3'', C5''), 128,8 (Cf, Ch), 128,2 (Ce, Ci), 128,1 (Cg), 118,5 (C6'), 118,8 (C4''), 114,5 (C5'), 114,2 (C2'), 113,3 (C2'', C6''), 110,2 (C1), 106,5 (C5), 99,1 (C3), 70,3 (CH₂), 63,5 (Cc), 56,1 (*m*-OCH₃), 55,9 (*o*-OCH₃), 55,7 (*p*-OCH₃), 46,9 (Cab).



Nomenclatura: 1-fenil-3-(2,5-dimetoxifenil)-5-(naftalen-1-il)-4,5-dihidro-1*H*-pirazol **8p**.

Fórmula Molecular: C₂₇H₂₄N₂O₂

Aspecto físico: Sólido amarelo pálido

Peso Molecular: 408,18 g/mol

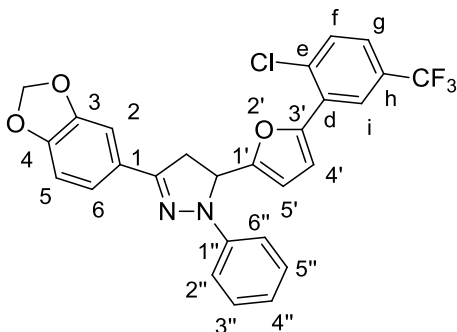
Rendimento: 92%

Ponto de fusão: 185,5-186°C

HRMS (ESI⁺) m/z: calculado para C₂₇H₂₄N₂O₂ [M⁺]: 408,1832; encontrado, 408,1836.

RMN ¹H (200 MHz, DMSO-*d*₆) δ/ppm: 8,30 (d, 1H, H8', *J* = 8,2 Hz); 8,0 (d, 1H, H5', *J* = 8,2 Hz), 7,84 (d, 1H, H4', *J* = 8,2 Hz), 7,62 (m, 2H, H6', H7'); 7,50 (m, 1H, H2') 7,41 (dd, 1H, H3, *J* = 7,4/7,8 Hz), 7,25 (s, 1H, H6), 7,13 (dd, 2H, H3'', H5'' *J* = 7,4/7,4Hz), 6,97 (m, 4H, H4', H3, H2'', H5''), 6,71 (m, 1H, H4''), 6,11 (dd, 1H, Hc, *J* = 12,1/7,0 Hz), 4,22 (dd, 1H, Hb, *J* = 17,9/12,5 Hz), 3,78 (s, 3H, *o*-OCH₃), 3,66 (s, 3H, *m*-OCH₃), 3,14 (dd, 1H, Ha, *J* = 17,5/7,0 Hz).

RMN ¹³C (50 MHz, DMSO-*d*₆) δ/ppm: 153,5 (C5), 152,0 (C2), 146,9 (C=N), 144,8 (C1''), 137,6 (C1'), 134,3 (C4a'), 130,0 (C8a'), 129,3 (C3'', C5''), 128,1 (C5'), 126,9 (C3'), 126,3 (C4'), 126,1 (C7'), 123,7 (C6'), 122,2 (C8', C2'), 118,9 (C1), 116,3 (C4''), 114,3 (C4), 113,2 (C2'', C6''), 112,8 (C3), 112,6 (C6), 64,9 (Cc), 55,6 (*o*-OCH₃), 55,9 (*m*-OCH₃), 45,8 (Cab).



Nomenclatura: 3-(benzo[*d*][1,3]dioxol-5-il)-5-(5-(2-cloro-5-(trifluorometil)fenil) furan-2-il)-1-fenil-4,5-dihidro-1*H*-pirazol-8*q*.

Fórmula Molecular: C₂₇H₁₈ClF₃N₂O₃

Aspecto físico: Sólido amarelo

Peso Molecular: 510,09 g/mol

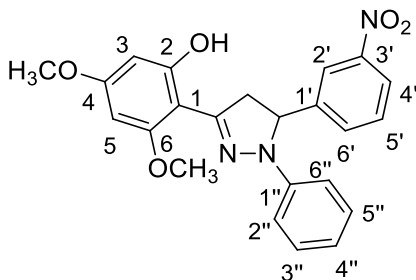
Rendimento: 84%

Ponto de fusão: 188-189°C

HRMS (ESI+) m/z: calculado para C₂₇H₁₈ClF₃N₂O₃ [M⁺]: 510,0952; encontrado, 510,0960

RMN ¹H (200 MHz, DMSO-*d*₆) δ/ppm: 7,91 (s, 1H, Hi), 7,76 (d, 1H, Hg, *J* = 8,2 Hz), 7,64 (d, 1H, Hf, *J* = 8,2 Hz), 7,41 (s, 1H, H2), 7,22 (m, 6H, H5', H6, H2'', H3'', H5'', H6''), 6,99 (d, 1H, H5, *J* = 8,2 Hz), 6,77 (m, 1H, H4''), 6,58 (d, 1H, H4', *J* = 3,1 Hz), 6,09 (s, 2H, CH₂), 5,73 (dd, 1H, Hc, *J* = 11,5/5,5 Hz), 3,77 (dd, 1H, Hb, *J* = 16,6/11,2 Hz), 3,51 (dd, 1H, Ha, *J* = 17,0/5,5 Hz).

RMN ¹³C (50 MHz, DMSO-*d*₆) δ/ppm: 155,0 (C3'), 148,7 (C4), 148,5 (C1'), 148,2 (C3), 147,7 (C=N), 145,0 (C1''), 133,1 (Cd), 132,5 (Ce), 129,3 (Ch), 129,2 (C3'', C5''), 129,0 (Cf), 128,4 (Ci), 126,9 (C1), 125,4 (Cg), 124,3 (CF₃), 121,0 (C6), 119,4 (C4''), 113,9 (C2'', C6''), 113,5 (C5), 110,3 (C2), 108,8 (C4'), 105,8 (C5'), 101,8 (CH₂), 57,2 (Cc), 40,2 (Cab).



Nomenclatura: 1-fenil-3,5-dimetóxi-2-(5-(3-nitrofenil)-4,5-dihidro-1H-pirazol-3-il)fenol **8r**.

Fórmula Molecular: C₂₃H₂₁N₃O₅

Aspecto físico: Sólido laranja

Peso Molecular: 419,14 g/mol

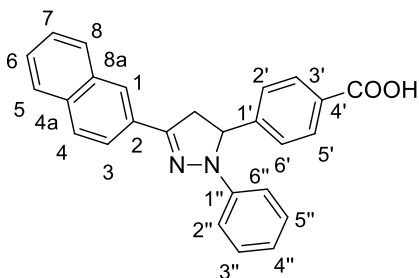
Rendimento: 76%

Ponto de fusão: 189-191°C

HRMS (ESI+) m/z: calculado para C₂₃H₂₁N₃O₅ [M⁺]: 419,1475; encontrado, 419,1483.

RMN ¹H (200 MHz, DMSO-*d*₆) δ/ppm: 11,74 (s, 1H, OH), 8,23 (s, 1H, H2'), 8,15 (dd, 1H, H4', *J* = 8,2/1,5 Hz), 7,78 (d, 1H, H6', *J* = 7,8 Hz), 7,66 (dd, 1H, H5', *J* = 8,2/7,8 Hz), 7,22 (dd, 2H, H3'', H5'', *J* = 8,5/7,4 Hz), 6,80 (m, 3H, H2'', H4'', H5''), 6,22 (s, 1H, H3), 6,15 (s, 1H, H5), 5,54 (dd, 1H, Hc, *J* = 11,7/7,0 Hz), 4,16 (dd, 1H, Hb, *J* = 18,3/12,1 Hz), 3,79 (s, 3H, *o*-OCH₃), 3,74 (s, 3H, *p*-OCH₃), 3,35 (dd, 1H, Ha, *J* = 18,3/7,0 Hz).

RMN ¹³C (50 MHz, DMSO) δ/ppm: 167,1 (C2), 160,0 (C6), 160,0 (C4), 150,4 (C3'), 145,0 (C=N), 144,1 (C1''), 133,1 (C1'), 131,6 (C6'), 129,7 (C3'', C5''), 122,9 (C5'), 121,4 (C2'), 119,7 (C4''), 113,2 (C2'', C6''), 99,8 (C1), 94,3 (C3), 91,3 (C5), 61,4 (Cc), 56,2 (*o*-OCH₃), 55,7 (*m*-OCH₃), 47,5 (Cab).



Nomenclatura: Ácido 1-fenil-4-(3-(naftalen-2-il)-4,5-dihidro-1H-pirazol-5-il)benzóico **8s**.

Fórmula Molecular: C₂₆H₂₀N₂O₂

Aspecto físico: Sólido amarelo

Peso Molecular: 392,15g/mol

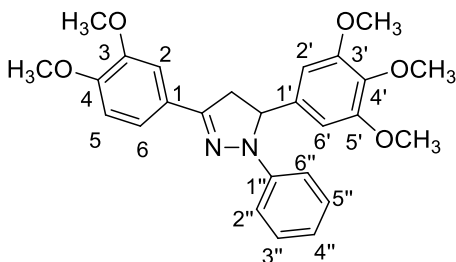
Rendimento: 86%

Ponto de fusão: 199-200°C

HRMS (ESI+) m/z: calculado para C₂₆H₂₀N₂O₂ [M⁺]: 392,1519; encontrado, 392,1513.

RMN ¹H (400 MHz, acetona-d₆) δ/ppm: 8,21 (dd, 1H, H5, *J* = 8,6/1,5 Hz), 8,03 (m, 3H, OH, H1, H4), 7,93 (m, 3H, H3, H7, H8), 7,52 (m, 5H, H2', H3', H4', H5', H6), 7,20 (m, 2H, H3'', H5''), 7,12 (m, 2H, H2'', H6''), 6,77 (m, 1H, H4''), 5,63 (dd, 1H, Hc, *J* = 12,5/6,6 Hz), 4,14 (dd, 1H, Hb, *J* = 17,1/12,5 Hz), 3,32 (dd, 1H, Ha, *J* = 17,2/6,6 Hz).

RMN ¹³C (100 MHz, acetona-d₆) δ/ppm: 166,9 (COOH), 147,9 (C1'), 147,3 (C=N), 144,5 (C1''), 133,4 (C4a), 133,4 (C8a), 130,3 (C3', C5'), 130,2 (C2), 130,1 (C4'), 128,8 (C3'', C5''), 128,1 (C5), 128,1 (C8), 127,7 (C4), 126,5 (C6), 126,5 (C7), 126,1 (C2', C6'), 125,4 (C1), 123,2 (C3), 119,0 (C4''), 113,2 (C2'', C6''), 63,7 (Cc), 42,8 (Cab).



Nomenclatura: 1-fenil-3-(3,4-dimetóxfenil)-5-(3,4,5-trimetóxfenil)-4,5-dihidro-1H-pirazol **8t**.

Fórmula Molecular: C₂₆H₂₈N₂O₅

Aspecto físico: Sólido branco cristalino

Peso Molecular: 448,19 g/mol

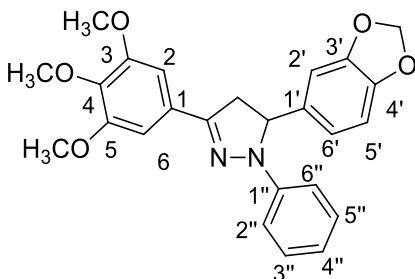
Rendimento: 73%

Ponto de fusão: 128,5-129°C

HRMS (ESI+) m/z: calculado para C₂₆H₂₈N₂O₅ [M+H]⁺: 448,1998; encontrado, 448,1994.

RMN ¹H (400 MHz, acetona-*d*₆) δ/ppm: 7,93 (d, 1H, H₆, *J* = 8,2 Hz), 7,13 (m, 2H, H_{3''}, H_{5''}), 7,07 (m, 2H, H_{2''}, H_{6''}), 6,70 (m, 1H, H_{4''}), 6,69 (s, 2H, H_{2'}, H_{6'}), 6,62 (m, 1H, H₅), 6,60 (s, 1H, H₂), 5,17 (dd, 1H, H_c, *J* = 12,1/7,8 Hz), 3,96 (dd, 1H, H_b, *J* = 17,9/12,1 Hz), 3,84 (s, 6H, *m*-OCH₃, *p*-OCH₃), 3,75 (s, 6H, *m*-OCH₃'), 3,69 (s, 3H, *p*-OCH₃'), 3,23 (dd, 1H, H_a, *J* = 17,9/7,4 Hz).

RMN ¹³C (100 MHz, acetona-*d*₆) δ/ppm: 161,8 (C₄), 158,9 (C₃), 153,9 (C_{3'}, C_{5'}), 146,9 (C=N), 145,9 (C_{1''}), 139,1 (C_{4'}), 137,3 (C_{1'}), 129,3 (C₆), 128,5 (C_{3''}, C_{5''}), 118,3 (C_{4''}), 114,6 (C₁), 113,2 (C_{2''}, C_{6''}), 105,8 (C₅), 102,9 (C_{2'}, C_{6'}), 98,3 (C₂), 64,6 (C_c), 59,5 (*p*-OCH₃'), 55,4 (*m*-OCH₃'), 55,0 (*p*-OCH₃), 54,8 (*m*-OCH₃), 46,8 (C_b).



Nomenclatura: 5-(benzo[*d*][1,3]dioxol-5-il)-1-fenil-3-(3,4,5-trimetóxilfenil)-4,5-dihidro-1*H*-pirazol **8u**.

Fórmula Molecular: C₂₅H₂₄N₂O₅

Aspecto físico: Sólido amarelo cristalino

Peso Molecular: 432,16 g/mol

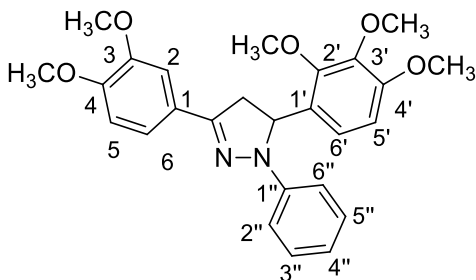
Rendimento: 68%

Ponto de fusão: 145-146°C

HRMS (ESI+) m/z: calculado para C₂₅H₂₄N₂O₅ [M]⁺: 432,1680; encontrado, 432,1679.

RMN ¹H (400 MHz, acetona-*d*₆) δ/ppm: 7,12 (m, 6H, H₂, H₆, H_{2''}, H_{3''}, H_{5''}, H_{6''}), 6,83 (m, 3H, H_{2'}, H_{5'}, H_{6'}), 6,72 (m, 1H, H_{4''}), 5,96 (d, 2H, CH₂, *J* = 3,5 Hz), 5,35 (dd, 1H, H_c, *J* = 12,1/6,6 Hz), 3,88 (dd, 1H, H_b, *J* = 17,5/12,1 Hz), 3,88 (s, 6H, *m*-OCH₃), 3,75 (s, 3H, *p*-OCH₃) 3,15 (dd, 1H, H_a, *J* = 17,5/6,6 Hz).

RMN ^{13}C (100 MHz, acetona- d_6) δ/ppm : 161,8 (C4), 158,9 (C3), 153,9 (C3', C5'), 146,9 (C=N), 145,9 (C1''), 139,1 (C4'), 137,3 (C1'), 132,1 (C1), 129,3 (C6), 128,5 (C3'', C5''), 118,3 (C4''), 114,6 (C5), 113,2 (C2'', C6''), 105,8 (C2), 102,9 (CH₂), 98,3 (C2', C6'), 64,6 (Cc), 59,5 (*p*-OCH₃), 55,4 (*m*-OCH₃), 46,8 (Cab).



Nomenclatura: 1-fenil-3-(3,4-dimetoxifenil)-5-(2,3,4-trimetóxiifenil)-4,5-dihidro-1*H*-pirazol **8v**.

Fórmula Molecular: C₂₆H₂₈N₂O₅

Aspecto físico: Sólido marrom

Peso Molecular: 448,20 g/mol

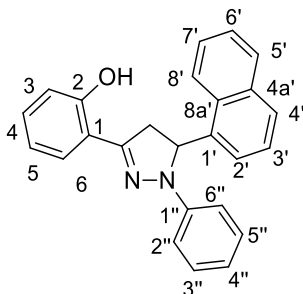
Rendimento: 86%

Ponto de fusão: 191-191,5°C

HRMS (ESI+) m/z : calculado para C₂₅H₂₄N₂O₅ [M⁺]: 448,1998; encontrado, 448,1986.

RMN ^1H (200 MHz, DMSO- d_6) δ/ppm : 7,80 (m, 1H, H6), 7,12 (dd, 2H, H3'', H5'', $J = 7,8/7,5$ Hz), 6,90 (d, 2H, H2'', H6'', $J = 8,2$ Hz), 6,64 (m, 7H, H5', H6', H2, H5, H4'', CH₂), 5,39 (dd, 1H, Hc, $J = 12,0/6,5$ Hz), 3,86 (m, 4H, Hb, *o*-OCH₃), 3,79 (s, 3H, *m*-OCH₃), 3,77 (s, 3H, *p*-OCH₃), 3,03 (dd, 1H, Ha, $J = 17,9/6,4$ Hz),

RMN ^{13}C (50 MHz, DMSO- d_6) δ/ppm : 161,7 (C4), 159,0 (C3), 150,8 (C4'), 149,2 (C2') 147,5 (C=N), 145,3 (C3'), 143,2 (C1''), 129,9 (C1'), 129,6 (C1), 129,4 (C6), 129,2 (C3'', C5''), 121,4 (C6'), 118,4 (C4''), 114,7 (C5), 113,0 (C2'', C6''), 111,6 (C5'), 106,3 (C2), 99,1 (CH₂), 57,8 (Cc), 56,9 (*o*-OCH₃), 56,2 (*p*-OCH₃), 55,8 (*m*-OCH₃), 45,5 (Cab).



Nomenclatura: 1-fenil-3-(5-(naftalen-1-il)-4,5-dihidro-1*H*-pirazol-3-il)fenol **8w**.

Fórmula Molecular: C₂₅H₂₀N₂O

Aspecto físico: Sólido marrom

Peso Molecular: 364,15 g/mol

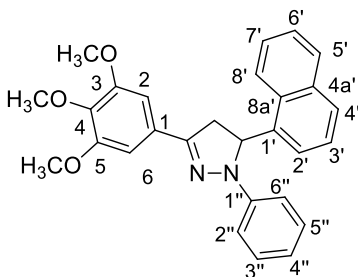
Rendimento: 76%

Ponto de fusão: 179-180°C

HRMS (ESI⁺) m/z: calculado para C₂₅H₂₀N₂O [M⁺]: 364,1570; encontrado, 364,1566.

RMN ¹H (400 MHz, acetona-*d*₆) δ/ppm: 10,75 (s, 1H, OH), 8,33 (d, 1H, H8', *J* = 8,6 Hz); 8,01 (d, 1H, H5', *J* = 8,2 Hz), 7,87 (m, 1H, H4'), 7,65 (m, 2H, H6', H7'); 7,42 (m, 2H, H2', H3'), 7,28 (m, 2H, H2, H4), 7,18 (dd, 2H, H3'', H5'', *J* = 8,2/7,4Hz), 7,00 (d, 1H, H6, *J* = 7,8 Hz), 6,94 (d, 2H, H2'', H5'', *J* = 7,8 Hz), 6,87 (dd, 1H, H5, *J* = 7,4/7,4 Hz), 6,80 (m, 1H, H4''), 6,13 (dd, 1H, Hc, *J* = 12,1/7,4 Hz), 4,39 (dd, 1H, Hb, *J* = 17,2/12,5 Hz), 3,30 (dd, 1H, Ha, *J* = 17,5/7,0 Hz).

RMN ¹³C (50 MHz, acetona-*d*₆) δ/ppm: 156,6 (C3), 150,8 (C=N), 144,1 (C1''), 136,9 (C5), 134,3 (C1'), 130,9 (C1), 130,0 (C4a'), 129,6 (C3''), C5''), 129,3 (C5'), 128,5 (C8a'), 128,3 (C3'), 127,0 (C4'), 126,4 (C7'), 126,1 (C6'), 123,7 (C8', C2'), 120,0 (C6), 119,6 (C4), 117,0 (C4''), 116,5 (C2), 113,1 (C2'', C6''), 60,0 (Cc), 43,7 (Cab).



Nomenclatura: 1-fenil-3-(3,4,5-trimetoxifenil)-5-(naftalen-1-il)-4,5-dihidro-1*H*-pirazol **8x**.

Fórmula Molecular: C₂₈H₂₆N₂O₃

Aspecto físico: Sólido amarelo

Peso Molecular: 438,19 g/mol

Rendimento: 83%

Ponto de fusão: 207-208°C

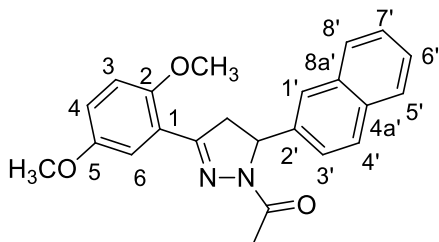
HRMS (ESI+) m/z: calculado para C₂₈H₂₆N₂O₃ [M⁺]: 438,1937; encontrado, 438,1940.

RMN ¹H (400 MHz, acetona-*d*₆) δ/ppm: 8,36 (d, 1H, H8', *J* = 7,8 Hz), 8,03 (d, 1H, H5', *J* = 8,2 Hz), 7,87 (d, 1H, H4', *J* = 8,2 Hz), 7,69 (dd, 1H, H6', *J* = 7,8/7,4 Hz), 7,62 (dd, 1H, H7', *J* = 7,4/7,0 Hz), 7,42 (dd, 1H, H3', *J* = 7,8/7,4 Hz), 7,33 (m, 1H, H2'), 7,14 (m, 4H, H2, H6, H3'', H5''), 7,02 (d, 2H, H2'', H6'', *J* = 7,8 Hz), 6,72 (m, 1H, H4''), 6,18 (dd, 1H, Hc, *J* = 12,1/7,0 Hz), 4,24 (dd, 1H, Hb, *J* = 17,5/12,5 Hz), 3,87 (s, 6H, *m*-OCH₃), 3,74 (s, 3H, *p*-OCH₃), 3,18 (dd, 1H, Ha, *J* = 17,1/6,2 Hz).

RMN ¹³C (50 MHz, acetona-*d*₆) δ/ppm: 153,4 (C3, C5), 148,2 (C=N), 144,7 (C1''), 138,7 (C1'), 137,4 (C8a'), 134,4 (C4a'), 130,0 (C5'), 129,3 (C3'', C5''), 128,2 (C4), 126,9 (C1), 126,4 (C3'), 126,4 (C4'), 126,3 (C7'), 126,1 (C6'), 123,9 (C2', C8') 118,9 (C4''), 113,1 (C2'', C6''), 103,5 (C2, C6), 60,5 (Cc), 60,5 (*p*-OCH₃), 56,3 (*m*-OCH₃), 42,9 (Cab).

8.2.1.3. Procedimento geral para a síntese de pirazolinas 9a-x

Em um balão de 25 mL e 1 boca, foram adicionados 1 mmol da chalcona correspondente, 3 mmol (0,2 mL) de hidrato de hidrazina e 10 mL de ácido acético. A mistura foi refluxada por 3h, sob agitação magnética, depois foi vertida sobre gelo. O precipitado formado foi filtrado a vácuo em funil de Büchner e recristalizado em etanol.



Nomenclatura: 1-(3-(2,5-dimetoxifenil)-5-(naftalen-2-il)-4,5-dihidro-1H-pirazol-1-il)etanona **9a**.

Fórmula Molecular: C₂₃H₂₂N₂O₃

Aspecto físico: Sólido bege

Peso Molecular: 374,16 g/mol

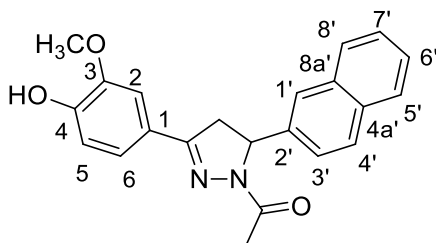
Rendimento: 80%

Ponto de fusão: 157-158°C

HRMS (APPI+) m/z: calculado para C₂₃H₂₂N₂O₃ [M+H⁺]: 375,1703 encontrado, 375,1702.

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) δ/ppm: (m, 3H, H4', H5', H8'), 7,66 (s, 1H, H1'), 7,46 (m, 2H, H6', H7'), 7,39 (s, 1H, H6), 7,30 (dd, 1H, H3', *J* = 8,0/1,5 Hz), 7,01 (s, 2H, H3, H4), 5,62 (dd, 1H, Hc, *J* = 12,0/4,0 Hz), 3,90 (m, 7H, Hb, *m*-OCH₃, *p*-OCH₃), 3,19 (dd, 1H, Ha, *J* = 18,0/4,0 Hz), 2,31 (s, 3H, COCH₃).

RMN ¹³C (50 MHz, DMSO-*d*₆) δ/ppm: 168,3 (C=O), 153,9 (C=N), 153,4 (C2), 152,8 (C5), 140,3 (C2'), 133,2 (C8a'), 132,6 (C4a'), 129,0 (C3'), 128,1 (C5'), 127,9 (C8'), 126,7 (C4'), 126,3 (C7'), 124,2 (C6'), 124,0 (C1'), 120,8 (C1), 117,6 (C4), 114,3 (C3), 113,5 (C6), 60,0 (Cc), 56,6 (OCH₃), 55,9 (OCH₃), 45,7 (Cab), 22,1 (CH₃).



Nomenclatura: 1-(3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-5-(naftalen-2-il)-4,5-dihidro-1H-pirazol-1-il)etanona **9b**.

Fórmula Molecular: C₂₂H₂₀N₂O₃

Aspecto físico: Sólido amarelo

Peso Molecular: 374,16 g/mol

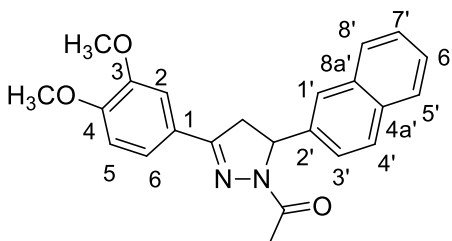
Rendimento: 87%

Ponto de fusão: 188-189 °C

HRMS (APPI+) m/z: calculado para C₂₈H₁₈N₄O₂ [M+H⁺]: 361,1547, encontrado, 361,1552.

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 9,58 (s, 1H, OH), 7,80 (m, 3H, H4', H5', H8'), 7,69 (s, 1H, H1'), 7,43 (m, 3H, H6', H7', H2), 7,32 (dd, 1H, H3', *J* = 8,4/1,5 Hz), 7,07 (dd, 1H, H6, *J* = 8,2/1,6 Hz), 6,90 (d, 1H, H5, *J* = 8,2 Hz), 5,74 (dd, 1H, Hc, *J* = 11,7/4,4 Hz), 3,96 (s, 3H, OCH₃), 3,78 (dd, 1H, Hb, *J* = 17,7/11,7 Hz), 3,28 (dd, 1H, Ha, *J* = 17,7/4,4 Hz), 2,34 (s, 3H, COCH₃).

RMN ¹³C (50 MHz, DMSO-*d*₆) δ/ppm 167,6 (C=O), 154,8 (C=N), 149,5 (C4), 148,1 (C3), 140,4 (C2'), 133,3 (C8a'), 132,6 (C4a'), 128,9 (C3'), 128,1 (C5'), 127,9 (C8'), 126,6 (C4'), 126,2 (C7'), 124,2 (C6, C6'), 122,8 (C1'), 121,1 (C1), 115,9 (C5), 110,5 (C2), 59,8 (Cc), 56,1 (OCH₃), 42,6 (Cab), 22,1 (CH₃).



Nomenclatura: 1-(3-(3,4-dimetoxifenil)-5-(naftalen-2-il)-4,5-dihidro-1H-pirazol-1-il)etanona **9c**.

Fórmula Molecular: C₂₃H₂₂N₂O₃

Aspecto físico: Sólido creme

Peso Molecular: 374,16 g/mol

Rendimento: 88%

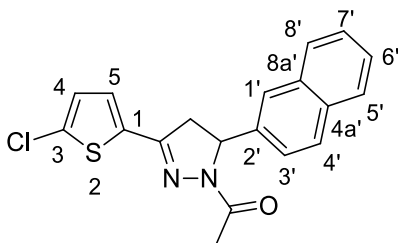
Ponto de fusão: 115-116°C

HRMS (APPI+) m/z: calculado para C₂₃H₂₂N₂O₃ [M+H⁺]: 375,1703; encontrado, 375,1707.

RMN ¹H (200 MHz, DMSO-*d*₆) δ/ppm: 7,82 (m, 3H, H4, H5, H8), 7,63 (s, 1H, H1), 7,44 (m, 2H, H6, H7), 7,34 (s, 1H, H2'), 7,24 (m, 2H, H3, H6'), 6,95 (d, 1H, H5', *J* = 8,3 Hz), 5,63 (dd, 1H, Hc, *J* = 11,4/4,0 Hz), 3,90 (m, 7H, Hb, *m*-OCH₃, *p*-OCH₃), 3,12 (dd, 1H, Ha, *J* = 17,9/4,0 Hz), 2,31 (s, 3H, COCH₃).

RMN ¹³C (50 MHz, DMSO-*d*₆) δ/ppm: 168,2 (C=O), 155,0 (C=N), 151,2 (C4), 149,1 (C3), 140,1 (C2'), 133,1 (C8a), 132,6 (C4a), 129,0 (C3'), 128,0 (C5'), 127,9 (C8'), 126,8 (C4'), 126,3 (C7'), 124,1 (C6'),

124,0 (C1'), 123,9 (C6), 121,0 (C1), 111,7 (C2), 109,3 (C5), 59,9 (Cc), 55,9 (*p*-OCH₃), 55,8 (*m*-OCH₃), 42,6 (Cab), 22,0 (CH₃).



Nomenclatura: 1-(3-(5-clorotiofen-2il)-5-(naftalen-2-il)-4,5-dihidro-1H-pirazol-1-il)etanona **9d**.

Fórmula Molecular: C₁₉H₁₅ClN₂OS

Aspecto físico: Sólido amarelo queimado

Peso Molecular: 354,06 g/mol

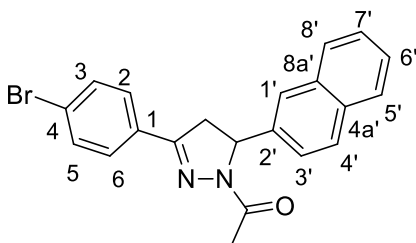
Rendimento: 62%

Ponto de fusão: 141-142°C

HRMS (APPI+) m/z: calculado para C₁₉H₁₅ClN₂OS [M+H]⁺: 355,0666; encontrado, 355,0667.

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 7,80 (m, 3H, H4', H5', H8'), 7,67 (d, 1H, H1', *J* = 1,39 Hz), 7,50 (m, 2H, H7', H6'), 7,30 (dd, 1H, H3', *J* = 8,4/1,7 Hz), 6,94 (d, 1H, H4, *J* = 3,91 Hz), 6,88 (d, 1H, H5, *J* = 3,91 Hz), 5,74 (dd, 1H, Hc, *J* = 11,8/4,8 Hz), 3,75 (dd, 1H, Hb, *J* = 17,4/11,8 Hz), 3,14 (dd, 1H, Ha, *J* = 17,4/4,8 Hz), 2,40 (s, 3H, COCH₃).

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 168,8 (C=O), 148,8 (C=N), 138,5 (C2'), 133,7 (C8a'), 133,5 (C3), 133,2 (C1), 132,9 (C4a'), 129,1 (C3'), 128,0 (C5'), 127,9 (C8'), 127,6 (C4), 126,3 (C4'), 126,3 (C5), 126,0 (C1'), 124,5 (C7'), 123,2 (C6'), 60,2 (Cc), 42,3 (Cab), 21,8 (CH₃).



Nomenclatura: 1-(3-(4-bromofenil)-5-(naftalen-2-il)-4,5-dihidro-1H-pirazol-1-il)etanona **9e**.

Fórmula Molecular: C₂₁H₁₇BrN₂O

Aspecto físico: Sólido laranja

Peso Molecular: 392,05 g/mol

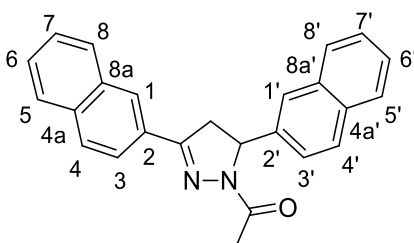
Rendimento: 73%

Ponto de fusão: 124-125°C

HRMS (APPI+) m/z: calculado para C₂₁H₁₇BrN₂O [M+H]⁺: 393,0597; encontrado, 393,0600.

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 7,88 (m, 3H, H4', H5', H8'), 7,68 (m, 5H, H2, H6, H3, H5, H1'), 7,48 (m, 2H, H6, H7'), 7,34 (d, 1H, H3', J = 8,5 Hz), 5,71 (dd, 1H, Hc, J = 11,6/4,6 Hz), 3,88 (dd, 1H, Hb, J = 18,0/11,6 Hz), 3,20 (dd, 1H, Ha, J = 18,0/4,6 Hz), 2,37 (m, 3H, COCH₃).

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 168,0 (C=O), 153,6 (C=N), 140,0 (C2'), 133,3 (C8a'), 132,7 (C4a'), 132,1 (C3, C5), 130,7 (C1), 128,9 (C2, C6), 128,1 (C3'), 128,9 (C5'), 126,7 (C8'), 126,3 (C4'), 124,4 (C1'), 124,2 (C7'), 124,1 (C6'), 60,3 (Cc), 42,3 (Cab), 22,2 (CH₃).



Nomenclatura: 1-(3,5-di(naftalen-2-il)-4,5-dihidro-1H-pirazol-1-il)etanona **9f**.

Fórmula Molecular: C₂₅H₂₀N₂O

Aspecto físico: Sólido branco

Peso Molecular: 364,16 g/mol

Rendimento: 94%

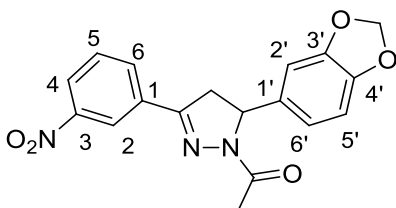
Ponto de fusão: 225-226°C

HRMS (APPI+) m/z: calculado para C₂₅H₂₀N₂O [M+H]⁺: 365,1648; encontrado, 365,1645.

RMN ¹H (200 MHz, DMSO-*d*₆) δ/ppm: 8,20 (s, 1H, H1), 8,10 (dd, 1H, H3, J = 8,7/1,5 Hz), 8,00 (d, 1H, H4, J = 8,7 Hz), 7,93 (m, 5H, H4', H5', H8', H5, H8), 7,75 (s, 1H, H1'), 7,53 (m, 4H, H6', H7', H6, H7), 7,38 (dd, 1H, H3', J = 8,4/1,5 Hz), 5,78 (dd, 1H, Hc, J = 11,7/4,6 Hz), 4,06 (dd, 1H, Hb, J = 18,0/11,7 Hz), 3,41 (dd, 1H, Ha, J = 18,0/4,6 Hz), 2,40 (s, 3H, COCH₃).

RMN ¹³C (50 MHz, DMSO-*d*₆) δ/ppm: 168,0 (C=O), 154,6 (C=N), 140,2 (C2'), 134,0 (C4a), 133,3 (C8a), 133,1 (C8a'), 132,7 (C4a'), 129,1 (C3'), 129,0 (C5'), 128,8 (C8'), 128,7 (C2), 128,1 (C5, C8), 127,9 (C6,

C7), 127,7 (C4), 127,2 (C1), 126,7 (C4'), 126,3 (C7'), 124,4 (C3), 124,3 (C6'), 123,5 (C1'), 60,2 (Cc), 42,5 (Cab), 22,2 (CH₃).



Nomenclatura: 1-(5-(benzo[*d*][1,3]dioxol-5-il)-3-(3-nitrofenil)-4,5-dihidro-1H-pirazol-1-il)etanona **9g**.

Fórmula Molecular: C₁₈H₁₅N₃O₅

Aspecto físico: Sólido marrom

Peso Molecular: 353,10 g/mol

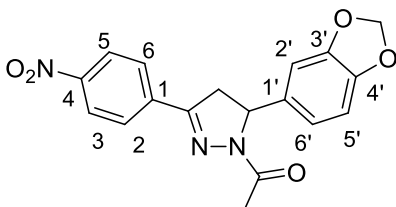
Rendimento: 85%

Ponto de fusão: 143-144°C

HRMS (APPI+) m/z: calculado para C₁₈H₁₅N₃O₅ [M+H]⁺: 354,1084; encontrado, 354,1086.

RMN ¹H (200 MHz, DMSO-*d*₆) δ/ppm: 8,51 (s, 1H, H2), 8,21 (d, 1H, H4, *J* = 8,0 Hz), 8,16 (d, 1H, H6, *J* = 8,0 Hz), 7,75 (dd, 1H, H5, *J* = 8,0/8,0 Hz), 6,78 (m, 3H, H2', H5', H6'), 5,98 (s, 2H, CH₂), 5,52 (dd, 1H, Hc, *J* = 12,0/4,4 Hz), 3,88 (dd, 1H, Hb, *J* = 18,0/12,0 Hz), 3,24 (dd, 1H, Ha, *J* = 18,0/4,4 Hz), 2,34 (s, 3H, COCH₃).

RMN ¹³C (50 MHz, DMSO-*d*₆) δ/ppm: 168,1 (C=O), 152,8 (C=N), 148,4 (C3), 147,9 (C3'), 146,8 (C4'), 134,4 (C1), 133,2 (C1'), 133,2 (C6), 130,8 (C5), 124,8 (C4), 121,1 (C2), 119,3 (C6'), 108,6 (C5'), 106,5 (C2'), 101,4 (CH₂), 60,1 (Cc), 42,2 (Cab), 22,1 (CH₃).



Nomenclatura: 1-(5-(benzo[*d*][1,3]dioxol-5-il)-3-(4-nitrofenil)-4,5-dihidro-1H-pirazol-1-il)etanona **9h**.

Fórmula Molecular: C₁₈H₁₅N₃O₅

Aspecto físico: Sólido amarelo

Peso Molecular: 353,10 g/mol

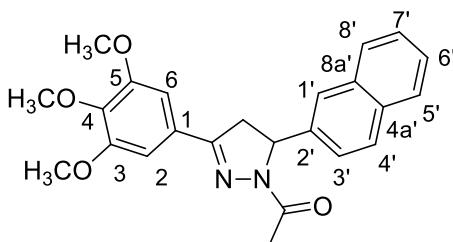
Rendimento: 80%

Ponto de fusão: 199-200°C

HRMS (APPI+) m/z: calculado para $C_{18}H_{15}N_3O_5$ $[M+H]^+$: 354,1084; encontrado, 354,1081.

RMN 1H (200 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm : 8,28 (d, 2H, H3, H5, $J = 8,0$ Hz), 7,89 (d, 2H, H2, H6, $J = 8,0$ Hz), 6,73 (m, 3H, H2', H5', H6'), 5,92 (s, 2H, CH_2), 5,57 (dd, 1H, Hc, $J = 12,0/4,8$ Hz), 3,77 (dd, 1H, Hb, $J = 18,0/12,0$ Hz), 3,17 (dd, 1H, Ha, $J = 18/4,8$ Hz), 2,44 (s, 2H, $COCH_3$).

RMN ^{13}C (50 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm : 169,1 (C=O), 151,4 (C=N), 148,4 (C4), 148,1 (C3'), 147,2 (C4'), 137,3 (C1), 135,2 (C1'), 127,1 (C2, C6), 123,9 (C3, C5), 119,0 (C6'), 108,5 (C5'), 105,8 (C2'), 101,1 (CH_2), 60,3 (Cc), 42,0 (Cab), 21,9 (CH_3).



Nomenclatura: 1-(3-(3,4,5-trimetoxifenil)-5-(naftalen-2-il)-4,5-dihidro-1H-pirazol-1-il)etanona **9i**.

Fórmula Molecular: $C_{24}H_{24}N_2O_4$

Aspecto físico: Sólido bege

Peso Molecular: 404,17 g/mol

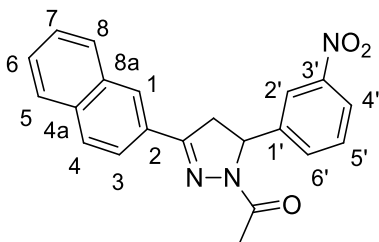
Rendimento: 91%

Ponto de fusão: 171-172°C

HRMS (APPI+) m/z: calculado para $C_{24}H_{24}N_2O_4$ $[M+H]^+$: 405,1809; encontrado, 405,1804.

RMN 1H (200 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm : 7,79 (m, 3H, H4', H5', H8'), 7,69 (s, 1H, H1'), 7,44 (m, 2H, H6', H7'), 7,32 (dd, 1H, H3', $J = 8,5/1,7$ Hz), 6,98 (s, 2H, H2, H6), 5,76 (dd, 1H, Hc, $J = 12,0/4,6$ Hz), 3,90 (s, 6H, 3-O CH_3 , 5-O CH_3), 3,89 (s, 3H, 4-O CH_3), 3,80 (dd, 1H, Hb, $J = 18,0/12,0$ Hz), 3,21 (dd, 1H, Ha, $J = 18,0/4,6$ Hz), 2,47 (s, 3H, $COCH_3$).

RMN ^{13}C (50 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm : 168,8 (C=O), 153,7 (C=N), 153,4 (C3, C5), 140,2 (C2'), 139,0 (C4), 133,3 (C8a'), 132,8 (C4a'), 129,0 (C1), 127,9 (C3'), 127,6 (C5'), 126,8 (C8'), 126,2 (C4'), 125,9 (C1'), 124,4 (C7'), 123,3 (C6'), 103,9 (C2, C6), 60,9 (4-O CH_3), 60,2 (Cc), 56,2 (3-O CH_3 , 5-O CH_3), 42,5 (Cab), 21,9 (CH_3).



Nomenclatura: 1-(3-(naftalen-2-il)-5-(3-nitrofenil)-4,5-dihidro-1H-pirazol-1-il)etanona **9j**.

Fórmula Molecular: C₂₁H₁₇N₃O₃

Aspecto físico: Sólido marrom

Peso Molecular: 359,13 g/mol

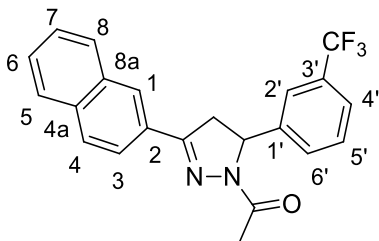
Rendimento: 81%

Ponto de fusão: 152-153 °C

HRMS (APPI+) m/z: calculado para C₂₁H₁₇N₃O₃ [M+H]⁺: 360,13427; encontrado, 360,13429.

RMN ¹H (200 MHz, DMSO-*d*₆) δ/ppm: 8,00 (m, 7H, H2, H4, H1', H3', H4', H5', H8'), 7,59 (m, 4H, H6', H7', H5, H6), 5,71 (dd, 1H, Hc, *J* = 11,7/4,8 Hz), 3,97 (dd, 1H, Hb, *J* = 18,3/11,7 Hz), 3,30 (dd, 1H, Ha, *J* = 18,3/4,8 Hz), 2,34 (s, 3H, COCH₃).

RMN ¹³C (50 MHz, DMSO-*d*₆) δ/ppm: 168,4 (C=O), 154,9 (C=N), 148,3 (C3) 144,7 (C1), 134,0 (C6), 133,0 (C4a'), 132,7 (C8a'), 130,8 (C5), 128,8 (C2'), 128,7 (C5', C8'), 128,1 (C7'), 128,0 (C6'), 127,8 (C4'), 127,3 (C1'), 123,4 (C3'), 122,7 (C2), 120,9 (C4), 59,4 (Cc), 42,1 (Cab), 22,0 (CH₃).



Nomenclatura: 1-(5-(3-trifluormetil)fenil)-3-(naftalen-2-il)-4,5-dihidro-1H-pirazol-1-il)etanona **9k**.

Fórmula Molecular: C₂₂H₁₇F₃N₂O

Aspecto físico: Sólido branco

Peso Molecular: 382,13 g/mol

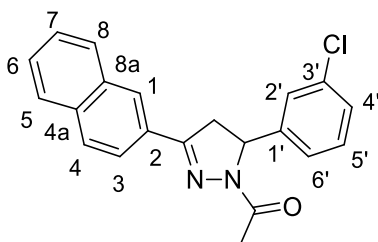
Rendimento: 75%

Ponto de fusão: 130-131°C

HRMS (APPI+) m/z: calculado para C₂₂H₁₇F₃N₂O [M+H]⁺: 383,1366; encontrado, 383,1363.

RMN ¹H (200 MHz, DMSO-*d*₆) δ/ppm: 8,08 (dd, 1H, H5, *J*= 1,6 Hz), 7,87 (m, 4H, H aromáticos), 7,51 (m, 6H, H aromáticos), 5,68 (dd, 1H, Hc, *J*=12,0/4,9 Hz), 3,91 (dd, 1H, Hb, *J*= 18,0/12,0 Hz), 3,28 (dd, 1H, Ha, *J*= 18,0/4,9 Hz), 2,49 (s, 3H, COCH₃).

RMN ¹³C (50 MHz, DMSO-*d*₆) δ/ppm: 169,0 (C=O), 153,7 (C=N), 142,8 (C1'), 134,2 (C4a), 132,9 (C8a), 129,4 (C2), 128,9 (C4), 128,6 (C3), 128,6 (C5, C8), 128,3 (C3'), 127,8 (C6, C7), 127,3 (C6'), 127,2 (C5'), 126,8 (C1), 124,6 (CF₃), 123,1 (C2'), 122,5 (C4'), 59,6 (Cc), 42,2 (Cab), 21,9 (CH₃).



Nomenclatura: 1-(5-(3-clorofenil)-3-(naftalen-2-il)-4,5-dihidro-1H-pirazol-1-il)etanona **9I**.

Fórmula Molecular: C₂₁H₁₇ClN₂O

Aspecto físico: Sólido branco

Peso Molecular: 348,10 g/mol

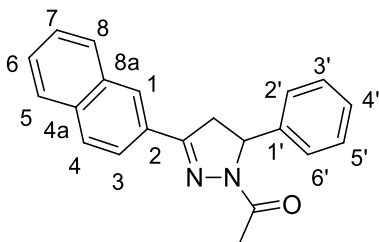
Rendimento: 84%

Ponto de fusão: 132-133°C

HRMS (APPI+) m/z: calculado para C₂₁H₁₇ClN₂O [M+H]⁺: 349,1102; encontrado, 349,1104.

RMN ¹H (200 MHz, DMSO-*d*₆) δ/ppm: 8,06 (dd, 1H, H5, *J*= 8,5/1,6 Hz), 7,85 (m, 4H, H1, H3, H4, H8), 7,54 (m, 2H, H6, H7), 7,19 (m, 4H, H2', H4', H5', H6'), 5,60 (dd, 1H, Hc, *J*= 12,0/4,8 Hz), 3,86 (dd, 1H, Hb, *J*= 17,6/12,0 Hz), 3,27 (dd, 1H, Ha, *J*= 17,6/4,8 Hz), 2,48 (s, 3H, COCH₃).

RMN ¹³C (50 MHz, DMSO-*d*₆) δ/ppm: 169,0 (C=O), 153,9 (C=N), 143,8 (C1'), 134,7 (C3'), 134,2 (C4a), 132,9 (C8a), 130,2 (C2), 128,7 (C4), 128,5 (C5), 128,4 (C8), 127,9 (C5'), 127,3 (C6, C7), 127,2 (C4'), 126,8 (C2'), 125,7 (C1), 123,8 (C6'), 123,2 (C3), 59,5 (Cc), 42,1 (Cab), 21,9 (CH₃).



Nomenclatura: 1-(5-fenil)-(3-naftalen-2-il)-4,5-dihidro-1H-pirazol-1-il)etanona **9m**.

Fórmula Molecular: C₂₁H₁₈N₂O

Aspecto físico: Sólido branco

Peso Molecular: 314,14 g/mol

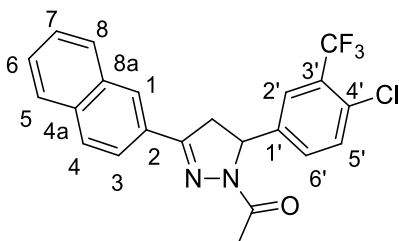
Rendimento: 80%

Ponto de fusão: 158-159°C

HRMS (APPI+) m/z: calculado para C₂₁H₁₈N₂O [M+H]⁺: 315,1492; encontrado, 315,1498.

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 8,07 (dd, 1H, H5, J= 8,5/1,5 Hz), 7,85 (m, 4H, H1, H3, H4, H8), 7,51 (m, 2H, H6, H7), 7,27 (m, 5H, H2', H3', H4', H5', H6'), 5,62 (dd, 1H, Hc, J= 12,0/4,6 Hz), 3,82 (dd, 1H, Hb, J= 18,0/12,0 Hz), 3,28 (dd, 1H, Hb, J= 18,0/4,6), 2,47 (s, 3H, COCH₃).

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 168,7 (C=O), 153,8 (C=N), 141,8 (C1'), 134,1 (C4a), 132,9 (C8a), 129,1 (C2), 128,9 (C3', C5'), 128,5 (C4), 128,3 (C3), 127,8 (C5), 127,6 (C8), 127,2 (C6), 127,1 (C7), 126,7 (C1), 125,5 (C2', C6'), 123,2 (C4'), 60,0 (Cc), 42,2 (Cab), 22,0 (CH₃).



Nomenclatura: 1-(5-(4-cloro-3-(trifluormetil)fenil)-3-(naftalen-2-il)-4,5-dihidro-1H-pirazol-1-il)etanona **9n**.

Fórmula Molecular: C₂₂H₁₆ClF₃N₂O

Aspecto físico: Sólido branco

Peso Molecular: 416,09 g/mol

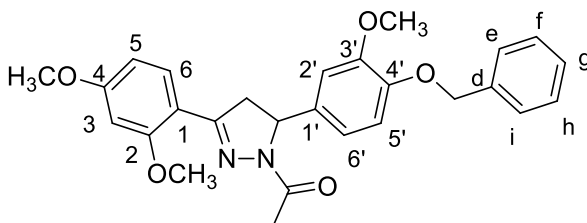
Rendimento: 68%

Ponto de fusão: 127-128°C

HRMS (APPI+) m/z: calculado para $C_{22}H_{16}ClF_3N_2O$ $[M+H]^+$: 417,0976; encontrado, 417,0979.

RMN 1H (200 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm : 8,07 (dd, 1H, H5, $J = 8,5/1,6$ Hz), 7,86 (m, 4H, H1, H3, H4, H8), 7,55 (m, 3H, H6, H7, H3'), 7,45 (d, 1H, H5', $J = 8,3$ Hz), 7,35 (dd, 1H, H6', $J = 8,3/2,0$ Hz), 5,63 (dd, 1H, Hc, $J = 12,0/5,0$ Hz), 3,89 (dd, 1H, Hb, $J = 17,8/12,0$ Hz), 3,25 (dd, 1H, Ha, $J = 17,8/5,0$ Hz), 2,48 (s, 3H, $COCH_3$).

RMN ^{13}C (50 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm : 169,1 (C=O), 153,7 (C=N), 140,9 (C1'), 134,2 (C4a), 132,9 (C8a), 132,0 (C6'), 130,1 (C3'), 128,6 (C2), 128,4 (C5, C8), 127,8 (C4), 127,4 (C6), 127,2 (C7), 126,9 (C1), 125,1 (CF₃), 123,1 (C3), 59,2 (Cc), 42,0 (Cab), 21,9 (CH₃).



Nomenclatura: 1-(5-(4-(benziloxi)-3-metoxifenil)-3-(2,4-dimetoxifenil)-4,5-dihidro-1H-pirazol-1-il)etanona **9o**.

Fórmula Molecular: $C_{27}H_{28}N_2O_5$

Aspecto físico: Sólido bege

Peso Molecular: 460,20 g/mol

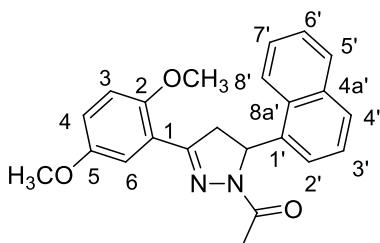
Rendimento: 88%

Ponto de fusão: 124-125°C

HRMS (APPI+) m/z: calculado para $C_{27}H_{28}N_2O_5$ $[M+H]^+$: 461,2071; encontrado, 461,2074.

RMN 1H (200 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm : 7,87 (d, 1H, H6, $J = 8,5$ Hz), 7,35 (m, 5H, He, Hf, Hg, Hh, Hi), 6,80 (m, 2H, H2', H5'), 6,71 (dd, 1H, H6', $J = 8,3/1,8$ Hz), 6,55 (dd, 1H, H5, $J = 8,5/2,4$ Hz), 6,46 (d, 1H, H3, $J = 2,4$ Hz), 5,44 (dd, 1H, Hc, $J = 11,6/4,4$ Hz), 5,10 (s, 2H, CH₂), 3,86 (s, 3H, *o*-OCH₃), 3,85 (m, 2H, Hb), 3,84 (s, 3H, *m*-OCH₃), 3,79 (s, 3H, *p*-OCH₃), 3,28 (dd, 1H, Ha, $J = 18,0/4,4$ Hz), 2,39 (s, 3H, $COCH_3$).

RMN ^{13}C (50 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm : 168,7 (C=O), 162,6 (C4), 159,6 (C2), 154,2 (C=N), 149,7 (C3'), 147,5 (C4'), 137,2 (Cd), 135,5 (C1'), 130,1 (C6), 128,4 (Cf, Ch), 127,7 (Cg), 127,1 (Ci, Ce), 117,6 (C6'), 114,1 (C5'), 113,4 (C2'), 109,8 (C1), 105,5 (C5), 98,6 (C3), 71,0 (CH₂), 59,4 (Cc), 58,0 (OCH₃), 55,4 (OCH₃), 55,3 (OCH₃), 45,5 (Cab), 21,9 (COCH₃).



Nomenclatura: 1-(3-(2,5-dimetoxifenil)-5-(naftalen-1-il)-4,5-dihidro-1H-pirazol-1-il)etanona **9p**.

Fórmula Molecular: C₂₃H₂₂N₂O₃

Aspecto físico: sólido creme

Peso Molecular: 374,16 g/mol

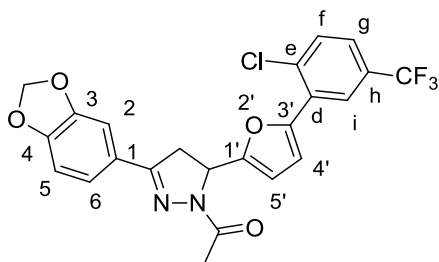
Rendimento: 90%

Ponto de fusão: 182-183 °C

HRMS (ESI+) m/z: calculado para [M+H]⁺: C₂₃H₂₂N₂O₃ [M+H]⁺: 375,1703; encontrado, 375,1707.

RMN ¹H (200 MHz, DMSO-*d*₆) δ/ppm: 8,16 (d, 1H, H8', *J* = 7,5 Hz), 7,98 (d, 1H, H5', *J* = 7,3 Hz), 7,84 (d, 1H, H4', *J* = 8,0 Hz), 7,61 (m, 2H, H6', H7'), 7,46 (m, 2H, H4', H6), 7,15 (d, 1H, H2', *J* = 7,0 Hz), 7,02 (s, 2H, H3, H4), 6,24 (dd, 1H, Hc, *J* = 11,7/4,4 Hz), 4,16 (dd, 1H, Hb, *J* = 18,4/11,7 Hz), 3,76 (s, 3H, *o*-OCH₃), 3,66 (s, 3H, *m*-OCH₃), 3,06 (dd, 1H, Ha, *J* = 18,4/4,4 Hz), 2,42 (s, 3H, COCH₃).

RMN ¹³C (50 MHz, DMSO-*d*₆) δ/ppm: 168,0 (C=O), 154,0 (C=N), 153,4 (C5), 152,8 (C2), 137,7 (C1'), 134,1 (C4a'), 129,7 (C8a'), 129,2 (C5'), 127,8 (C3'), 126,8 (C4'), 126,2 (C7'), 126,0 (C6'), 123,7 (C8'), 121,5 (C2'), 120,9 (C1), 117,8 (C4), 114,4 (C3), 113,4 (C6), 57,2 (Cc), 56,8 (*o*-OCH₃), 56,0 (*m*-OCH₃), 45,5 (Cab), 22,1 (CH₃).



Nomenclatura: 1-(3-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-5-(5-(2-cloro-5-(trifluorometil)fenil) furan-2-il)-dihidro-1H-pirazol-1-il)etanona **9q**.

Fórmula Molecular: C₂₃H₁₆ClF₃N₂O₄

Aspecto físico: Sólido amarelo

Peso Molecular: 476,08 g/mol

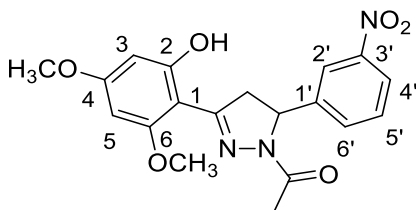
Rendimento: 81%

Ponto de fusão: 168-170°C

HRMS (APPI+) m/z: calculado para C₂₃H₁₆ClF₃N₂O₄ [M+H]⁺: 477,0823; encontrado, 477,0827.

RMN ¹H (200 MHz, DMSO-*d*₆) δ/ppm: 7,95 (s, 1H, Hi), 7,50 (d, 1H, Hg, *J* = 8,0 Hz), 7,37 (m, 2H, Hf, H2), 7,13 (m, 2H, H6, H5'), 6,80 (d, 1H, H5, *J* = 8,0 Hz), 6,43 (d, 1H, H4', *J* = 3,5 Hz), 6,00 (s, 2H, CH₂), 5,74 (dd, 1H, Hc, *J* = 11,1/4,9 Hz), 3,60 (dd, 1H, Hb, *J* = 17,3/11,1 Hz), 3,47 (dd, 1H, Ha, *J* = 17,3/4,9 Hz), 2,41 (s, 3H, COCH₃).

RMN ¹³C (50 MHz, DMSO-*d*₆) δ/ppm: 168,9 (C=O), 153,8 (C=N), 152,9 (C3'), 149,7 (C4), 148,2 (C1'), 148,1 (C3) 133,2 (Cd), 131,2 (Ce), 129,5 (Ci), 129,0 (Cf), 126,2 (C1), 125,4 (Cg), 124,5 (Ch), 124,4, 124,2, 124,1, 121,6 (C6), 113,1 (C5), 109,3 (C2), 108,2 (C4'), 106,1 (C5'), 101,5 (CH₂), 53,5 (Cc), 38,8 (Cab), 21,8 (CH₃)



Nomenclatura: 1-(3-(2-hidroxi-4,6-dimetoxifenil)-5-(3-nitrofenil)-4,5-dihidro-1H-pirazol-1-il)etanona **9r**.

Fórmula Molecular: C₁₉H₁₉N₃O₆

Aspecto físico: Sólido amarelo

Peso Molecular: 385,13 g/mol

Rendimento: 60%

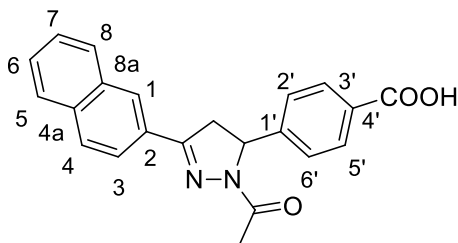
Ponto de fusão: 227-228°C

HRMS (APPI+) m/z: calculado para C₁₉H₁₉N₃O₆ [M+H]⁺: 386,1347; encontrado, 186,1346.

RMN ¹H (200 MHz, DMSO-*d*₆) δ/ppm: 11,43 (s, 1H, OH), 8,12 (m, 2H, H2', H4'), 6,21 (d, 1H, H3, *J* = 2,1 Hz), 6,01 (d, 1H, H5, *J* = 2,1 Hz), 5,51 (dd, 1H, Hc, *J* = 11,8/5,0 Hz), 4,05 (dd, 1H, Hb, *J* = 19,0/11,8 Hz), 3,82 (s, 3H, OCH₃), 3,76 (s, 3H, OCH₃), 3,47 (dd, 1H, Ha, *J* = 19,0/5,0 Hz), 2,37 (s 3H, COCH₃).

RMN ¹³C (50 MHz, DMSO-*d*₆) δ/ppm: 167,6 (C=O), 163,4 (C4), 161,4 (C2), 160,5 (C6), 158,3 (C=N), 148,5 (C3'), 143,8 (C1'), 131,9 (C6'),

129,9 (C5'), 122,6 (C4'), 120,9 (C2'), 98,7 (C1), 93,9 (C3), 91,1 (C5), 57,3 (Cc), 55,5 (OCH₃), 46,4 (Cab), 21,9 (CH₃).



Nomenclatura: Ácido-4-(1-acetil-3-(naftalen-2-il)-4,5-dihidro-1H-pirazol-5-il) benzóico **9s**.

Fórmula Molecular: C₂₂H₁₈N₂O₃

Aspecto físico: Sólido branco

Peso Molecular: 358,13 g/mol

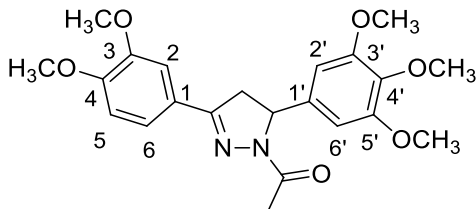
Rendimento: 62%

Ponto de fusão: 240-241°C

HRMS (APPI+) m/z: calculado para C₂₂H₁₈N₂O₃ [M+H]⁺: 359,1390; encontrado, 359,1393.

RMN ¹H (200 MHz, DMSO-*d*₆) δ/ppm: 8,17 (s, 1H, H1), 8,07 (dd, 1H, H5, *J*= 8,7/1,3 Hz), 7,97 (m, 5H, H3, H4, H8, H3', H5'), 7,57 (m, 2H, H6, H7), 7,36 (d, 2H, H2', H6', *J*= 8,3 Hz), 5,67 (dd, 1H, Hc, *J*= 11,7/ 4,6 Hz), 4,00 (dd, 1H, Hb, *J*=18,0/11,7 Hz), 3,29 (dd, 1H, Ha, *J*= 18,0/4,6 Hz), 2,83 (s, 3H, COCH₃).

RMN ¹³C (50 MHz, DMSO-*d*₆) δ/ppm: 168,0 (COOH), 167,4 (C=O), 154,5 (C=N), 147,5 (C1'), 134,0 (C4a), 133,1 (C8a), 130,2 (C3', C5'), 128,9 (C5), 128,8 (C8), 128,7 (C4), 128,1 (C4'), 127,9 (C6), 127,7 (C7), 127,2 (C1), 126,1 (C2', C6'), 123,4 (C3), 59,8 (Cc), 42,3 (Cab), 22,1 (CH₃).



Nomenclatura: 1-(3-(3,4-dimetoxifenil)-5-(3,4,5-trimetoxifenil)-4,5-dihidro-1H-pirazol-1-il)etanona **9t**.

Fórmula Molecular: C₂₂H₂₆N₂O₆

Aspecto físico: Sólido branco

Peso Molecular: 414,18 g/mol

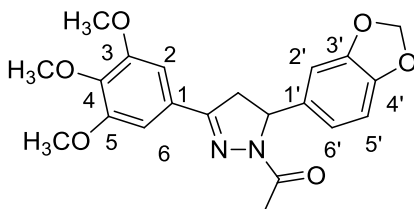
Rendimento: 83%

Ponto de fusão: 197-198°C

HRMS (APPI+) m/z: calculado para C₂₂H₂₆N₂O₆ [M+H]⁺: 415,1791; encontrado, 415,1911.

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 7,88 (d, 1H, H5, J= 8,7 Hz), 6,56 (dd, 1H, H6, J= 8,7/2,4 Hz), 6,47 (d, 1H, H2, J= 2,4 Hz), 6,45 (s, 2H, H2', H6'), 5,44 (dd, 1H, Hc, J= 11,6/4,5 Hz), 3,90 (m, 1H, Hb), 3,85 (s, 3H, OCH₃), 3,83 (s, 6H, 3'-OCH₃, 5'-OCH₃), 3,81 (s, 3H, OCH₃), 3,80 (s, 3H, OCH₃), 2,42 (s, 3H, COCH₃).

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 168,8 (C=O), 162,7 (C4), 159,6 (C3), 154,2 (C=N), 153,4 (C3', C5'), 138,1 (C1'), 137,0 (C4'), 130,0 (C1), 113,3 (C6), 105,5 (C2), 102,4 (C2', C6'), 98,5 (C5), 60,6 (OCH₃), 59,9 (Cc), 56,0 (3'-OCH₃, 5'-OCH₃), 55,4 (OCH₃), 55,4 (OCH₃), 45,6 (Cab), 21,9 (CH₃).



Nomenclatura: 1-(5-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-3-(3,4,5-trimetoxifenil)-4,5-dihidro-1H-pirazol-1-il)etanona **9u**.

Fórmula Molecular: C₂₁H₂₂N₂O₆

Aspecto físico: Sólido branco

Peso Molecular: 398,15 g/mol

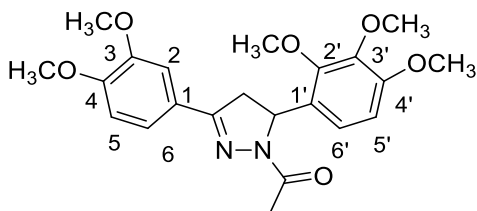
Rendimento: 91%

Ponto de fusão: 161-162°C

HRMS (APPI+) m/z: calculado para C₂₁H₂₂N₂O₆ [M+H]⁺: 399,1551; encontrado, 399,1556.

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 6,69 (s, 2H, H2, H6), 6,71 (m, 3H, H2', H5', H6'), 5,91 (s, 2H, CH₂), 5,51 (dd, 1H, Hc, J= 11,7/4,4 Hz), 3,91 (s, 6H, 3-OCH₃, 5-OCH₃), 3,89 (s, 3H, 4-OCH₃), 3,72 (dd, 1H, Hb, J= 17,5/11,7 Hz), 3,11 (dd, 1H, Ha, J= 17,5/4,4 Hz), 2,42 (s, 3H, COCH₃).

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 168,7 (C=O), 153,6 (C4), 153,3 (C3, C5), 148,0 (C3'), 147,0 (C4'), 135,8 (C1'), 126,7 (C1), 119,0 (C6'), 108,4 (C5'), 105,9 (C2'), 103,8 (C2, C6), 101,0 (CH₂), 60,9 (4-OCH₃), 59,8 (Cc), 56,2 (3-OCH₃, 5-OCH₃), 42,4 (CH₂), 21,9 (CH₃).



Nomenclatura: 1-(3-(3,4-dimetoxifenil)-5-(2,3,4-trimetoxifenil)-4,5-dihidro-1H-pirazol-1-il)etanona **9v**.

Fórmula Molecular: C₂₂H₂₆N₂O

Aspecto físico: Sólido laranja

Peso Molecular: 414,18 g/mol

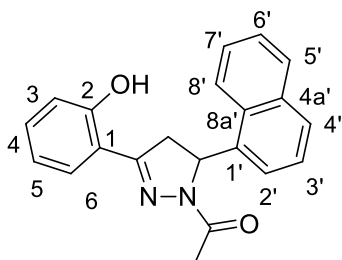
Rendimento: 90%

Ponto de fusão: 194-195°C

HRMS (APPI+) m/z: calculado para C₂₂H₂₆N₂O [M+H]⁺: 415,1791; encontrado, 415,1859.

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 7,86 (d, 1H, H₅, *J* = 8,5 Hz), 6,54 (m, 4H, H₂, H₆, H_{5'}, H_{6'}), 5,69 (dd, 1H, H_c, *J* = 11,7/4,8 Hz), 3,85 (s, 3H, OCH₃), 3,84 (s, 3H, OCH₃), 3,82 (s, 3H, OCH₃), 3,79 (s, 3H, OCH₃), 3,78 (s, 3H, OCH₃), 3,75 (m, 1H, H_b), 3,15 (dd, 1H, H_a, *J* = 18,0/4,8 Hz), 2,41 (s, 3H, COCH₃).

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 168,5 (C=O), 162,5 (C₄), 159,5 (C_{4'}), 154,7 (C=N), 150,4 (C_{2'}), 148,9 (C₃), 143,1 (C_{3'}), 130,0 (C₁), 121,9 (C_{1'}), 113,7 (C₆), 110,7 (C_{6'}), 105,4 (C₂), 98,5 (C₅), 98,2 (C_{5'}), 56,7 (C_c), 56,5 (OCH₃), 56,1 (OCH₃), 55,4 (OCH₃), 55,3 (OCH₃), 55,1 (OCH₃), 44,7 (C_{ab}), 21,9 (CH₃).



Nomenclatura: 1-(3-(2-hidroxifenil)-5-(naftalen-1-il)-4,5-dihidro-1H-pirazol-1-il)etanona **9w**.

Fórmula Molecular: C₂₁H₁₈N₂O₂

Aspecto físico: Sólido amarelo

Peso Molecular: 330,14 g/mol

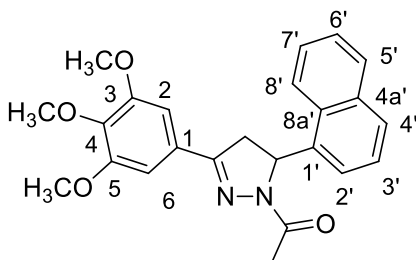
Rendimento: 86%

Ponto de fusão: 198-199 °C

HRMS (APPI+) m/z: calculado para $C_{21}H_{18}N_2O_2$ $[M+H]^+$: 331,1441; encontrado, 331,1443.

RMN 1H (200 MHz, DMSO- d_6) δ/ppm : 10.23 (s, 1H, OH), 8.14 (d, 1H, H8', $J = 8.0$ Hz), 7.96 (d, 1H, H5', $J = 7.5$ Hz), 7.82 (d, 1H, H4', $J = 8.0$ Hz), 7.55 (m, 3H, H4', H6', H7'), 7.41 (dd, 1H, H5, $J = 7.7/7.7$ Hz), 7.29 (dd, 1H, H4, $J = 7.5/7.8$ Hz), 7.15 (d, 1H, H2', $J = 7.0$ Hz), 6.89 (m, 2H, H3, H6), 6.22 (dd, 1H, Hc, $J = 11.6/4.0$ Hz), 4.19 (dd, 1H, Hb, $J = 18.1/12.0$ Hz), 3.14 (dd, 1H, Ha, $J = 18.1/4.1$ Hz), 2.39 (s, 3H, COCH₃).

RMN ^{13}C (50 MHz, DMSO- d_6) δ/ppm : 167.7 (C=O), 157.1 (C2), 156.5 (C=N), 137.2 (C1'), 134.1 (C4a'), 132.3 (C4), 139.6 (C8a'), 129.4 (C6), 129.3 (C5'), 128.0 (C3'), 126.8 (C4'), 126.3 (C7'), 125.9 (C6'), 123.7 (C8'), 121.4 (C2'), 120.0 (C5), 116.9 (C3), 116.6 (C1), 56.3 (Cc), 43.9 (Cab), 22.2 (CH₃).



Nomenclatura: 1-(3-(3,4,5-trimetoxifenil)-5-(naftalen-1-il)-4,5-dihidro-1H-pirazol-1-il)etanona **9x**.

Fórmula Molecular: $C_{24}H_{24}N_2O_4$

Aspecto físico: Sólido laranja

Peso Molecular: 404,17 g/mol

Rendimento: 75%

Ponto de fusão: 178-179°C

HRMS (APPI+) m/z: calculado para $C_{24}H_{24}N_2O_4$ $[M+H]^+$: 405,18088; encontrado, 405,18093.

RMN 1H (200 MHz, CDCl₃) δ/ppm : 7,99 (d, 1H, H8', $J = 8,0$ Hz), 7,90 (dd, 1H, H5', $J = 7,5/1,7$ Hz), 7,77 (d, 1H, H4', $J = 8,2$ Hz), 7,55 (m, 2H, H6', H7'), 7,41 (dd, 1H, H3', $J = 8,2/7,3$ Hz), 7,23 (d, 1H, H2', $J = 7,3$ Hz), 6,94 (s, 2H, H2, H6), 6,34 (dd, 1H, Hc, $J = 11,6/4,3$ Hz), 3,88 (m, 10H, 3,4,5-triOCH₃, Hb), 3,12 (dd, 1H, Ha, $J = 17,3/4,3$ Hz), 2,58 (s, 3H, COCH₃).

RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) δ/ppm : 168,8 (C=O), 154,3 (C=N), 153,3 (C3, C5), 140,2 (C4), 136,0 (C4a'), 134,3 (C8a'), 129,5 (C1'), 129,1 (C5'), 128,1 (C1), 126,8 (C3'), 126,3 (C4'), 125,7 (C7'), 125,5 (C6'), 122,9 (C2'), 121,3 (C8'), 103,8 (C2, C6), 60,9 (4-OCH₃), 57,4 (Cc), 56,2 (3-OCH₃, 5-OCH₃), 42,2 (Cab), 22,0 (CH₃).

8.2.2. Atividade biológica

Os testes biológicos foram realizados pelas alunas de doutorado Priscila Graziela Alves Martins e Ângela Camila Orbem Menegatti e Dra. Louise Domeneghini Chiaradia Delatorre no Centro de Biologia Molecular e Estrutural (CEBIME - UFSC), coordenado pelo Prof. Dr. Hernán Terenzi.

8.2.2.1. YopH: expressão e purificação

Para expressar a fosfatase YopH, bactérias *E. coli* BL21(DE3)pLysS transformadas com o vetor p7-7Yop51* Δ 162 (cedido pelo Dr. Tiago A. Silva Brandão (Universidade Federal de Minas Gerais) foram cultivadas a 37 °C em meio LB contendo ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) até que se atingisse a densidade ótica de 0,8 a 600 nm. Posteriormente, a indução foi feita acrescentando isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) até a concentração final de 0,4 mM. O cultivo foi mantido à temperatura de 25 °C durante 16 horas, centrifugado e o sedimento foi guardado a -20 °C.

O precipitado obtido após o cultivo foi homogeneizado em 3 mL do tampão Y (Acetato de sódio 100 mM pH 5,7; NaCl 100 mM; EDTA 1 mM e (DL-ditiotreitol) DTT 1 mM) contendo Fluoreto de Fenilmetilsulfonila (PMSF) na concentração final de 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Em seguida as células foram rompidas por sonicação em 7 ciclos de 20 segundos em gelo. O conteúdo obtido após a sonicação foi então centrifugado, a 4 °C por 40 minutos a 16000 rpm. O sobrenadante obtido após a centrifugação foi então injetado no sistema ÄKTA(GE Healthcare) ao qual estava conectada uma coluna HiTrap™ SP HP (Amersham Biosciences) de 5 mL. Os tampões utilizados na purificação foram os tampões Y e Y+ (Acetato de sódio 100 mM pH 5,7; NaCl 500 mM; EDTA 1 mM e DTT 1 mM). A purificação da proteína foi realizada pelo método de cromatografia de troca iônica. A coluna HiTrap™ SP HP é uma coluna trocadora de cátions, carregada com grupos $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3$. No pH dos tampões de purificação a YopH se encontra com cargas positivas (pH abaixo do ponto isoelétrico) e é atraída pelos grupos $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3$ presentes na coluna. As demais proteínas são então eluídas com o tampão. Com o acréscimo de cargas positivas devido ao aumento da concentração

de NaCl do tampão Y+ a proteína de interesse é então liberada da coluna. Após a purificação, a YopH foi quantificada pelo método de Bradford,¹⁴⁷ separada em frações e estocada a -80 °C.

8.2.2.2. PtpA: expressão e purificação

O vetor de expressão pRT28a (QIAGEN), contendo o gene da proteína PtpA de *M. tuberculosis*, foi cedido pelo Dr. Pedro M. Alzari, do Institut Pasteur, Paris. Este vetor foi inserido em *Escherichia coli* BL21(DE3) para produzir proteínas recombinantes com uma cauda de 6 histidinas. As bactérias com o vetor de expressão foram incubadas por 16 horas (*overnight*) em 10 ml de meio Luria-Bertani (LB), contendo 50 µg/mL de canamicina a 37°C.

Para a expressão da proteína, 5 mL de cultura *overnight* foram transferidos para 250 mL de meio LB e incubou-se a 37°C com agitação (140 rpm) até a fase de crescimento exponencial, correspondente a uma densidade ótica de 0,6-0,8 nm. Em seguida, as bactérias foram colocadas a 15°C por 20 min e depois adicionou-se 0,5 mM de IPTG para a indução da síntese da proteína. As culturas foram incubadas *overnight* a 15°C e então centrifugadas a 5.000 *xg* por 30 min; o sedimento foi ressuspensionado em tampão de lise (20 mM Tris-HCl pH=8,0, 0,5 M NaCl, 10 mM imidazol e 10% glicerol) contendo inibidores de proteases (Amersham Biosciences). As células foram lisadas por sonicação em gelo (Fischer Scientific Model 60 Sonic Dismembrator) e depois centrifugadas a 12.000 *xg* por 1 hora, a 4°C.

As proteínas recombinantes com cauda de histidina na porção N-terminal (*His-tag*) foram purificadas em condições nativas por cromatografia de afinidade com metal imobilizado (IMAC). Foram utilizadas colunas His-trap (*His Trap HP Kit for purification of histidine tagged proteins*, Amersham Biosciences), carregadas com níquel, conectadas a um sistema ÄKTA (GE Healthcare). A resina foi inicialmente equilibrada com o tampão de lise, e o sobrenadante obtido após a lise e centrifugação dos cultivos foi incubado com a coluna, à temperatura ambiente. Em seguida, a coluna foi lavada com soluções de concentração crescente de imidazol, desde um tampão sem imidazol até uma concentração final de 500 mM. O imidazol compete quimicamente com a cauda de histidina da proteína recombinante e, ao serem aumentadas as concentrações do imidazol, a proteína é eluída da coluna.¹⁴⁸

A pureza das frações foi analisada por SDS-PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio) e as frações contendo proteína purificada foram reunidas e dializadas a 4°C, em 4 etapas por 2h

em tampão de diálise (tampão D), com concentrações decrescentes de imidazol (150 mM, 75 mM, 35 mM e sem imidazol). O último tampão (tampão D) contém 20 mM Tris-HCl pH = 8,0, 50 mM NaCl, 5 mM EDTA, 20% glicerol e 5 mM DTT. As proteínas foram concentradas por ultrafiltração, usando membrana porosa de 10 kDa (Amicon Ultra-15 Millipore) e armazenadas a -80°C. A concentração da proteína foi determinada por ensaio de Bradford.¹⁴⁷

8.2.2.3. PtpB: expressão e purificação

O vetor de expressão pET28 (QIAGEN), contendo o gene da proteína PtpB de *M. tuberculosis*, foi cedido pelo PhD. Pedro M. Alzari, do Institut Pasteur, Paris. Este vetor foi inserido em *E. coli* BL21(DE3) para produzir proteínas recombinantes com uma cauda de 6 histidinas. As bactérias com o vetor de expressão foram incubadas por 16 horas (*overnight*) em 10 mL de meio Luria-Bertani (LB), contendo 50 µg/mL de canamicina a 37°C.

Os procedimentos de expressão, purificação e análise da pureza da proteína recombinante PtpB foram idênticos aos descritos para a PtpA. As frações contendo PtpB recombinante foram associadas, concentradas por centrifugação (sem adição de DTT) e armazenadas a -80°C. A concentração da proteína foi determinada por ensaio de Bradford.¹⁴⁷

8.2.2.4. PTP1B: expressão e purificação

O plasmídeo pEt-19b que codifica a proteína PTP1B humana WT de 37kDa, foi cedido pelo Dr. Tiago A. Silva Brandão (Universidade Federal de Minas Gerais). Esse vetor foi inserido em *E. coli* BL21(DE3). As bactérias contendo o vetor de expressão foram incubadas *overnight*, em 10mL de meio LB contendo 10 µL de ampicilina (100 mM) a 37°C.

Para a expressão da proteína, 5mL de cultura *overnight* de *E. coli* BL21(DE3) PTP1B foi transferida para 250 mL de meio LB contendo 250µL de ampicilina (100mM) e incubou-se a 37°C com agitação (140rpm) até a fase de crescimento exponencial, correspondente a uma densidade ótica de 0,85 a 600 nm. Para a indução da síntese da proteína de interesse, adicionou-se 0,6 mM de isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG). As culturas foram incubadas por mais 20 horas à temperatura ambiente, e as células foram recolhidas por centrifugação a 8.000 rpm por 30 min. As etapas seguintes foram realizadas a 4°C. o sedimento resultante foi resuspendido em 40mL de Tampão A (20 mM imidazol, pH= 7,5, 1 mM EDTA, 3 mM DTT e 10% glicerol) contendo inibidores de proteases (2mM benzamidina e 2 µg/mL

cada de aprotinina, leupeptina e pepstatina). As células foram lisadas por sonicação e centrifugadas a 40.000 rpm por 30 min.

A purificação foi realizada com uma ligeira modificação do método previamente descrito por Barford e col.¹⁴⁹ O sobrenadante foi eluído em uma coluna HiTrap™ Q FF de 1mL a 1,5 mL/min. A coluna foi lavada com Tampão A até que a absorbância de 280 nm estivesse em zero. A proteína foi eluída a 2 mL/min com 100mL de Tampão A, com concentrações crescentes de NaCl de zero a 0,5 M no tampão A. As frações contendo proteína foram reunidas e dessalinizadas em uma coluna HiTrap™ SP FF de 1mL a 1,5 mL/min. A coluna foi lavada com Tampão B até que a absorbância de 280 nm estivesse em zero. A proteína foi eluída a 2 mL/min com 150 mL de Tampão B, com concentrações crescentes de NaCl de zero a 0,5 M no tampão B. A concentração da proteína foi monitorada por UV ($A_{1\text{mg/mL}}^{280\text{nm}} = 1,0 \text{ mg/mL}$)⁷⁵, e as frações proteicas foram armazenadas a -80°C.

8.2.2.5. Avaliação da atividade residual das enzimas PtpA, PtpB, YopH e PTP1B

Os testes de avaliação da inibição enzimática pelas pirazolininas foram feitos de acordo com metodologia já descrita¹¹⁰, com uma pequena modificação. Os ensaios foram realizados em placas de 96 poços, contendo 5 µl do composto diluído a $1,0 \times 10^{-3}$ M (concentração final de 25 µM), 20 µl de imidazol 200 mM pH=7,0 (concentração final de 20 mM), água MilliQ q.s.p. 198 µl em cada poço, seguidos da adição de 2 µl de proteína recombinante diluída. Após incubação de 10 min a 37 °C (YopH, PtpB e PTP1B) ou a temperatura ambiente (PtpA), 10 µl de *p*-nitrofenilfosfato [pNPP] 400 mM (concentração final de 40 mM) foram adicionados, para início da reação. As proteínas foram usadas nas seguintes concentrações: *i*) YopH 42.7 ng/µL (em tampão 20 mM bis-Tris-propano pH 6,5, 1 mM EDTA, 1 mM DTT e 100 mM NaCl), PtpA 115.0 ng/µL (em tampão 20 mM Tris-HCl pH 8,0, 5 mM EDTA, 5 mM DTT, 20% glicerol e 50 mM NaCl), PtpB 93.3 ng/µL (no mesmo tampão da PtpA) e PTP1B 105.1 ng/µL (em tampão 20 mM biTris-HCl pH 6,5, 1 mM EDTA, 3 mM DTT, 10% glicerol e 92 mM NaCl). As enzimas, quando ativas, clivam o substrato (pNPP), liberando *p*-nitrofenol, de cor amarela. A absorbância foi medida em espectrofotômetro UV-VIS para placas de ELISA (TECAN Magellan Infinite M200), por 10 minutos a 37°C (a 410 nm com leituras a cada 1 minuto). Controles negativos foram feitos na ausência de enzima e compostos, e controles positivos na presença de enzima e DMSO 100% no lugar do composto. O percentual

de atividade residual foi calculado pela diferença de Absorbância entre o tempo 7 minutos e 2 minutos, obtido pela média de três experimentos feitos em triplicata.

8.2.2.6. Determinação dos valores de IC₅₀ das pirazolinas

A inibição dos compostos foi determinada por cálculos de IC₅₀ (concentração necessária para um composto inibir 50% a atividade da enzima original). Os valores de IC₅₀ foram determinados usando concentrações crescentes de inibidor (0,5-100 µM) *versus* % de inibição, obtidos pela mesma metodologia do item anterior. A atividade enzimática foi expressa em valores de percentual de atividade residual comparada ao controle sem inibidor. Os dados experimentais foram analisados com o programa Microsoft Office Excel 7.0 e os valores de IC₅₀ determinados graficamente através da regressão linear de melhor ajuste.

8.2.2.7. Cinética enzimática

Para determinar o mecanismo de inibição foram usadas três concentrações de cada inibidor e sete concentrações de pNPP (0,2, 0,4, 0,8, 1,6, 3,2, 6,4, e 12,8 mM). A absorbância foi convertida utilizando a absorvidade molar do *p*-nitrofenol: 4938.7096 M⁻¹.cm⁻¹ (calculado experimentalmente). As velocidades de reação foram expressas como a atividade específica da proteína (µmol. pNP.min⁻¹.mg⁻¹). A produção de *p*-nitrofenol foi quantificada e analisada pelo gráfico de Lineweaver-Burk (1/V x 1/[S]) no GraphPad Prism 5.0. A análise de regressão linear foi utilizada para determinar V_{max} e K_{Mapp} para cada composto. Os valores de K_i foram determinados plotando K_{Mapp} x [I], considerando - K_i a interceptação no eixo x. Todos os ensaios foram realizados em duplicata em pelo menos cinco experimentos independentes.

8.2.3 Modelagem molecular

A modelagem molecular foi realizada pelo Dr. Mattia Mori e Dra. Alessandra Mascarello na Università La Sapienza, em Roma-Itália, coordenado pelo Prof. Dr. Bruno Botta.

Ambos os enantiômeros de **8p** e **8c** foram analisados com o programa *Maestro Suite*¹⁵⁰ e, posteriormente, preparados para o docking usando o programa LigPrep.¹⁵¹ A análise de pKa foi realizada com MoKa (Molecular Discovery)¹⁵², LigPrep e QUACPAC (OpenEye)¹⁵³. As estruturas cristalinas da PTP1B e YopH foram obtidas a partir do Protein Data Bank sob os códigos: PDB ID: 1T48¹⁴⁵ e PDB ID: 1YTW,¹⁴⁶ respectivamente. Coordenadas dos resíduos 290-298 (sequência QWKELSHED) que não são covalentemente ligados ao resto da proteína

foram removidos da estrutura da PTP1B. O docking foi realizado com o programa AutoDock4¹⁵⁴ usando as configurações mais elevadas de precisão. O *docking* dos complexos proteína-ligantes tiveram suas energias minimizadas através do programa Amber12.¹⁵⁷ Os complexos foram ainda solvatados em uma caixa de moléculas de água TIP3P tamponantes 6 Å da superfície da proteína e a carga total de cada sistema foi neutralizado através da adição de contra-íons (2 íons de Na⁺ para pirazolina/PTP1B e 4 íons Cl⁻ para pirazolina/YopH).

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Barreiro, E. J.; Fraga, C. A. M.; *Química Medicinal - As Bases Moleculares da Ação dos Fármacos* 3ª ed. Artmed, **2015**.
2. INCA 2012. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/cancer/site/oquee+/>. Acesso em 22/09/2014.
3. Gottesman, M. M. *Annu. Rev. Med.* **2002**, *53*, 615.
4. Gottesman, M. M. *Discovery Medicine* **2009**, *6*, 18.
5. Dean, M.; Rzhetsky, A.; Allikmets, R. *Genome Research* **2001**, *11*, 1156.
6. Anglicheau, D.; Pallet, N.; Rabant, M.; Marquet, P.; Cassinat, B.; Méria, P.; Beaune, P.; Legendre, C.; Thervet, E. *Kidney Int.* **2006**, *70*, 1019.
7. Cripe, L. D.; Uno, H.; Paietta, E. M.; Litzow, M. R.; Ketterling, R. P.; Bennett, J. M.; Rowe, J. M.; Lazarus, H. M.; Luger, S.; Tallman, M. S. *Blood* **2010**, *116*, 4077.
8. Darby, R. A.; Callaghan, R.; McMahon, R. M. *Curr. Drug Metab.* **2011**, *12*, 722.
9. Zuanazzi, J. A. S. Flavonóides. In: Simões, C. M. O.; *et al.* (orgs.). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 3 ed. Florianópolis: Editora da UFSC, Porto Alegre: Editora da UFRGS, **2001**. Cap. 23. p. 499-526.
10. Polinsky, A. Lead-likeness and drug-likeness. In: Wermuth, C. G. (org.). *The Practice of Medicinal Chemistry*. 3 ed. Illkirch, France: Elsevier, **2008**. Cap. 12, p. 244-254.
11. Nielsen, S. F.; Boesen, T.; Larsen, M.; Schonning, K.; Kromann, H. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 3047.
12. Selvakumar, N.; Kumar, G. S.; Azhagan, A. M.; Rajalu, G. G.; Sharma, S.; Kumar, M. S.; Das, J.; Iqbal, J.; Trehan, S. *Eur. J. Med. Chem.* **2007**, *42*, 538.

13. Ávila, H.P.; Smânia E. F.; Monache, F.D.; Júnior, A.S. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 9790.
14. Nowakowska, Z. *Eur. J. Chem.* **2007**, *42*, 125.
15. Batt, D. G.; Goodman, R.; Jones, D. G.; Kerr, J. S.; Mantegna, L. R.; McAllister, C.; Newton, R. C.; Nurnberg, S.; Welch, P. K.; Covington, M. B. *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 1434.
16. Ducki, S.; Forrest, R.; Hadfield, J. A.; Kendall, A.; Lawrence, N. J.; McGrown, A. T.; Rennison, D. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 1051.
17. Smit, F. J.; van Biljon, R. A.; Birkholtz, L.; N'Da, D. D. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *90*, 33.
18. Yang, Z.; Wu, W.; Wang, J.; Liu, L.; Li, L.; Yang, J.; Wang, G.; Cao, D.; Zhang, R.; Tang, M.; Wen, J.; Zhu, J.; Xiang, W.; Wang, F.; Ma, L.; Xiang, M.; You, J.; Chen, L. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 7977.
19. Boeck, P.; Leal, P. C.; Yunes, R. A.; Cechinel-Filho, V.; Lopez, S.; Sortino, M.; Escalantes, A.; Furlan, R. L. E.; Zacchino, S. *Archiv der Pharmazie - Chemistry Life Scientific* **2005**, *338*, 87.
20. Nielsen, S. F.; Christensen, S. B.; Cruciani, G.; Kharazmi, A.; Liljefors, T. *J. Med.l Chem.* **1998**, *41*, 4819.
21. Boeck, P.; Falcão, C. A. B.; Leal, P. C.; Yunes, R. A.; Cechinel-Filho, V.; Torres-Santos, E. C.; Bergmann, B. R. *Bioorg. Med. Chem.***2006**, *14*, 1538.
22. Juvalé, K.; Pape, V. F.; Wiese, M. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 346.
23. Valdameri, G.; Gauthier, C.; Terreux, R.; Kachadourian, R.; Day, B. J.; Winnischofer, S. M.; Rocha, M. E.; Frachet, V.; Ronot, X.; Di Pietro, A.; Boumendjel, A. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 3193.
24. Rangel, L. P.; Winter, E.; Gauthier, C.; Terreux, R.; Chiaradia-Delatorre, L. D.; Mascarello, A.; Nunes, R. J.; Yunes, R. A.; Creczynski-Pasa, T. B.; Macalou, S.; Lorendeau, D.; Baubichon-

Cortay, H.; Ferreira-Pereira, A.; Di Pietro, A. *Drug Des. Dev. Ther.* **2013**, *7*, 1043.

25. Winter, E.; Gozzi, G. J.; Chiaradia-Delatorre, L. D.; Daflon-Yunes, N.; Terreux, R.; Gauthier, C.; Mascarello, A.; Leal, P. C.; Cadena, S. M.; Yunes, R. A.; Nunes, R. J.; Creczynski-Pasa, T. B.; Di Pietro, A. *Drug Des. Dev. Ther.* **2014**, *8*, 609.

26. WHO **2012**. *Tuberculosis*. Disponível em: <<http://www.who.int/topics/tuberculosis/en/>>. Acesso em: 11 novembro 2014.

27. Nogueira, A. F.; Facchinetti, V.; Souza, M. V. N.; Vasconcelos, T. R. A. *Rev. Bras. Farm.* **2012**, *93*, 3.

28. Souza, M. V. N.; Vasconcelos, T. T. A. *Quim. Nova* **2005**, *28*, 678.

29. Cole, S. T.; Brosch, R.; Parkhill, J.; Garnier, T.; Churcher, C.; Harris, D.; Gordon, S. V.; Eiglmeier, K.; Gas, S.; Barry, C. E.; Tekaia, F.; Badcock, K.; Basham, D.; Brown, D.; Chillingworth, T.; Connor, R.; Davies, R.; Devlin, K.; Feltwell, T.; Gentles, S.; Hamlin, N.; Holroyd, S.; Hornsby, T.; Jagels, K.; Krogh, A.; McLean, J.; Moule, S.; Murphy, L.; Oliver, K.; Osborne, J.; Quail, M. A.; Rajandream, M. A.; Rogers, J.; Rutter, S.; Seeger, K.; Skelton, J.; Squares, R.; Squares, S.; Sulston, J. E.; Taylor, K.; Whitehead, S.; Barrell, B. G. *Nature* **1998**, *393*, 537.

30. Hestvik, A. L.; Hmama, Z.; Av-Gay, Y. *Infect. Immun.* **2003**, *71*, 5514.

31. Viboud, G. I.; Bliska, J. B. *Annu. Rev. Microbiol.* **2005**, *59*, 69.

32. Christie, A. B.; *Ecol. Dis.* **1982**, *1*, 111.

33. Tautz, L.; Bruckner, S.; Sareth, S.; Alonso, A.; Bogets, J.; Bottini, N.; Pellecchia, M.; Mustelin, T. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 9400.

34. Bliska, J. B.; Guan, K.; Dixon, J. E.; Falkow, S. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 1187.

35. Yao, T.; Meccas, J.; Healy, J. I.; Falkow, S.; Chien, Y. *J. Exp. Med.* **1999**, *190*, 1343.
36. Alonso, A.; Bottini, N.; Brucker, S.; Rahmouni, S.; Williams, S.; Schoenberger, S. P.; Mustelin, T. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 4922.
37. Mascarello, A.; Chiaradia, L. D.; Vernal, J.; Villarino, A.; Guido, R. V. C.; Perizzolo, P.; Poirier, V.; Wong, D.; Martins, P. G. A.; Nunes, R. J.; Yunes, R. A.; Andricopulo, A. D.; Av-Gay, Y.; Terenzi, H. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 3783.
38. Chiaradia, L. D.; Mascarello, A.; Purificação, M.; Vernal, J.; Cordeiro, M. N. S.; Zenteno, M. E.; Villarino, A.; Nunes, R. J.; Yunes, R. A.; Terenzi, H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 6227.
39. Chiaradia, L. D.; Martins, P. G. A.; Cordeiro, M. N. S.; Guido, R. V. C.; Ecco, G.; Andricopulo, A. D.; Yunes, R. A.; Vernal, J.; Nunes, R. J.; Terenzi, H. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 390.
40. Martins, P. G. A.; Caracterização de uma arsenato redutase de *Trypanosoma cruzi* e inibição de uma fosfotirosina fosfatase de *Yersinia enterocolitica* por chalconas sintéticas. 2011. 99fls. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, **2011**.
41. Kumar, S.; Bawa, S.; Drabu, S.; Kumar, R.; Gupta, H.; *Recent. Pat. Antiinfect. Drug Discov.* **2009**, *4*, 154.
42. Acharya, B. N.; Saraswat, D.; Tiwari, M.; Shrivastava, A. K.; Ghorpade, R.; Bapna, S.; Kaushik, M. P. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 430.
43. Gordaliza, M.; Del Corral, J. M. M.; Castro, M. A.; López-Vázquez, M. L.; San Feliciano, A.; García-Grávalos, M. D.; Carpy, A. *Bioorg. Med. Chem.* **1995**, *3*, 1203.
44. Manna, K.; Agrawal, Y. K. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 3831.

45. Bandgar, B. P.; Adsul, L. K.; Chavan, H. V.; Jalde, S. S.; Shringare, S. N.; Shaikh, R.; Meshram, R. J.; Gacche, R. N.; Masand, V. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 5839.
46. Lobo, P. L.; Poojary, B.; Kumsi, M.; Chandra, V.; Kumari, N. S.; Chandrashekar, K. R. *Med. Chem. Res., Ahead of Print.* **2012**.
47. Reddy, M. V. R.; Billa, V. K.; Pallela, V. R.; Mallireddigari, M. R.; Boominathan, R.; Gabriel, J. L.; Reddy, P. E. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 3907.
48. Almeida, V. L.; Leitão, A.; Reina, L. C. B.; Montanari, C. A.; Donnici, C. L.; Lopes, T. P. M. *Quim Nova* **2005**, *28*, 118.
49. WHO - World Health Organization. Disponível em: <http://www.who.int/cancer> , Acesso em 21 out 2014.
50. Danaei, G.; Hoorn, S. V.; Lopez, A. D.; Murray, C. J. L.; Ezzati, M. *Lancet* **2005**, *366*, 1784.
51. Szakács, G.; Paterson, J. K.; Ludwig, J. A.; Booth-Genthe, C.; Gottesman, M. M. et al. *Nature Reviews/Drug Discovery* **2006**, *5*, 219.
52. Juliano, R.L.; Ling, V. *Biochimica et Biophysica Acta* **1976**, *455*, 152.
53. Cole, S. P. C.; Bhardwaj, G.; Gerlach, J. H.; Mackie, J. E.; Grant, C. E.; Almquist, K. C.; Stewart, A. J.; Kurz, E. U.; Duncan, A. M. V.; Deeley, R. G. *Science* **1992**, *258*, 1650.
54. Sun, Y. L.; Patel, A.; Kumar, P.; Chen, Z. *Chinese Journal of Cancer* **2012**, *31*, 51.
55. Doyle, L. A.; Yang, W.; Abruzzo, L. V.; Krogmann, T.; Gao, Y.; Rishi, A. K.; Ross, D. D. *PNAS* **1998**, *95*, 15665.
56. Miyake, K.; Mickley, L.; Litman, T.; Zhan, Z.; Robey, R.; Cristensen, B.; Brangi, M.; Greenberger, L.; Dean, M.; Fojo, T.; Bates, S. E. *Cancer Research* **1999**, *59*, 8.
57. Allikmets, R.; Schriml, L. M.; Hutchinson, A.; Romano-Spica, V.; Dean, M. *Cancer Research* **1998**, *58*, 5337.

58. Vlaming, M.H.; Lagas, J.S.; Schinkel, A.H. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2009**, 61, 14.
59. Natarajan, K.; Xie, Y.; Baer, M. R.; Ross, D. D. *Biochemical Pharmacology* **2012**, 83, 1084.
60. Kawai, T.; Caaveiro, J. M. M.; Abe, R.; Katagiri, T.; Tsumoto, K. *FEBS Letters* **2011**, 585, 3533.
61. Rabindran, S. K.; He, H.; Singh, M.; Brown, E.; Collins, K. I.; Annable, T.; Greenberger, L. M. *Cancer Res.* **1998**, 58, 5850.
62. Allen, J. D.; Van Loevezijn, A.; Lakhai, J. M.; Van der Valk, M.; Van Tellingeng, O.; Reid, G.; Schellens, J. H. M.; Koomen, G. J.; Schinkel, A. H. *Mol. Cancer Ther.* **2002**, 1, 417.
63. Van Loevezijn, A.; Allen, J. D.; Schinkel, A. H.; Koomen, G. J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, 11, 29.
64. Lecerf-Schmidt, F.; Peres, B.; Valdameri, G.; Gauthier, C.; Winter, E.; Payen, L.; Di Pietro, A.; Boumendjel, A. *Future Med Chem* **2013**, 5, 1037.
65. Allen, J. D.; van Loevezijn, A.; Lakhai, J. M.; van der Valk, M.; van Tellingeng, O.; Reid, G.; Schellens, J. H. M.; Koomen, G.; Schinkel, A. H. *Molecular Cancer Therapeutics* **2002**, 1, 417.
66. Ahmed-Belkacem, A.; Pozza, A.; Munoz-Martinez, F.; Bates, S. E.; Castanys, S.; Gamarro, F.; Di Pietro, A.; Pérez-Victoria, J. M. *Cancer Res.* **2005**, 65, 4852.
67. Yuan, J.; Wong, I. L. K.; Jiang, T.; Wang, S. W.; Liu, T.; Wen, B. J.; Chow, L. M. C.; Sheng, B. W. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, 54, 413.
68. Winter, E.; Lecerf-Schmidt, F.; Jabor Gozzi, G.; Peres, B.;
69. Lightbody, M.; Gauthier, C.; Ozvegy-Laczka, C.; Szakacs, G.; Sarkadi, B.; Creczynski-Pasa, T.; Boumendjel, A.; Di Pietro, A. J. *Med. Chem.* **2013**, 56, 9849.
70. Sahu, N. K.; Balbhadra, S. S.; Choudhary, J.; Kohli, D.V. *Current Med. Chem.* **2012**, 19, 209.

71. Calvino, V.; Picallo, M.; López-Peinado, A. J.; Martin-Aranda, R. M.; Durán-Valle, C. J. *Applied Surface Science* **2006**, *252*, 6071.
72. Lévai, A. *Arkivoc* **2004**, vii, 15.
73. Go, M. L.; Wu, X.; Liu, X. L. *Current Medicinal Chemistry* **2005**, *12*, 483.
74. Bukhari, S. N. A.; Jasamai, M.; Jantan, I.; Ahmad, W. *Mini-Reviews in Organic Chemistry*, **2013**, *10*, 73.
75. Bukhari, S. N. A.; Jasamai, M.; Jantan, I. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, **2012**, *12*, 1394.
76. Ferreira, N. C.; Marques, I. A.; Conceição, W. A.; Macedo, B.; Machado, C. S.; Mascarello, A.; Chiaradia-Delatorre, L. D.; Yunes, R. A.; Nunes, R. J.; Hughson, A. G.; Raymond, L. D.; Pascutti, P. G.; Caughey, B.; Cordeiro, Y. *Plos One* **2014**, *9*, e84531.
77. Salum, L. B.; Altei, W. F.; Chiaradia, L. D.; Cordeiro, M. N. S.; Canevarolo, R. R.; Melo, C. P. S.; Winter, E.; Mattei, B.; Daghestani, H. N.; Santos-Silva, M. C.; Creczynski-Pasa, T. B.; Yunes, R. A.; Yunes, J. A.; Andricopulo, A. D.; Day, B. W.; Nunes, R. J.; Vogt, A. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *63*, 501.
78. De Lima, A. P.; Chiaradia-Delatorre, L. D.; Mascarello, A.; De Oliveira, K. A.; Leal, P. C.; Yunes, R. A.; De Aguiar, C. B. N. M.; Tasca, C. I.; Nunes, R. J.; Smânia, A. *International Journal of Antimicrobial Agents (Print)* **2013**, *42*, 519.
79. Osório, T. M.; Delle Monache, F.; Chiaradia, L. D.; Mascarello, A.; Stumpf, T. R.; Zanetti, C. R.; Silveira, D. B.; Barardi, C. R. M.; Smânia, E. F. A.; Viancelli, A.; Garcia, L. A. T.; Yunes, R. A.; Nunes, R. J.; Smânia, A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 225.
80. Bello, M. L.; Chiaradia, L. D.; Dias, L. R. S.; Pacheco, L. K.; Stumpf, T. R.; Mascarello, A.; Steindel, M.; Yunes, R. A.; Castro, H. C.; Nunes, R. J.; Rodrigues, C. R. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 5046.

81. Borchhardt, D. M.; Mascarello, A.; Chiaradia, L. D.; Nunes, R. J.; Oliva, G.; Yunes, R. A.; Andricopulo, A. D. *J. Braz. Chem. Soc.* **2010**, *21*, 142.
82. Damazio, R. G.; Zanatta, A. P.; Cazarolli, L. H.; Chiaradia, L. D.; Mascarello, A.; Nunes, R. J.; Yunes, R. A.; Barreto Silva, F. R. M. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 1332.
83. Winter, E.; Neuenfeldt, P. D.; Chiaradia-Delatorre, L. D.; Gauthier, C.; Yunes, R. A.; Nunes, R. J.; Creczynski-Pasa, T. B.; Di Pietro, A. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 2930.
84. Mobinikhaledi, A.; Kalhor, M.; Jamalifar, H. *Med. Chem. Res.* **2012**, *21*, 1811.
85. Nagaraj, A.; Reddy, C. S. *J. Iran. Chem. Soc.* **2008**, *5*, 262.
86. Modzelewska, A.; Pettit, C.; Achanta, G.; Davidson, N. E.; Huangb, P.; Khan, S. R. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 3491.
87. Vogel, A. I. *Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry*, 5 ed. New York: John Wiley & Sons, **1989**. p.1017.
88. El-Rayyes, N. R.; Al-Johary, A. J. *J. Iraqi Chem. Soc.* **1984**, *9*, 63.
89. Harrison, W. T. A.; Ravindra, H. J.; Suresh, K. M. R.; Dharmaparakash, S. M. *Acta Crystallogr., Sect. E: Struct. Rep. Online* **2007**, *63*, o3069.
90. Reddy, D.; Bhaskar, S. B.; Eswaraiyah, S.; Seshamma, T.; Reddy, M. V. R. *J. Indian Chem. Soc.* **1989**, *66*, 893.
91. Zhou, J.; Zhou, J.; Zou, Z.; Feng, J. *Synth. Commun.* **2002**, *32*, 3389.
92. Yoshitake, O.; Miyazaki, H.; Suzaki, D.; Yamada, Y. PCT Int. Appl. WO 2005030901 A120050407, **2005**.
93. Tsukerman, S. V.; Maslennikova, V. P.; Nikitchenko, V. M.; Lavrushin, V. F. *Zh. Prikl. Spektrosk.* **1970**, *12*, 91.

94. Chitra, M.; Rajendran, T. V.; Duraipandiyan, V.; Rajan, Y. C.; Reuben, J. D. *Indian J. Sci. Technol.* **2010**, *3*, 890.
95. Mobinikhaledi, A.; Kalhor, M.; Jamalifar, H. *Med. Chem. Res.* **2012**, *21*, 1811.
96. McMurry, J. *Química Orgânica – Combo*, Tradução da 7^a edição norte-americana, Cengage Learning, **2011**, 821-825.
97. Rieder, H. L. Interventions for tuberculosis control and elimination. *International Union Against Tuberculosis and Lung Disease (IUATLD)*. Paris, France, **2002**.
98. Aoyama, H.; Silva, T. M. A.; Miranda, M. A.; Ferreira, C. V. *Quim. Nova* **2003**, *26*, 896.
99. Koul, A.; Choidas, A.; Treder, M.; Tyagi, A. K.; Drlica, K.; Singh, Y.; Ullrich, A. *J. Bacteriol* **2000**, *182*, 5425.
100. Bakal, C. J.; Davies, J. E. *Trends Cell. Biol.* **2000**, *10*, 32.
101. Cozzone, A. J.; Grangeasse, C.; Doublet, P.; Duclos, B.; *Arch. Microbiol.* **2004**, *181*, 171.
102. Sturgill-Koszycki, S.; Schaible, U. E.; Russel, D. G. *Embo J.* **1996**, *15*, 6960.
103. Madhurantakam, C.; Rajakumara, E.; Mazumbar, P. A.; Saha, B.; Mitra, D.; Wiker, H. G.; Sankaranarayanan, R.; Das, A. K. *J. Bacteriol.* **2005**, *187*, 2175.
104. Cowley, S. C.; Babakaiff, R.; Av-Gay, Y. *Research in Microbiology* **2002**, *153*, 233.
105. Grundner, C.; Ng, H.; Alber, T. *Structure* **2005**, *13*, 1625.
106. Beresford, N.; Patel, S.; Armstrong, J.; Szoor, B.; Frodham-Skelton, A. P.; Taberner, L. *Biochem. J.* **2007**, *406*, 13.
107. Koul, A.; Herget, T.; Klebl, B.; Ullrich, A. *Nat. Rev. Microbiol.* **2004**, *2*, 189.

108. Bach, H.; Papavinasundaram, K. G.; Wong, D.; Hmama, Z. Av-Gay, Y.; *Cell Host & Microbe* **2008**, *3*, 316.
109. Manger, M.; Scheck, M.; Prinz, H.; Von Kries, J. P.; Langer, T.; Saxena, K.; Schwalbe, H.; Furstner, A.; Rademann, J.; Waldmann, H. *Chem. Bio. Chem.* **2005**, *6*, 1749.
110. Grundner, C.; Perrin, D.; Van Huijsduijnen, R. H.; Swinnen, D.; Gonzalez, J.; Gee, C. L. Wells, T. N.; Albert, T. *Structure* **2007**, *15*, 499.
111. Corrêa Jr., I. R.; Noren-Muller, A.; Ambrosi, H. D.; Jakupovik, S.; Saxena, K. Schwalbe, H.; Kaiser, M.; Waldmann, H. *Chem. Asian J.* **2007**, *2*, 1109.
112. Chen, L.; Zhou, B.; Zhang, S.. Wu, L.; Wang, Y.; Franzblau, S. G.; Zhang, Z. Y. *ACS Med. Chem. Lett.* **2010**, *1*, 355.
113. Vintonyak, V. V.; Warburg, K.; Over, B.; Hubel, K.; Rauh, D.; Waldmann, H. *Tetrahedron* **2011**, *67*, 6713.
114. Beresford, N. J.; Mulhearn, D.; Szczepankiewicz, B.; Liu, G.; Johnson, M. E.; Fordham-Skelton, A.; Abad-Zapatero, C.; Cavet, J. S.; Taberero, L. *J. Antimicrobial Chem.* **2009**, *63*, 928.
115. Soellner, M. B.; Rawls, K. A.; Grundner, C.; Alber, T.; Ellman, J. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 9613.
116. Cornelis, G. R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 8778.
117. Trosky, J. E.; Liverman, A. D. B.; Orth, K. *Cell Microbiol.* **2008**, *10*, 557.
118. Hinnebush, B. J. *J. Mol. Med.* **1997**, *75*, 645.
119. Titball, R. W.; Leary, S. E. *Br. Med. Bull.* **1998**, *54*, 625.
120. Friedlander, A. M.; Welkos, S. L.; Worsham, P. L.; Andrews, G. P.; Heath, D. G.; Anderson Jr., G. W.; Pitt, M. L.; Estep, J.; Davis, K. *Clin. Infect. Dis.* **1995**, *21*, 178.

121. Cleri, D. J.; Vernaleo, J. R.; Lombardi, L. J.; Rabbat, M. S.; Mathew, A.; Marton, R.; Reyelt, M. C. *Semin. Respir. Infect.* **1997**, *12*, 12.
122. De la Puerta, M. L.; Trinidad, A. G.; Rodríguez, M. del C.; Bogetz, J.; Crespo, M. S.; Mustelin, T.; Alonso, A.; Bayón, Y. *Plos One* **2009**, *4*, e4431.
123. Lee, K.; Gao, Y.; Yao, Z. J.; Phan, J.; Wu, L.; Liang, J.; Waugh, D. S.; Zhang, Z. Y.; Burke Jr., T. R. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 2577.
124. Lee, K.; Boovanahalli, S. K.; Nam, K. Y.; Kang, S. U.; Lee, M.; Phan, J.; Wu, L.; Waugh, D. S.; Zhang, Z. Y.; No, K. T.; Lee, J. J.; Burke Jr., T. R. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 4037.
125. Hu, W.; Stebbins, E.; *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 1101.
126. Liu, F.; Hakami, R. M.; Dyas, B.; Bahta, M.; Lountos, G. T.; Waugh, D. S.; Ulrich, R. G.; Burke Jr., T. R. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *20*, 2813.
127. Rahman, M. A.; Siddiqui, A. A.; *Int. J. Pharm. Sci. Drug Res.* **2010**, *2*, 165.
128. Bai, G.; Li, J.; Li, D.; Dong, C.; Han, X.; Lin, P. *Dyes and Pigments* **2007**, *75*, 93.
129. Safaei-Ghomi, J.; Bamoniri, A. H.; Soltanian-Telkabadí, M. *Chem. Heterocycl. Compd.* **2006**, *42*, 892.
130. Li, J.; Zhang, X.; Lin, Z. *Beilstein J. Org. Chem.* **2007**, *3*, 1.
131. Azarifar, D.; Ghasemnejad, H. *Molecules* **2003**, *8*, 642.
132. Zangade, S.; Shinde, A.; Patil, A.; Vibhute, Y. *Eur. J. Chem.* **2012**, *3*, 208.
133. Lévai, A.; Jeko, J. J. *Heterocycl. Chem.* 2006, *43*, 111.
134. Zolfigol, M. A.; Azarifar, M.; Maleki, B. *Tetrahedron Lett.* 2004, *45*, 2181.

135. El-Shehry, H. A.; Al-Hazimi, H. M. A.; Korraa, M. M. S. J. *Saudi Chem. Soc.* **2008**, *12*, 353.
136. Rostom, S. A. F.; Badr, M. H.; Abd El Razik, H. A.; Ashour, H. M. A.; Abdel Wahab, A. E. *Arch. Pharm.* **2011**, *344*, 572.
137. Regaila, H. A. A. *Egyptian Journal of Pharmaceutical Sciences* **1988**, *29*, 191.
138. Nepali, K.; Kadian, K.; Ojha, R.; Dhiman, R.; Garg, A.; Singh, G.; Buddhiraja, A.; Bedi, P. M. S.; Dhar, K. L.; *Med. Chem. Research* **2012**, *21*, 2990.
139. Yang, A.; Wu, J.; Xu, Z.; Wang, B.; *Gaodeng Xuexiao Huaxue Xuebao* **2011**, *32*, 2306.
140. Luo, Y.; Zhang, S.; Qiu, K.; Liu, Z.; Yang, Y.; Fu, J.; Zhong, W.; Zu, H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 1091.
141. El-Rayyes, N.; Hovakeemian, G. H.; Hmoud, H. S. *J. Chem. Eng. Data* **1984**, *29*, 225.
142. Johnson, T. O.; Ermolieff, J.; Jirousek, M. R. *Nat. Rev. Drug Disc.* **2002**, *1*, 696.
143. Graham, P. L. *An Introduction to Medicinal Chemistry*. 4^a ed. Oxford: University Press. **2008**.
144. Campbell, M. K.; Farrel, S. O. *Bioquímica*, 3ed. Thomson, **2006**, 158-159.
145. Wiesmann, C.; Barr, K. J.; Kung, J.; Zhu, J.; Erlanson, D. A.; Shen, W.; Fahr, B. J.; Zhong, M.; Taylor, L.; Randal, M.; McDowell, R. S.; Hansen, S. K. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2004**, *11*, 730.
146. Fauman, E. B.; Yuvaniyama, C.; Schubert, H. L.; Stuckey, J. A.; Saper, M. A. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 18780.
147. Bradford, M. M. *Analytical Biochem.* **1976**, *72*, 248
148. Martins, S.; Farnaud, S.; Pacheco, V.; Pacheco, R.; Karmali, A.; Tata, R.; Brown, P. R. *Int. J. Bio-Chromatogr.* **2000**, *5*, 111.

149. Barford, D.; Flint, A. J.; Tonks, N. K. *Science* **1994**, *263*, 1397.
150. *Maestro, version 9.2, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2011.*
151. LigPrep, version 2.5, (2011), Schrödinger, LLC, New York, NY.
152. Milletti, F.; Storchi, L.; Sforna, G.; Cruciani, G. *J. Chem. Inf. Model.* **2007**, *47*, 2172.
153. *OpenEye QUACPAC 2013. OpenEye Scientific Software, Santa Fe, NM. <http://www.eyesopen.com>.*
154. Morris, G. M.; Huey, R.; Lindstrom, W.; Sanner, M. F.; Belew, R. K.; Goodsell, D. S.; Olson, A. J., AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility. *J. Comput. Chem.* **2009**, *30* (16), 2785-2791.
155. Jones, G.; Willett, P.; Glen, R. C.; Leach, A. R.; Taylor, R., Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. *J. Mol. Biol.* **1997**, *267* (3), 727-748.
156. *OpenEye OEDocking 2013. OpenEye Scientific Software, Santa Fe, NM. <http://www.eyesopen.com>.*
157. D.A. Case; T.A. Darden; T.E. Cheatham, I.; C.L. Simmerling; J. Wang; R.E. Duke; R. Luo; R.C. Walker; W. Zhang; K.M. Merz; B. Roberts; S. Hayik; A. Roitberg; G. Seabra; J. Swails; A.W. Goetz; I. Kolossváry; K.F. Wong; F. Paesani; J. Vanicek; R.M. Wolf; J. Liu; X. Wu; S.R. Brozell; T. Steinbrecher; H. Gohlke; Q. Cai; X. Ye; J. Wang; M.-J. Hsieh; G. Cui; D.R. Roe; D.H. Mathews; M.G. Seetin; R. Salomon-Ferrer; C. Sagui; V. Babin; T. Luchko; S. Gusarov; Kovalenko, A.; Kollman, P. A. *AMBER 12, University of California, San Francisco., 2012.*

APÊNDICE I –
Espectros de RMN ^1H e ^{13}C
dos compostos sintetizados

Figura 46. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto **3a**.

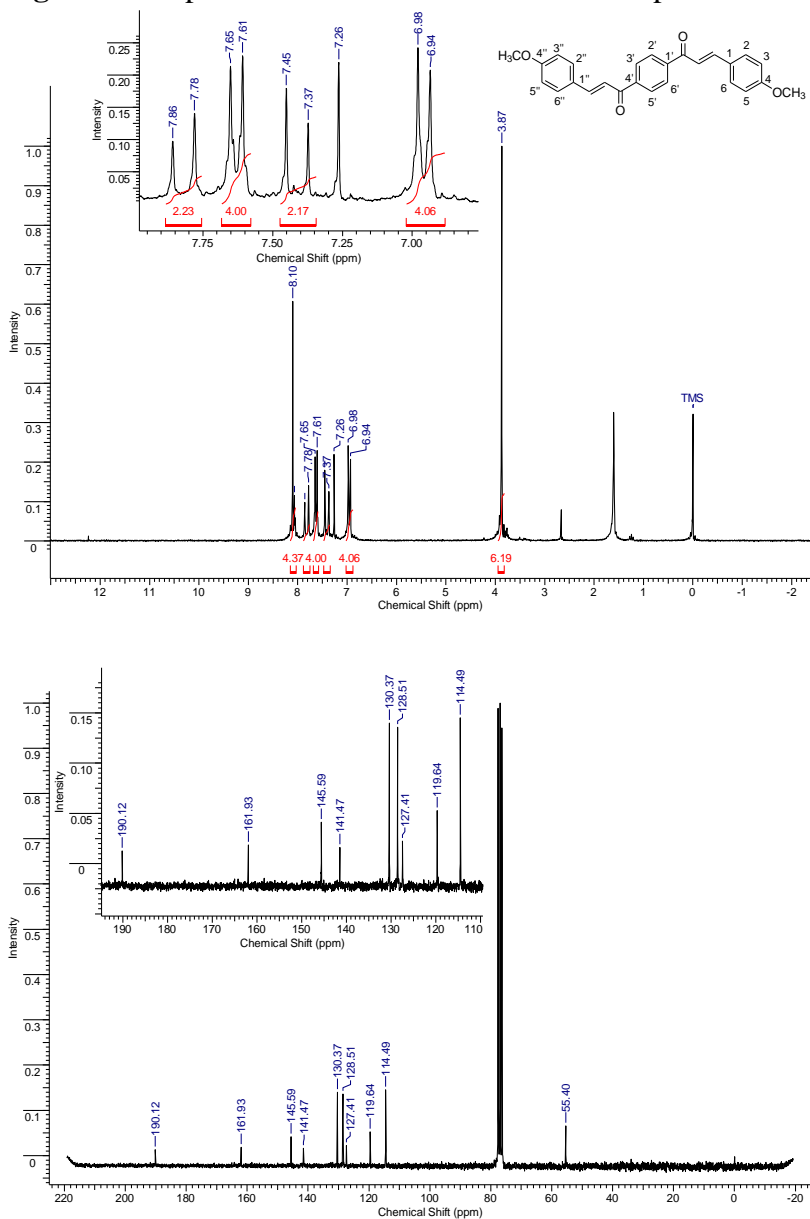


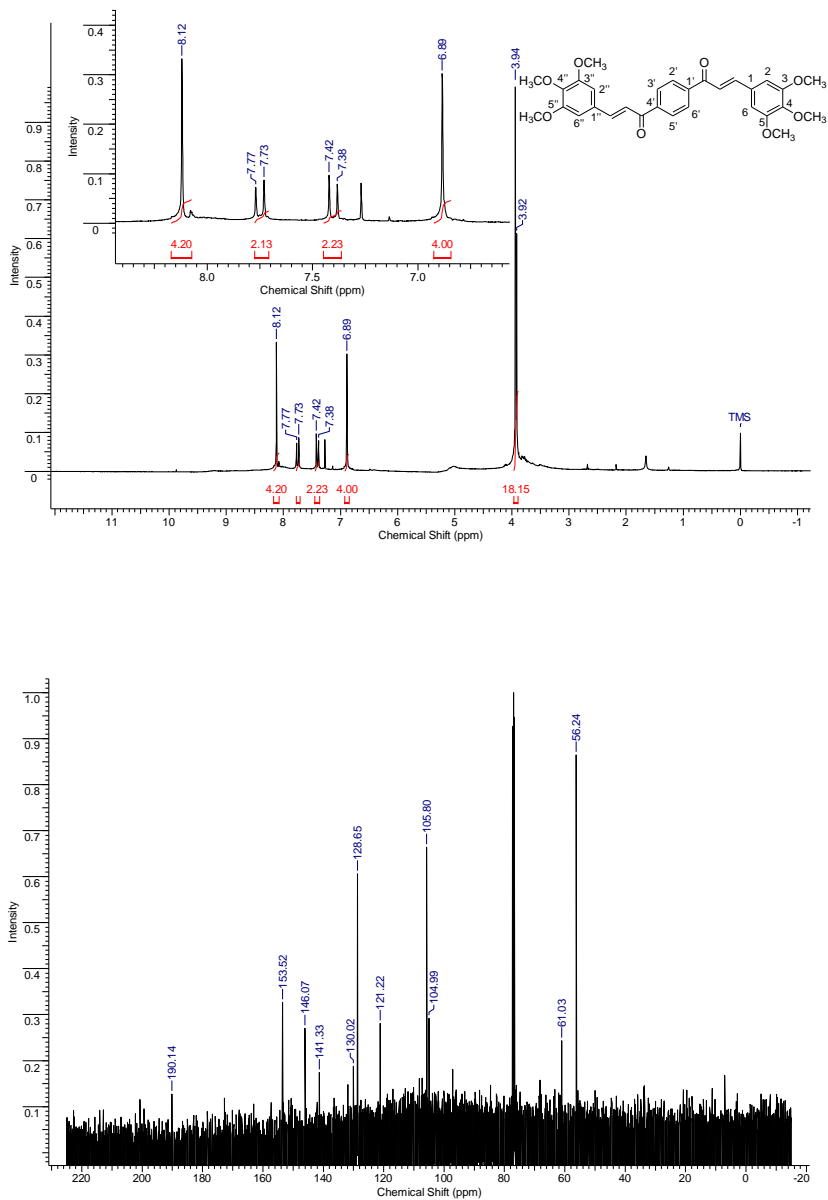
Figura 47. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto **3b**.

Figura 48. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto **3c**.

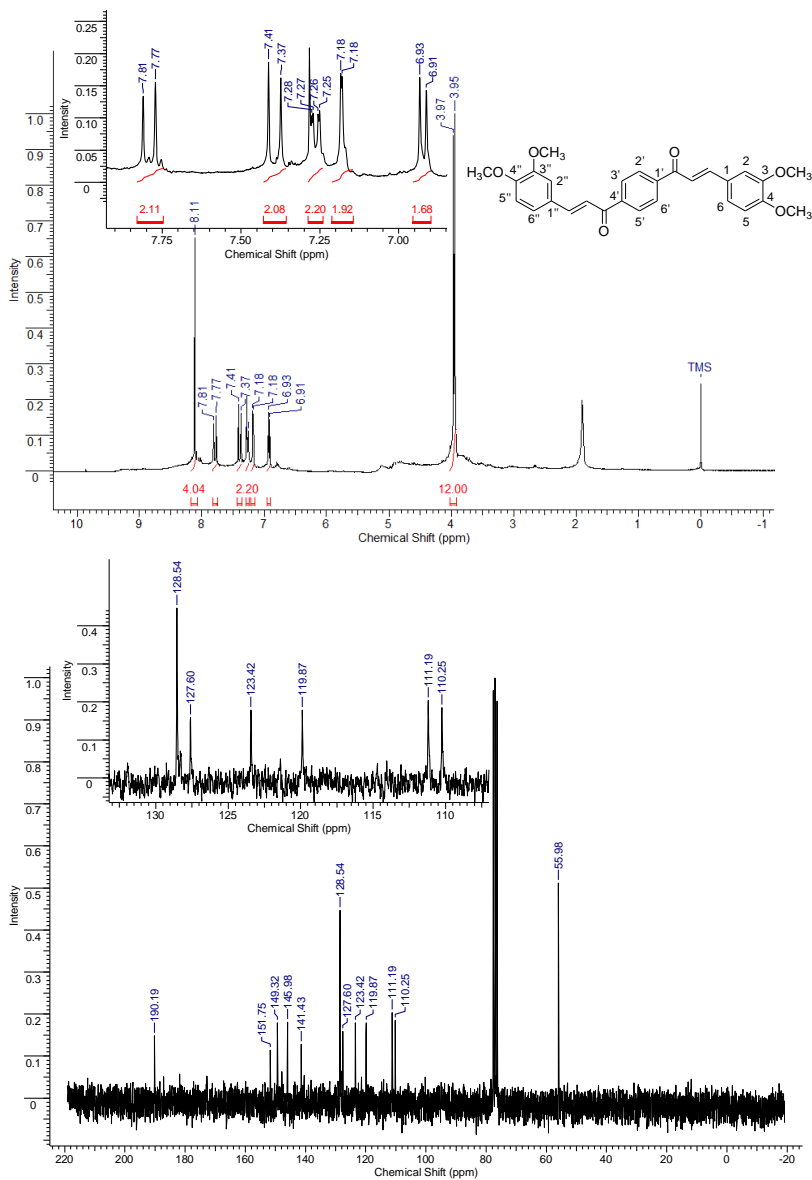


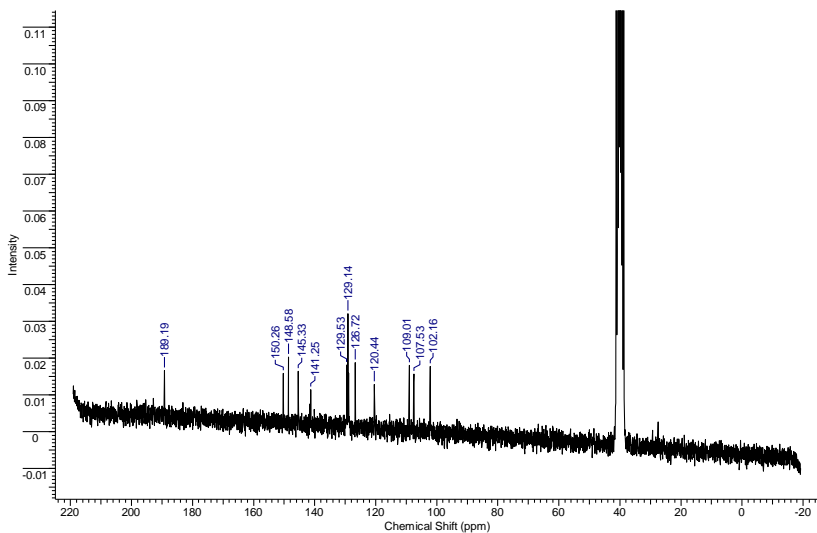
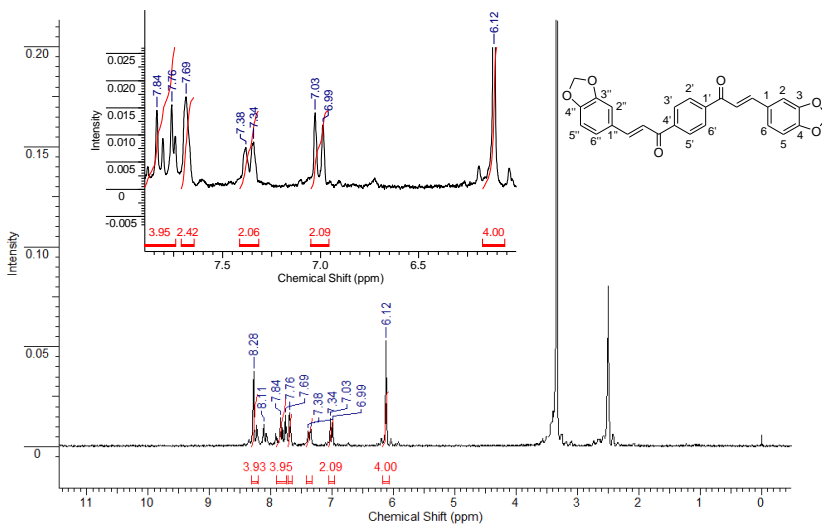
Figura 49. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto **3d**.

Figura 50. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto **3e**.

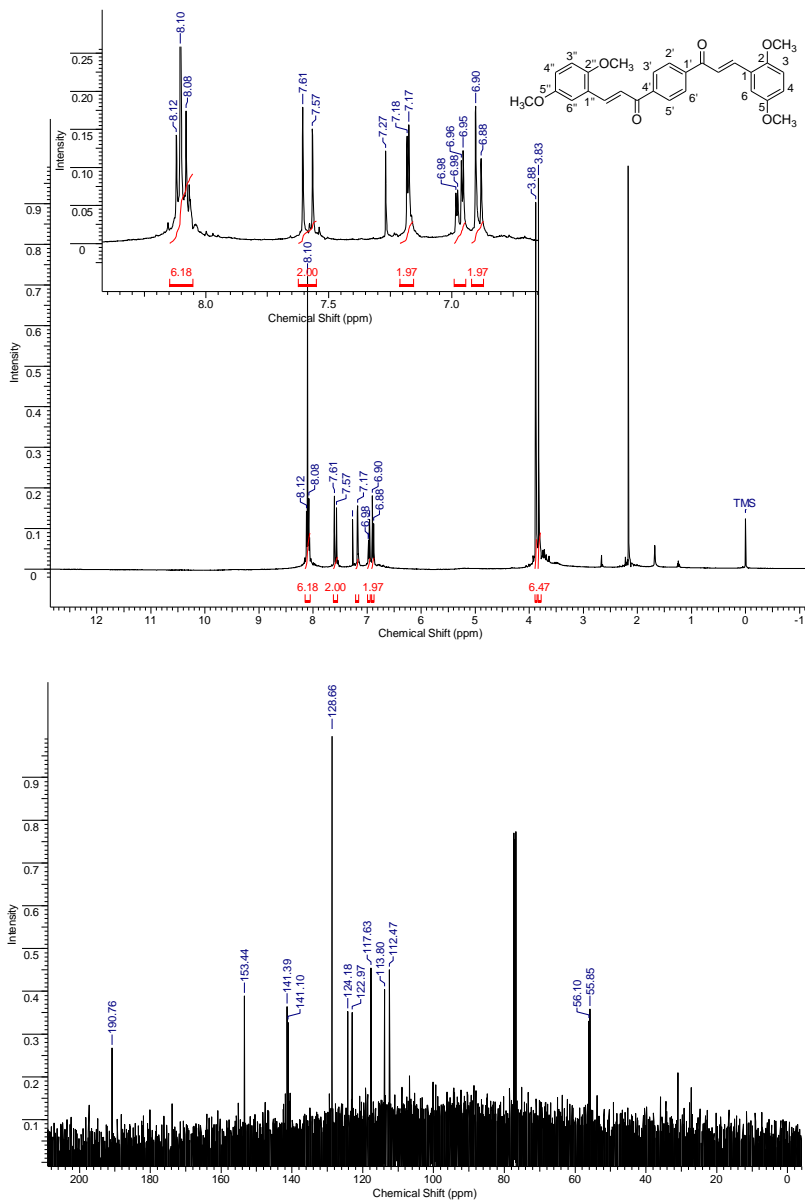


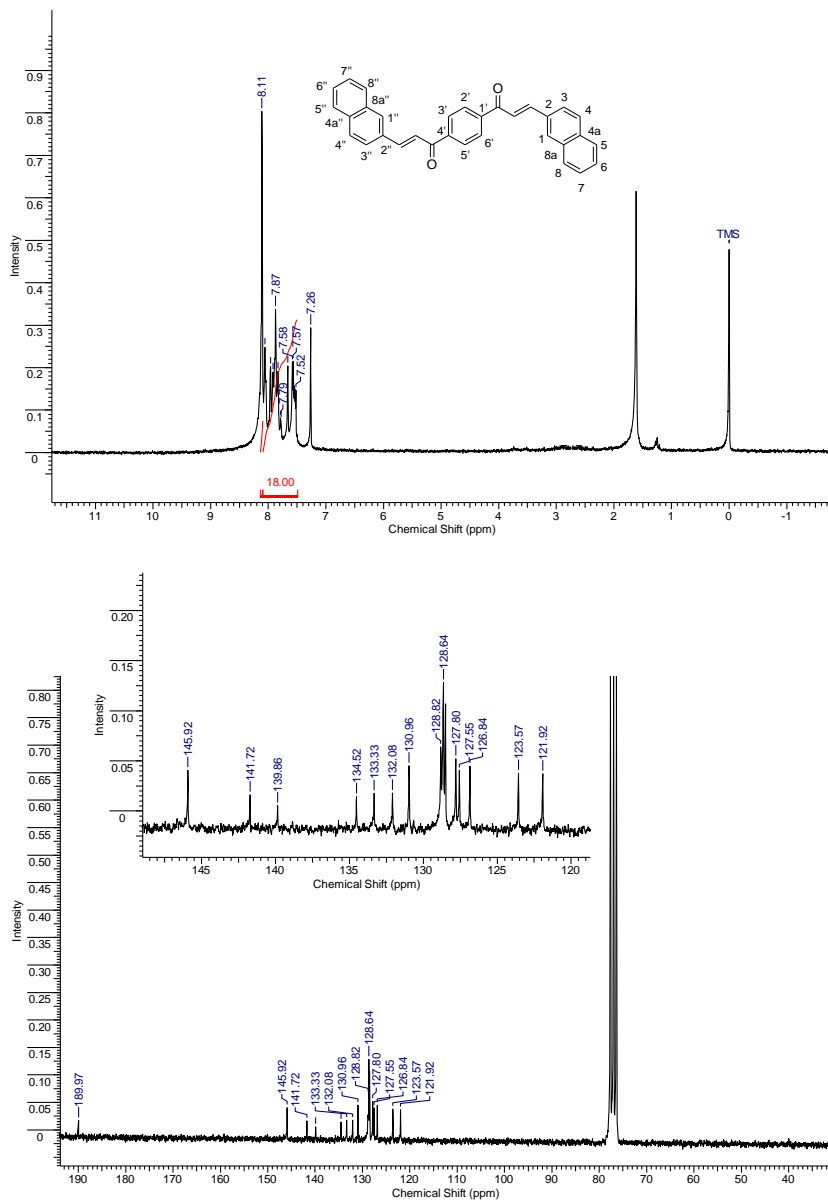
Figura 51. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto **3f**.

Figura 52. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto **3g**.

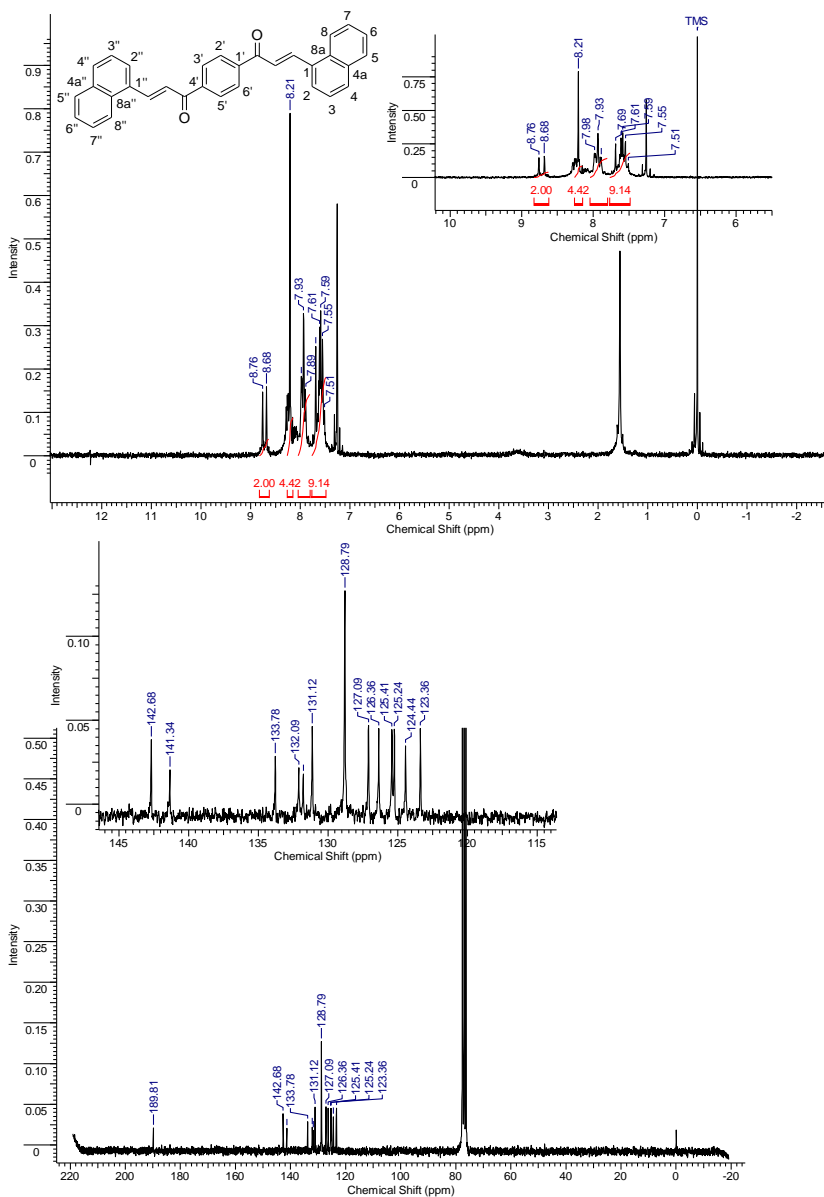


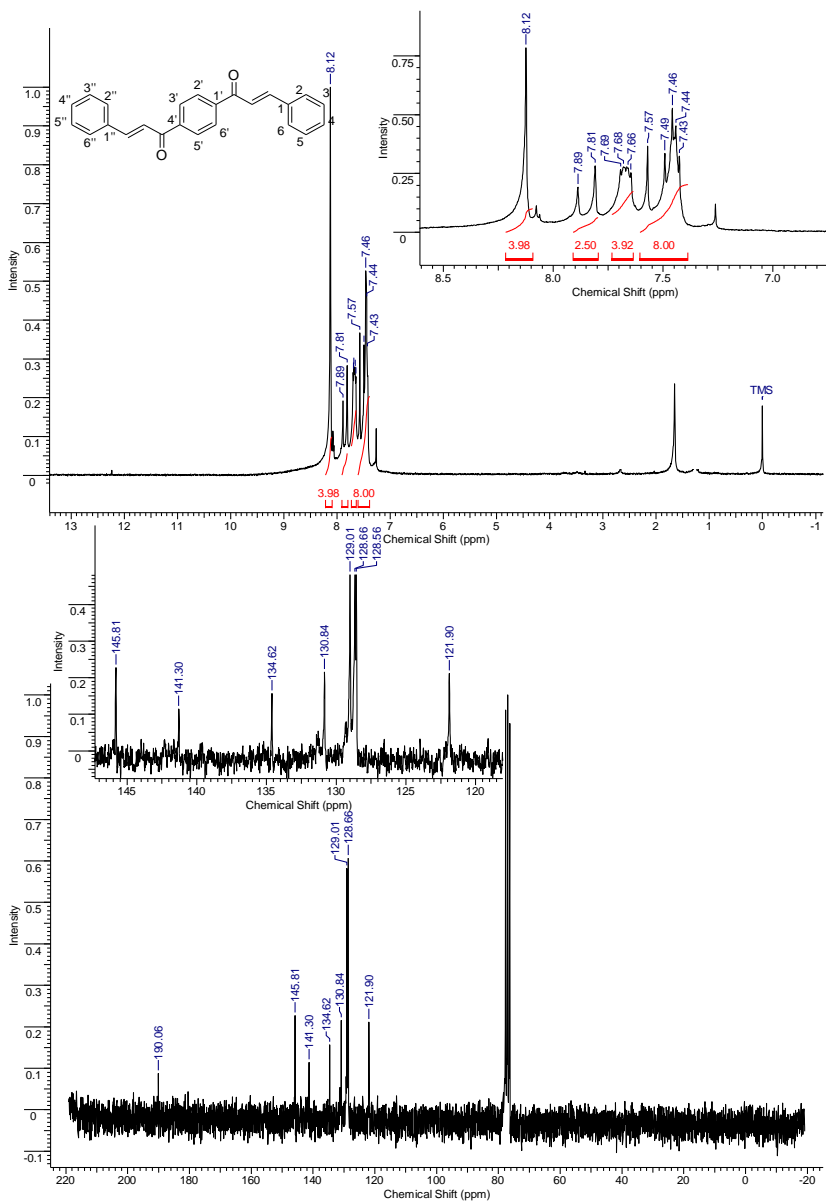
Figura 53. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto **3h**.

Figura 54. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto **3i**.

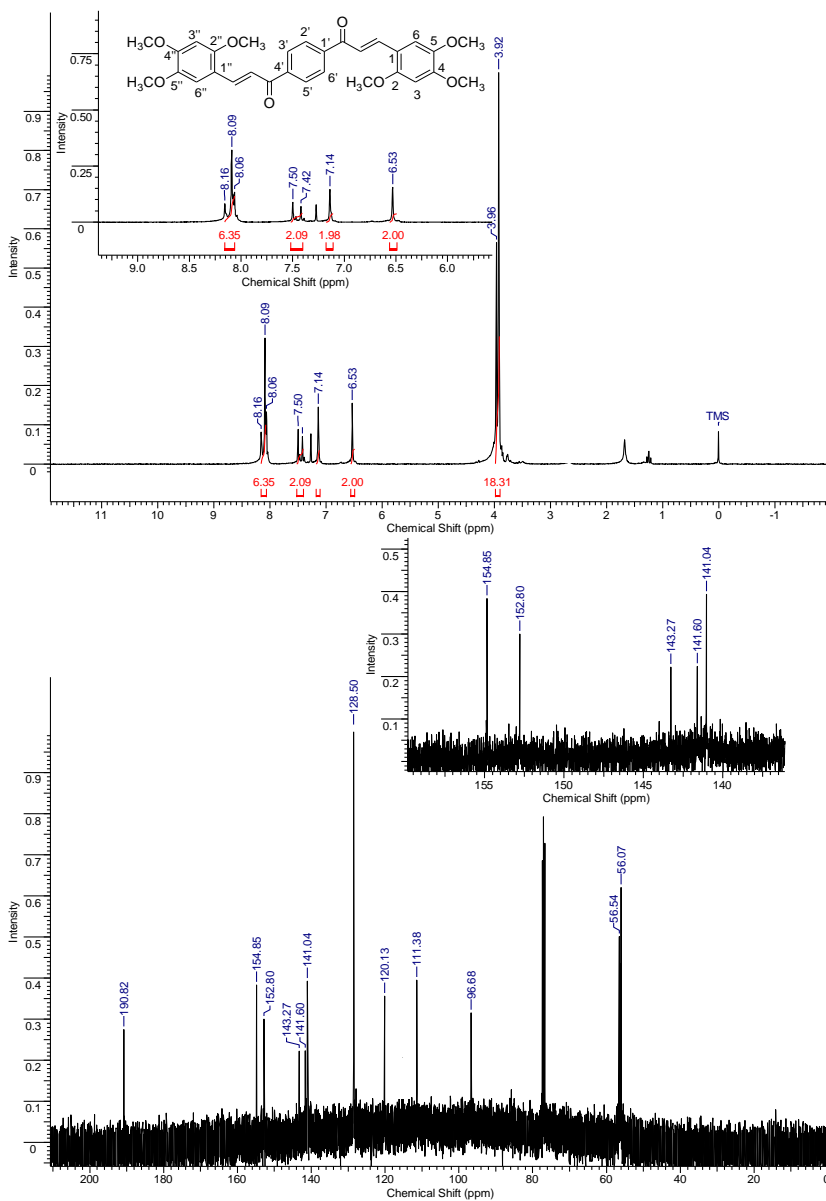


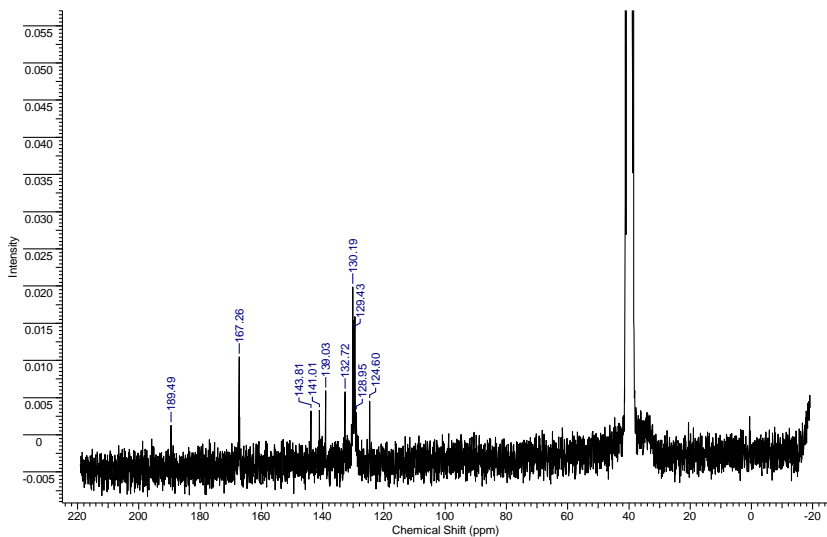
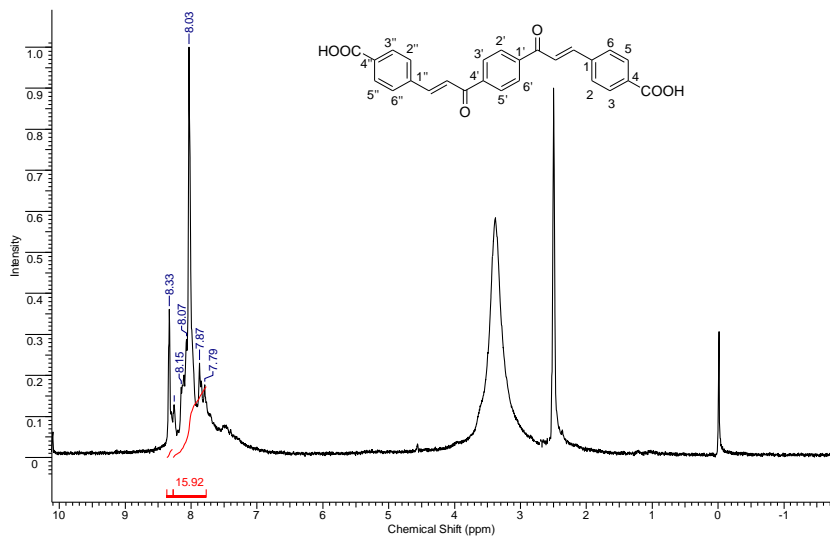
Figura 55. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto **3j**.

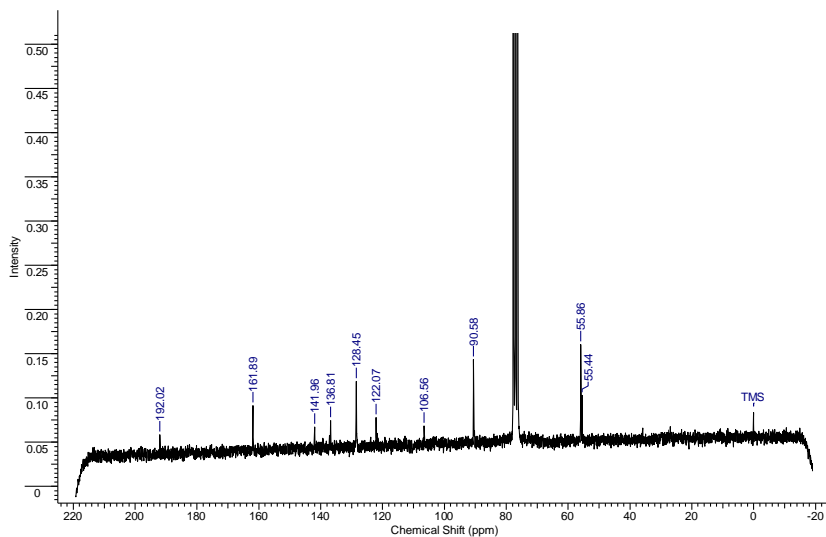
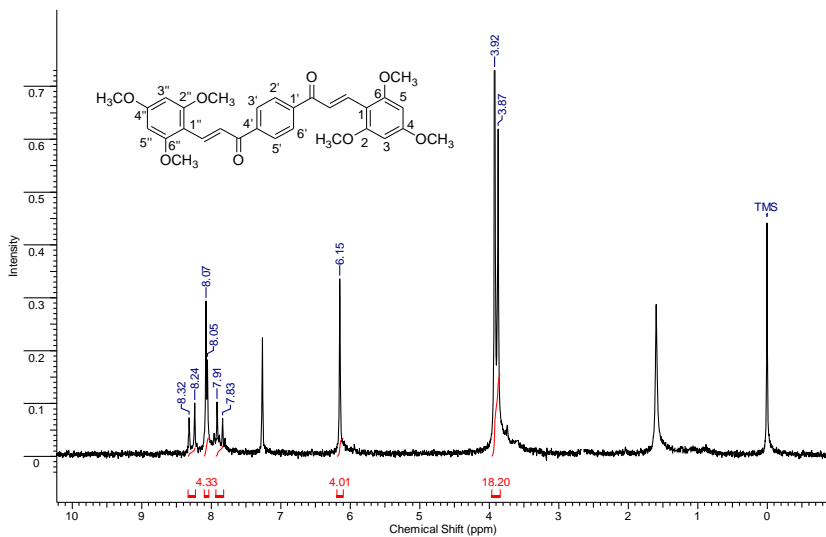
Figura 56. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto **3k**.

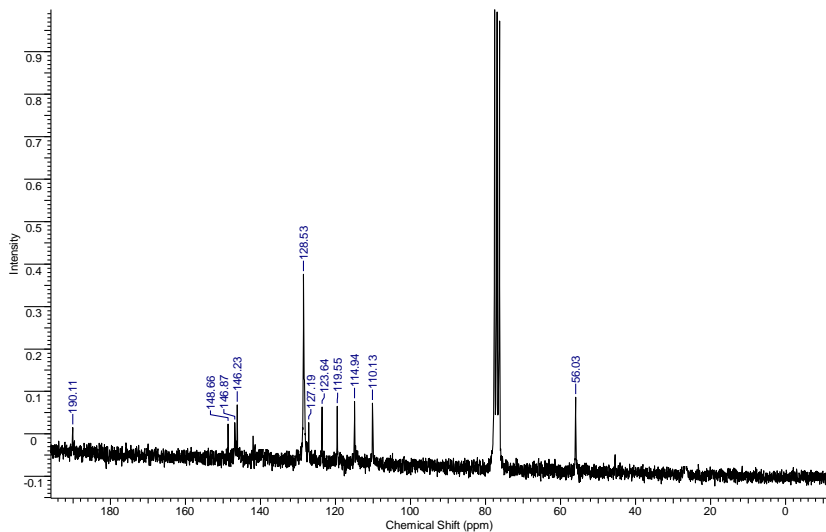
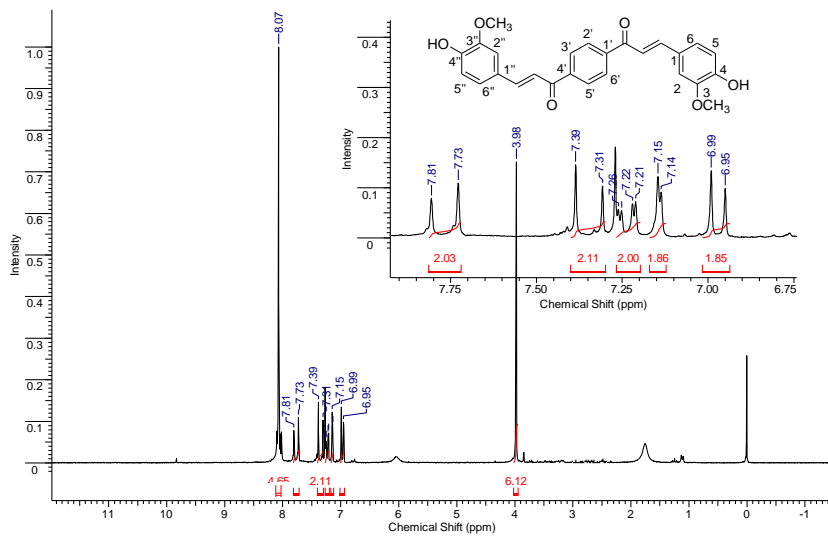
Figura 57. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto **31**.

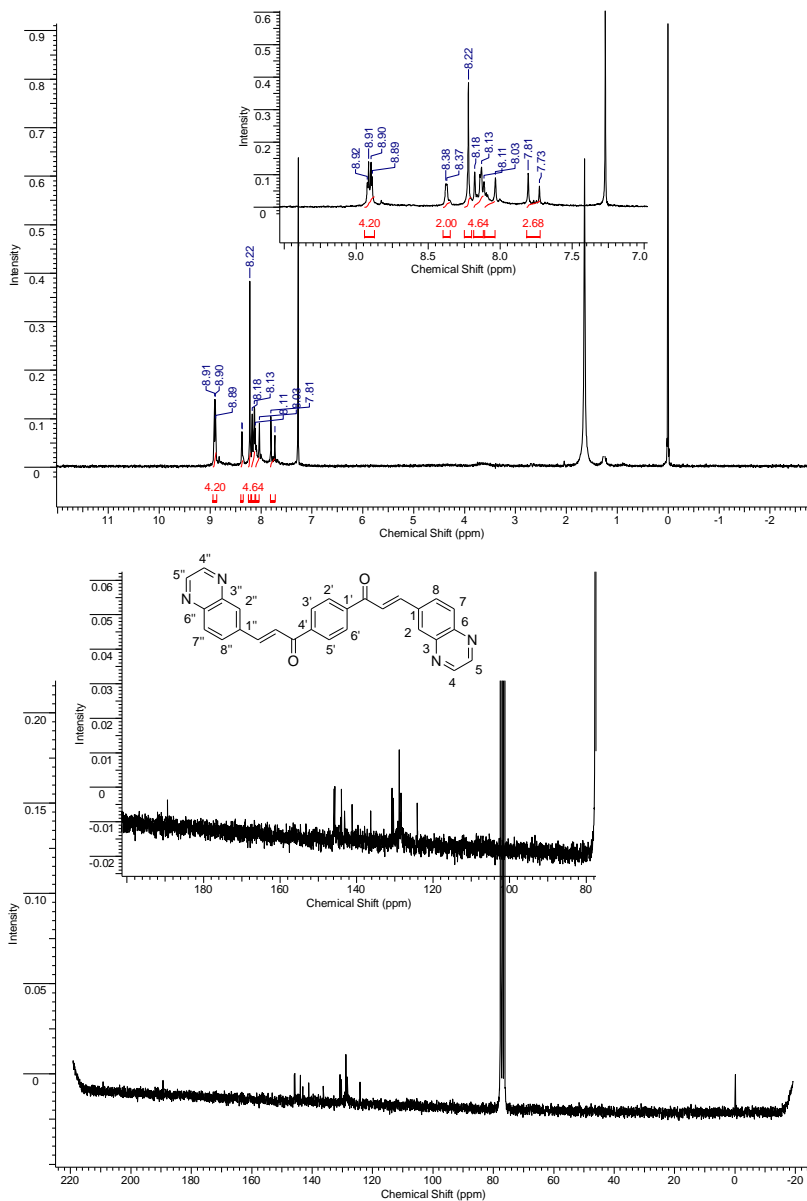
Figura 58. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto **3m**.

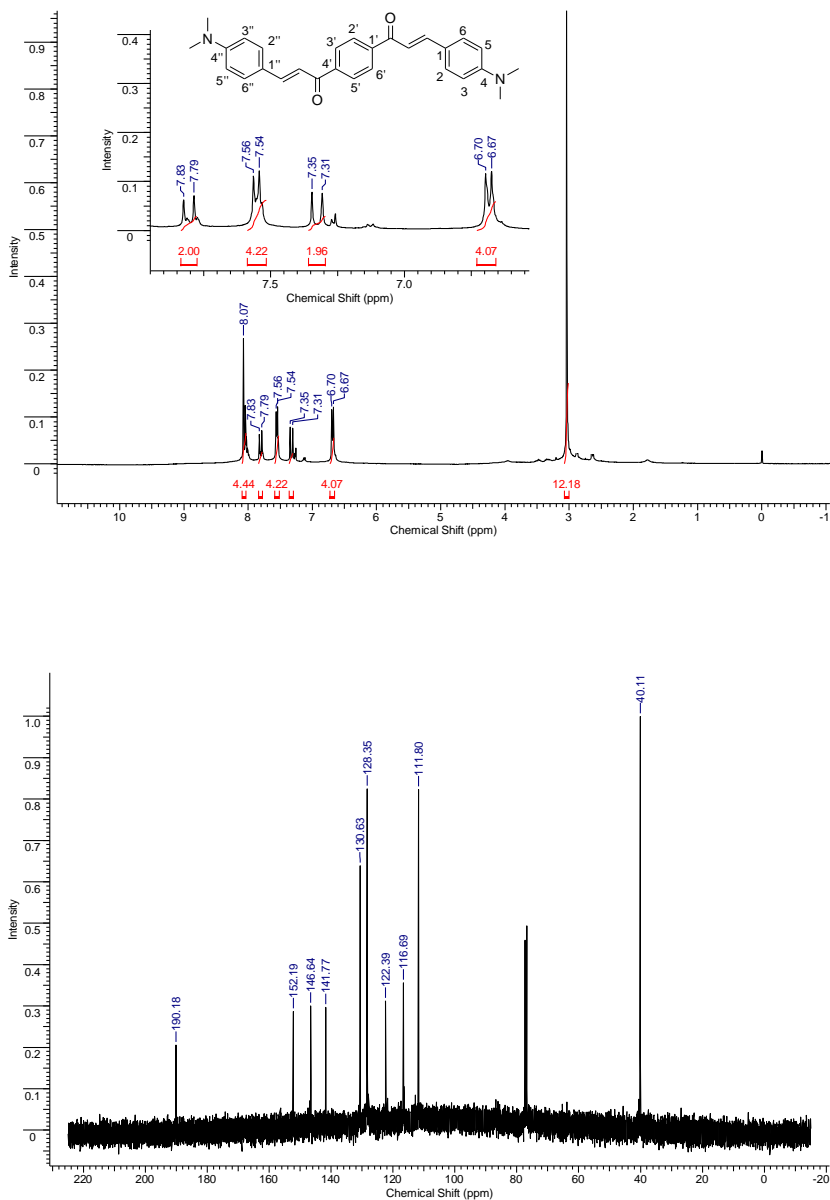
Figura 59. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto **3n**.

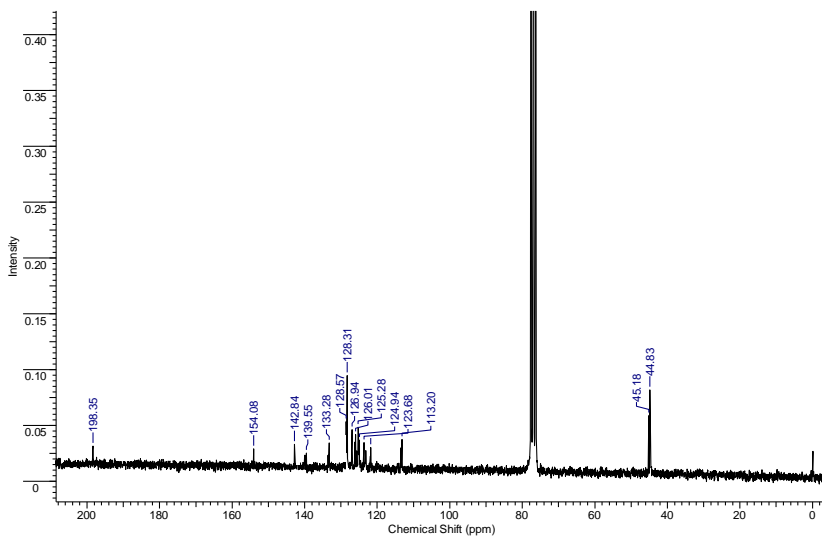
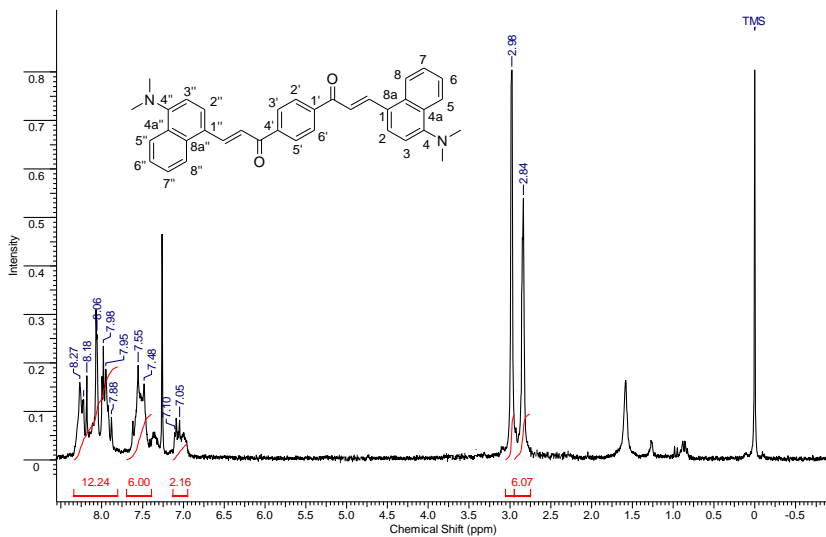
Figura 60. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto **30**.

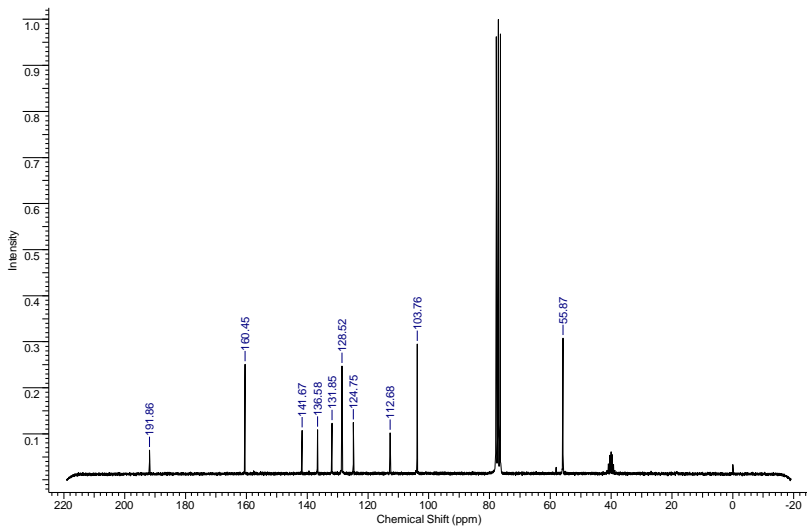
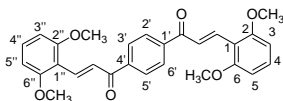
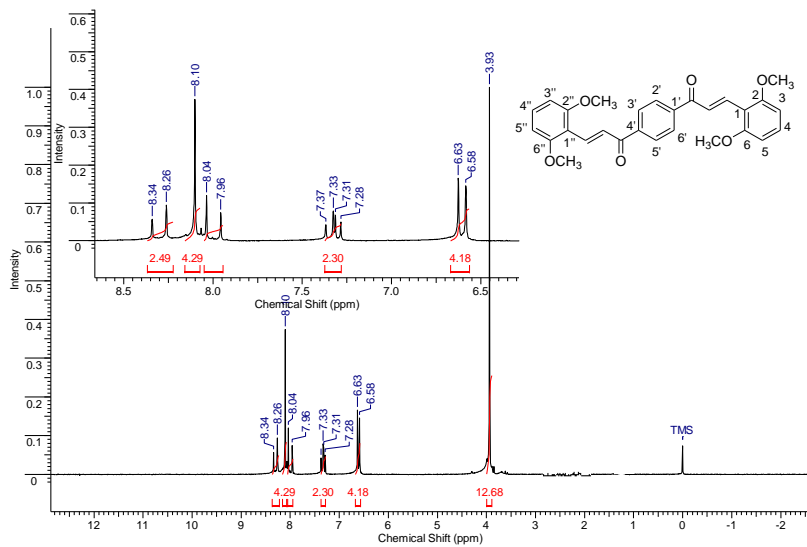
Figura 61. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto **3p**.

Figura 62. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto **3q**.

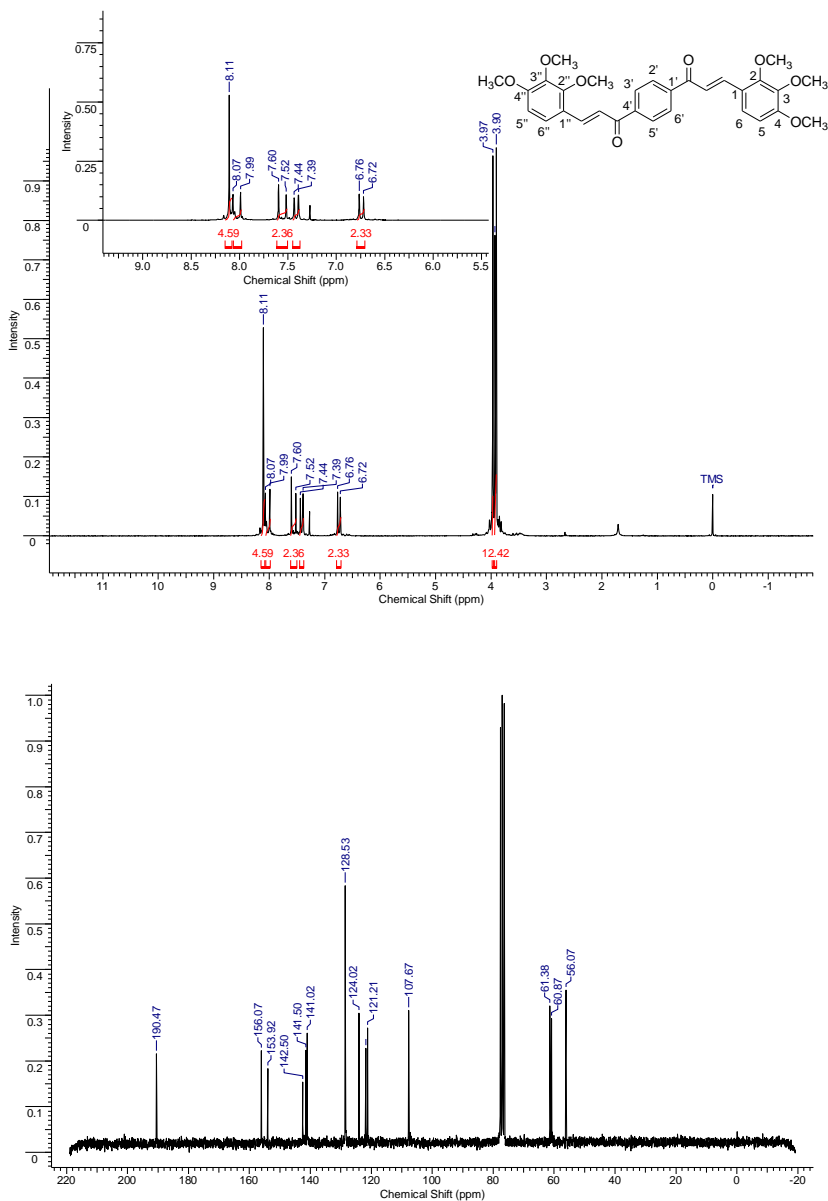


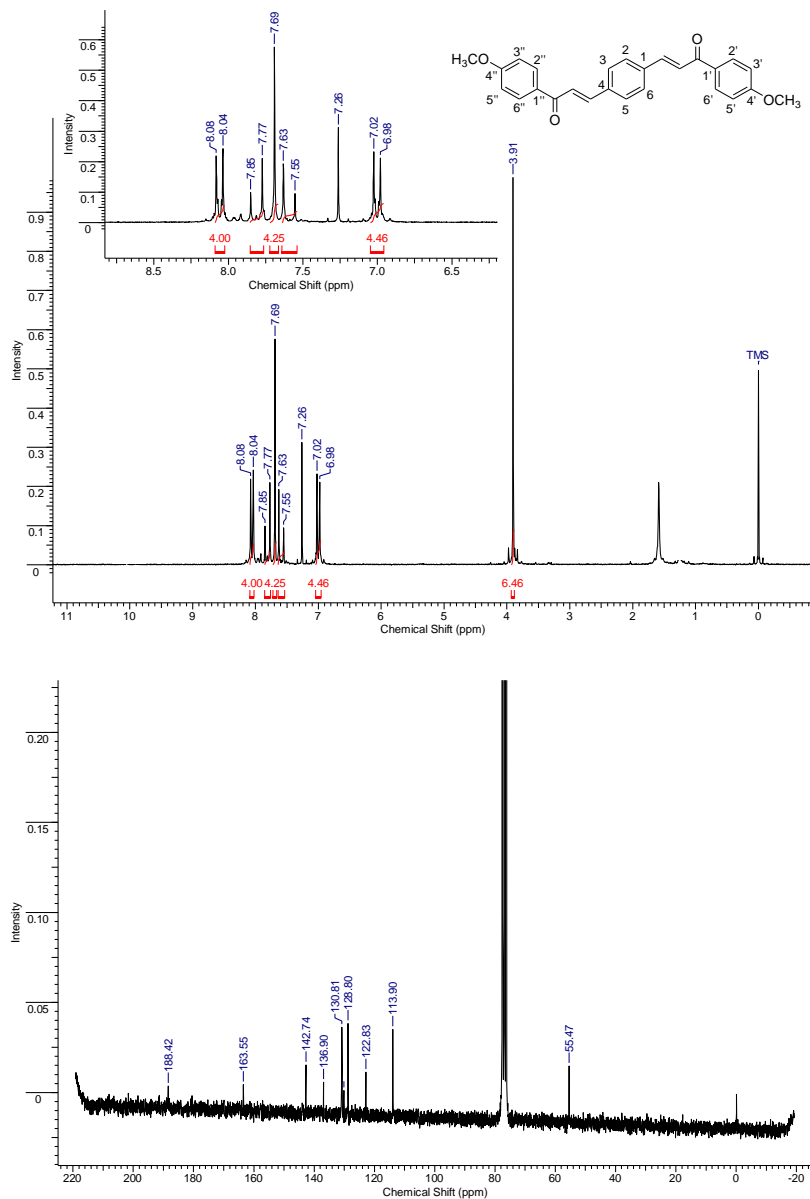
Figura 63. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto **6a**.

Figura 64. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto **6b**.

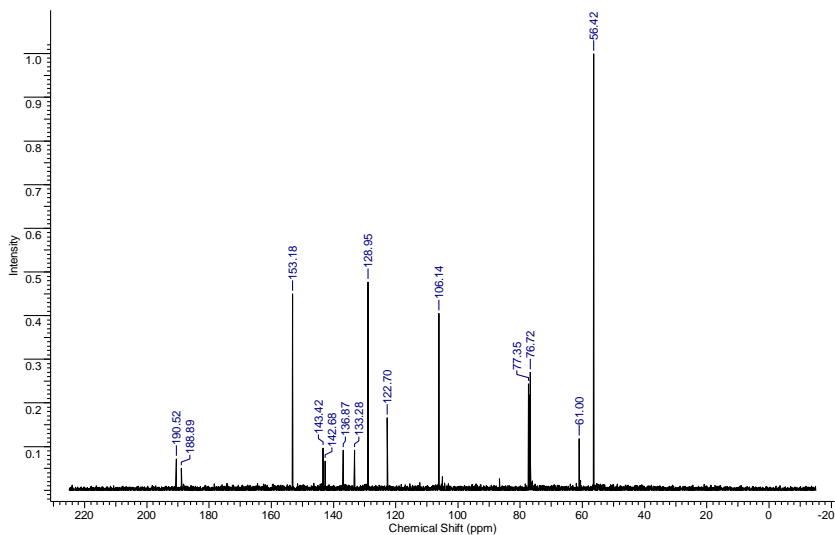
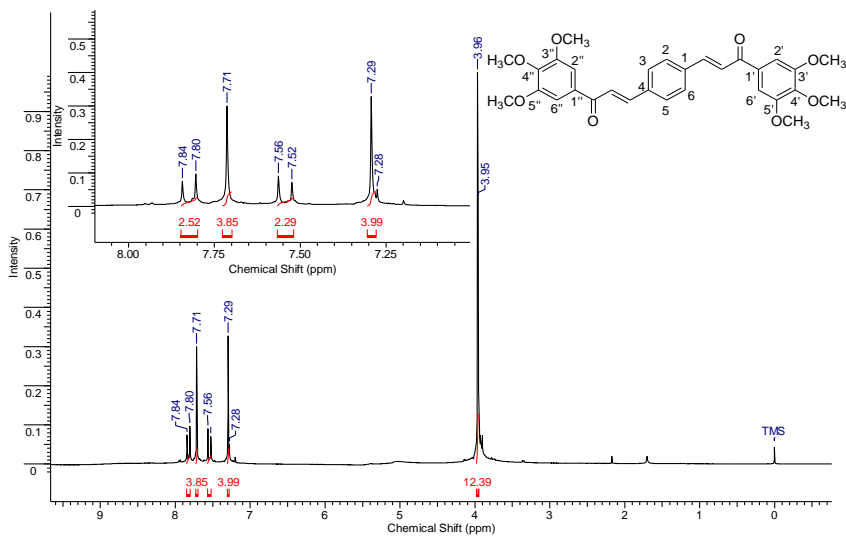


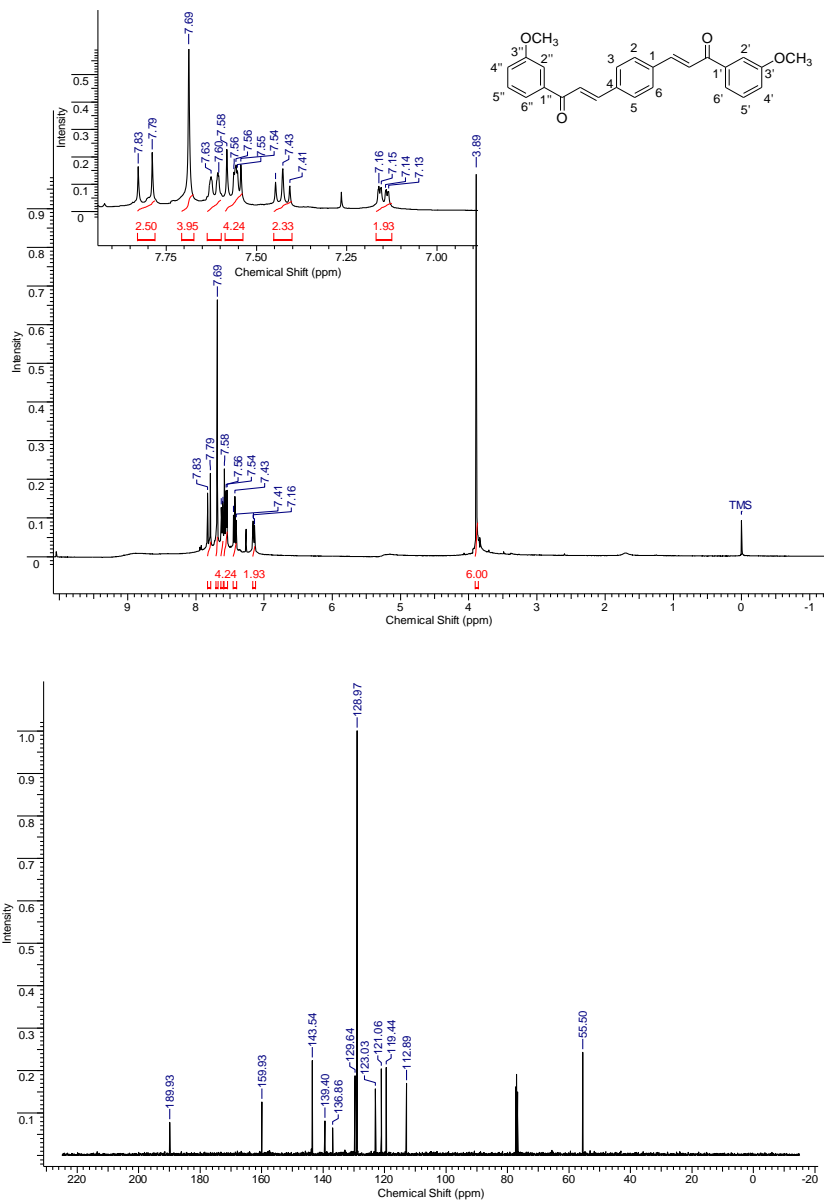
Figura 65. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto **6c**.

Figura 66. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto **6d**.

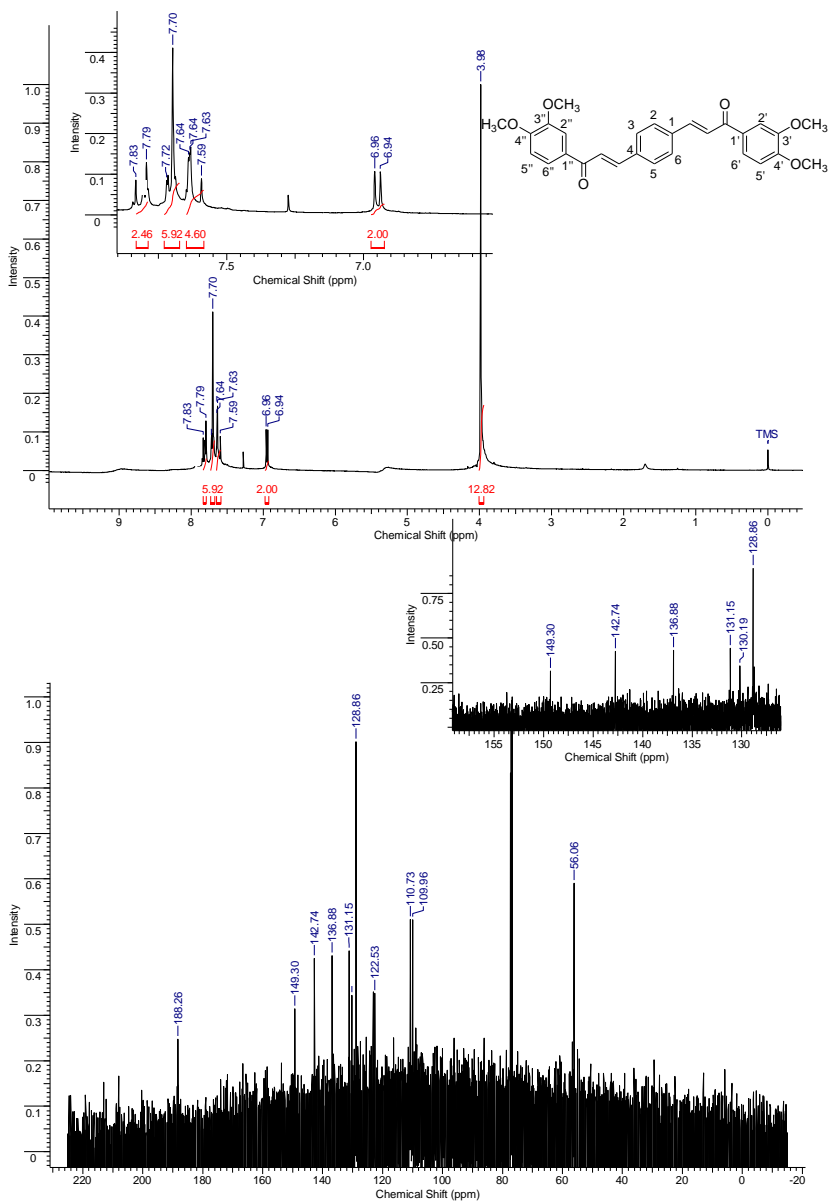


Figura 67. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto **6e**.

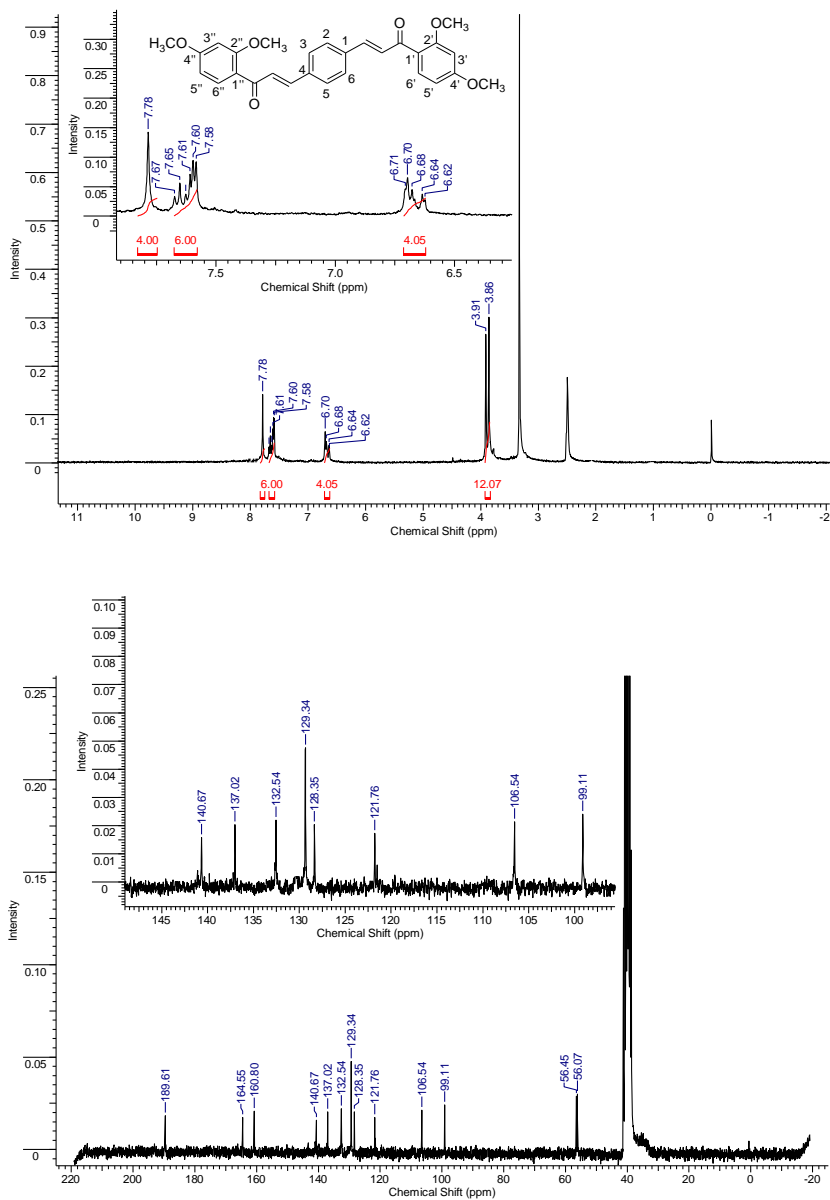


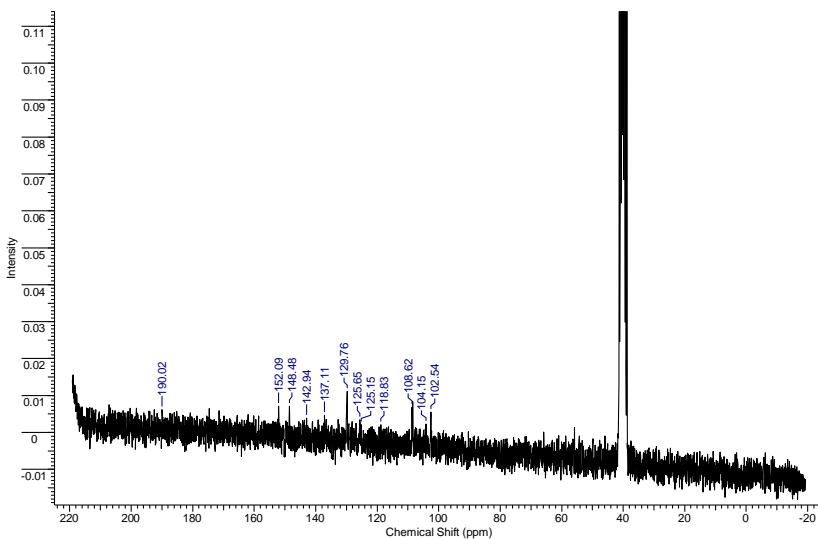
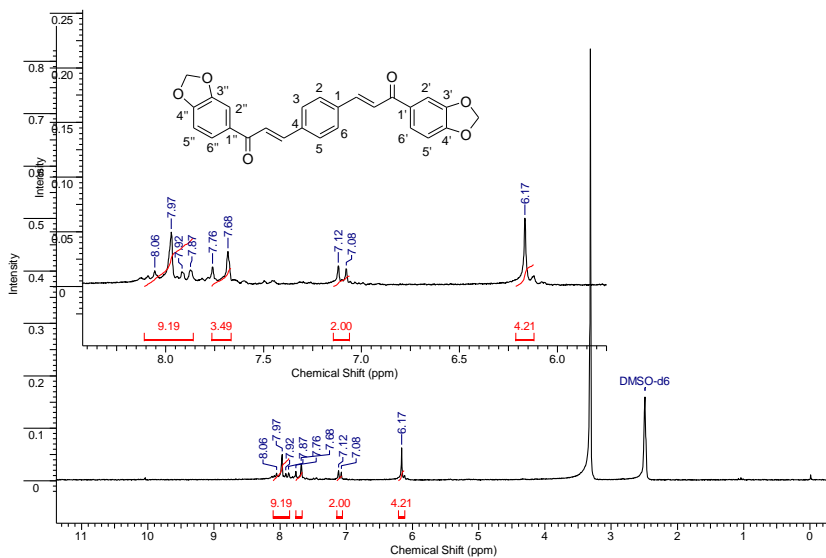
Figura 68. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto **6f**.

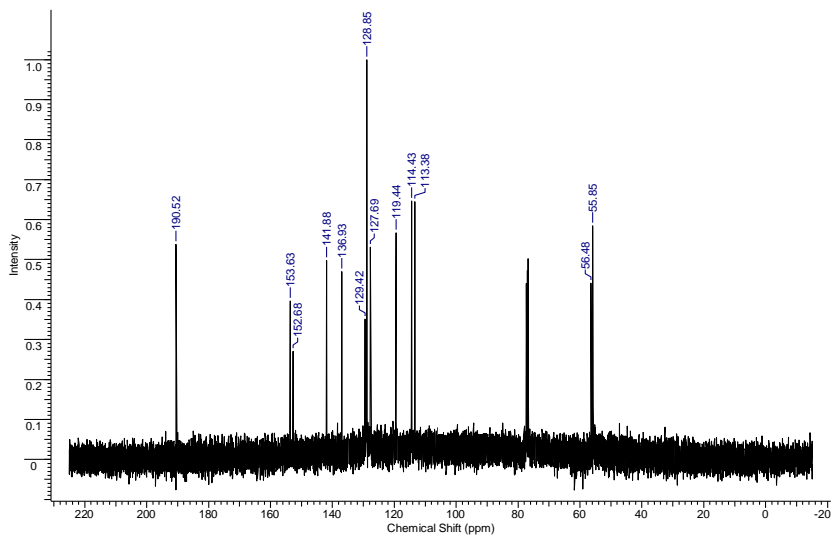
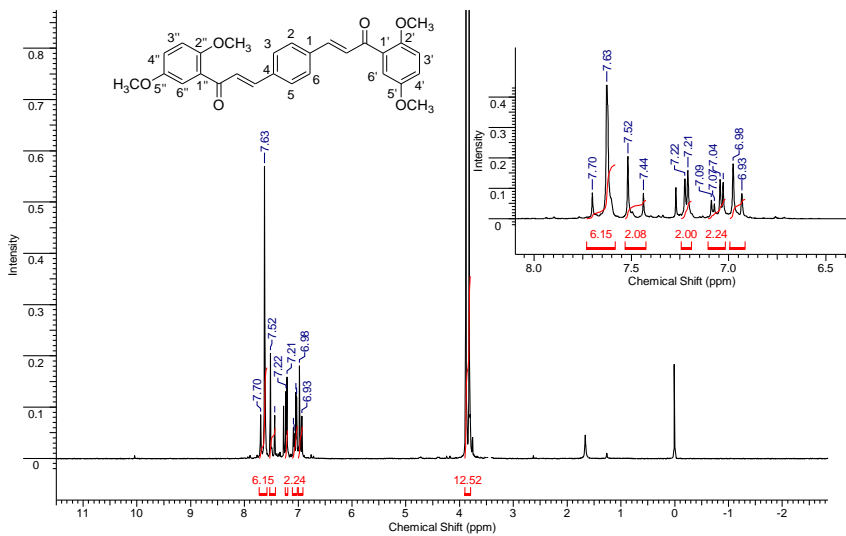
Figura 69. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto **6g**.

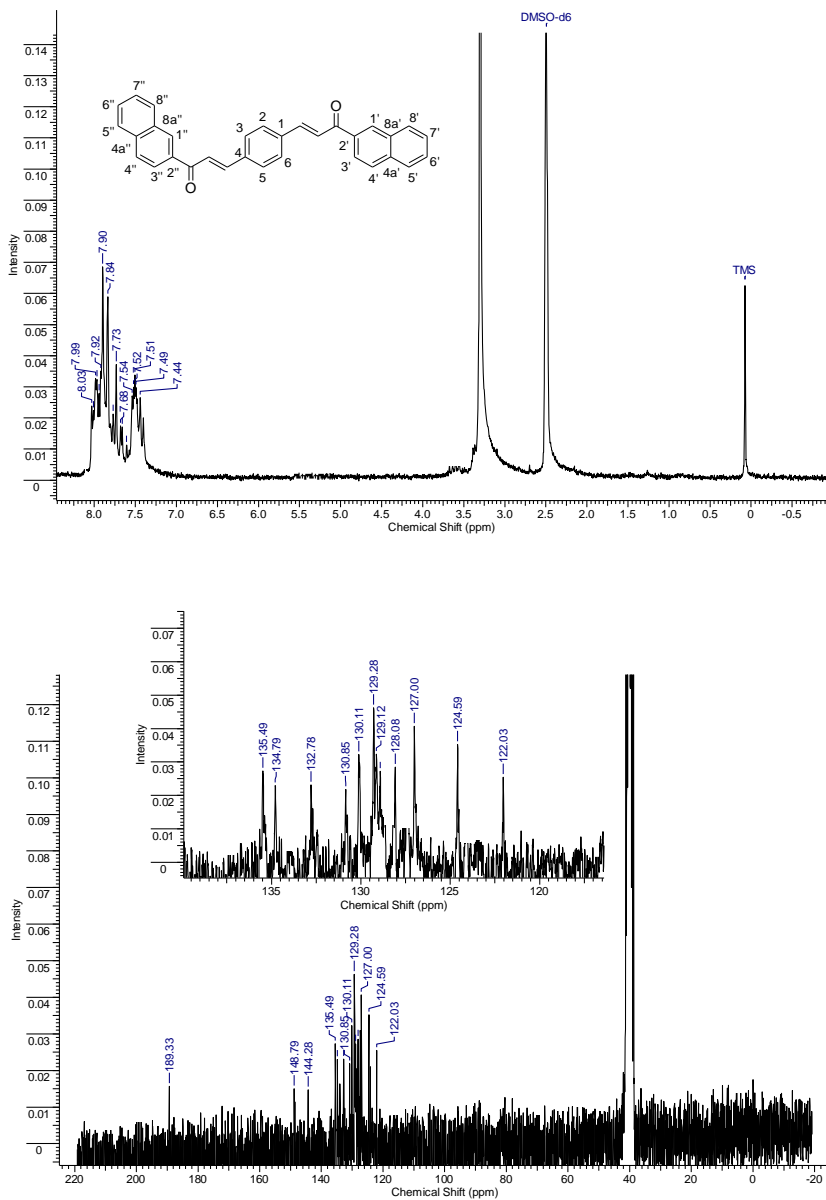
Figura 70. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto **6h**.

Figura 71. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto **6i**.

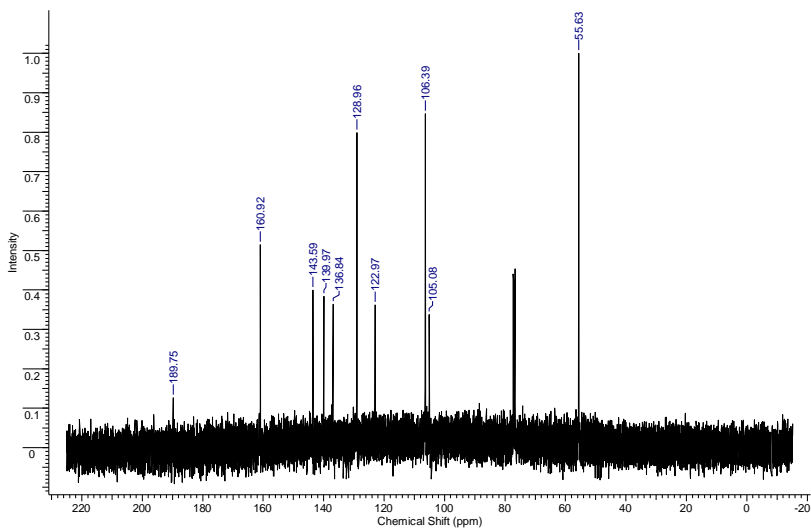
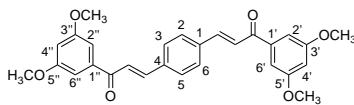
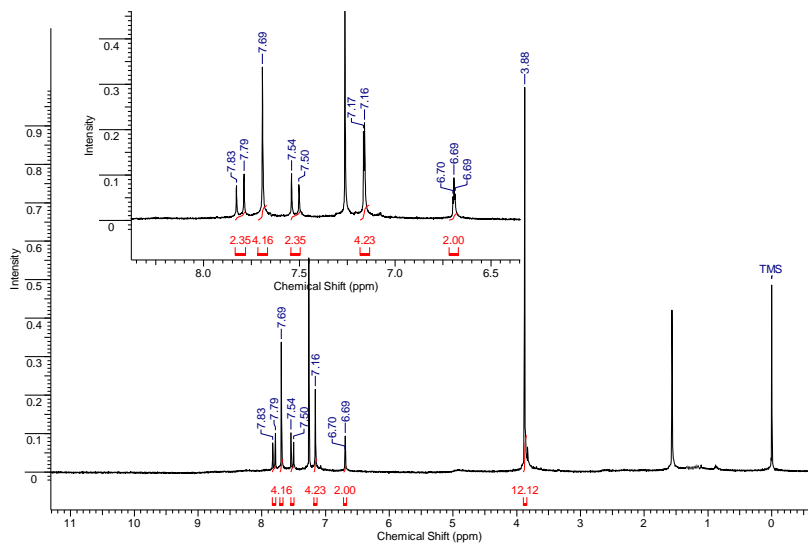


Figura 72. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto **6j**.

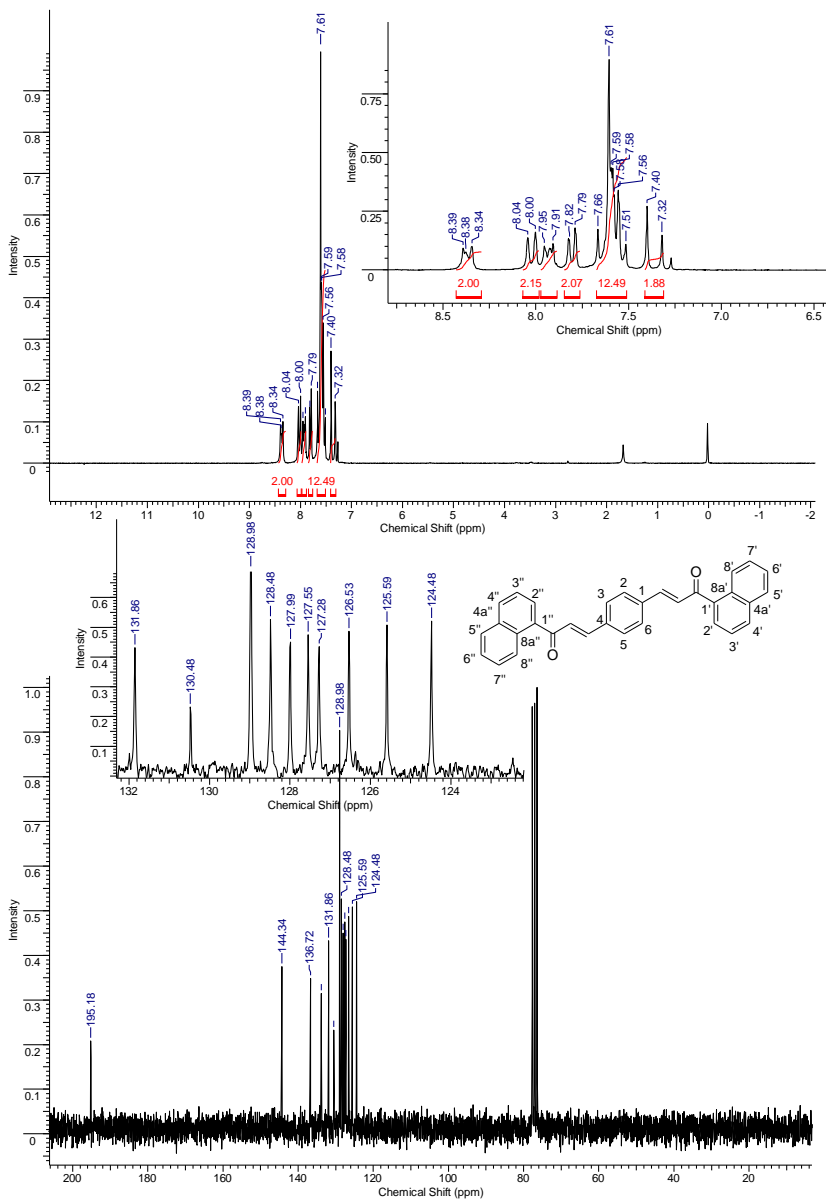


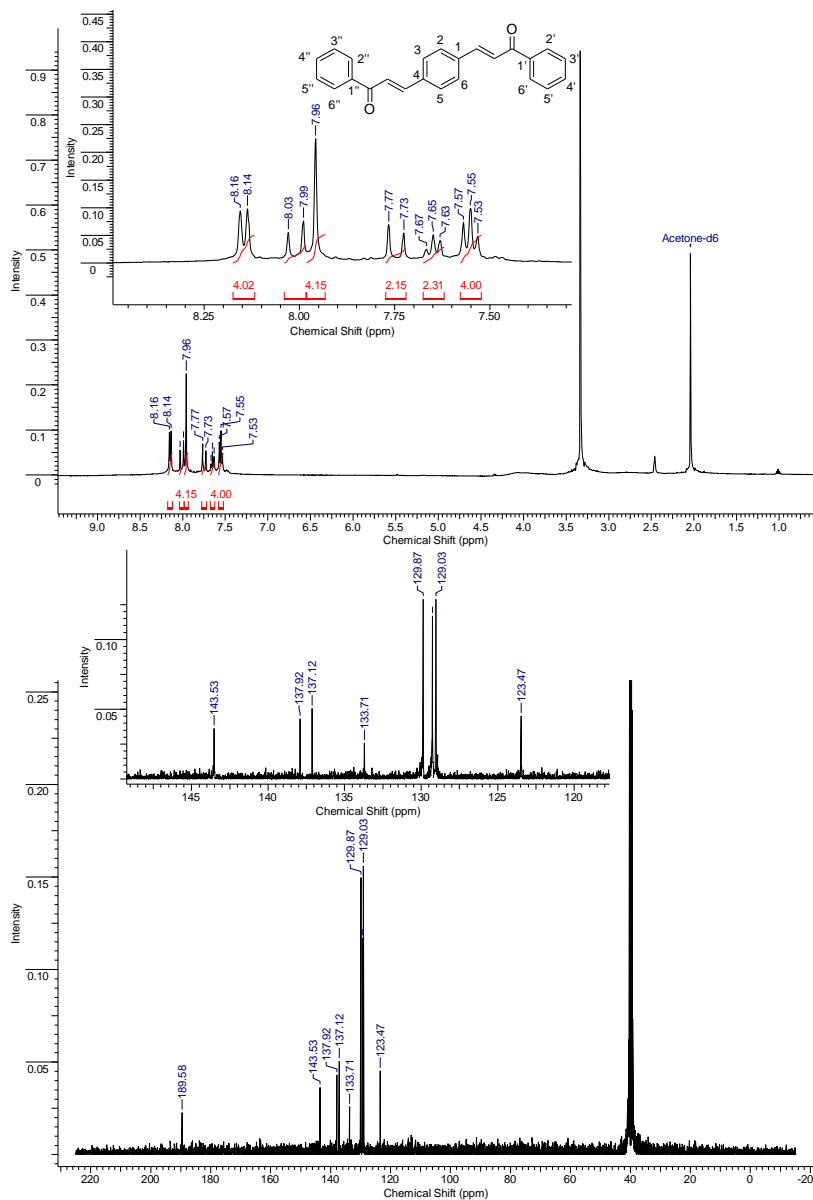
Figura 73. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto **6k**.

Figura 74. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto **6l**.

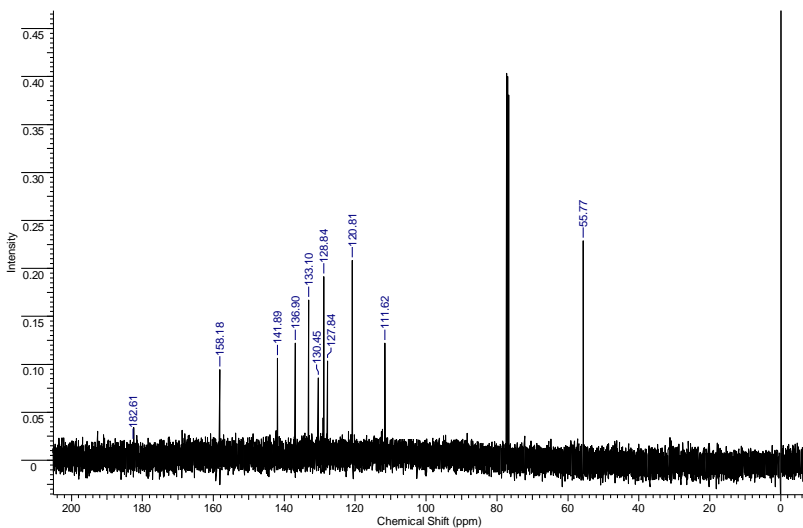
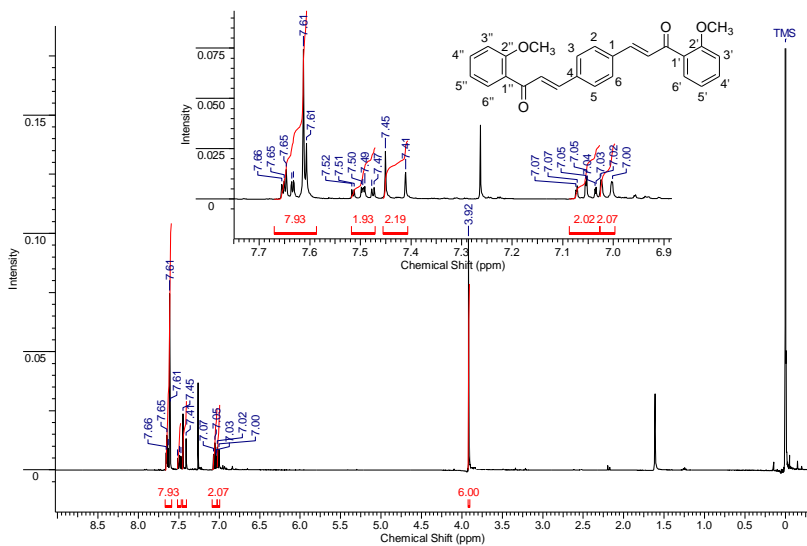


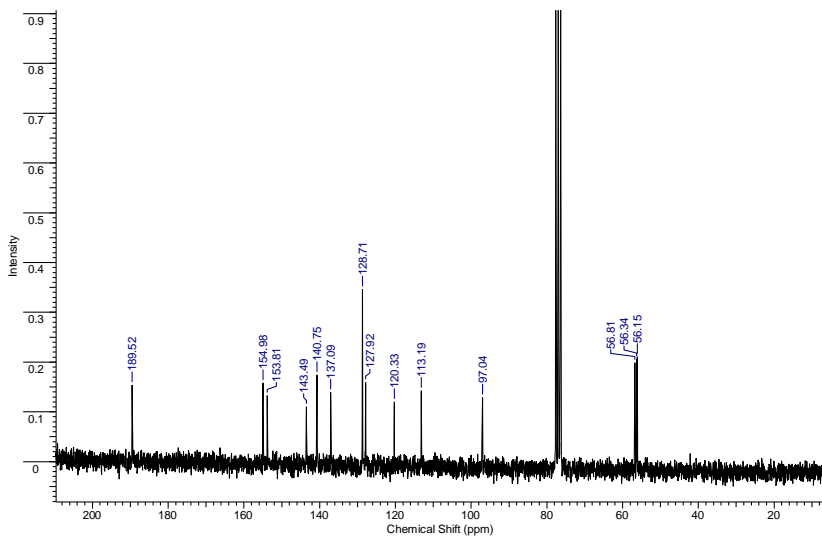
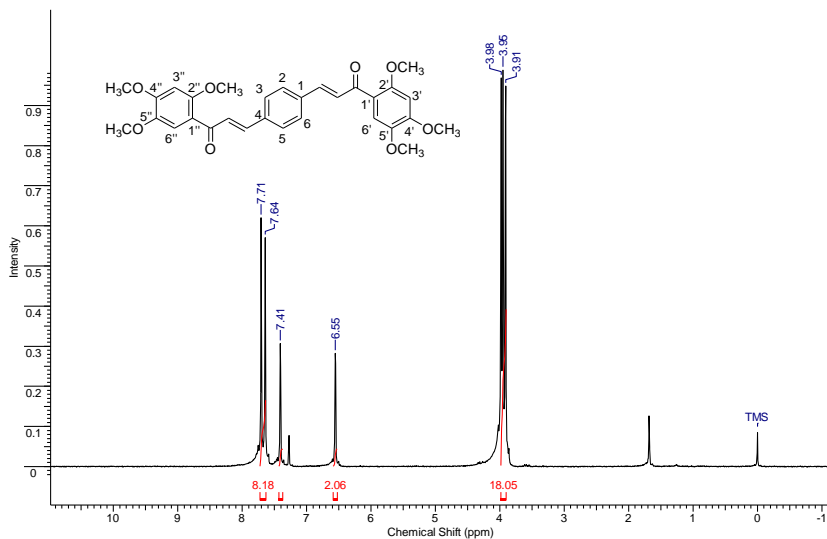
Figura 75. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto **6m**.

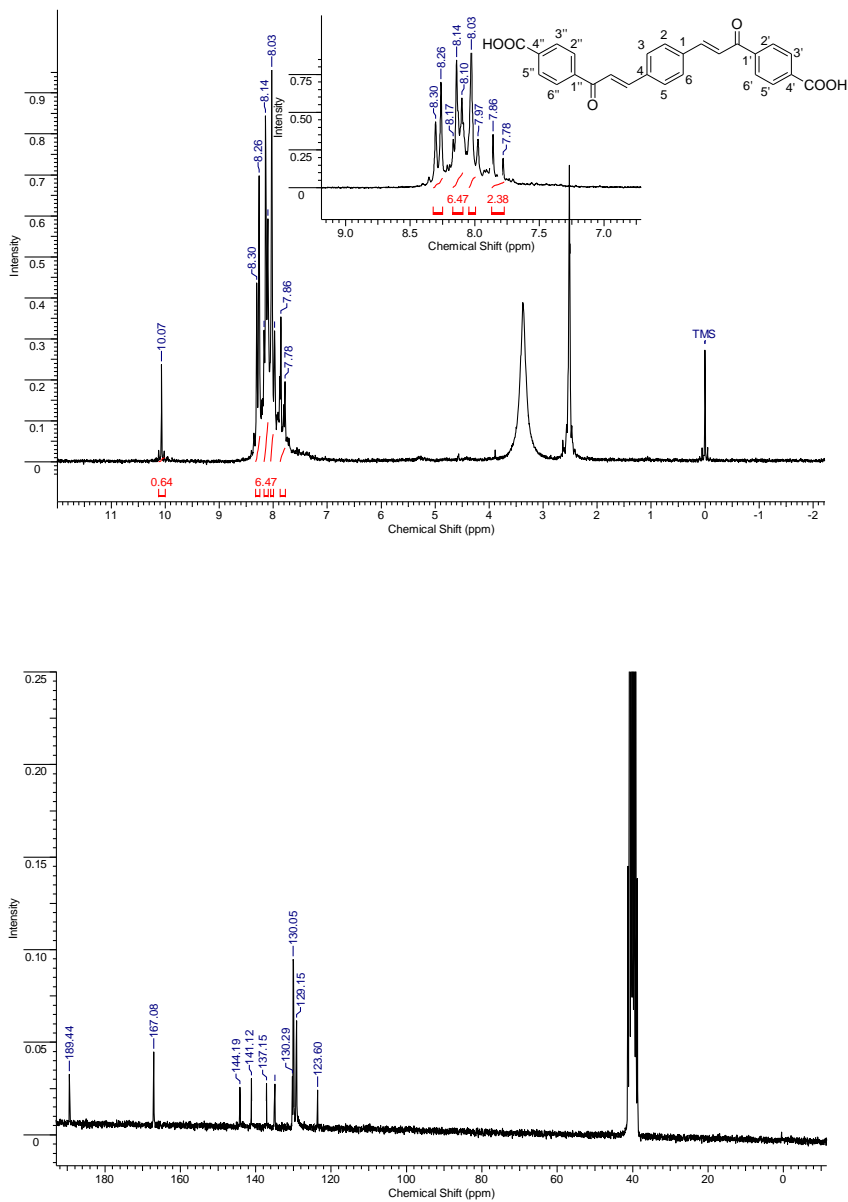
Figura 76. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto **6n**.

Figura 77. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto **60**.

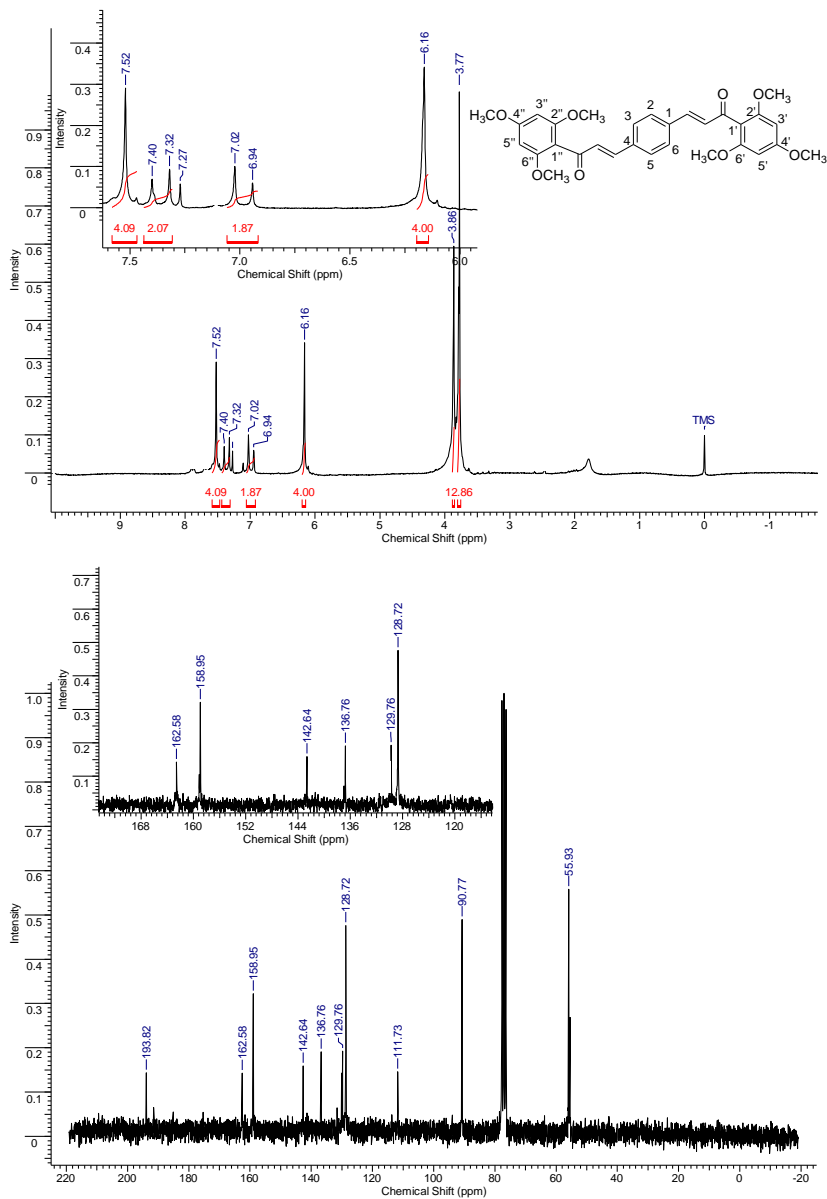


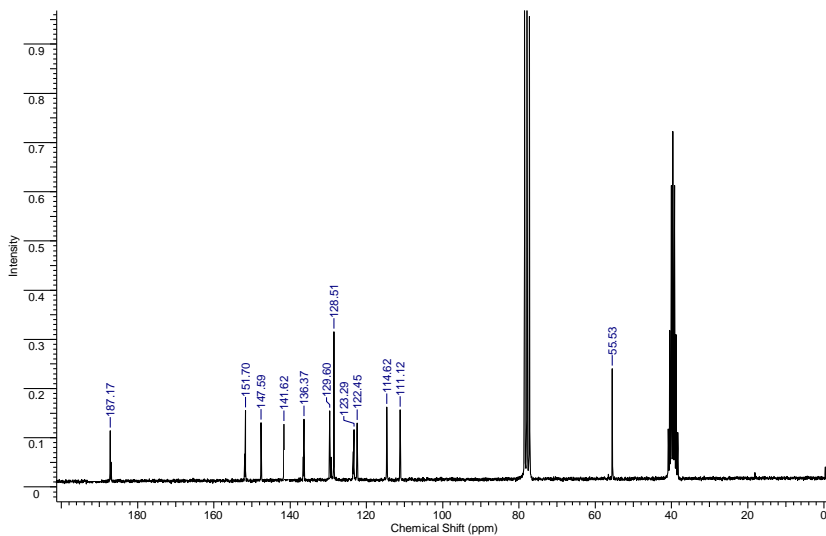
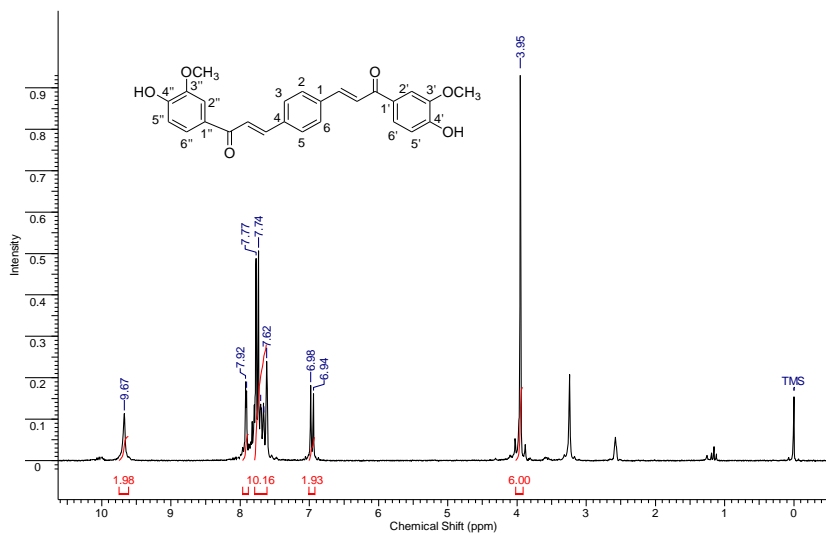
Figura 78. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto **6p**.

Figura 79. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto **8a**.

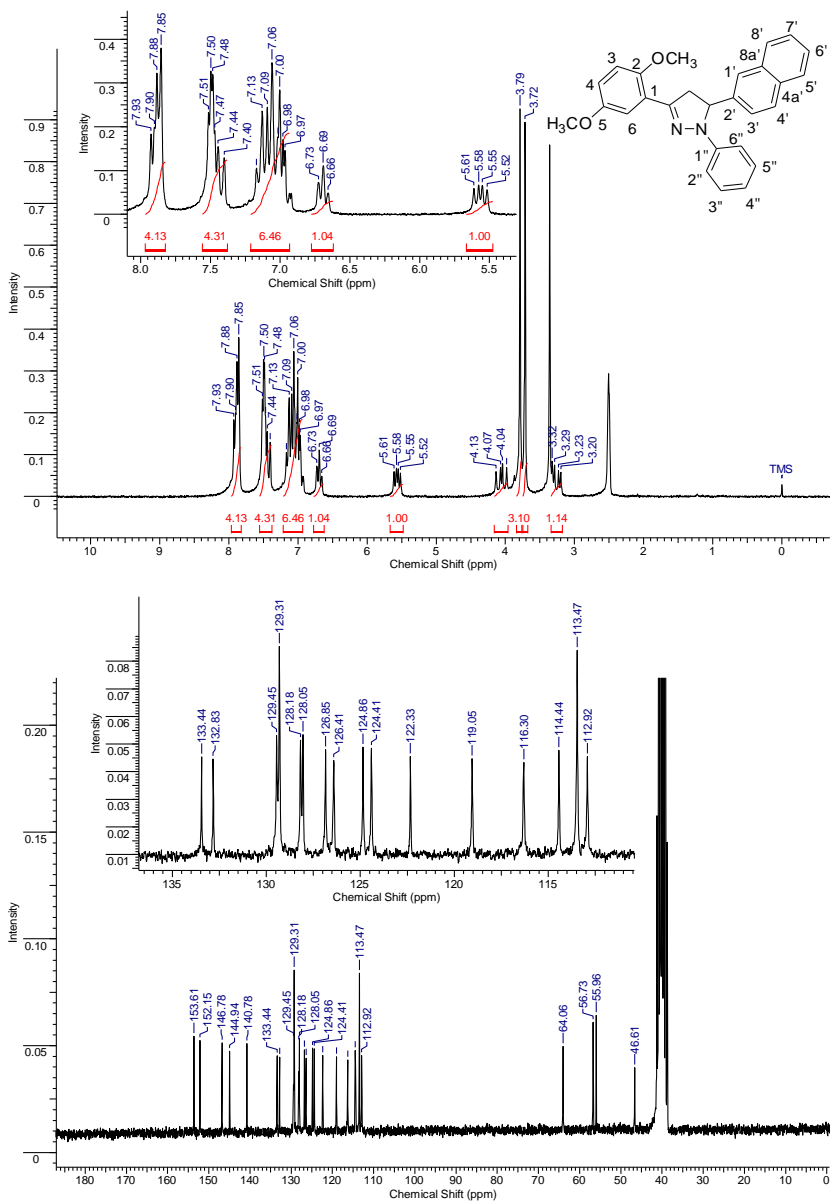


Figura 81. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto **8c**.

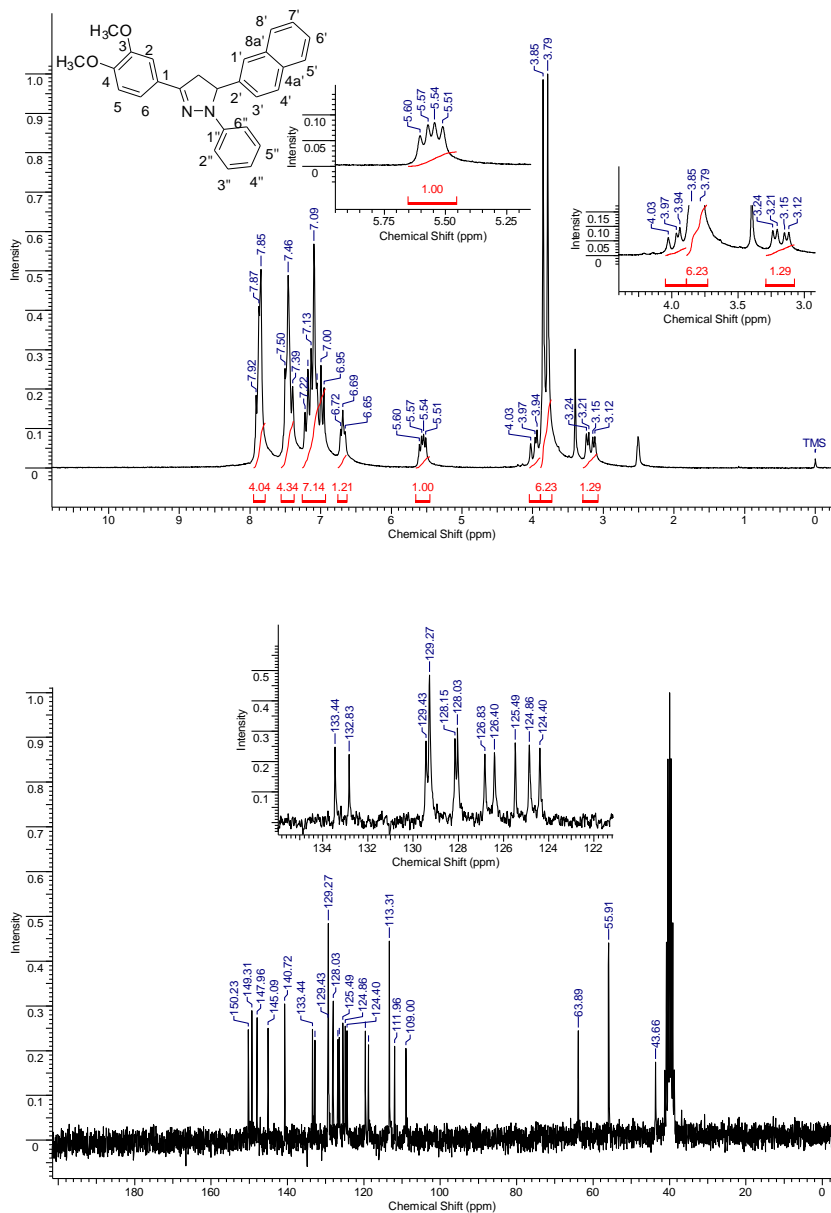


Figura 82. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto **8d**.

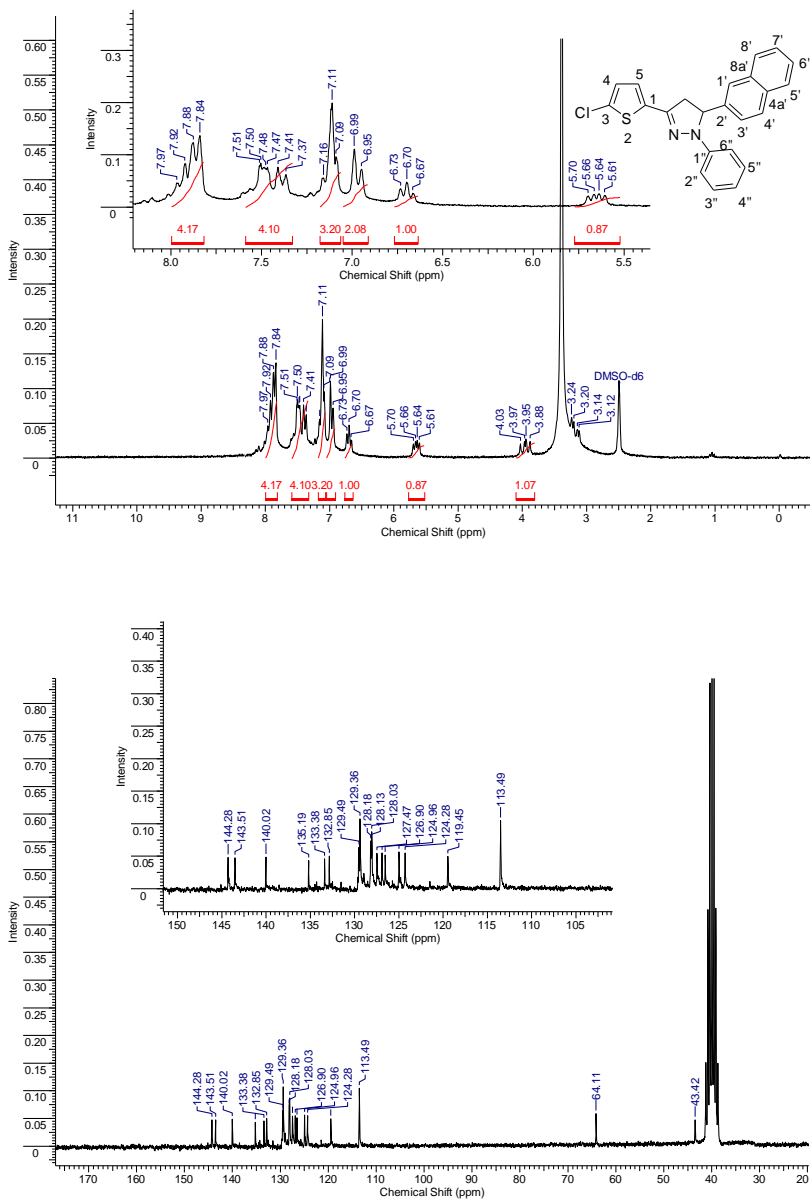


Figura 83. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto **8e**.

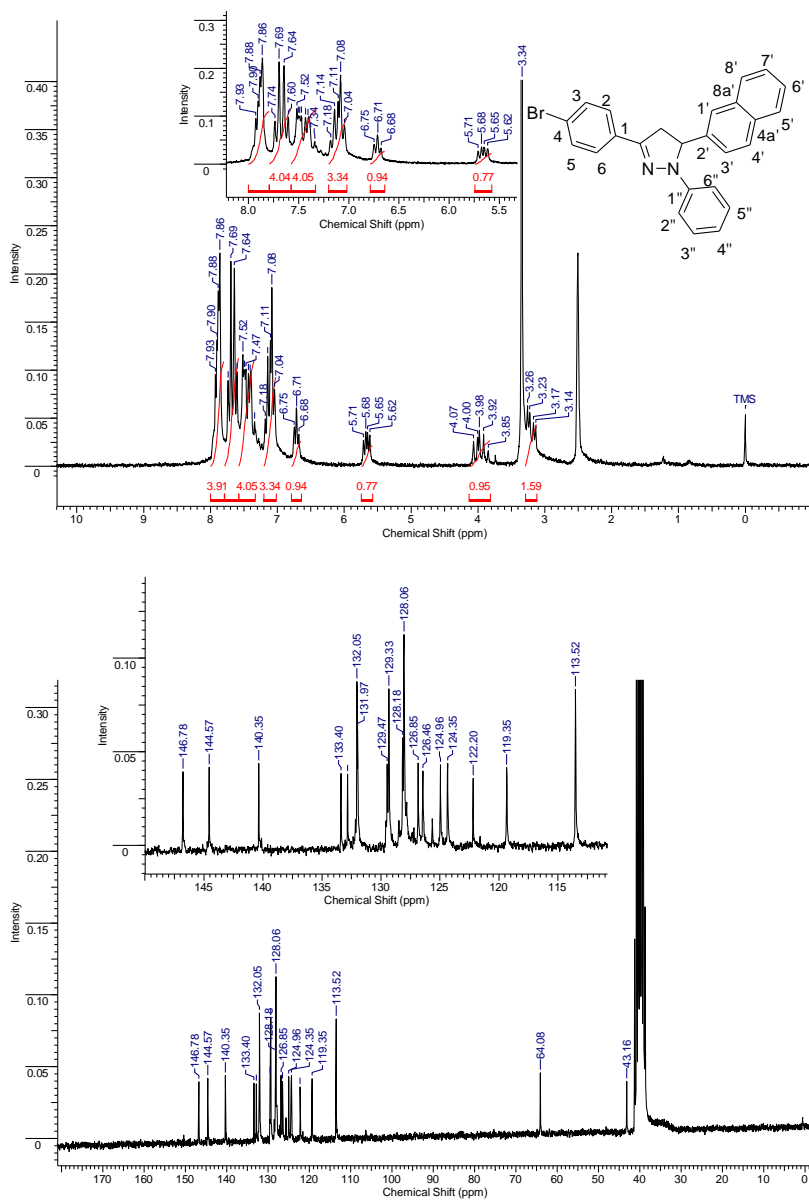


Figura 84. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto **8f**.

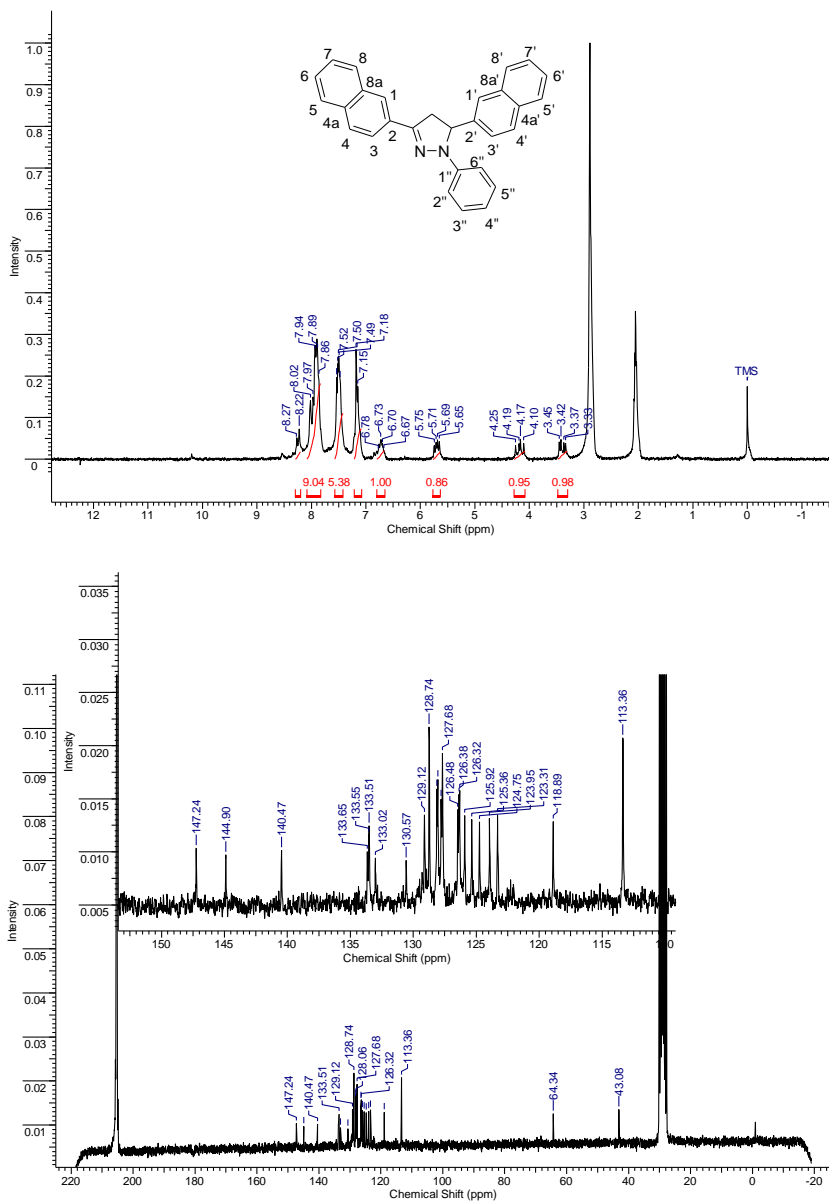


Figura 85. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto **8g**.

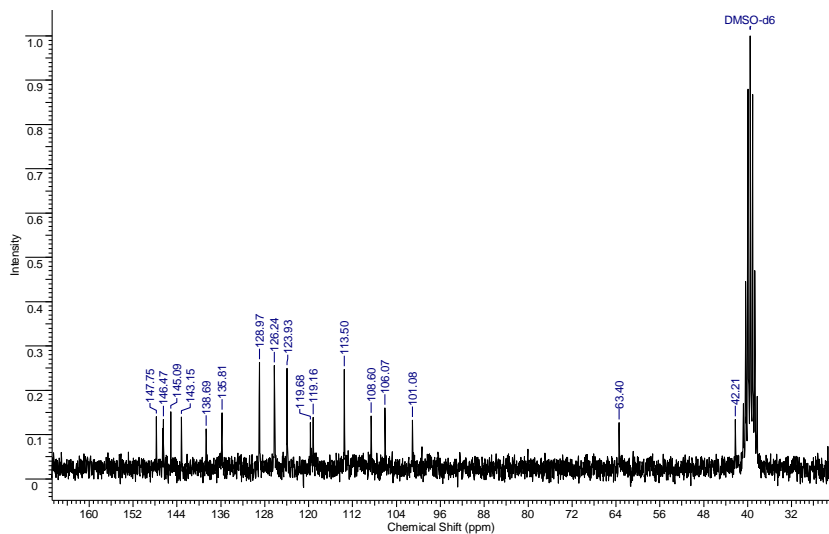
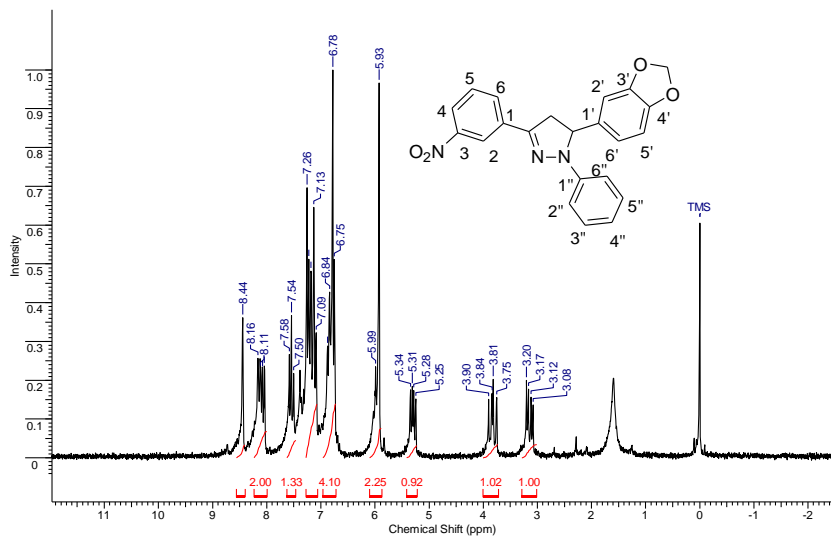


Figura 86. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto **8h**.

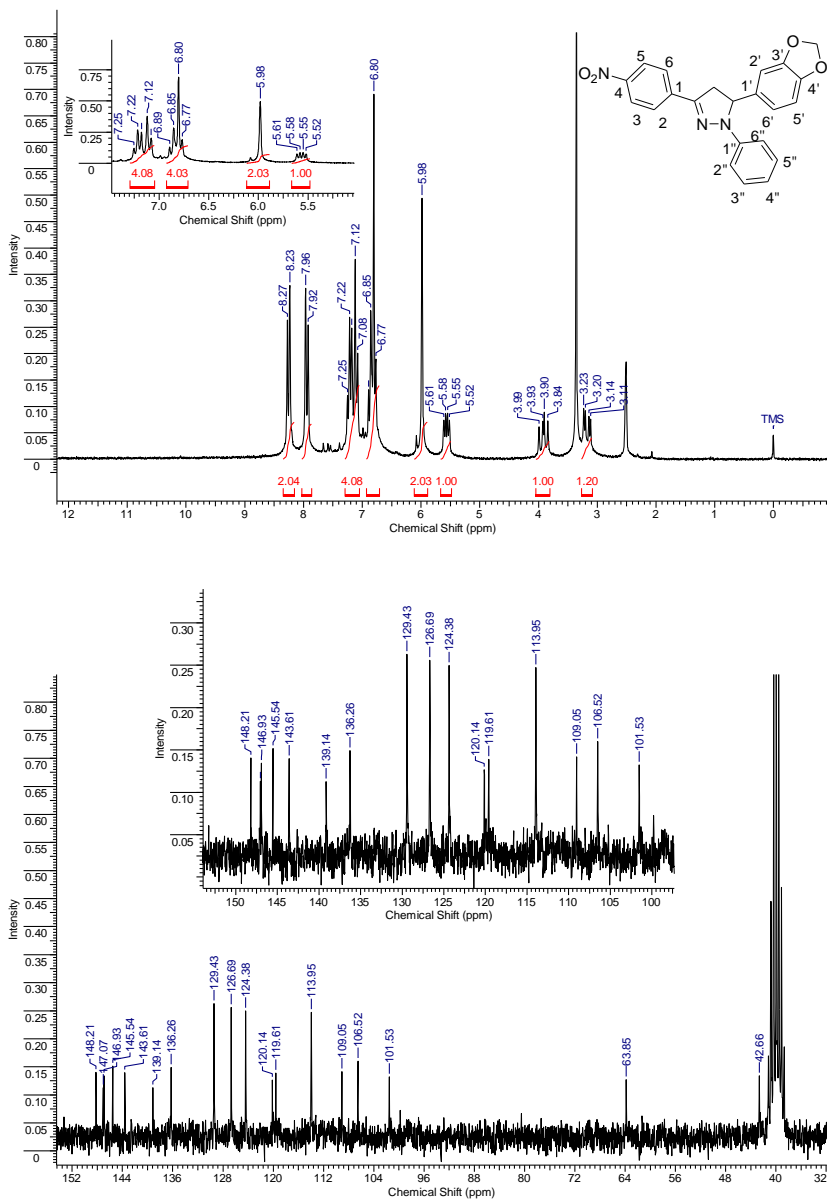


Figura 87. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto **8i**.

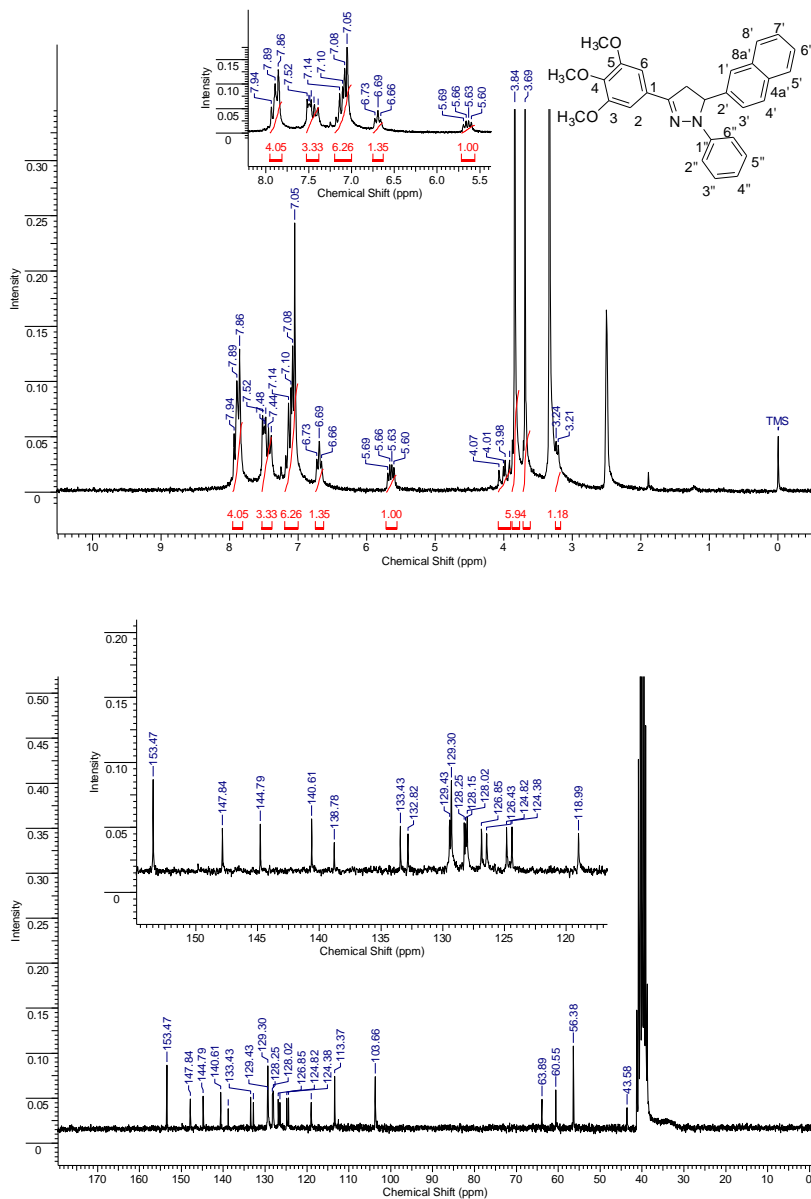


Figura 88. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto **8j**.

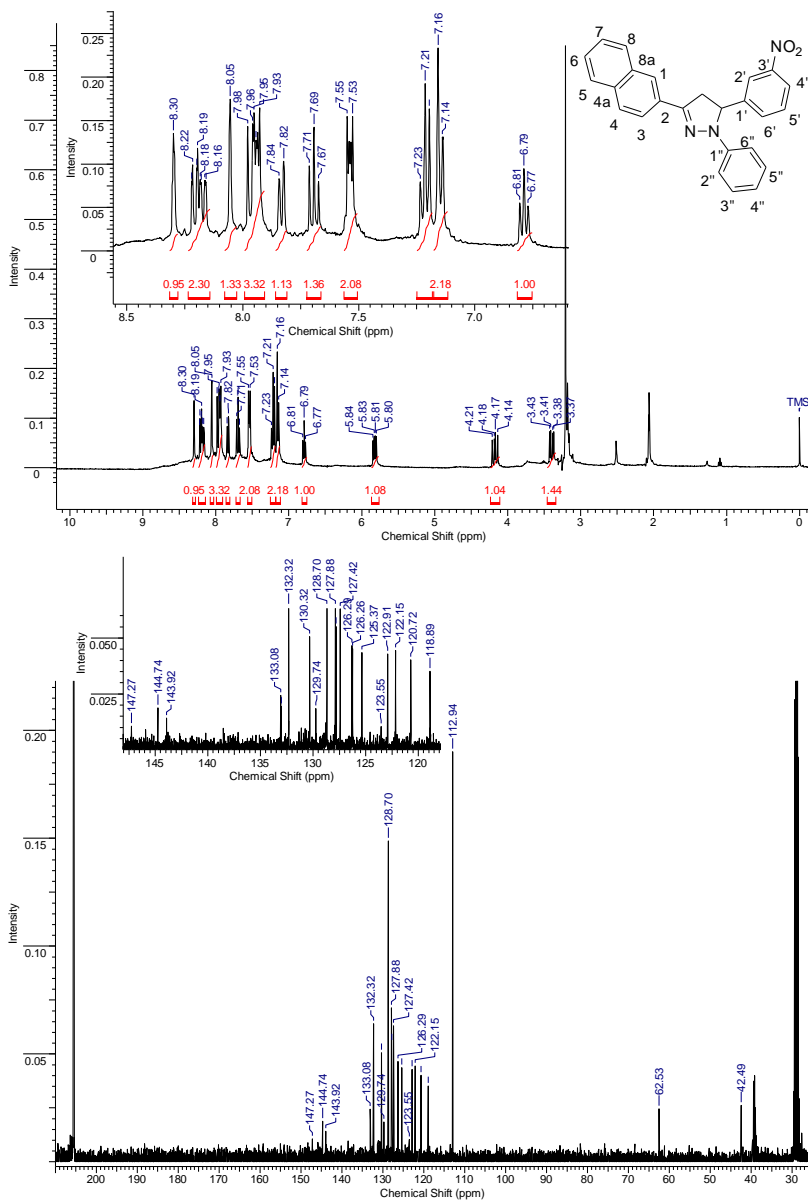


Figura 89. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto **8k**.

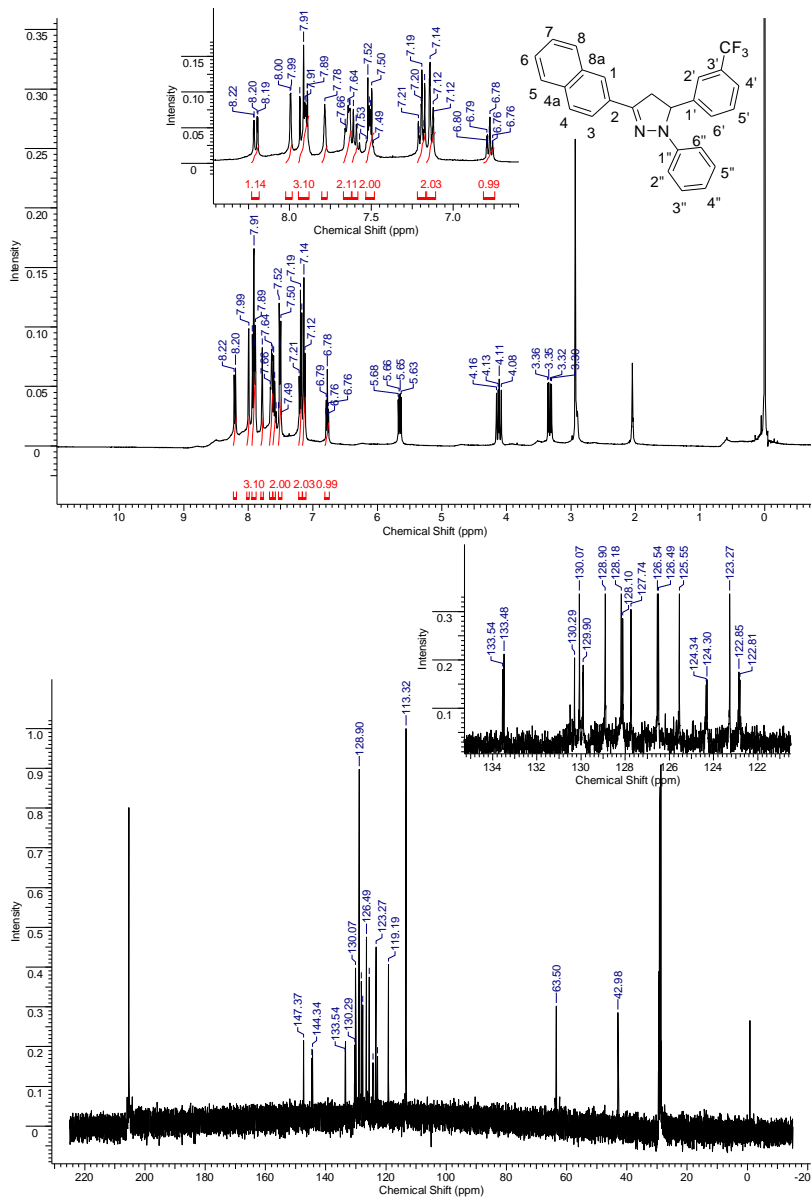


Figura 90. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto **8l**.

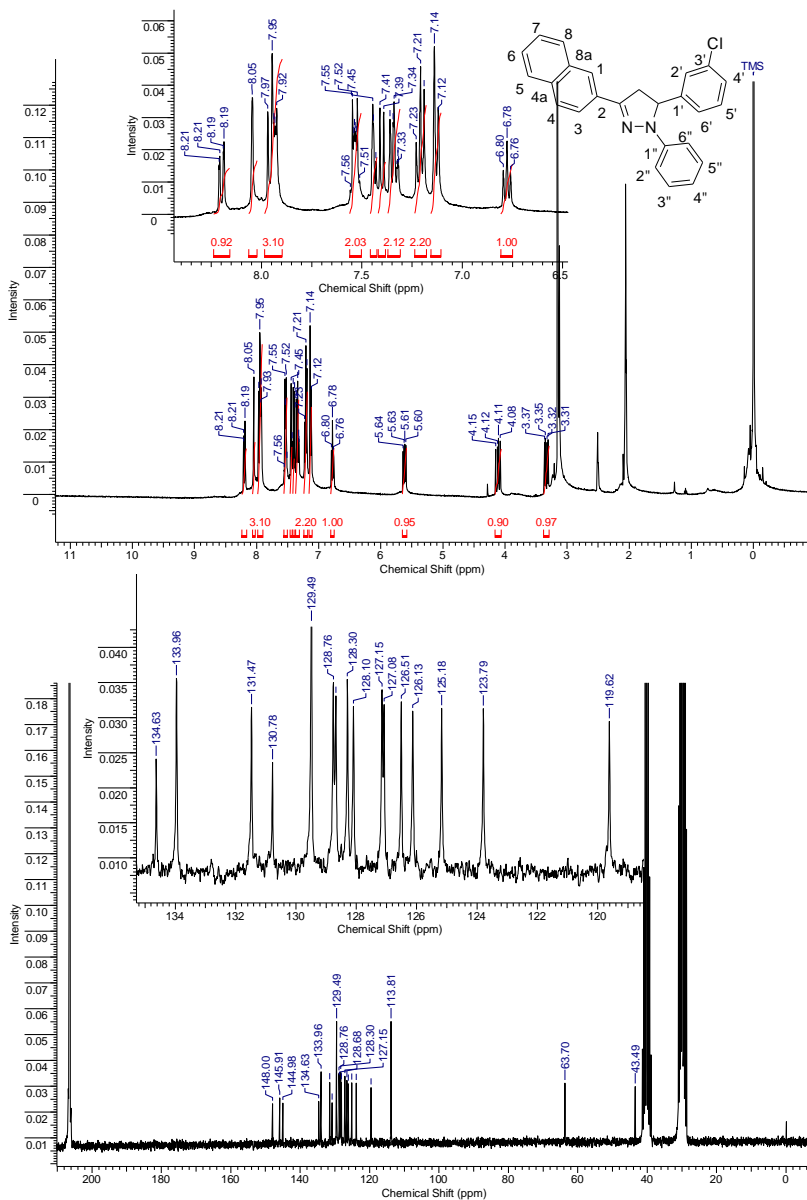


Figura 91. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto **8m**.

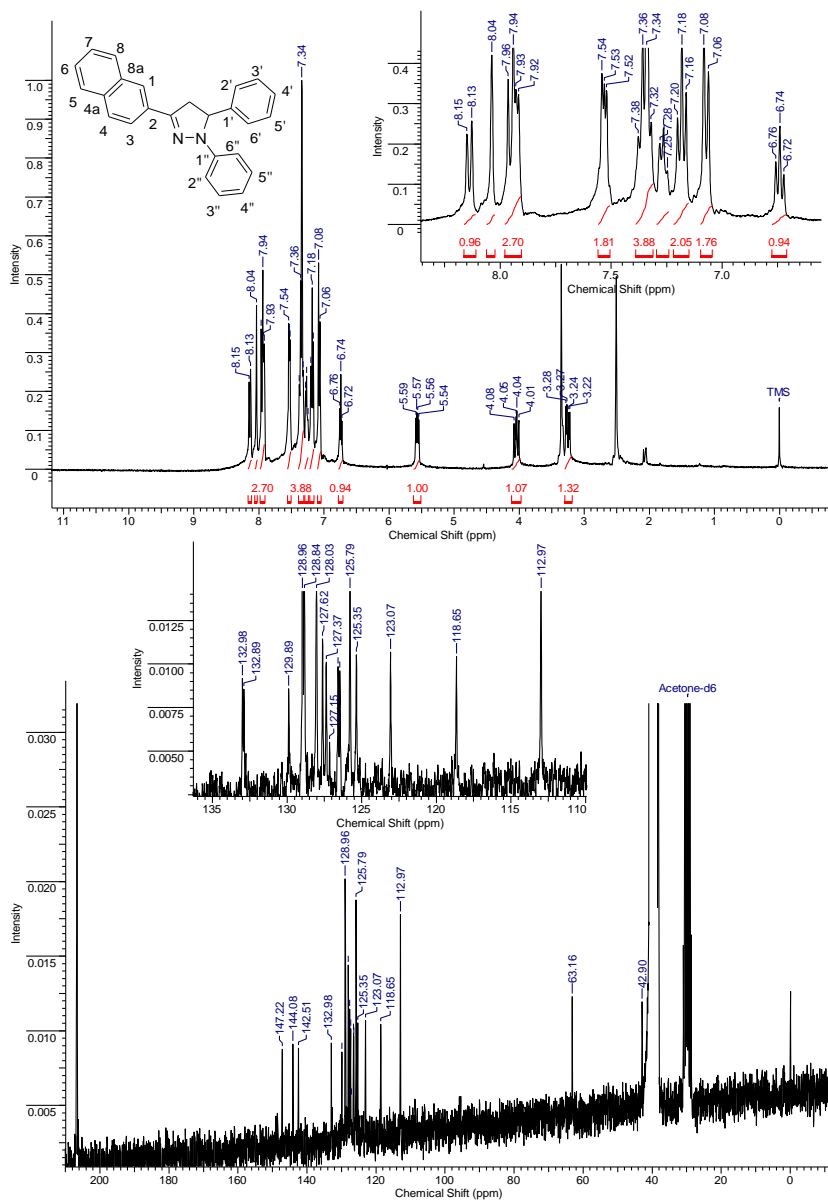


Figura 92. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto **8n**.

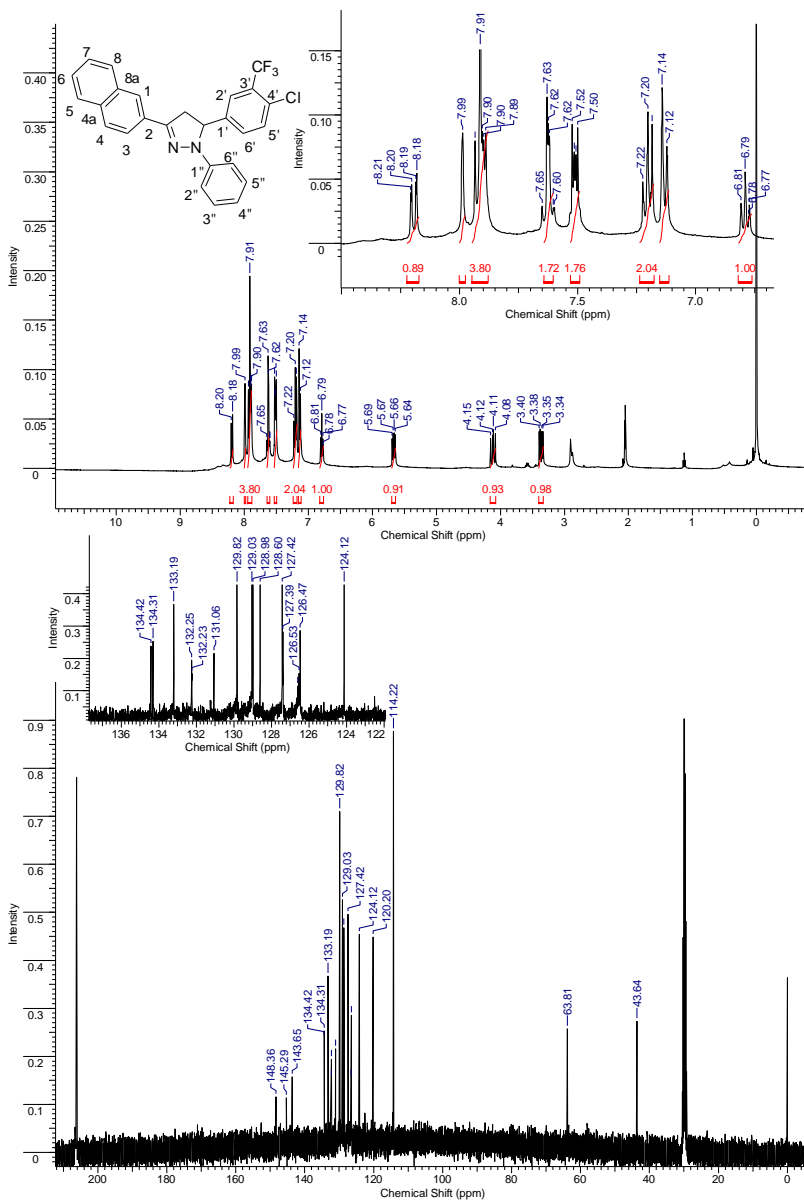


Figura 93. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto **80**.

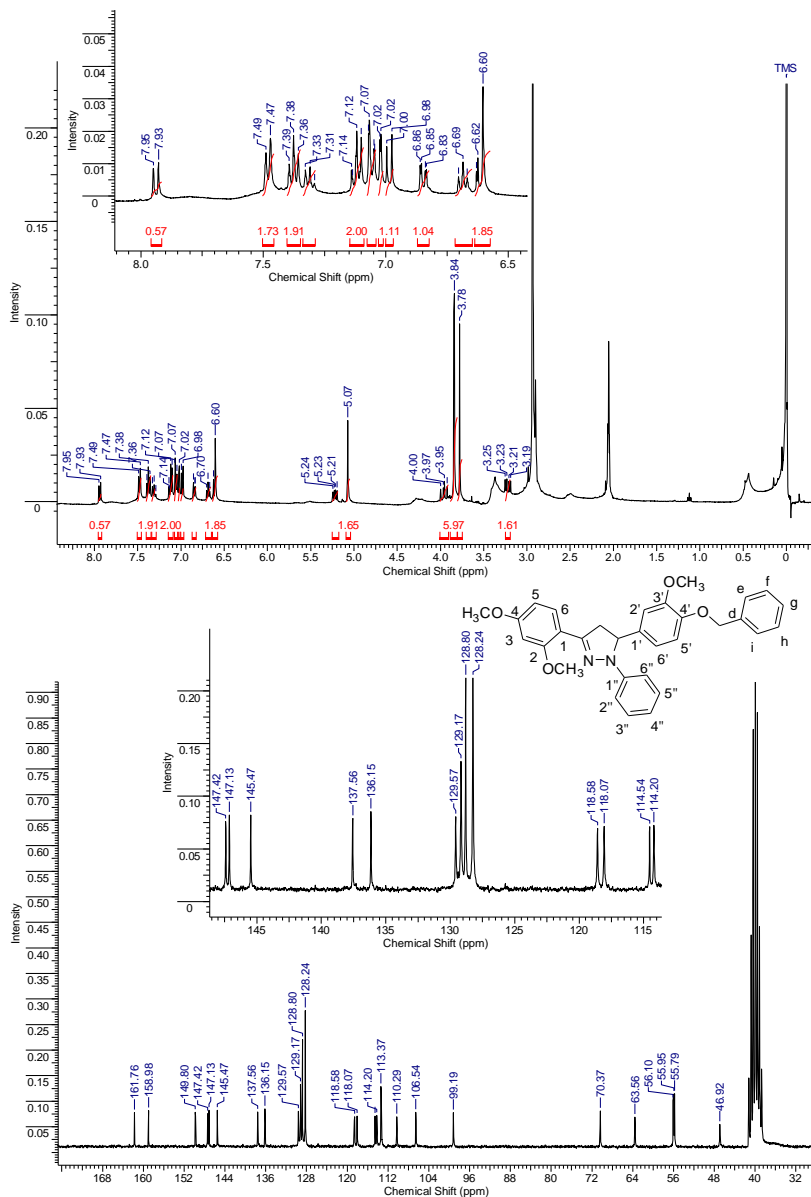


Figura 94. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto **8p**.

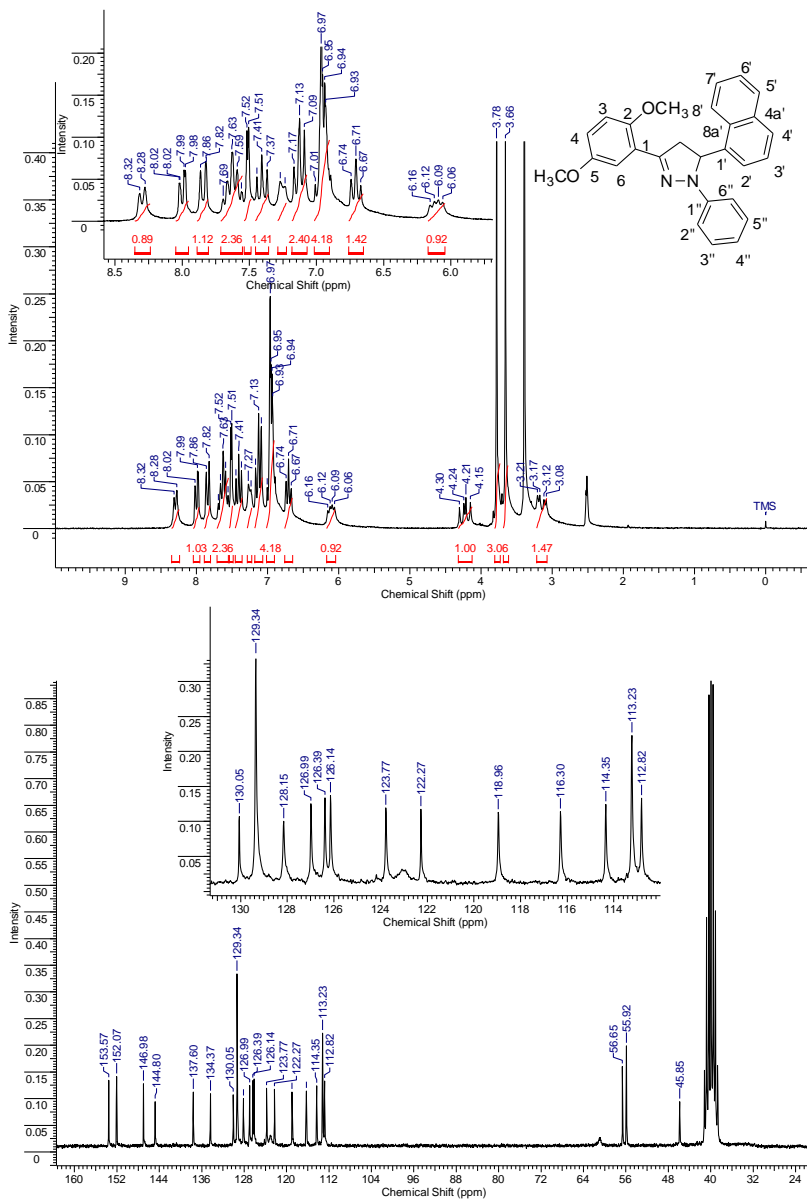


Figura 96. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto **8r**.

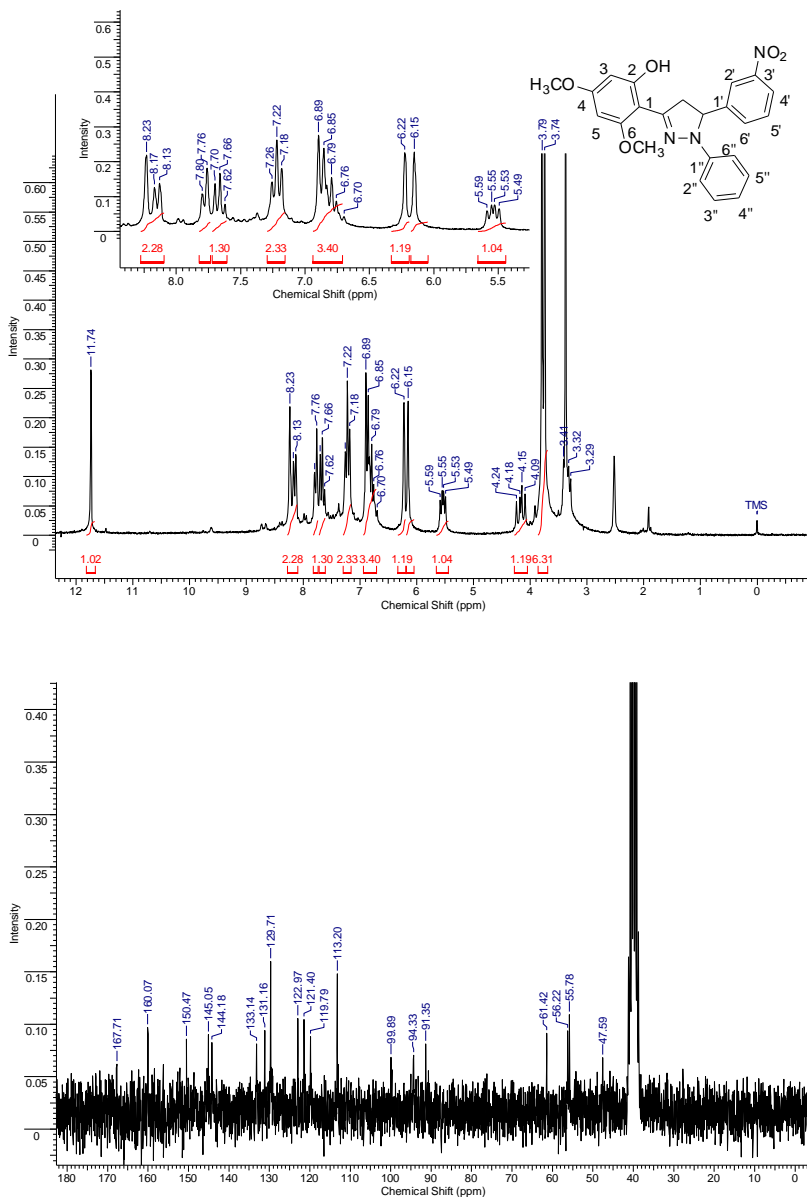


Figura 97. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto **8s**.

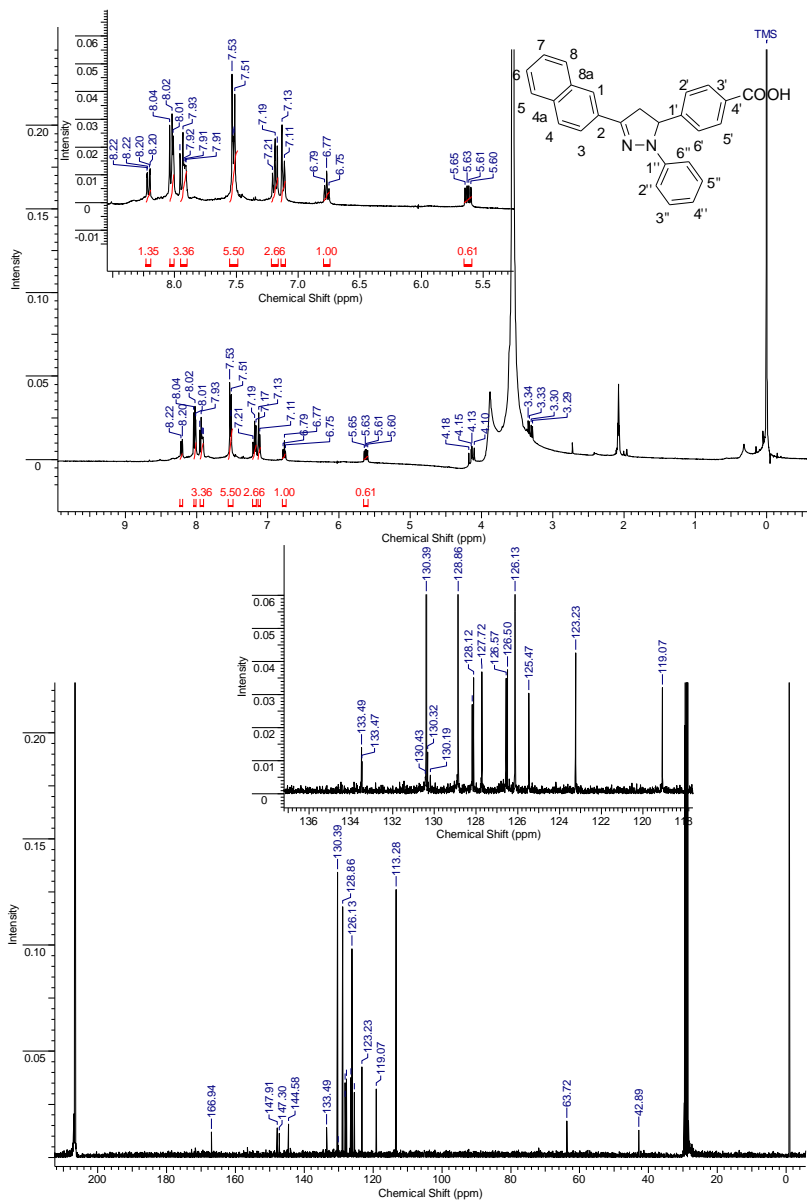


Figura 98. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto **8t**.

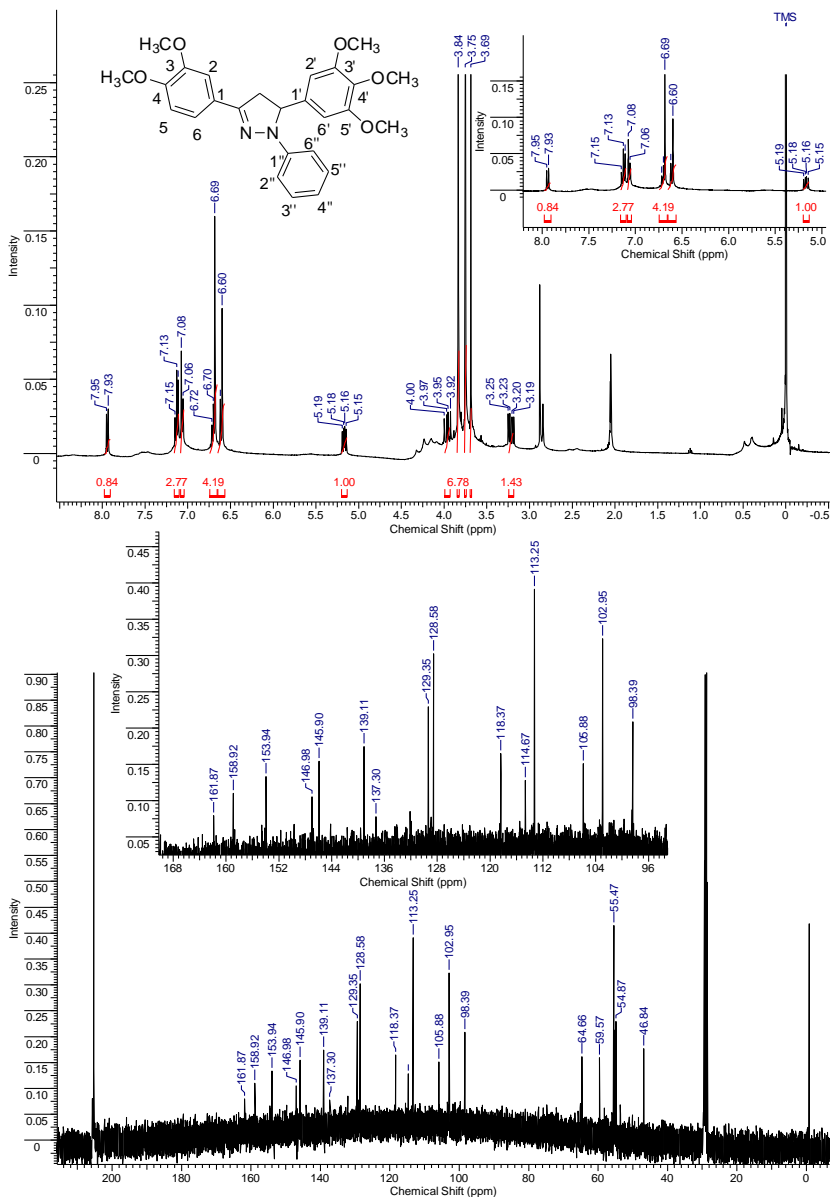


Figura 99. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto **8u**.

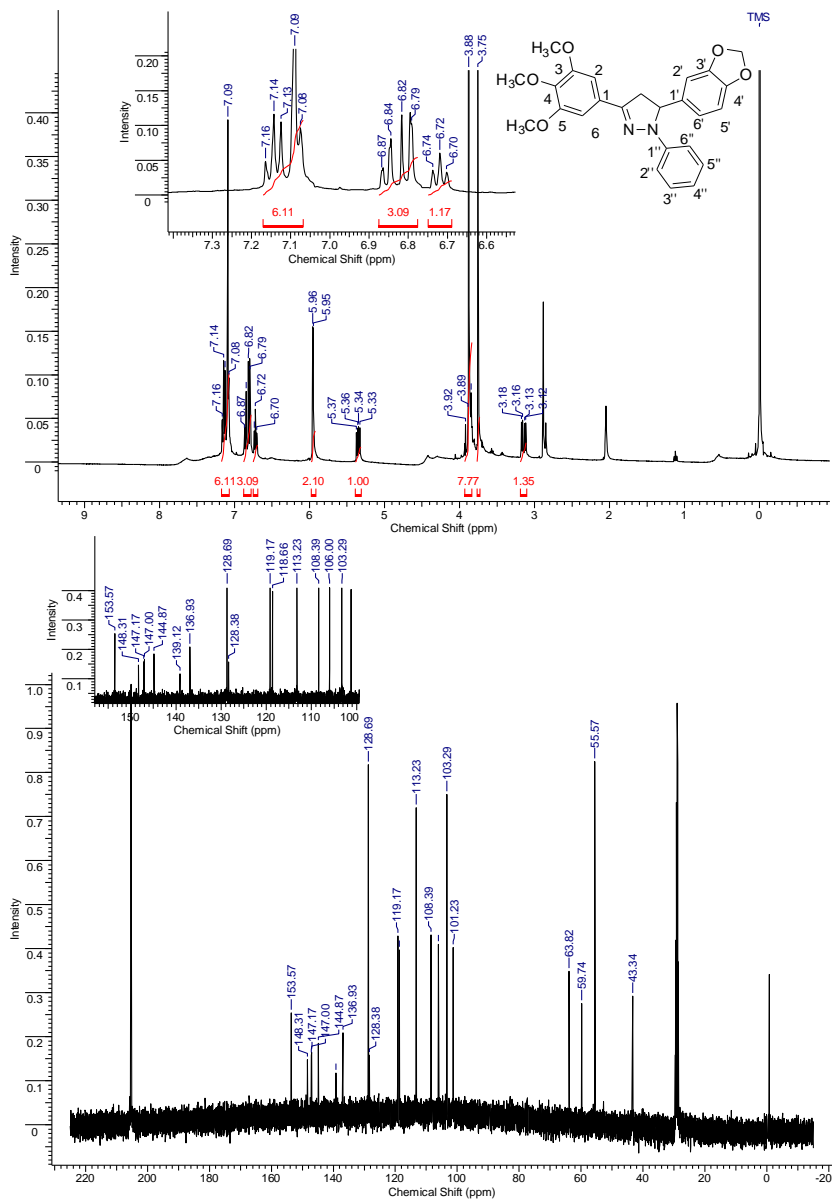


Figura 100. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto **8v**.

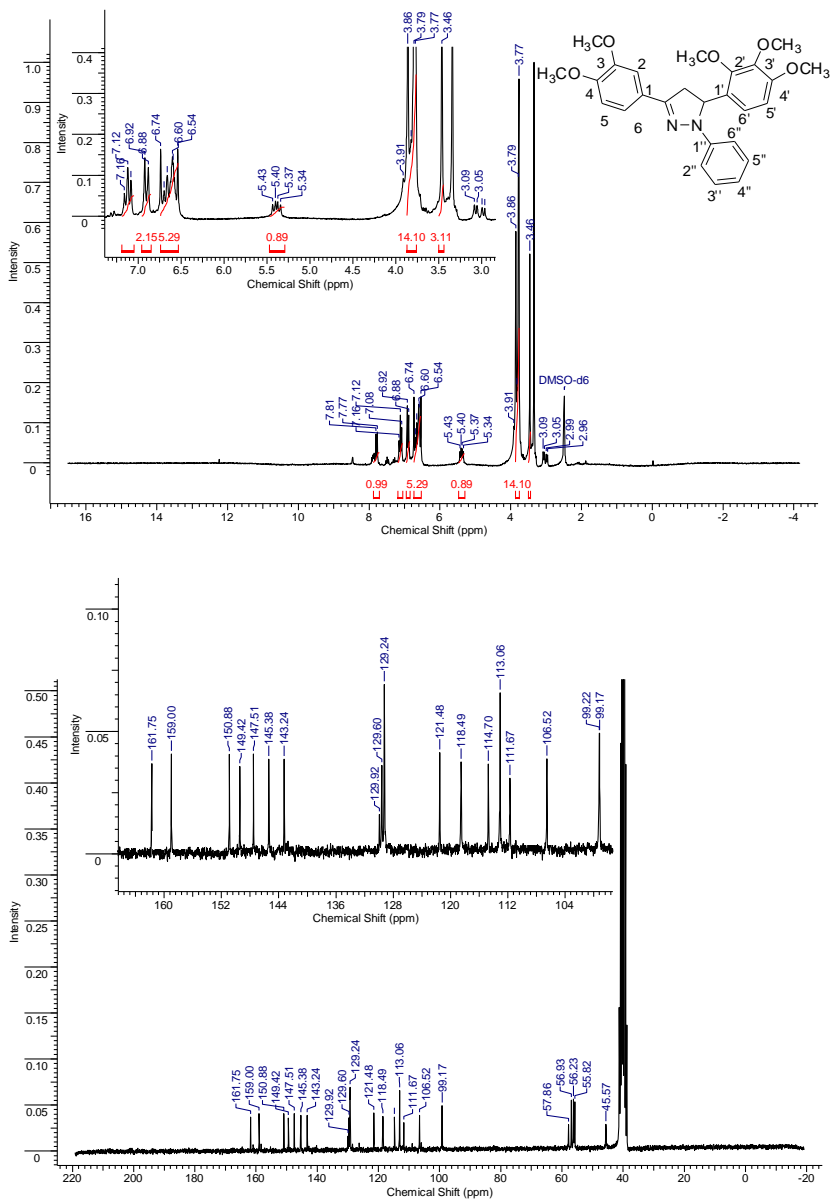


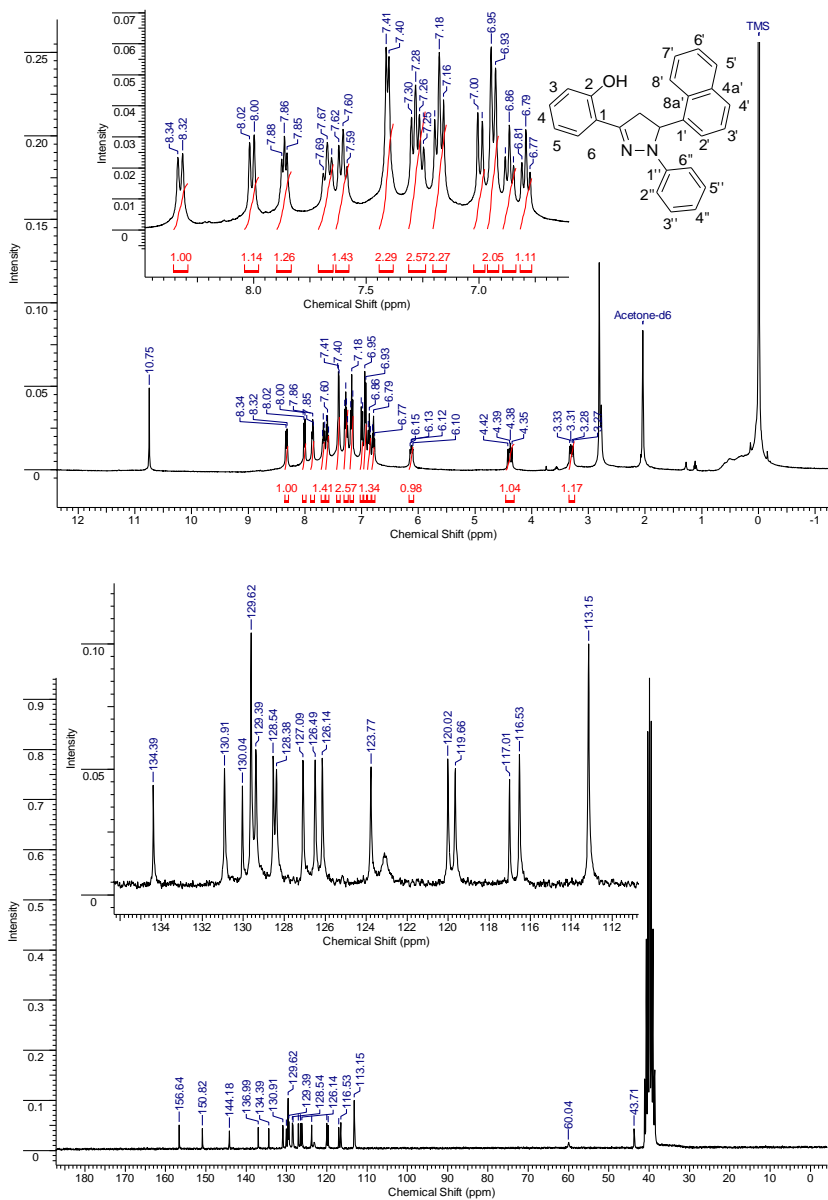
Figura 101. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto **8w**.

Figura 102. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto **8x**.

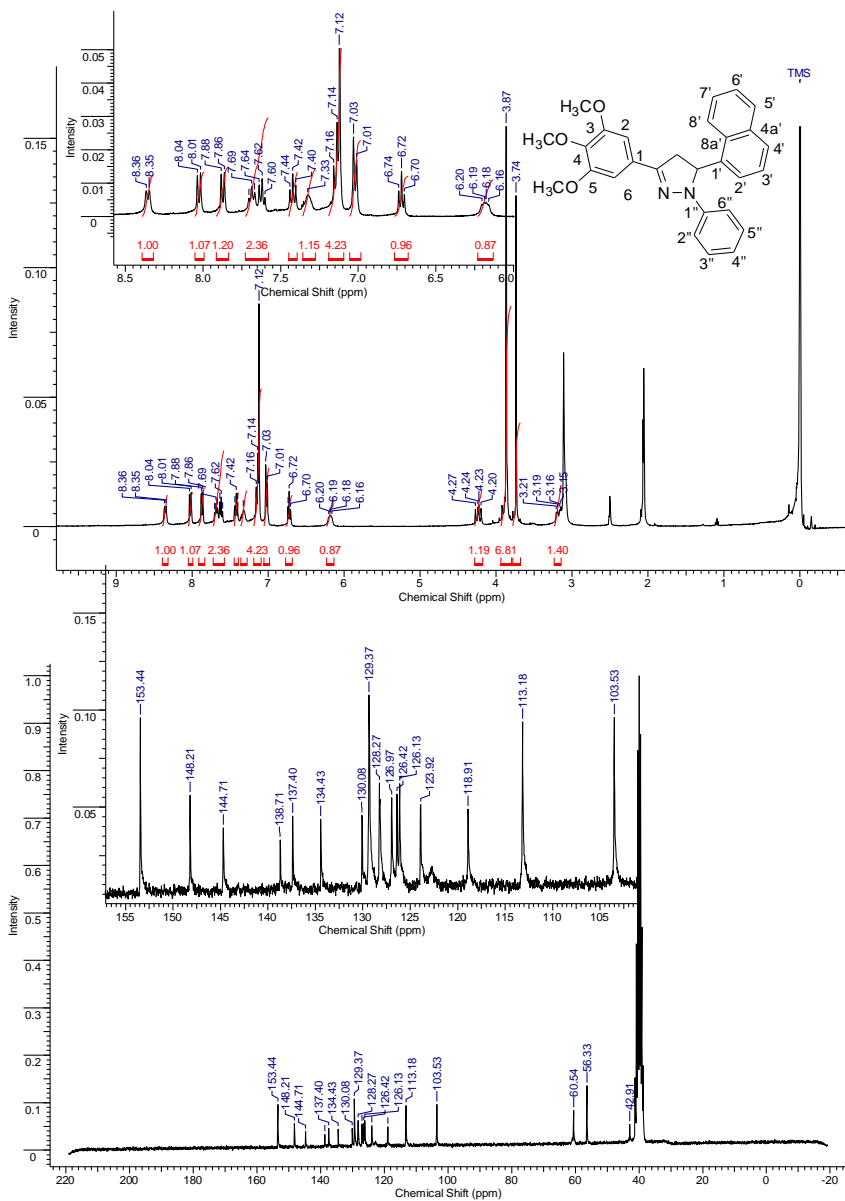


Figura 103. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto **9a**.

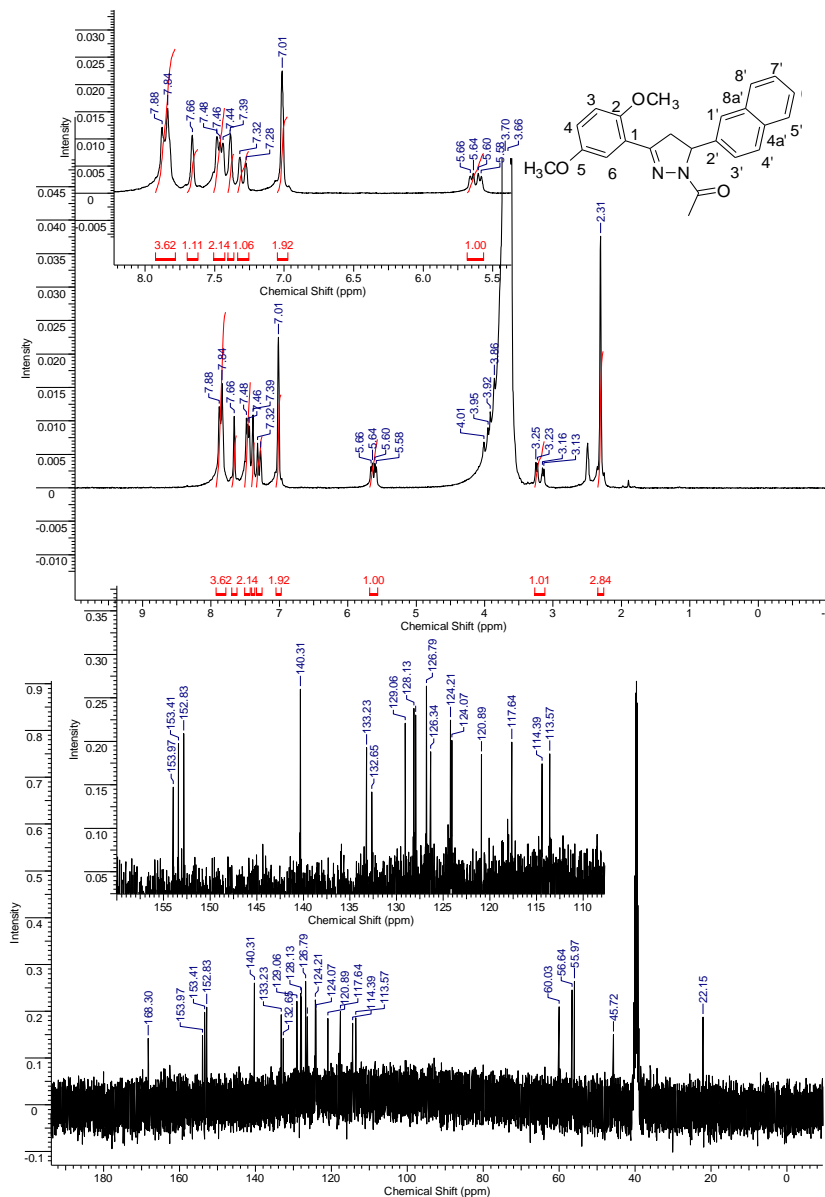


Figura 104. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto **9b**.

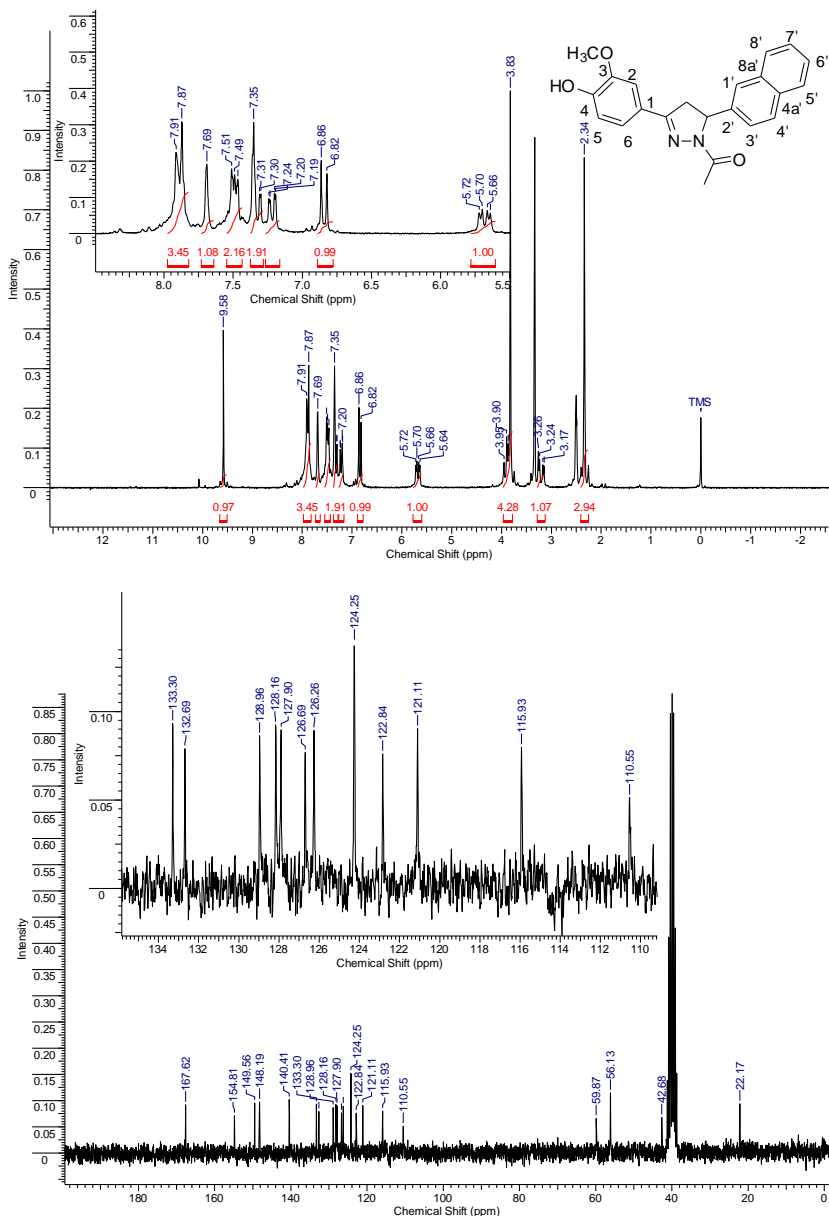


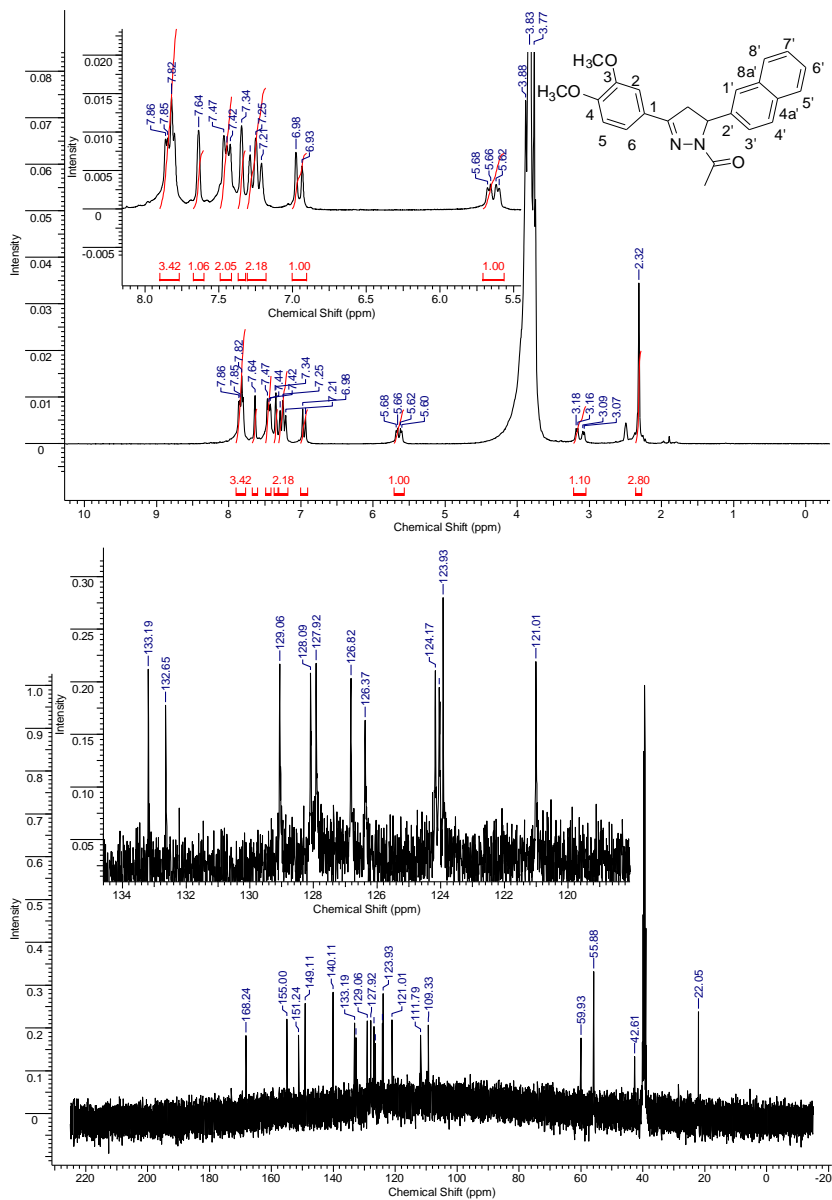
Figura 105. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto **9c**.

Figura 106. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto **9d**.

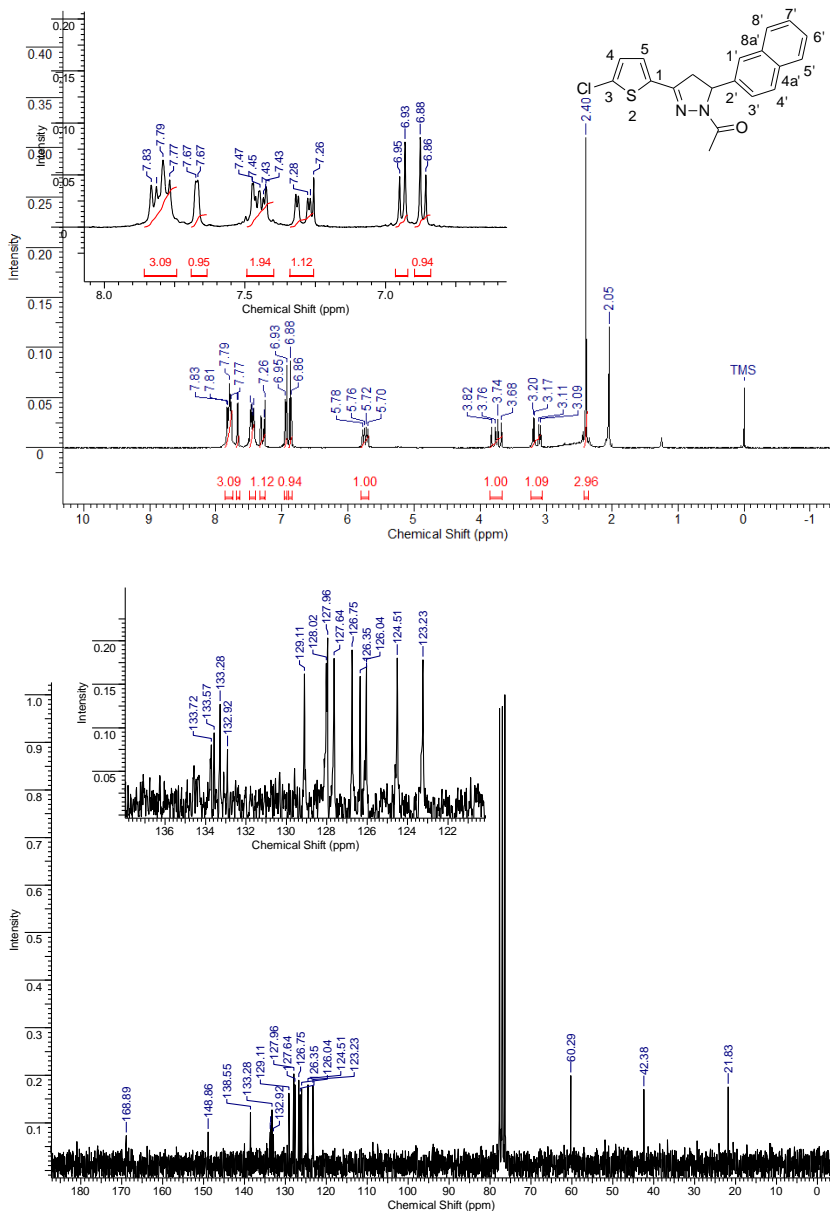


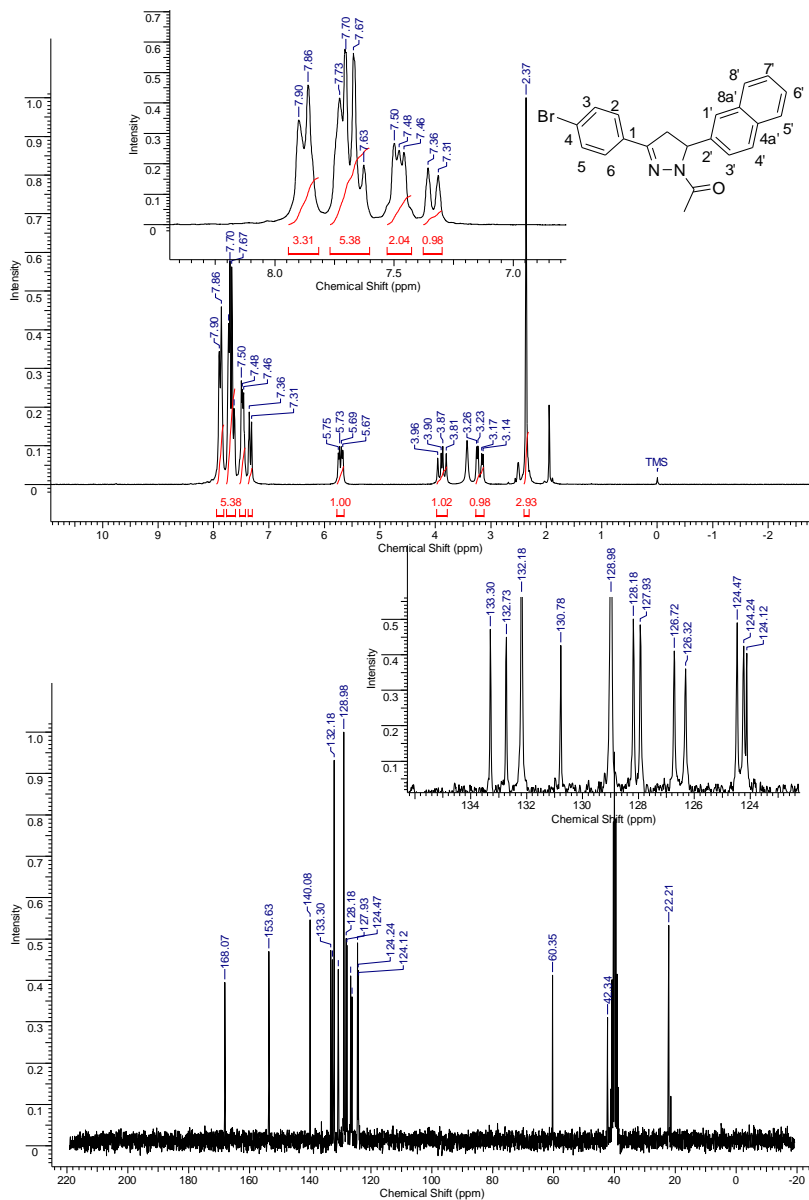
Figura 107. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto **9e**.

Figura 108. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto **9f**.

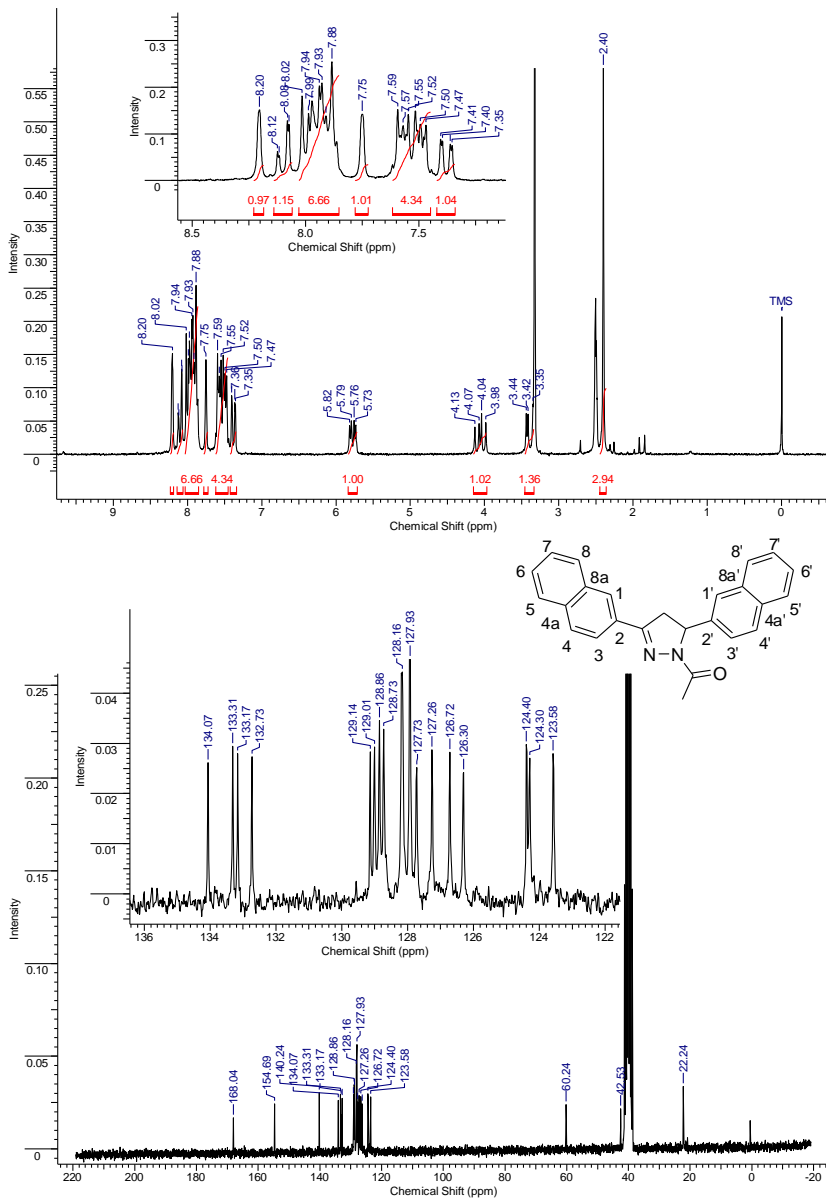


Figura 109. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto **9g**.

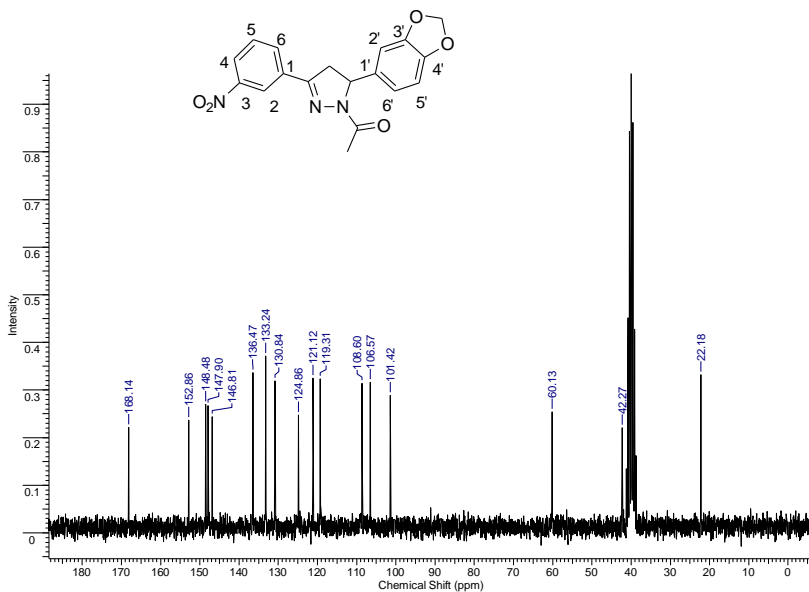
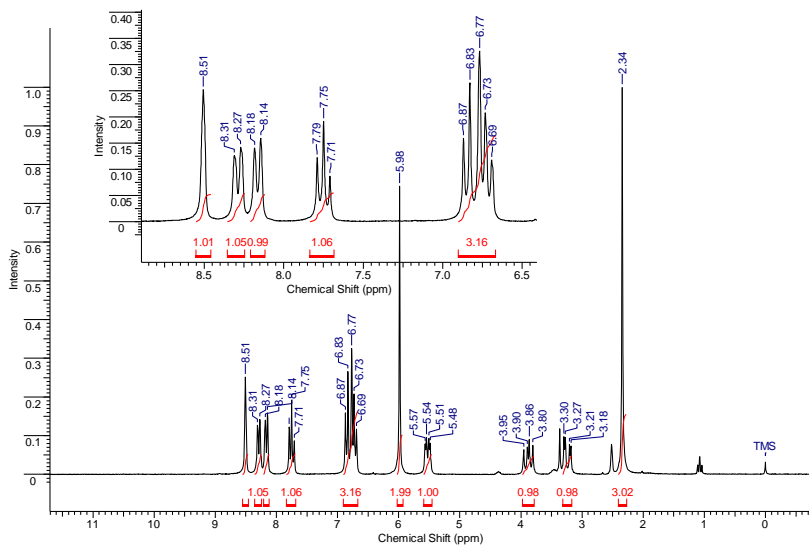


Figura 110. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto **9h**.

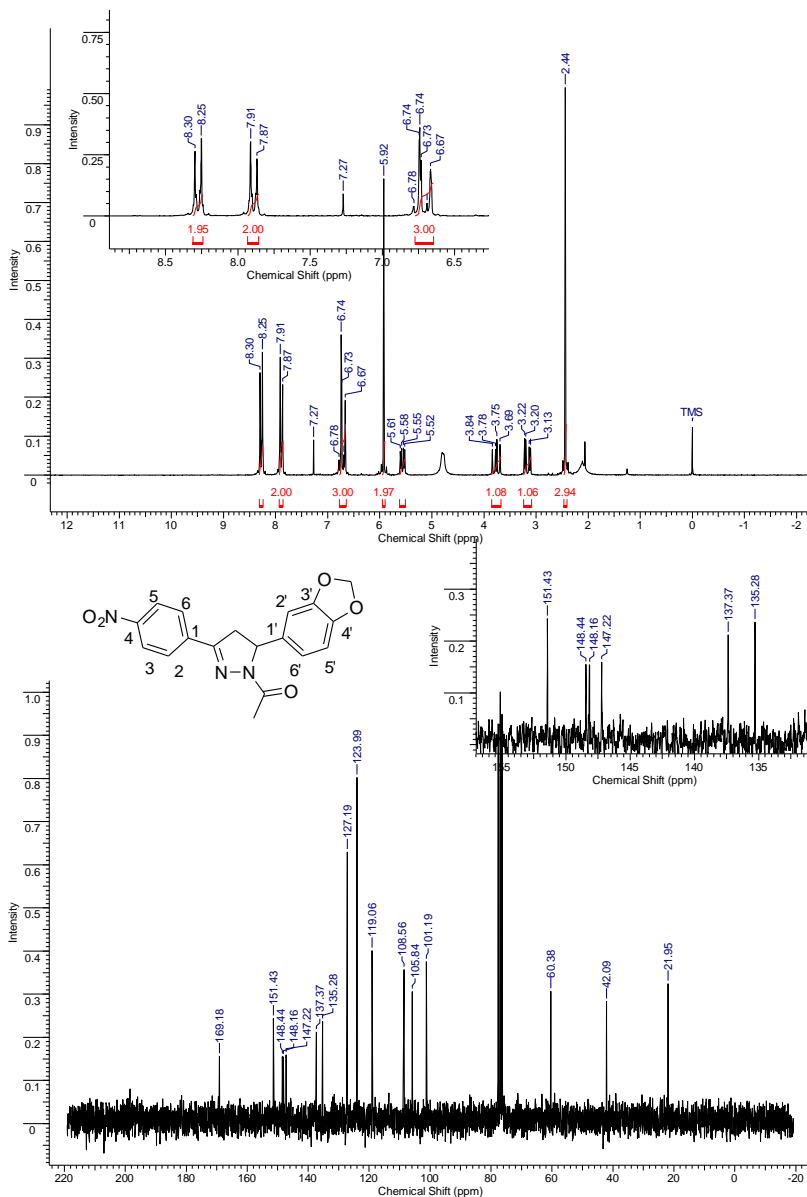


Figura 111. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto **9i**.

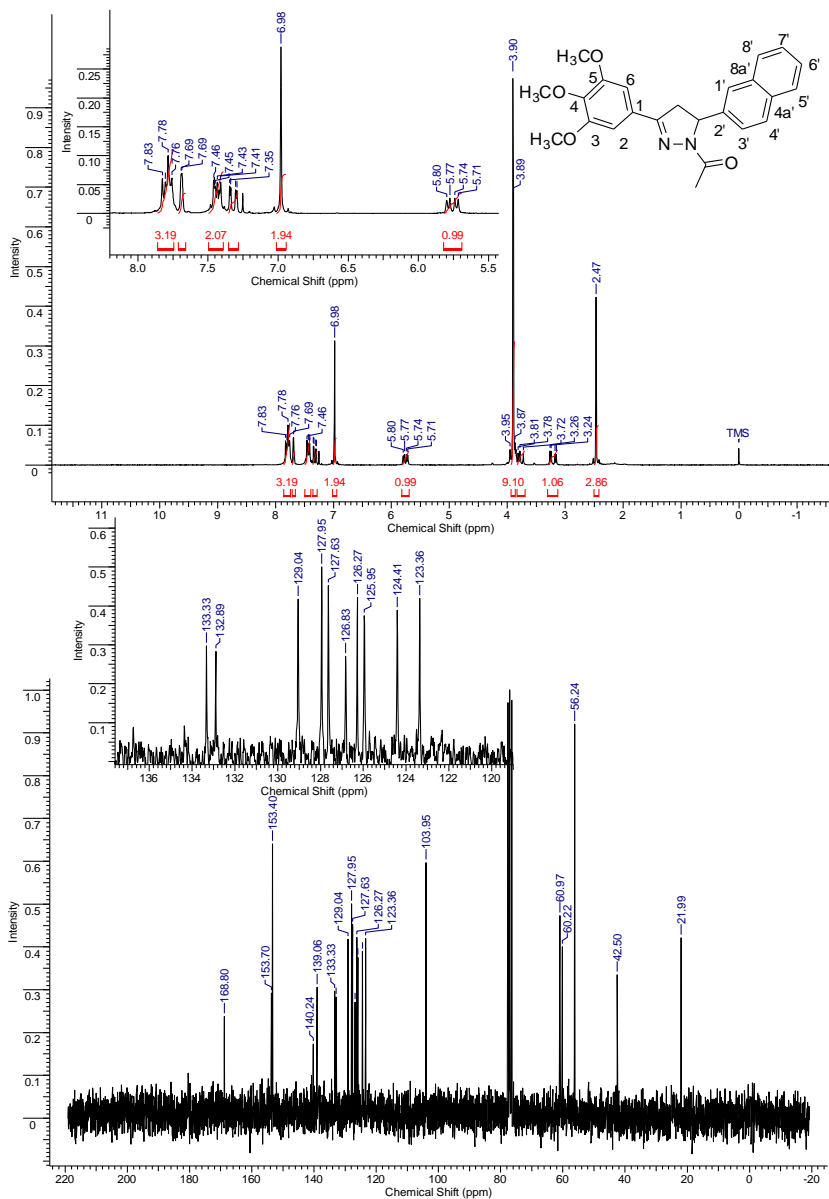


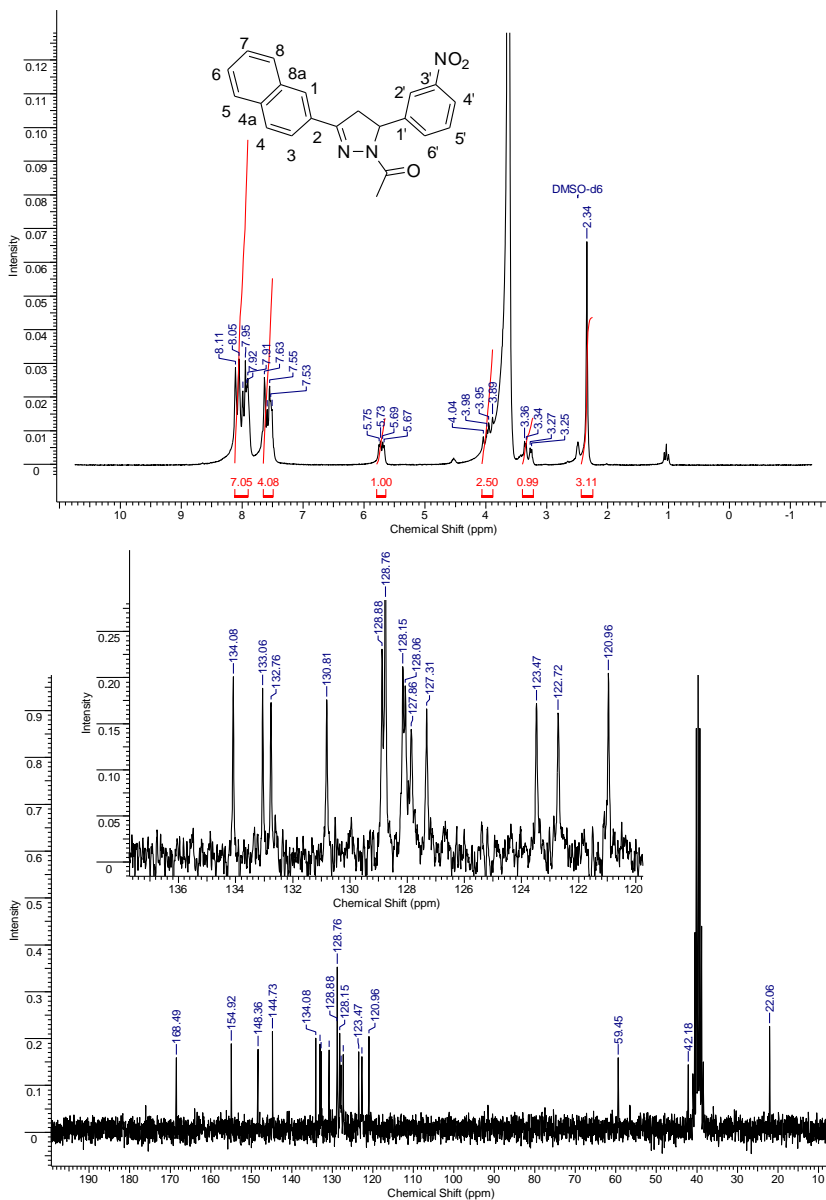
Figura 112. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto **9j**.

Figura 113. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto **9k**.

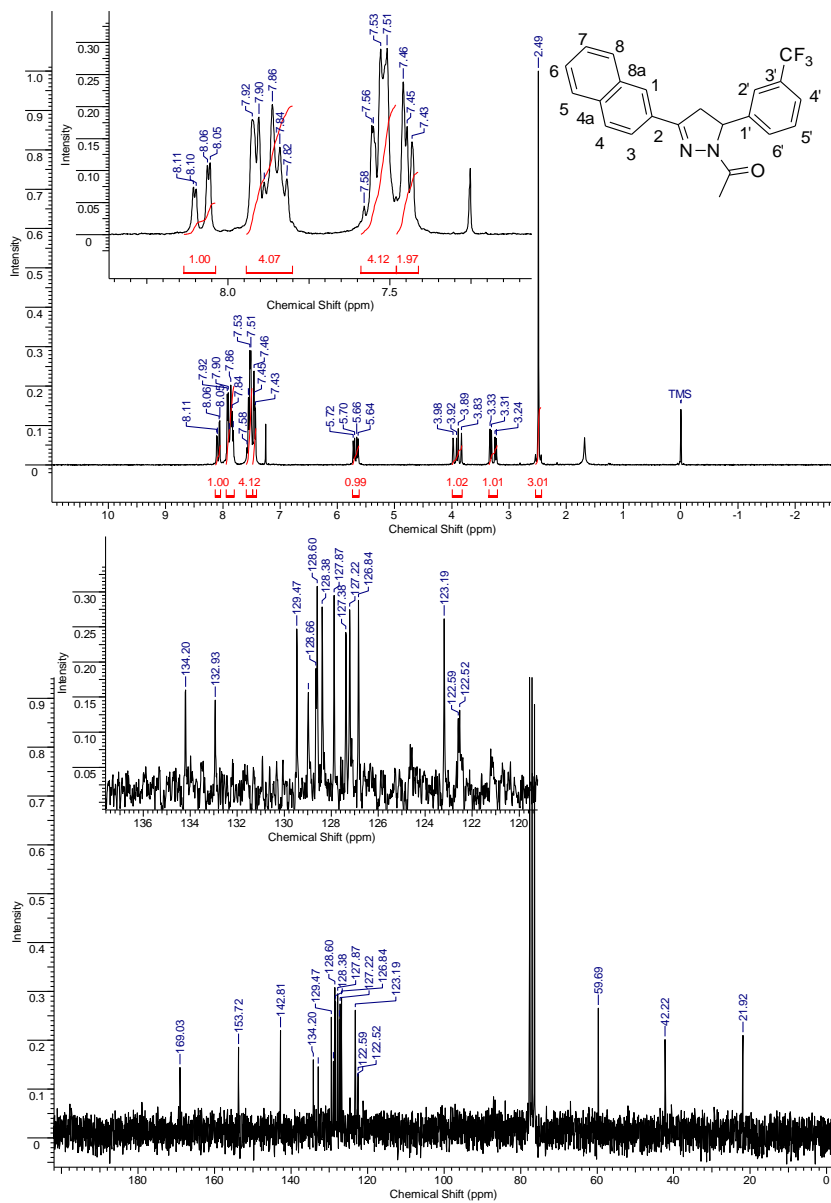


Figura 114. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto **9I**.

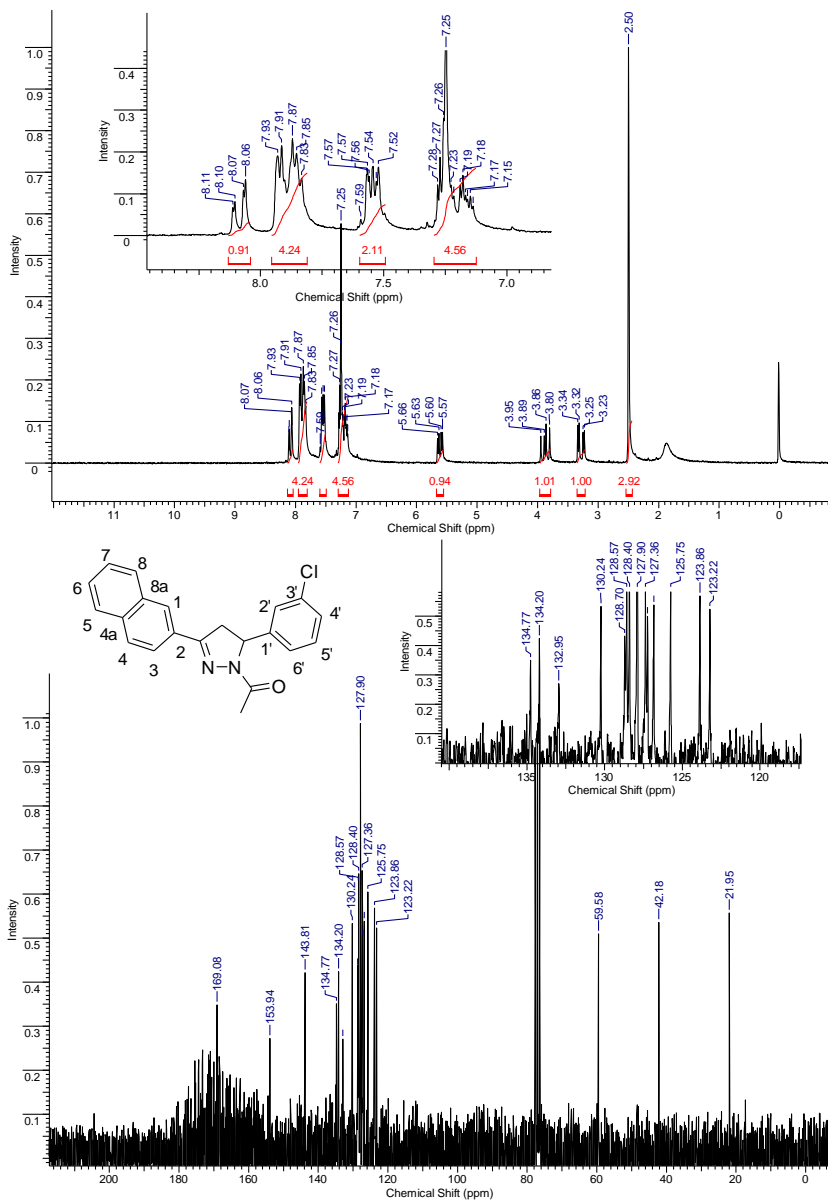


Figura 115. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto **9m**.

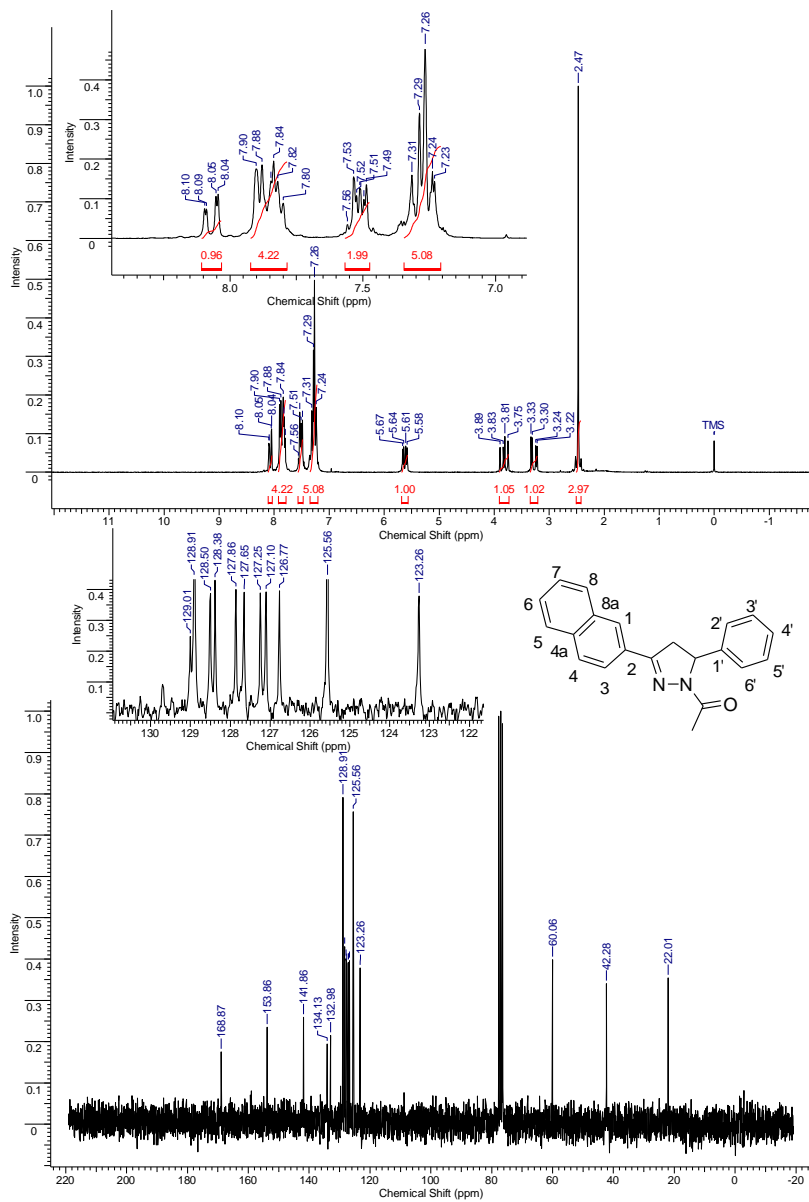


Figura 116. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto **9n**.

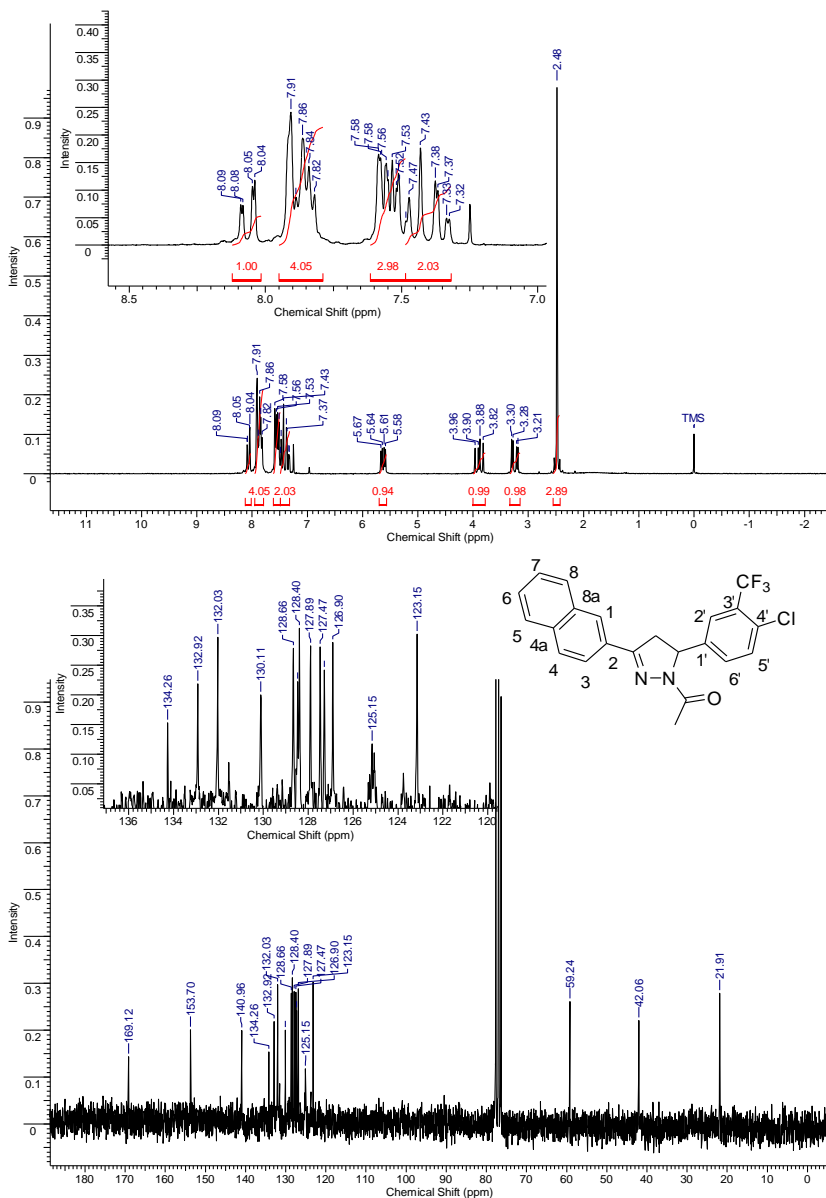


Figura 118. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto **9p**.

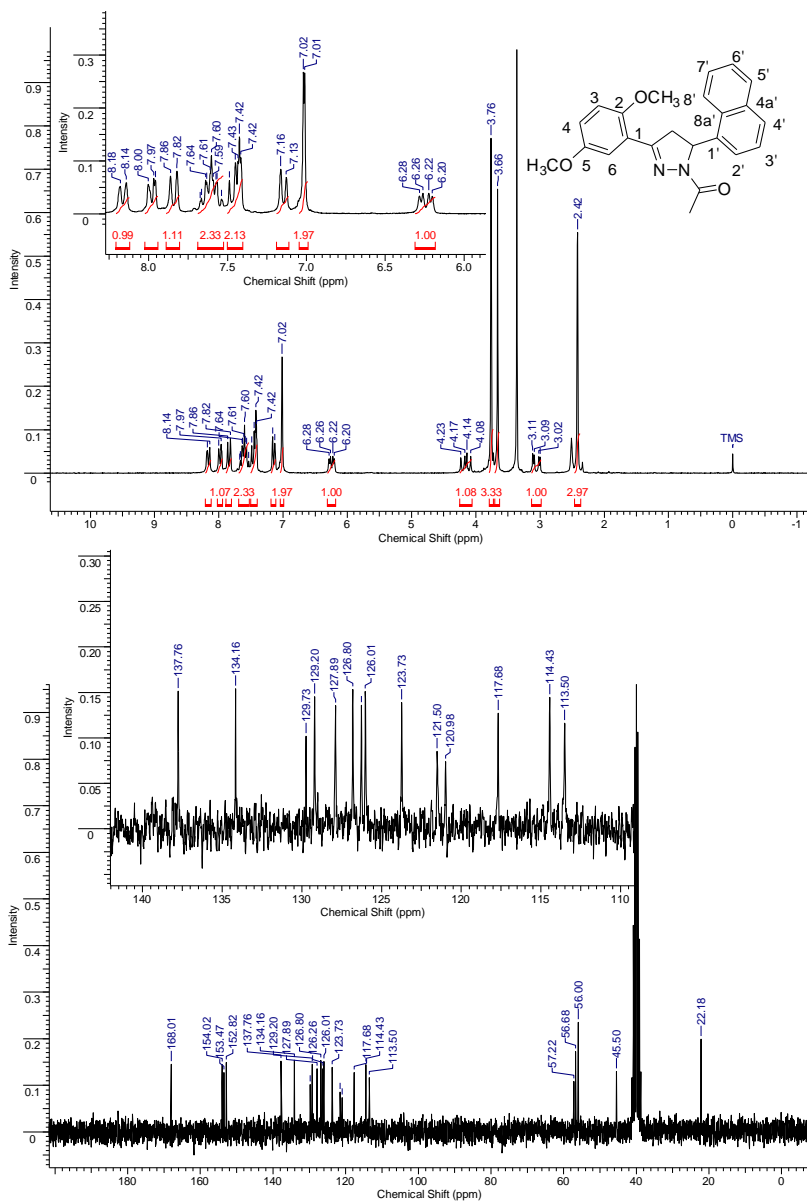


Figura 119. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto **9q**.

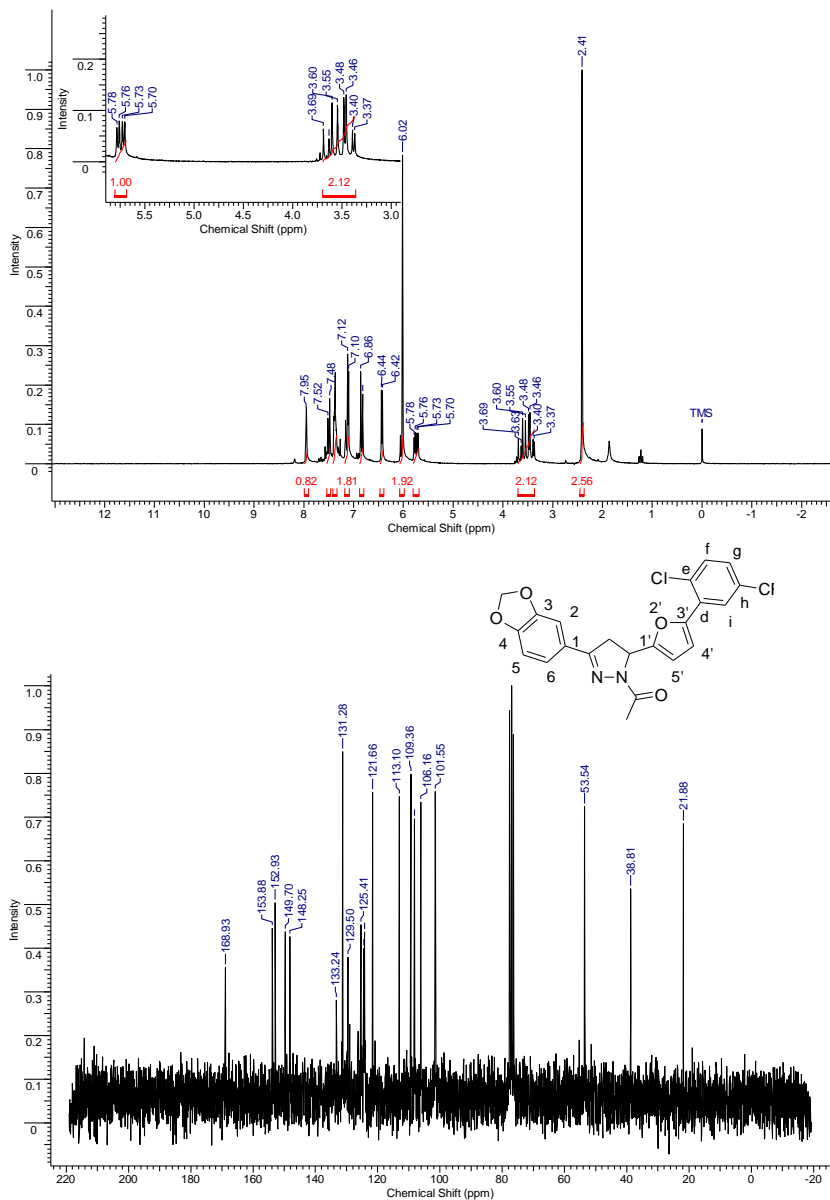


Figura 120. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto **9r**.

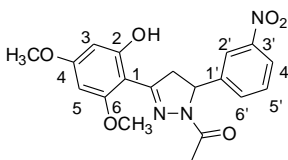
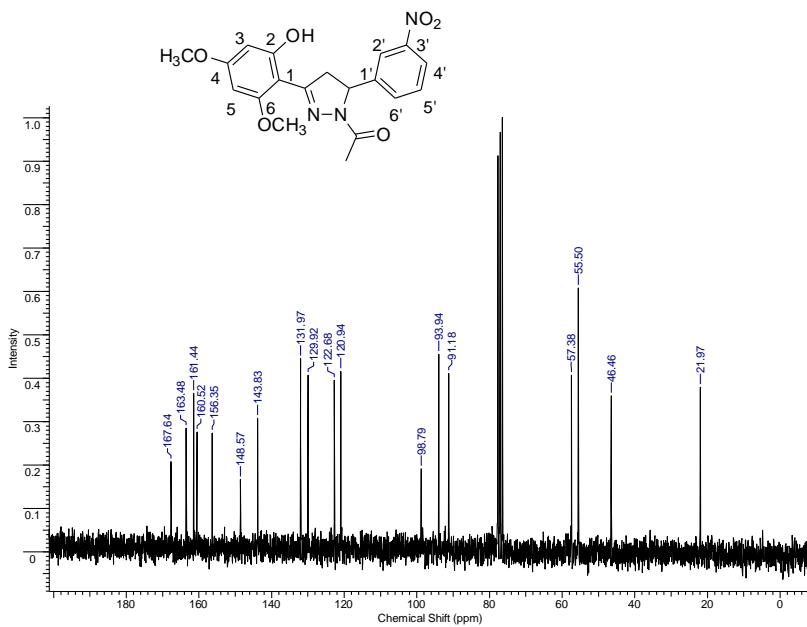
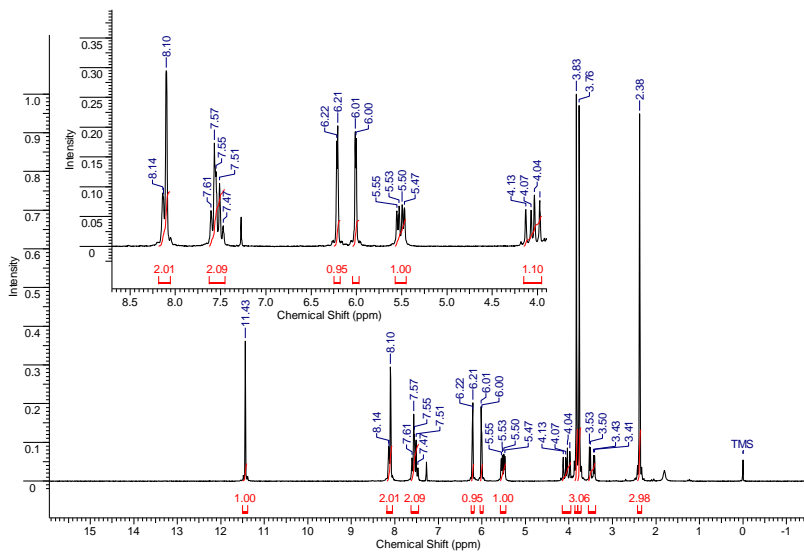


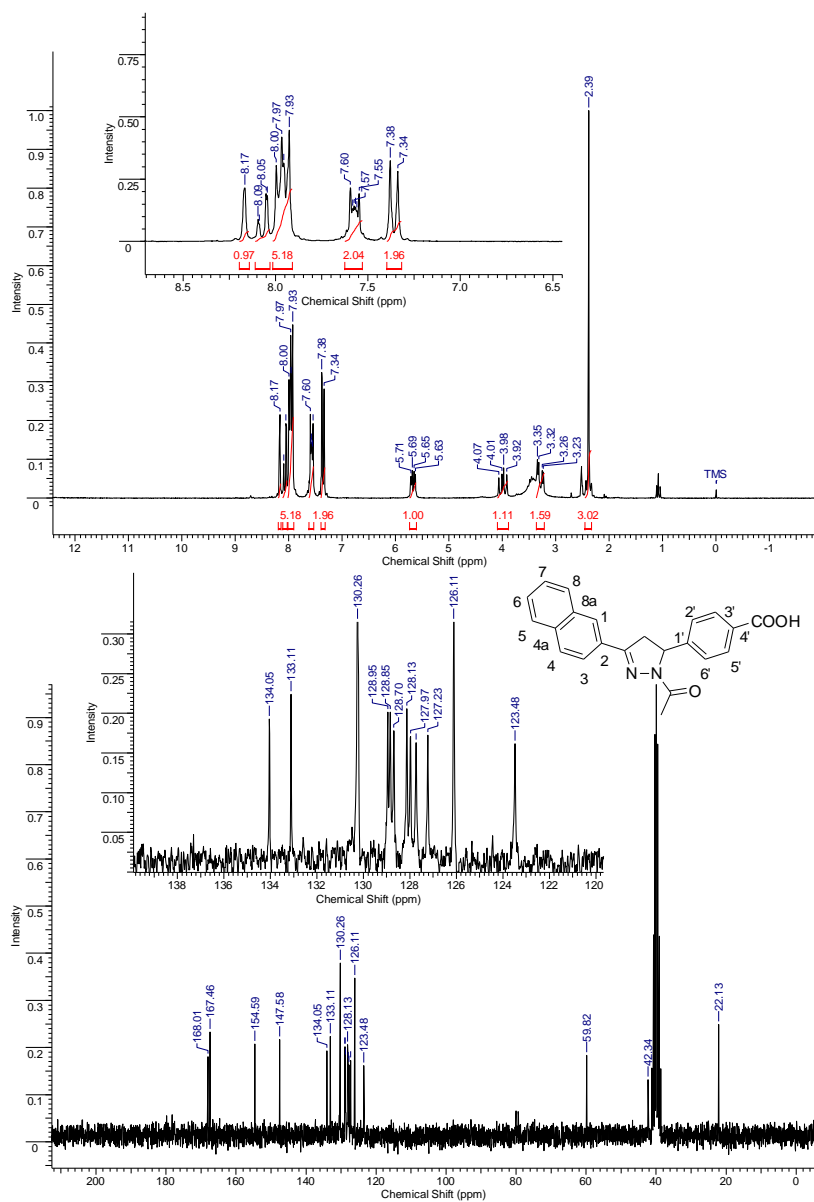
Figura 121. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto **9s**.

Figura 122. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto **9t**.

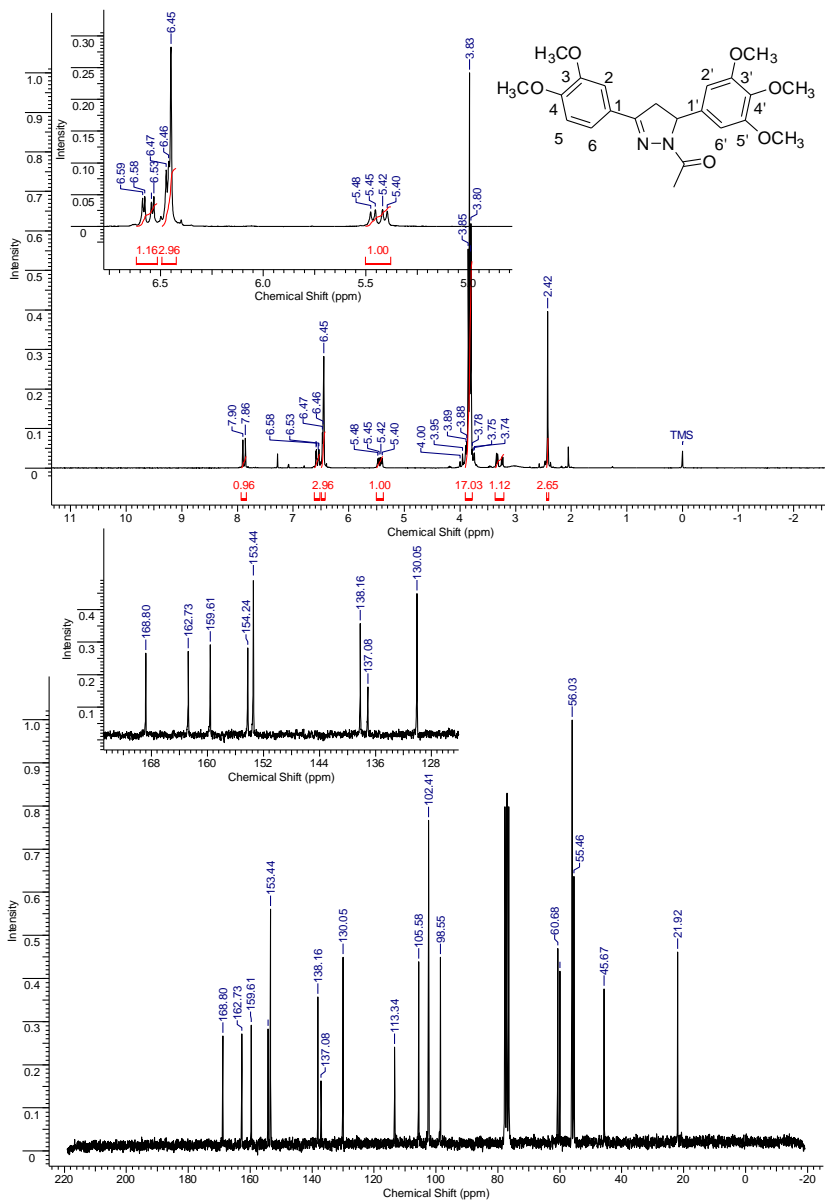


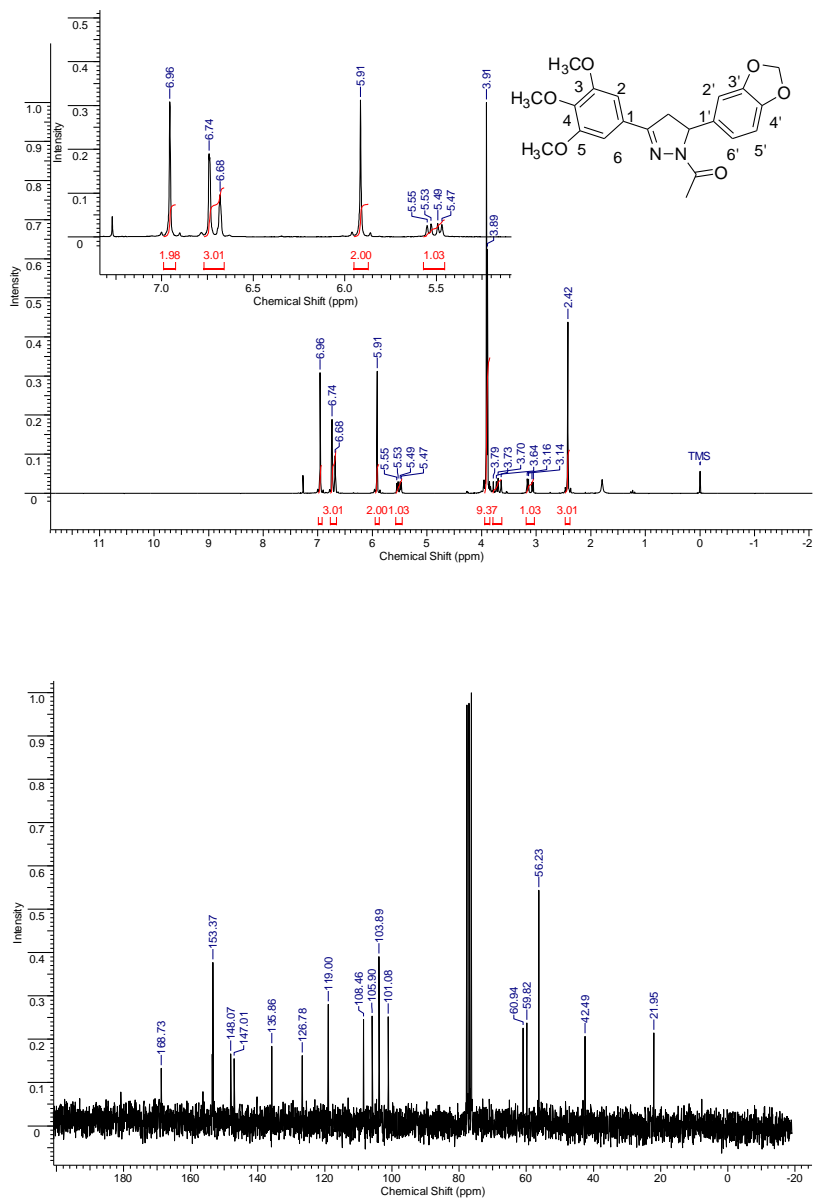
Figura 123. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto **9u**.

Figura 124. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto **9v**.

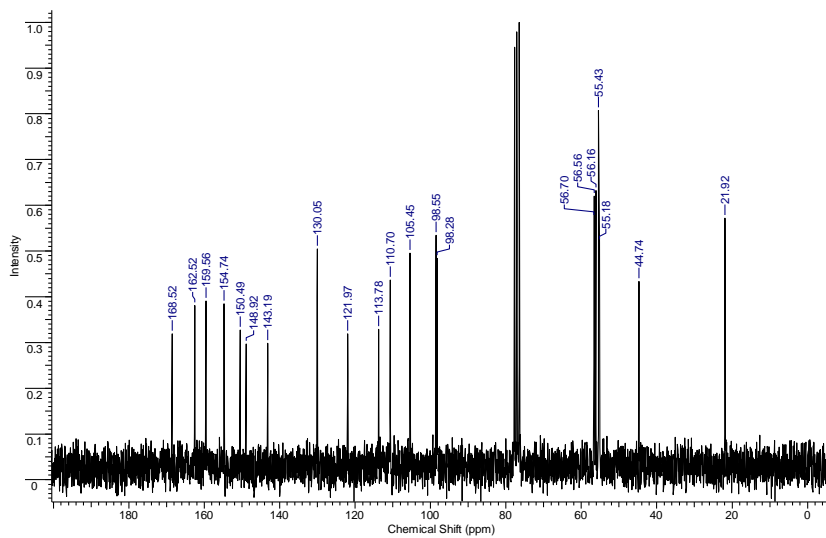
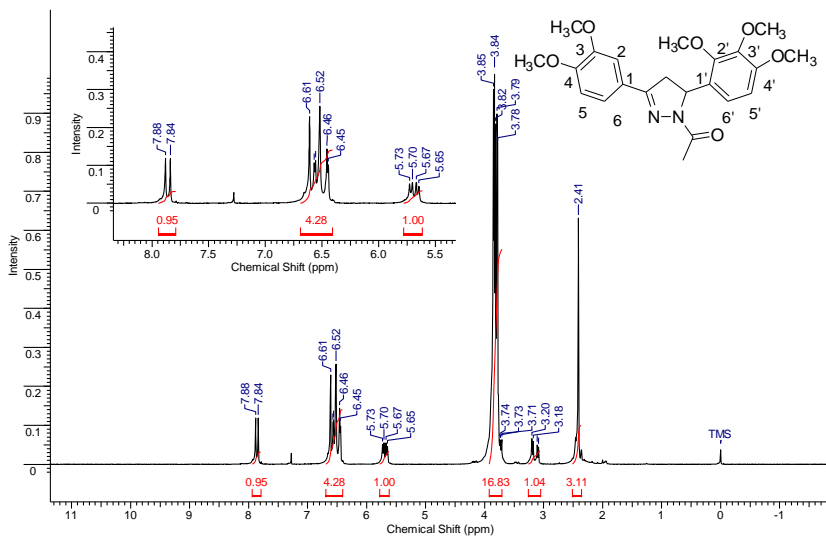


Figura 125. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto **9w**.

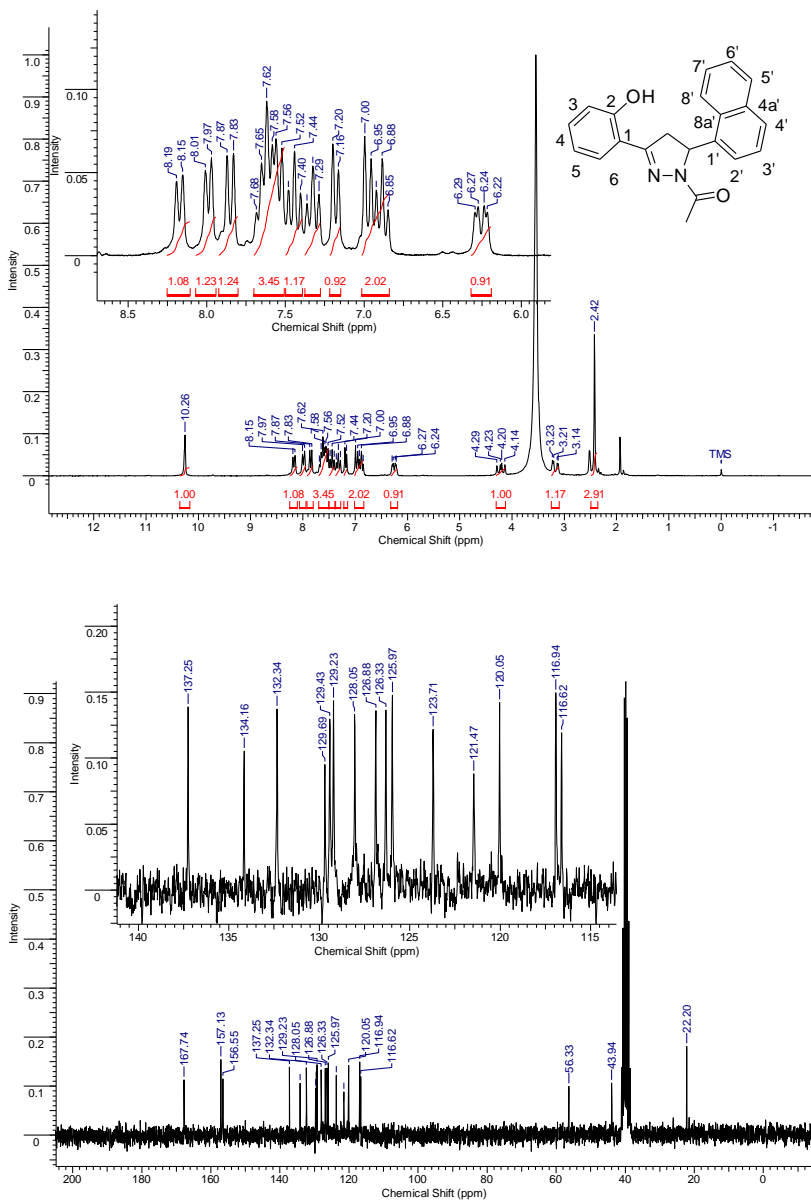
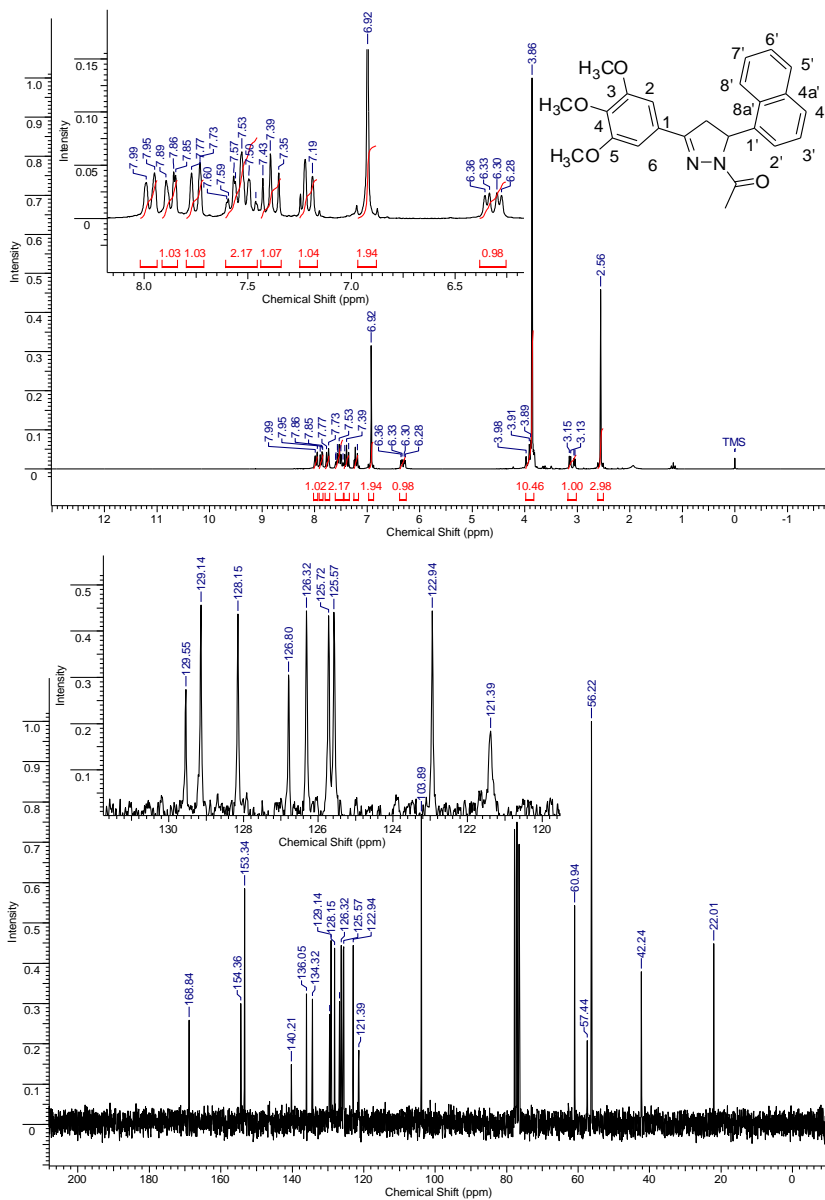


Figura 126. Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto **9x**.



APÊNDICE II –
Espectros de massas
de alta resolução dos
compostos sintetizados.

Figura 127. Espectro de massas de alta resolução do composto **3a**.

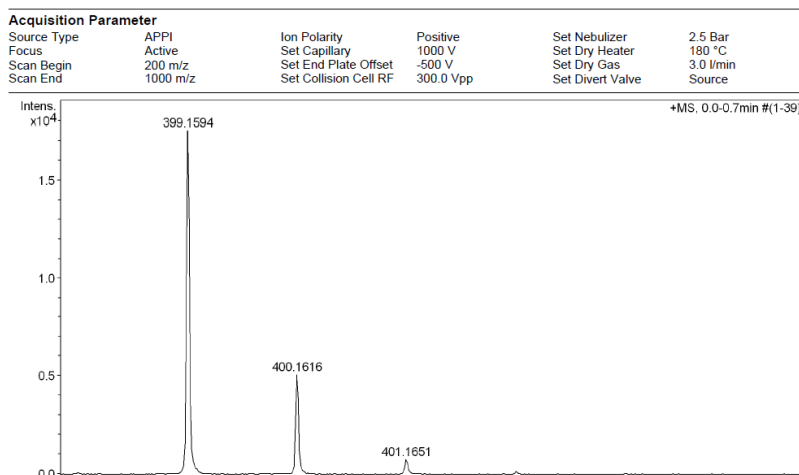


Figura 128. Espectro de massas de alta resolução do composto **3b**.

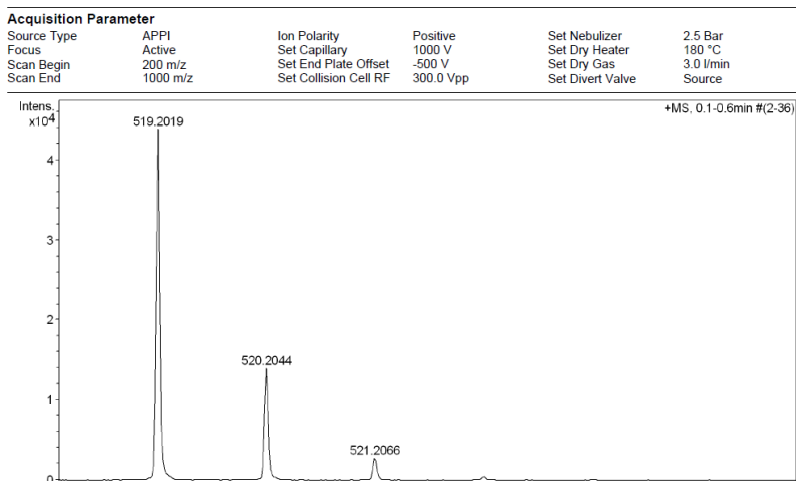


Figura 129. Espectro de massas de alta resolução do composto **3c**.

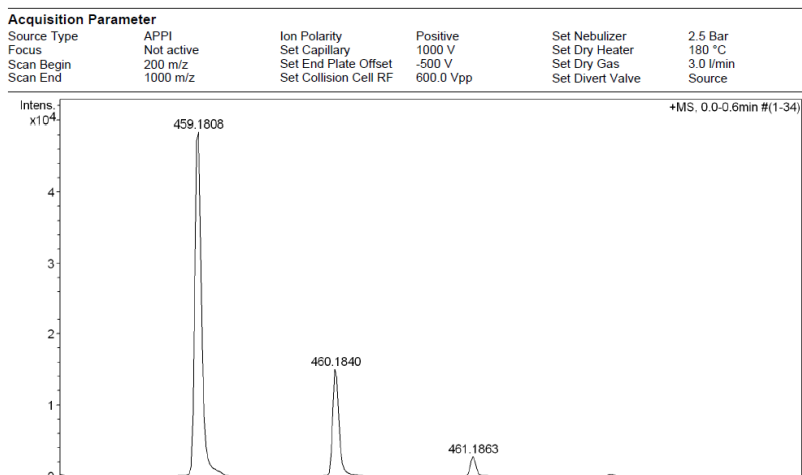


Figura 130. Espectro de massas de alta resolução do composto **3d**.

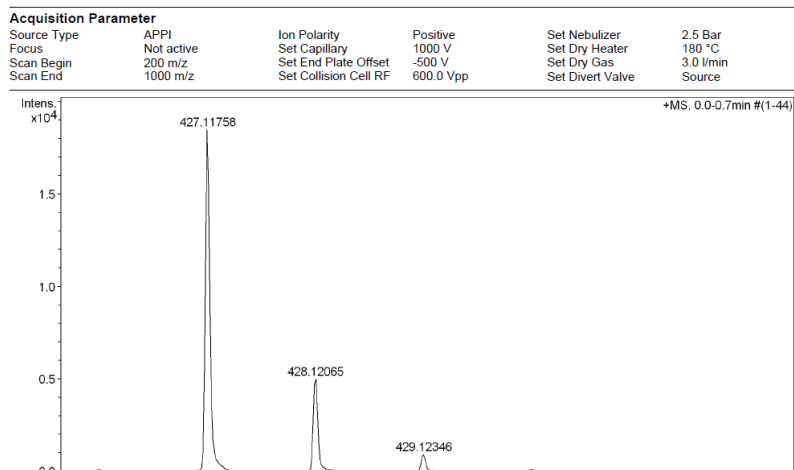


Figura 131. Espectro de massas de alta resolução do composto **3e**.

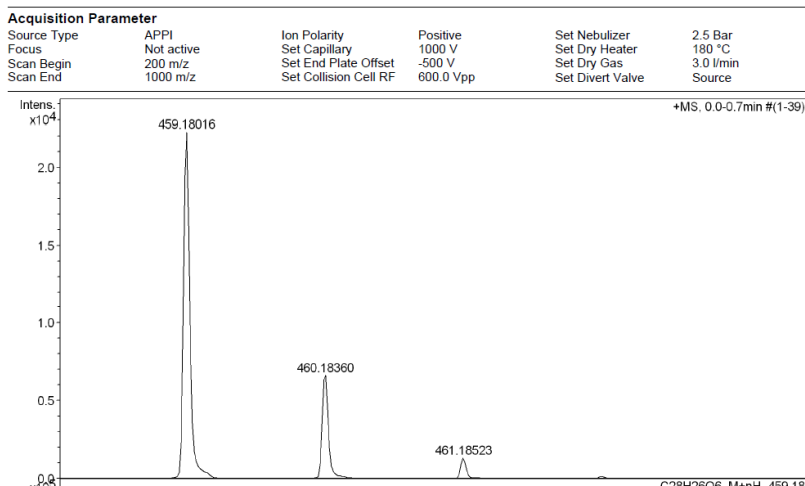


Figura 132. Espectro de massas de alta resolução do composto **3f**.

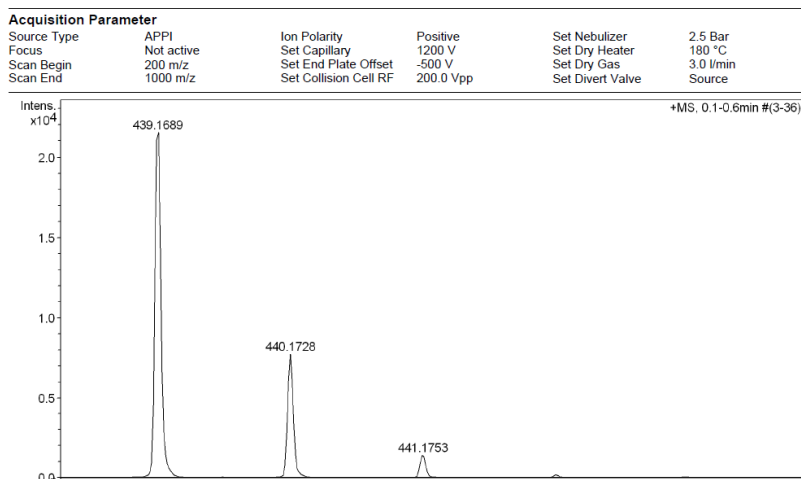


Figura 133. Espectro de massas de alta resolução do composto **3g**.

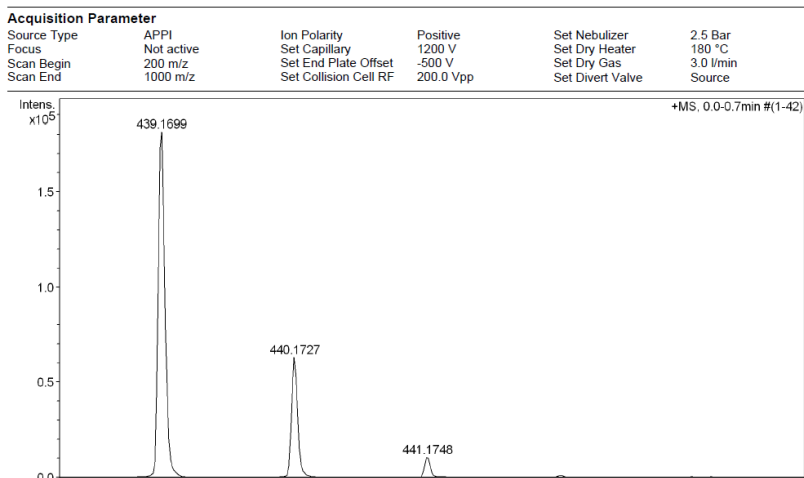


Figura 134. Espectro de massas de alta resolução do composto **3h**.

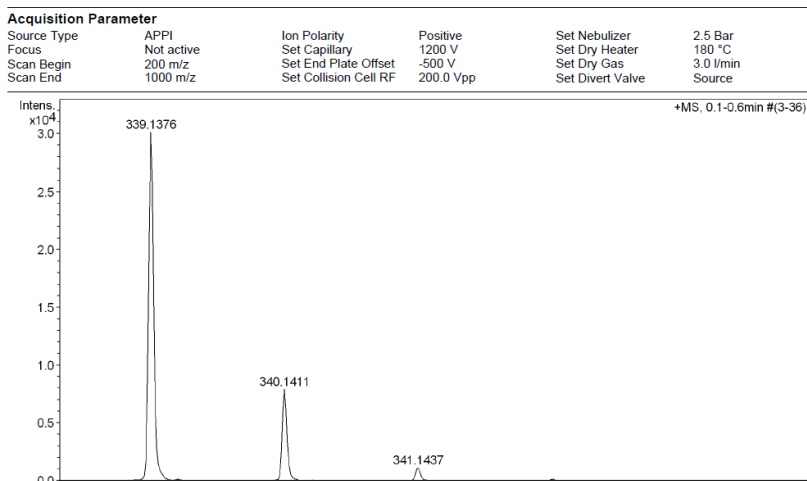


Figura 135. Espectro de massas de alta resolução do composto **3i**.

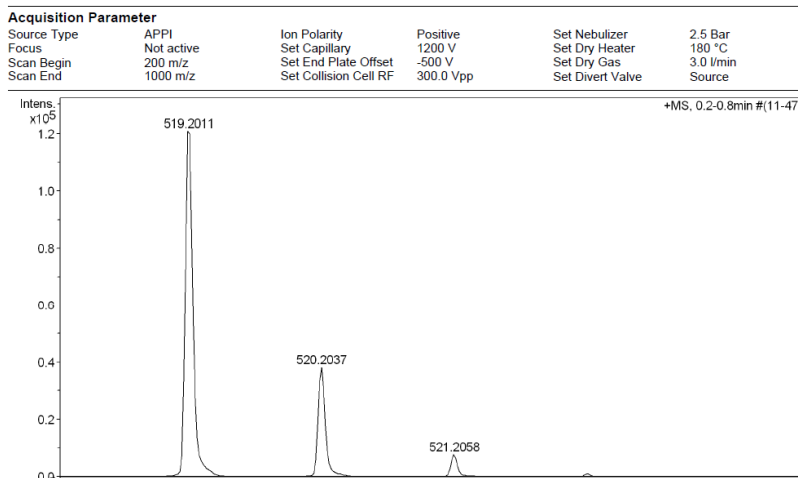


Figura 136. Espectro de massas de alta resolução do composto **3j**.

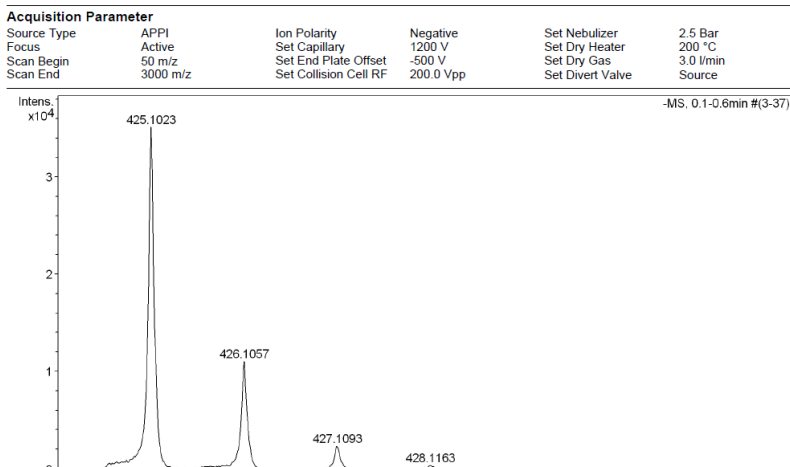


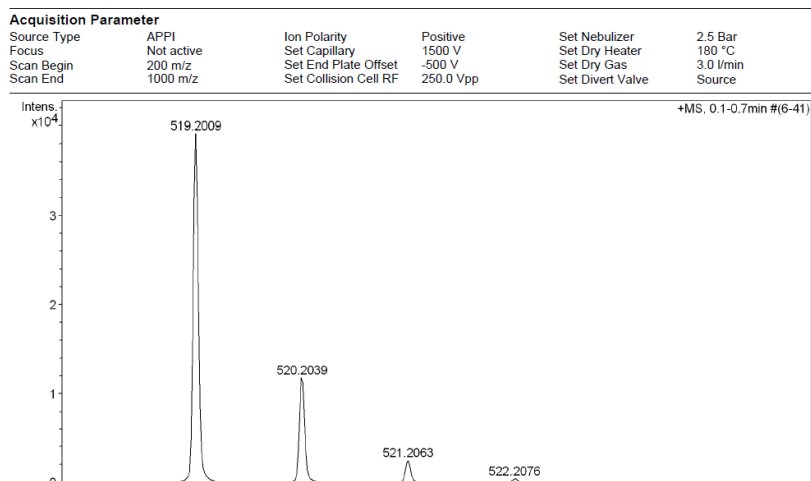
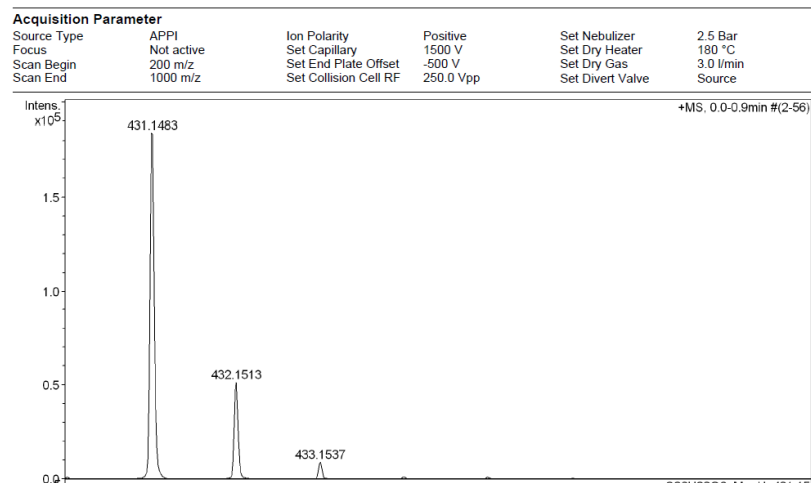
Figura 137. Espectro de massas de alta resolução do composto **3k**.**Figura 138.** Espectro de massas de alta resolução do composto **3l**.

Figura 139. Espectro de massas de alta resolução do composto **3m**.

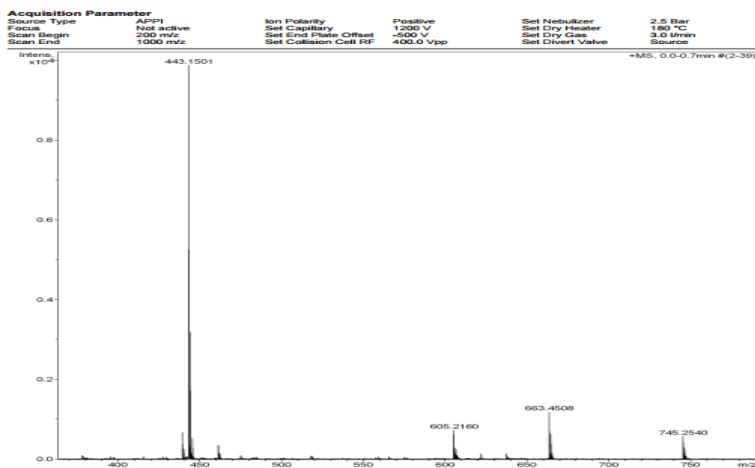


Figura 140. Espectro de massas de alta resolução do composto **3n**.

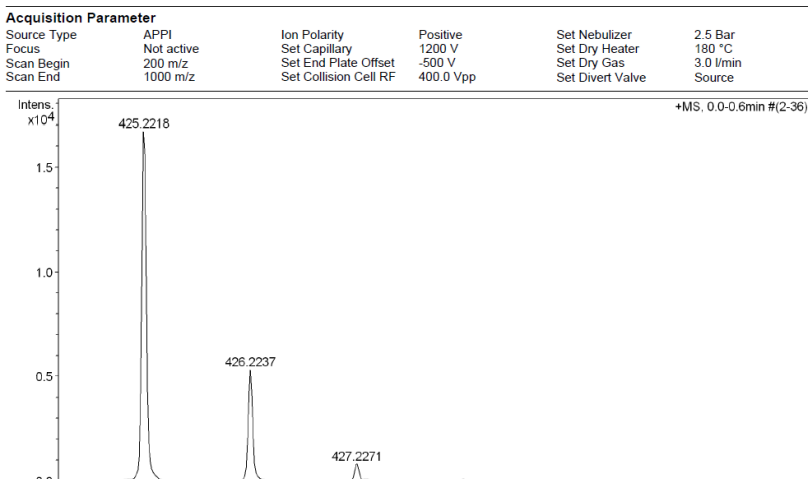


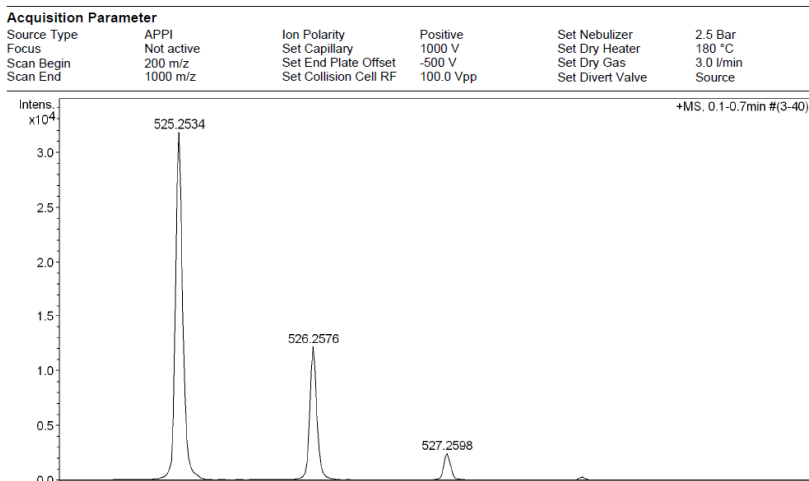
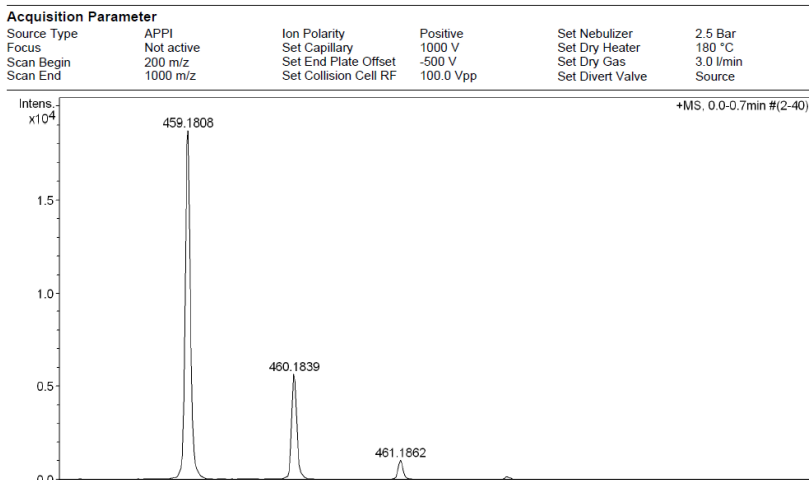
Figura 141. Espectro de massas de alta resolução do composto **3o**.**Figura 142.** Espectro de massas de alta resolução do composto **3p**.

Figura 143. Espectro de massas de alta resolução do composto **3q**.

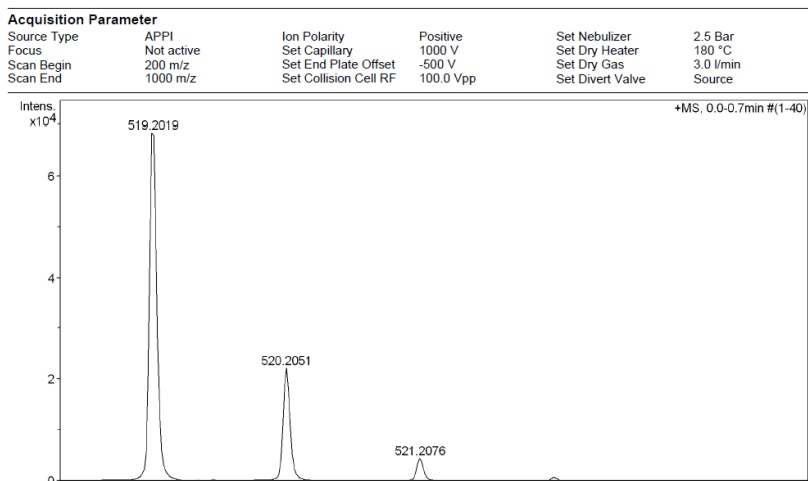


Figura 144. Espectro de massas de alta resolução do composto **6a**.

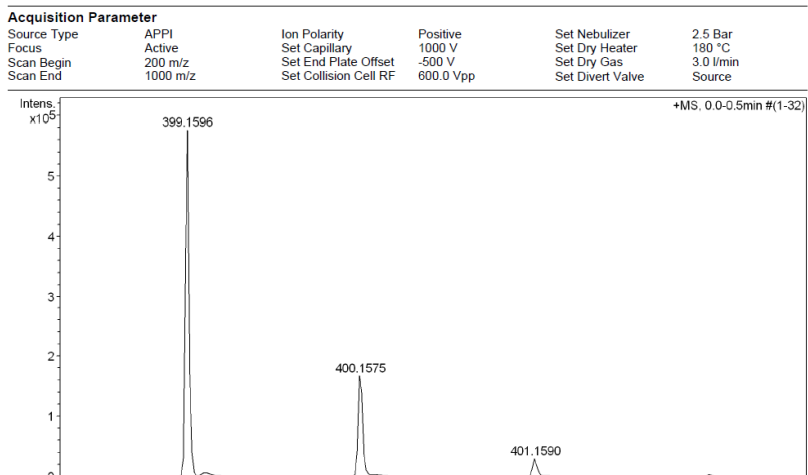


Figura 145. Espectro de massas de alta resolução do composto **6b**.

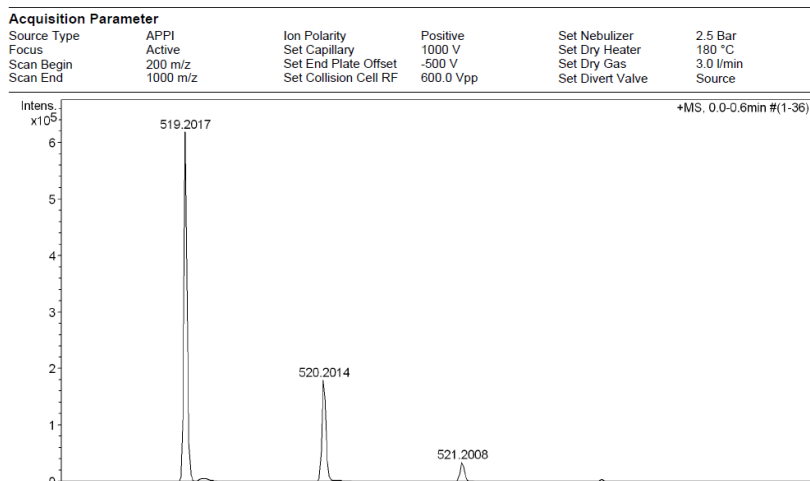


Figura 146. Espectro de massas de alta resolução do composto **6c**.

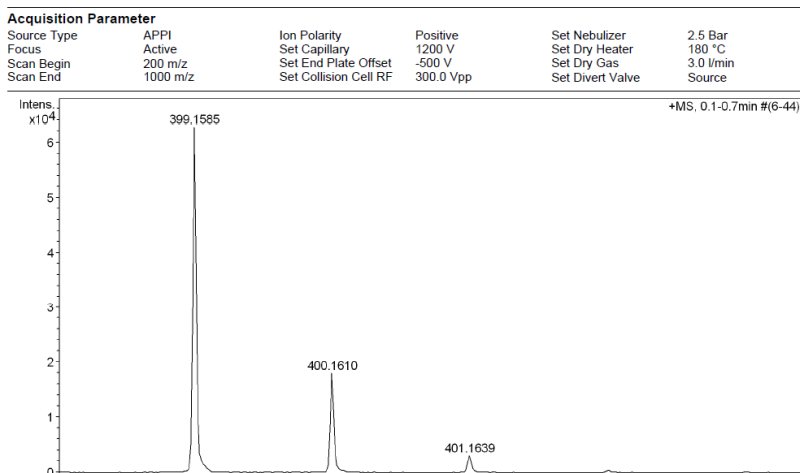


Figura 147. Espectro de massas de alta resolução do composto **6d**.

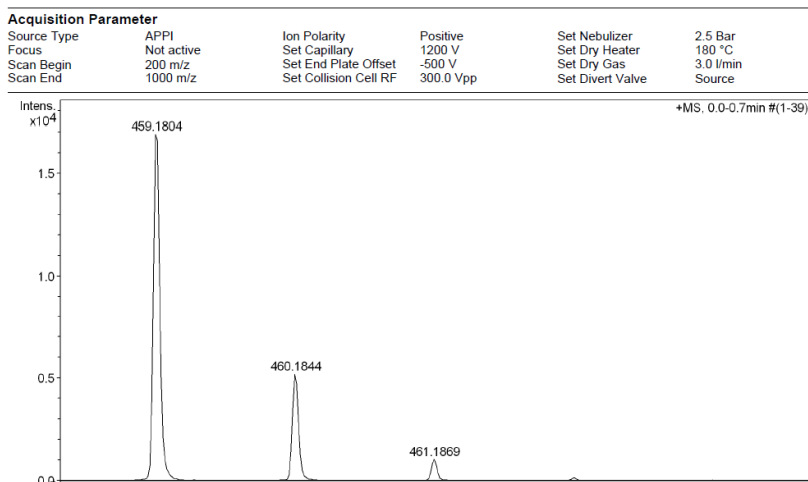


Figura 148. Espectro de massas de alta resolução do composto **6e**.

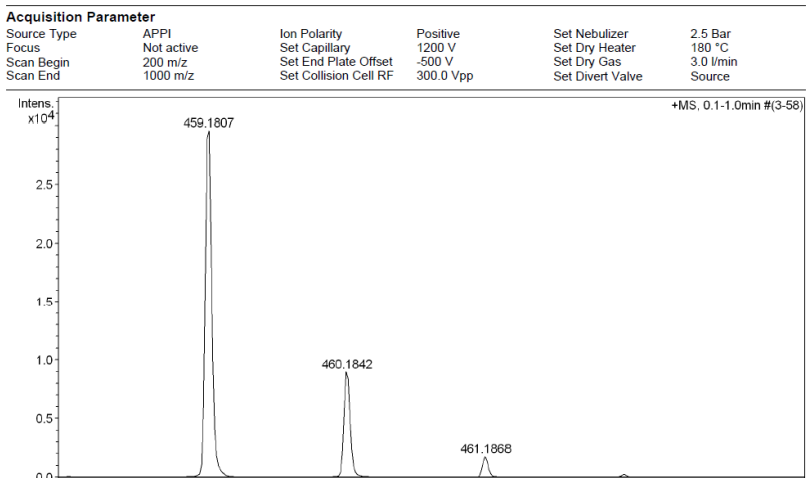


Figura 149. Espectro de massas de alta resolução do composto **6f**.

Acquisition Parameter

Source Type	APPI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	2.5 Bar
Focus	Not active	Set Capillary	1500 V	Set Dry Heater	180 °C
Scan Begin	200 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Dry Gas	3.0 l/min
Scan End	1000 m/z	Set Collision Cell RF	280.0 Vpp	Set Divert Valve	Source

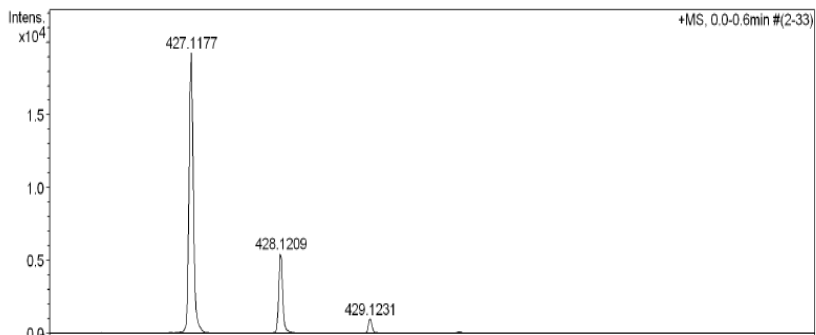


Figura 150. Espectro de massas de alta resolução do composto **6g**.

Acquisition Parameter

Source Type	APPI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	2.5 Bar
Focus	Not active	Set Capillary	1500 V	Set Dry Heater	180 °C
Scan Begin	200 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Dry Gas	3.0 l/min
Scan End	1000 m/z	Set Collision Cell RF	180.0 Vpp	Set Divert Valve	Source

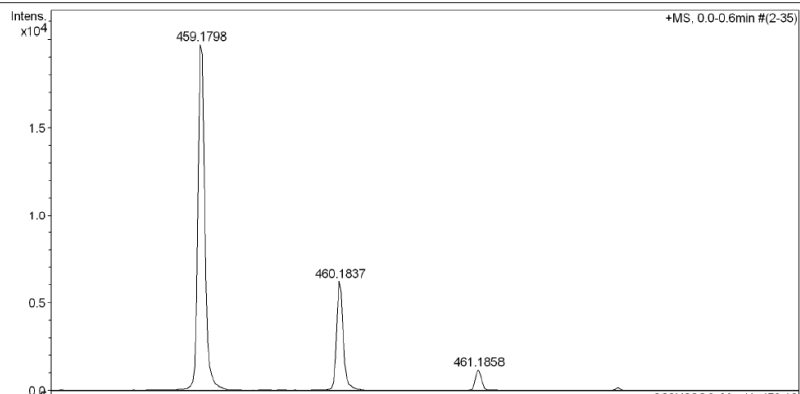


Figura 151. Espectro de massas de alta resolução do composto **6h**.

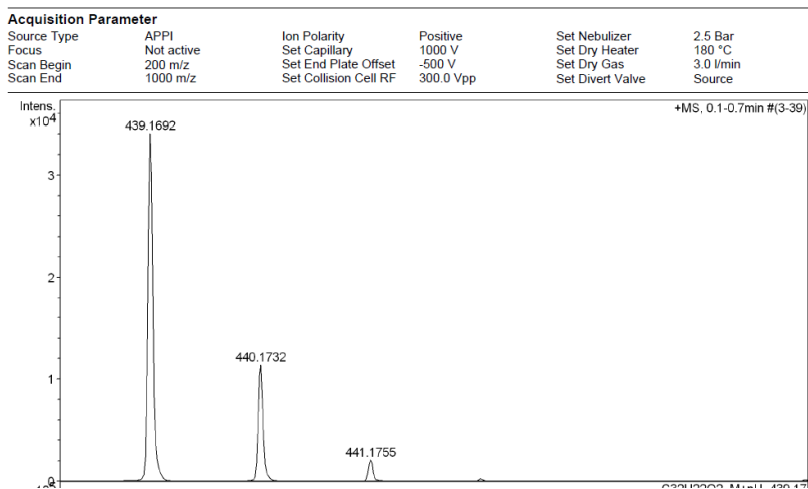


Figura 152. Espectro de massas de alta resolução do composto **6i**.

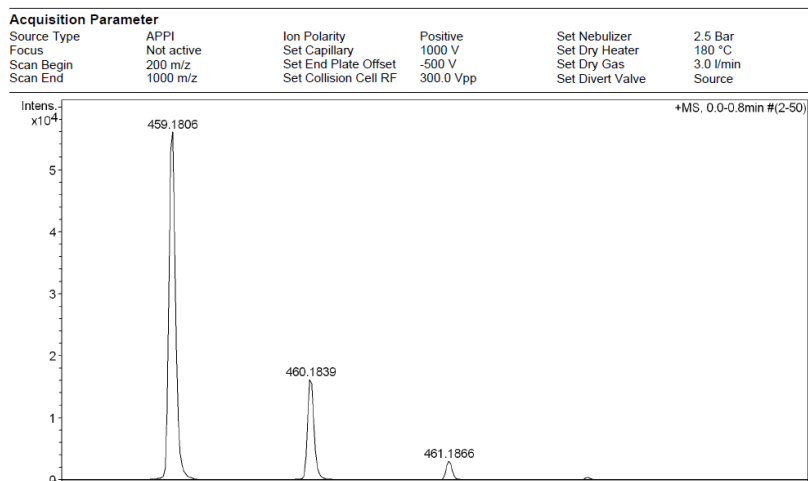


Figura 153. Espectro de massas de alta resolução do composto **6j**.

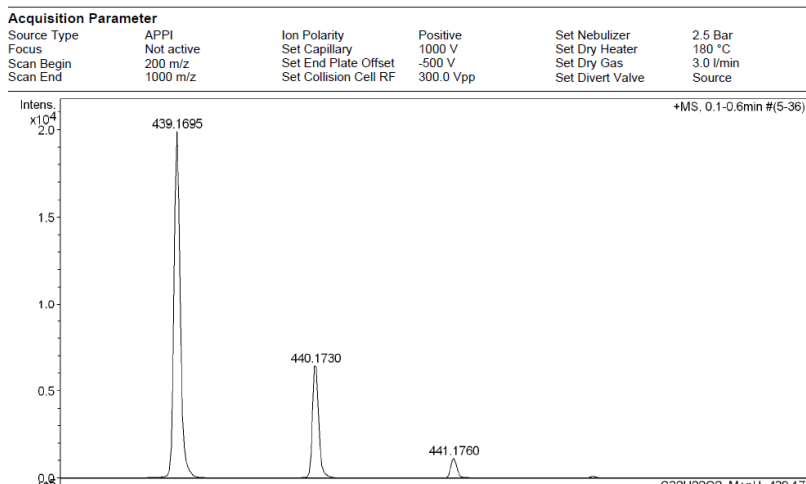


Figura 154. Espectro de massas de alta resolução do composto **6k**.

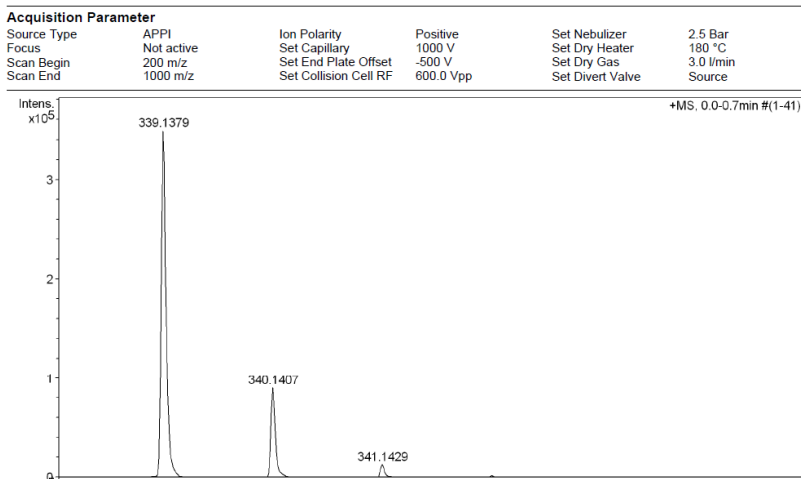


Figura 155. Espectro de massas de alta resolução do composto **6l**.

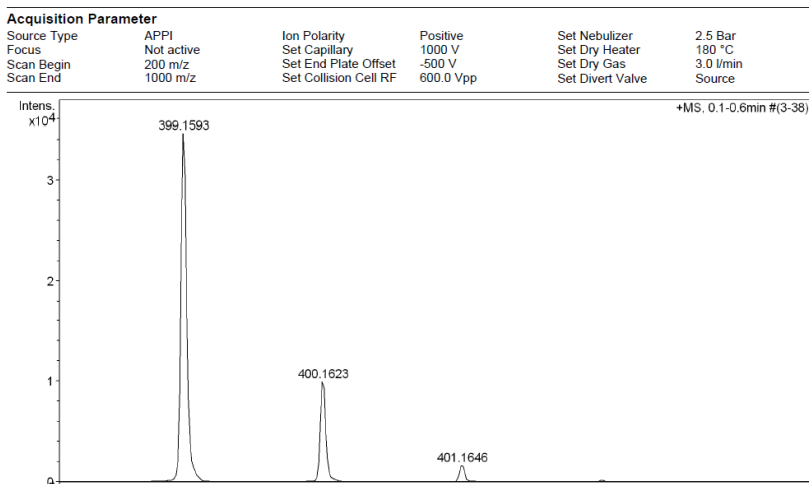


Figura 156. Espectro de massas de alta resolução do composto **6m**.

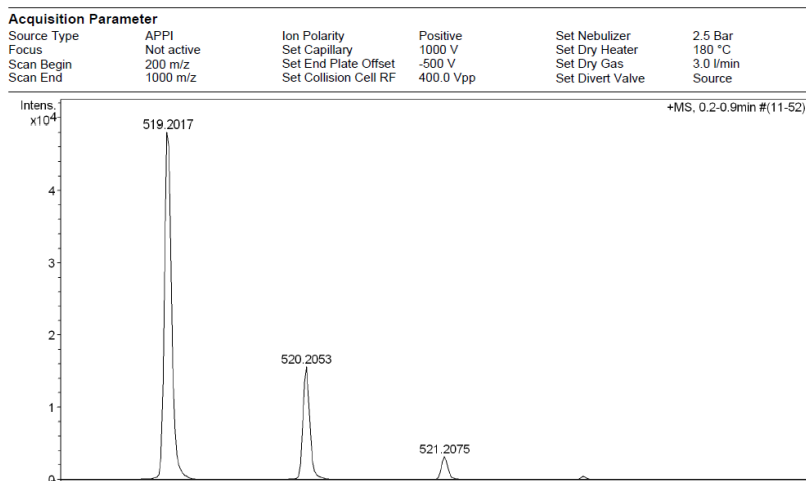


Figura 157. Espectro de massas de alta resolução do composto **6n**.

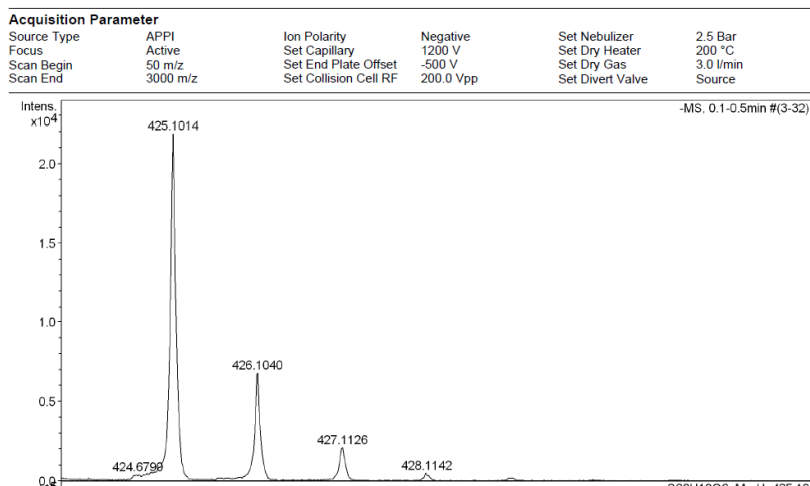


Figura 158. Espectro de massas de alta resolução do composto **6o**.

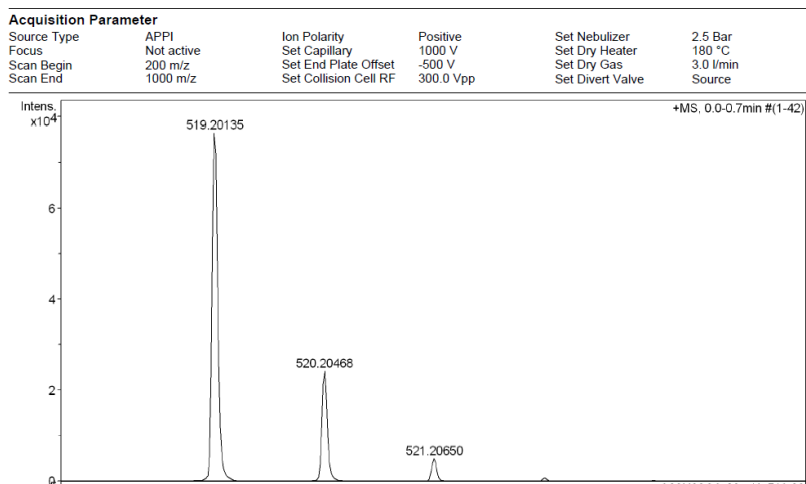


Figura 159. Espectro de massas de alta resolução do composto **6p**.

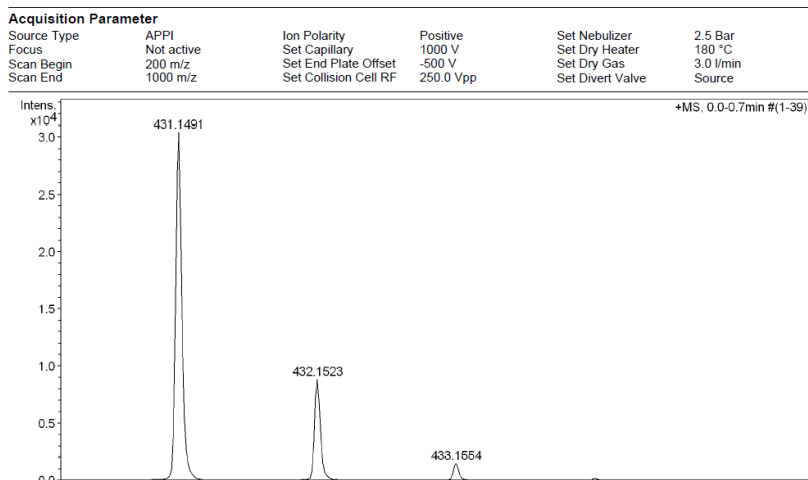


Figura 160. Espectro de massas de alta resolução do composto **8a**.

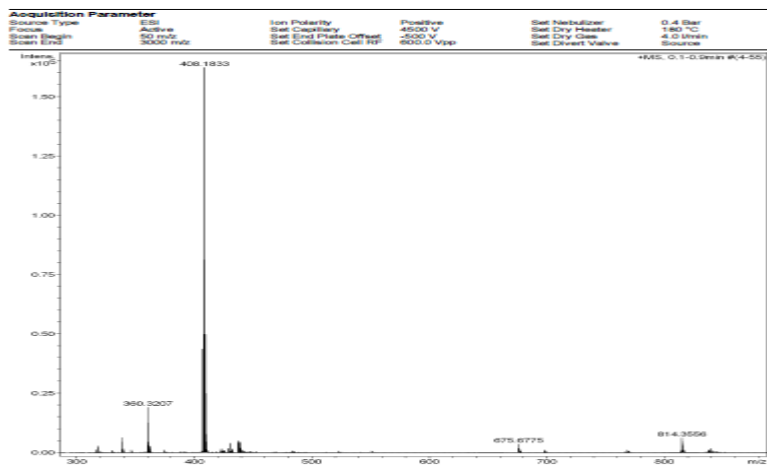


Figura 161. Espectro de massas de alta resolução do composto 8b.

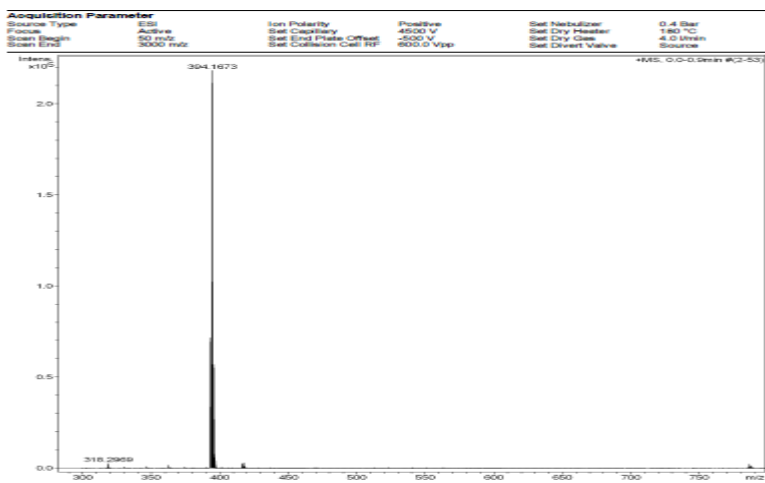


Figura 162. Espectro de massas de alta resolução do composto 8c.

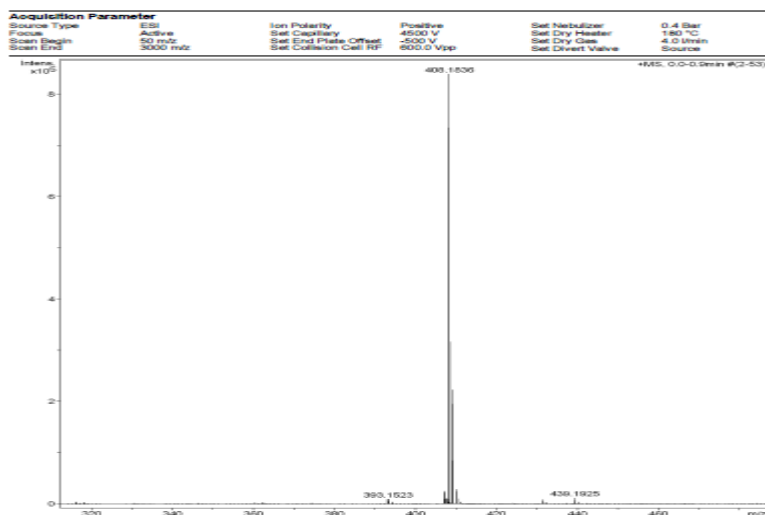


Figura 163. Espectro de massas de alta resolução do composto 8d.

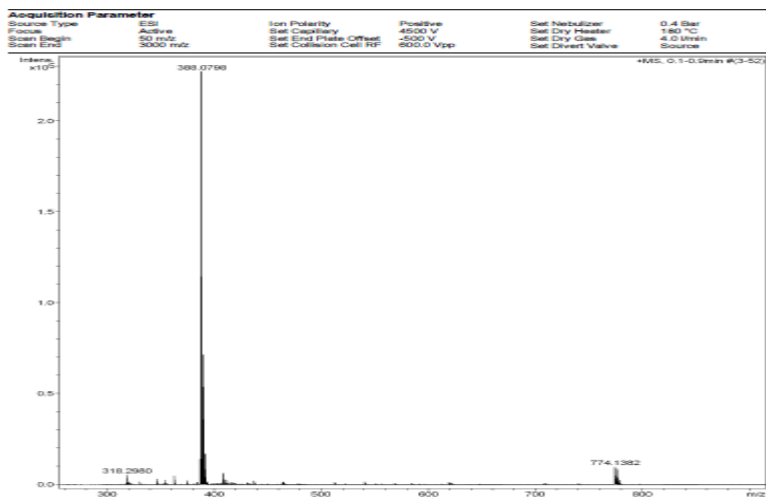


Figura 164. Espectro de massas de alta resolução do composto 8e.

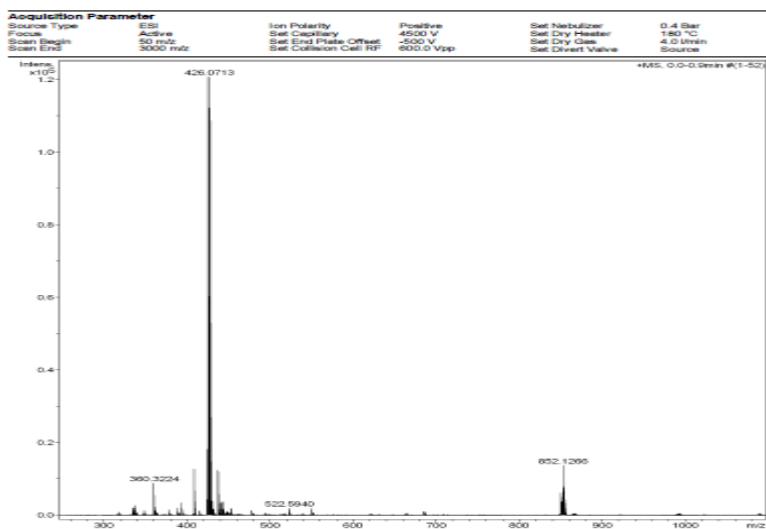


Figura 165. Espectro de massas de alta resolução do composto **8f**.

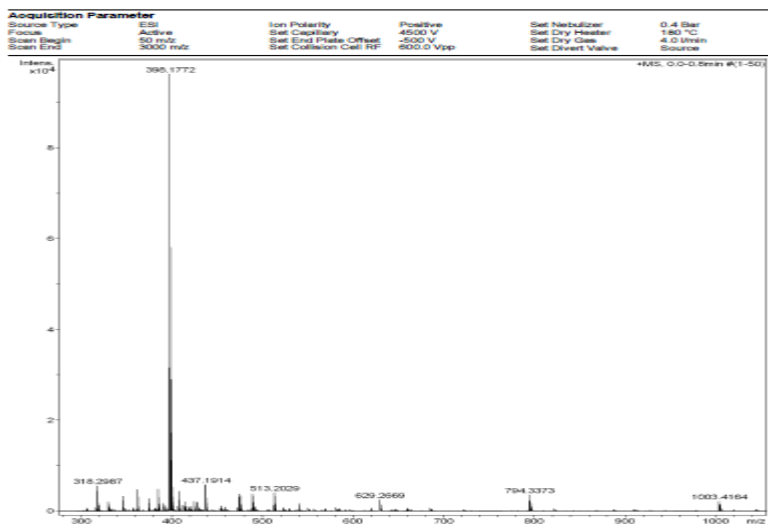


Figura 166. Espectro de massas de alta resolução do composto **8g**.

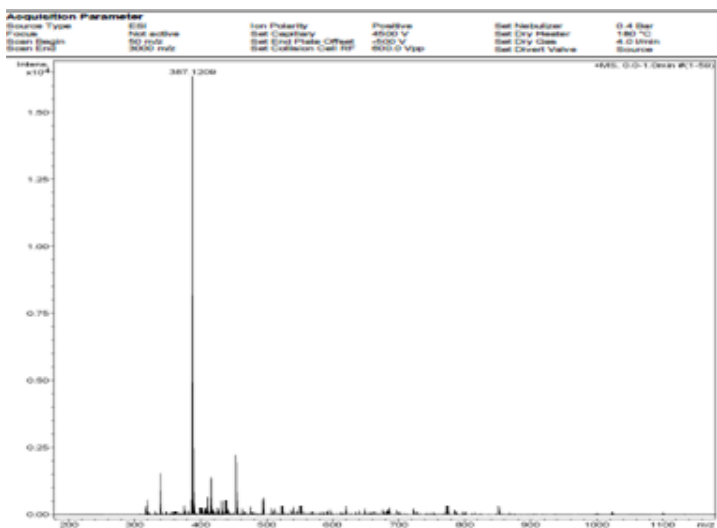


Figura 167. Espectro de massas de alta resolução do composto 8h.

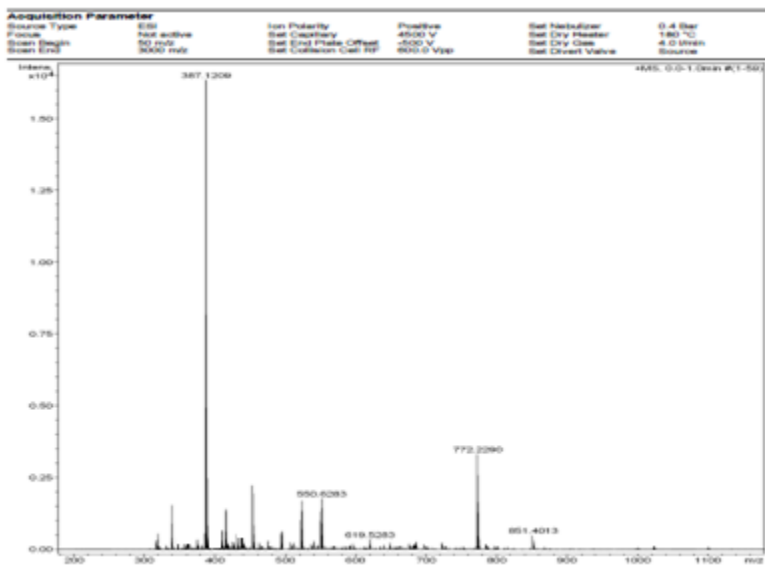


Figura 168. Espectro de massas de alta resolução do composto 8i.

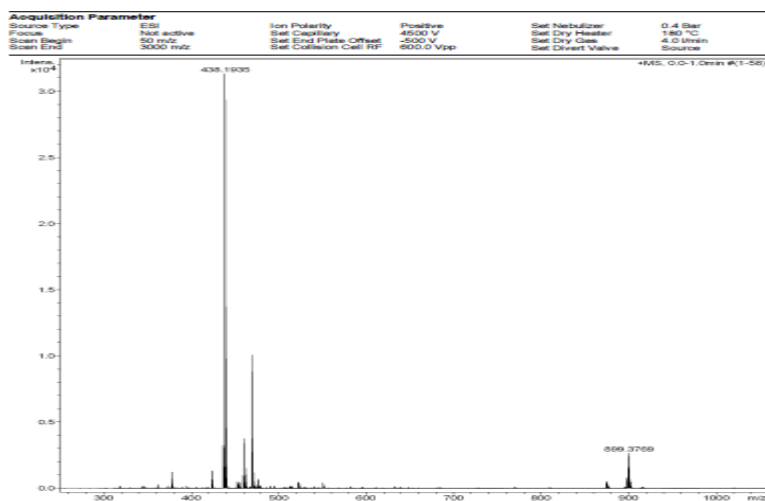


Figura 169. Espectro de massas de alta resolução do composto 8j.

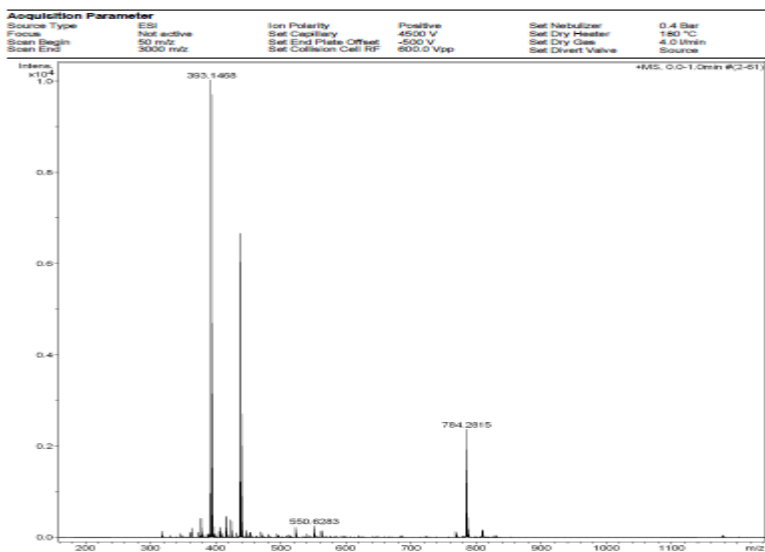


Figura 170. Espectro de massas de alta resolução do composto 8k.

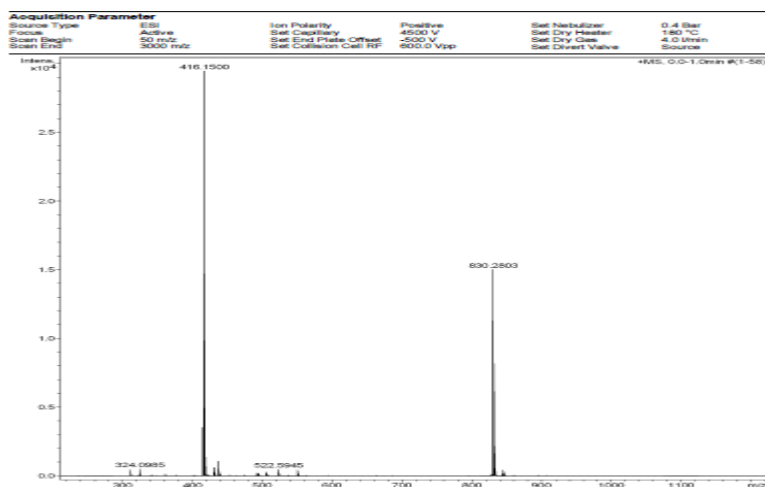


Figura 171. Espectro de massas de alta resolução do composto **8l**.

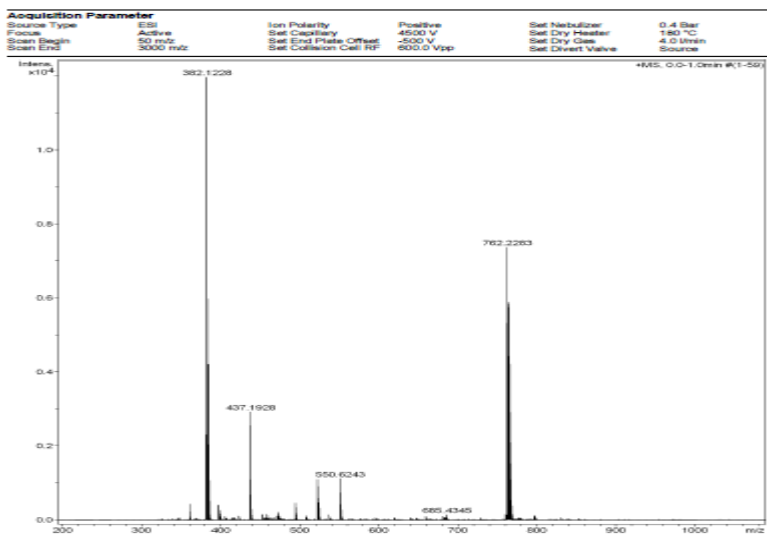


Figura 172. Espectro de massas de alta resolução do composto **8m**.

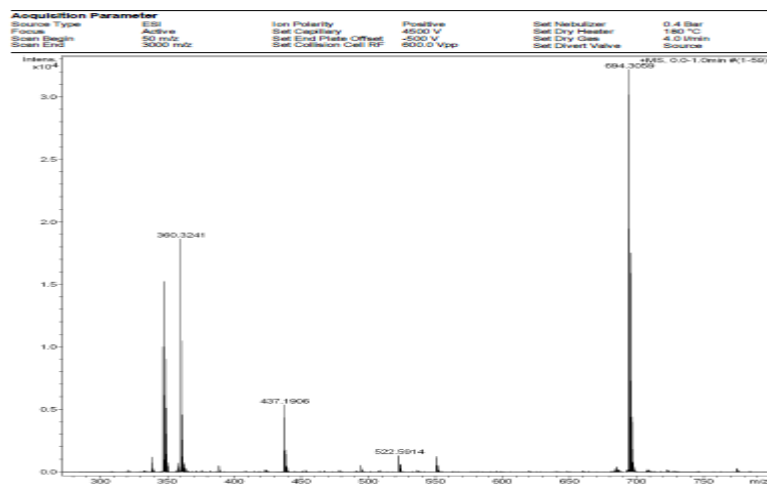


Figura 173. Espectro de massas de alta resolução do composto **8n**.

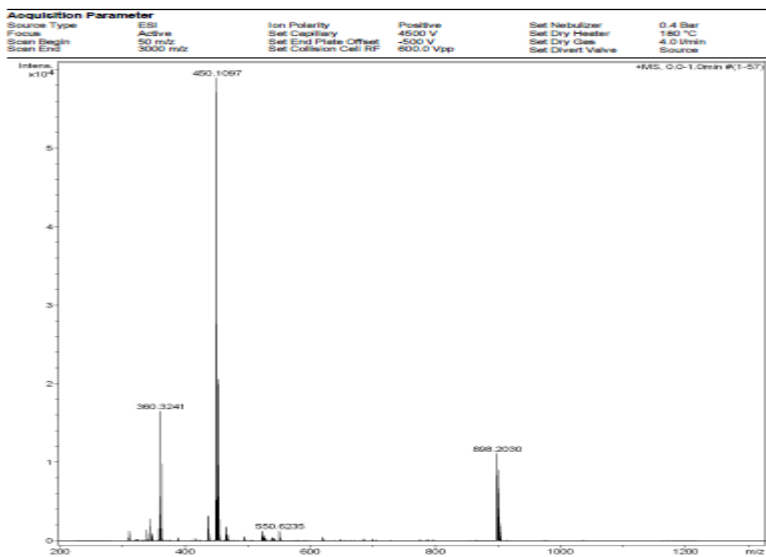


Figura 174. Espectro de massas de alta resolução do composto **8o**.

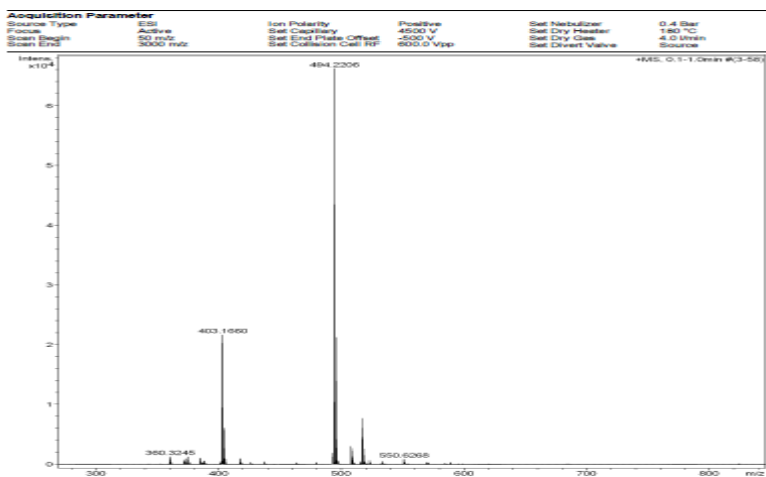


Figura 175. Espectro de massas de alta resolução do composto 8p.

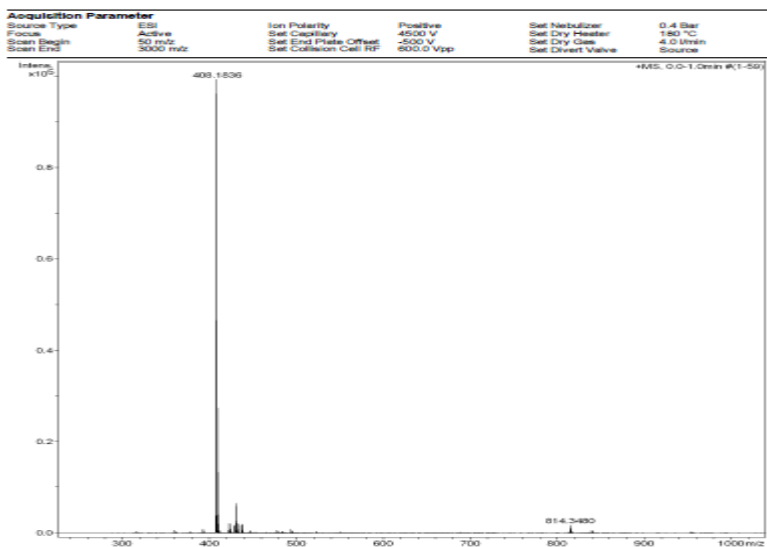


Figura 176. Espectro de massas de alta resolução do composto 8q.

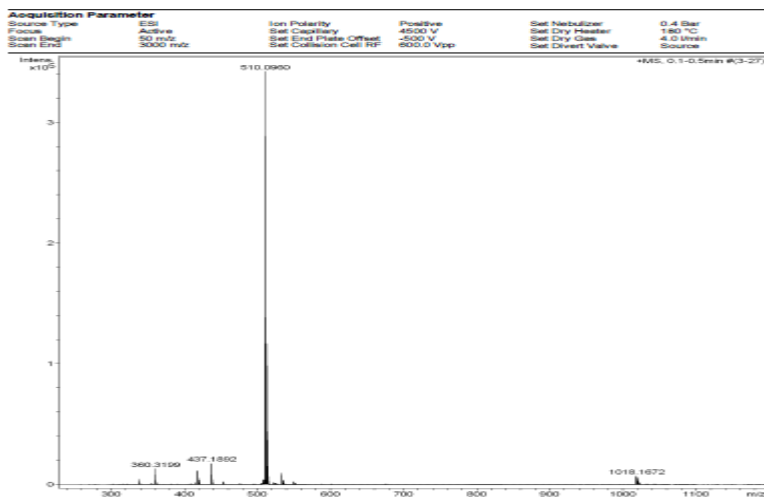


Figura 177. Espectro de massas de alta resolução do composto **8r**.

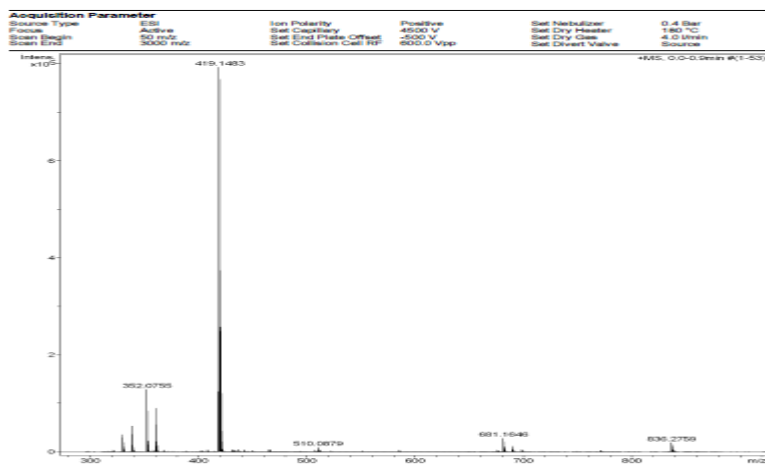


Figura 178. Espectro de massas de alta resolução do composto **8s**.

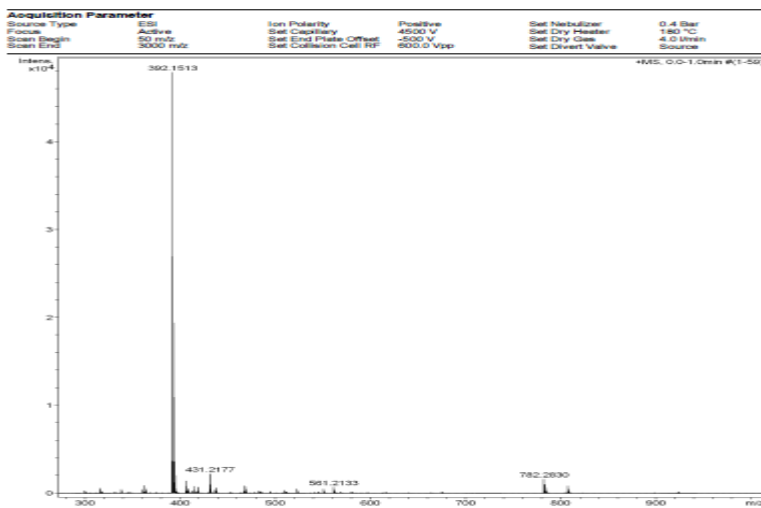


Figura 179. Espectro de massas de alta resolução do composto 8t.

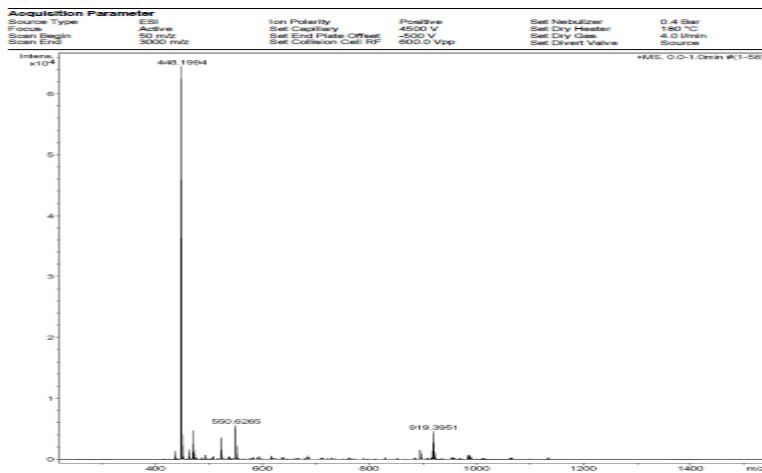


Figura 180. Espectro de massas de alta resolução do composto 8u.

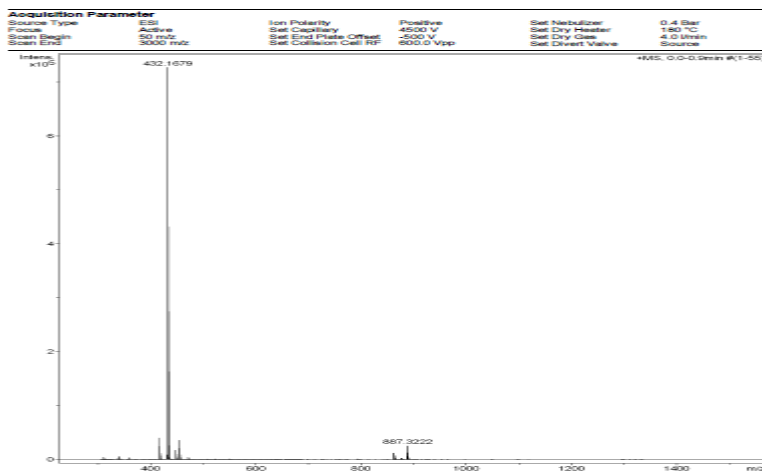


Figura 181. Espectro de massas de alta resolução do composto **8v**.

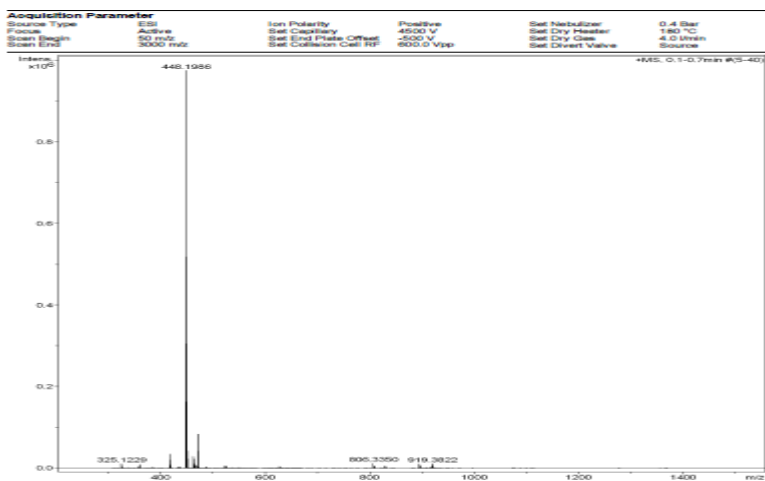


Figura 182. Espectro de massas de alta resolução do composto **8w**.

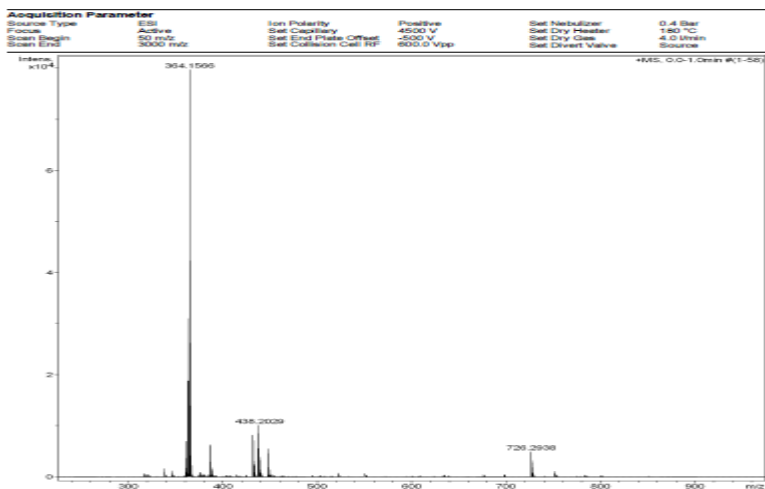


Figura 183. Espectro de massas de alta resolução do composto **8x**.

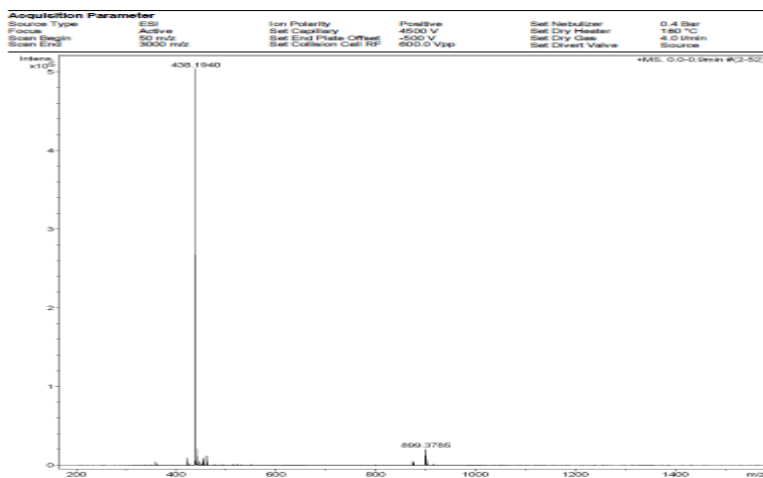


Figura 184. Espectro de massas de alta resolução do composto **9a**.

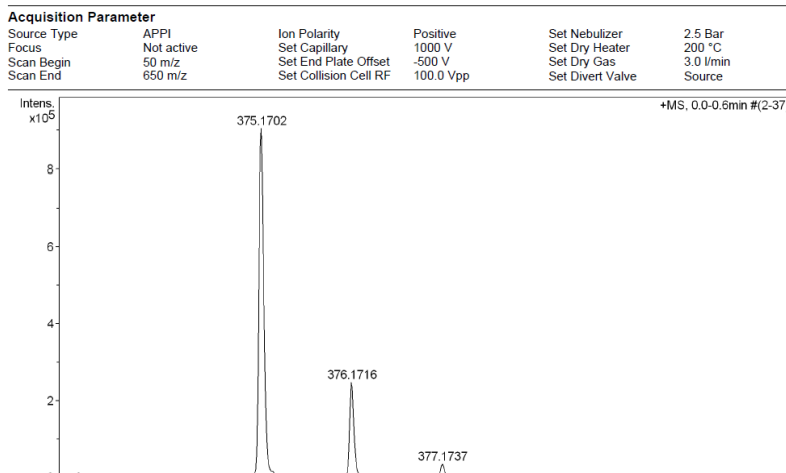


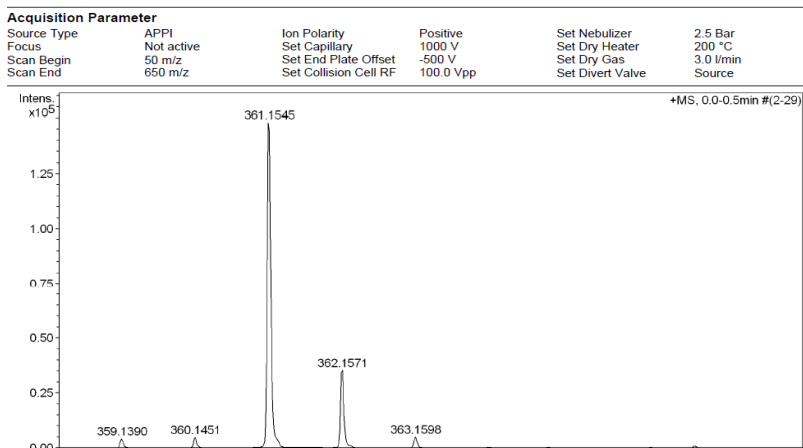
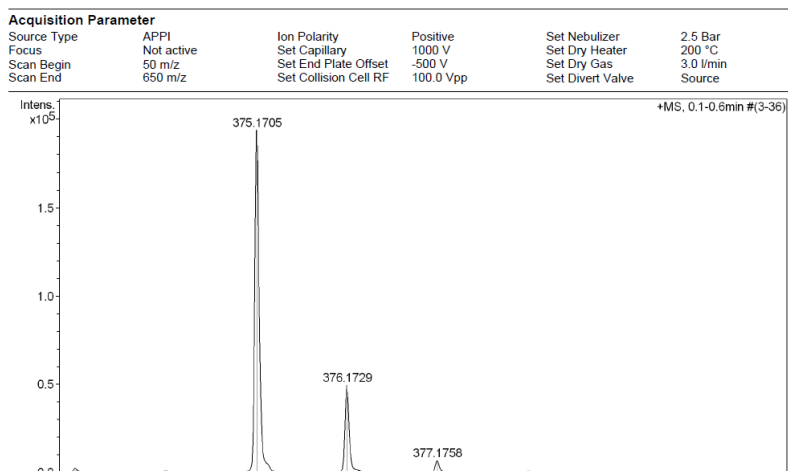
Figura 185. Espectro de massas de alta resolução do composto **9b****Figura 186.** Espectro de massas de alta resolução do composto **9c**.

Figura 187. Espectro de massas de alta resolução do composto **9d**.

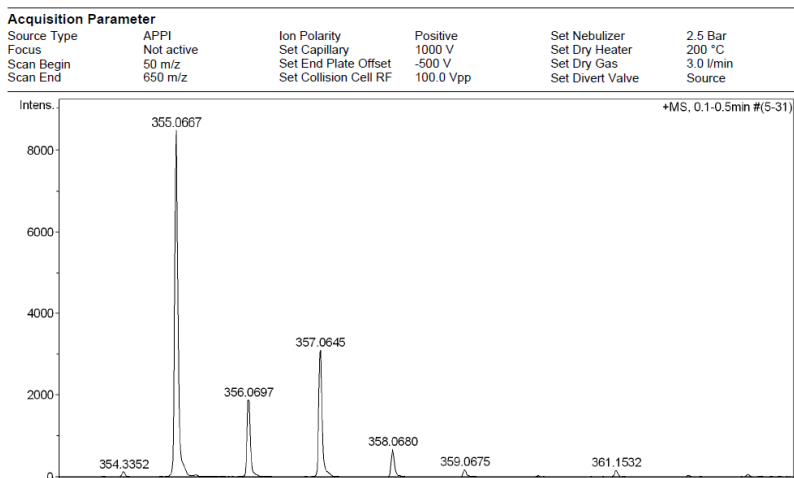


Figura 188. Espectro de massas de alta resolução do composto **9e**.

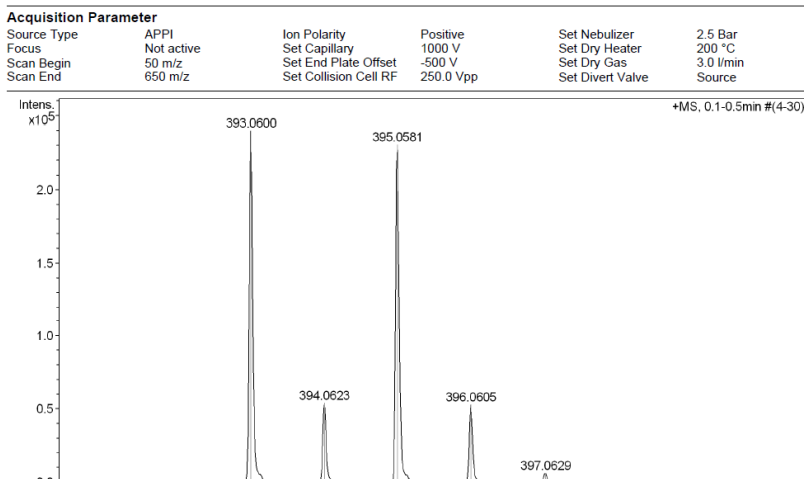


Figura 189. Espectro de massas de alta resolução do composto **9f**.

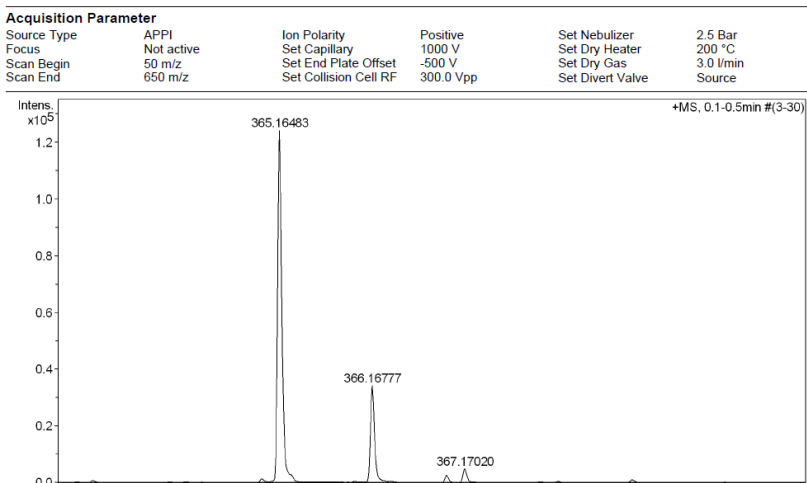


Figura 190. Espectro de massas de alta resolução do composto **9g**.

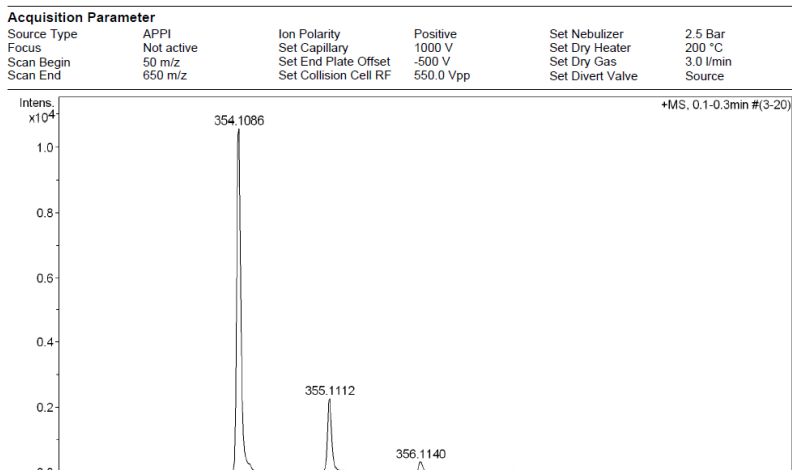


Figura 191. Espectro de massas de alta resolução do composto **9h**.

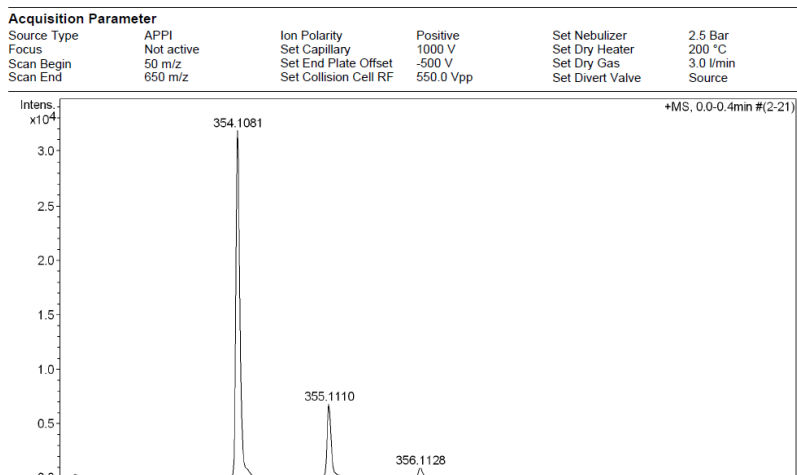


Figura 192. Espectro de massas de alta resolução do composto **9i**.

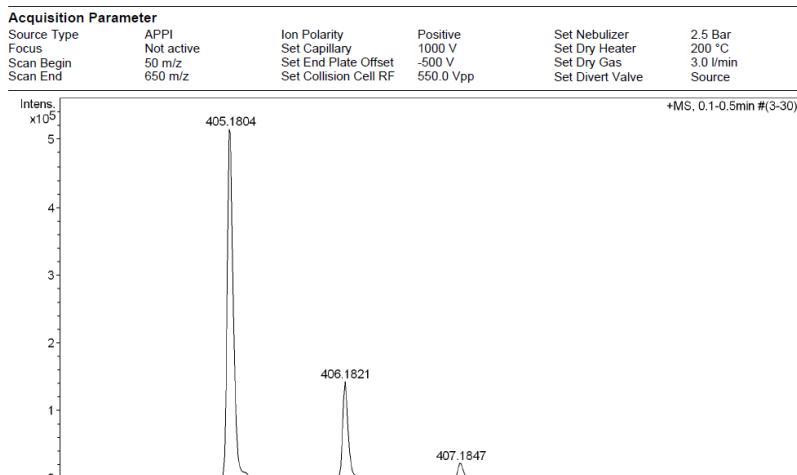


Figura 193. Espectro de massas de alta resolução do composto **9j**.

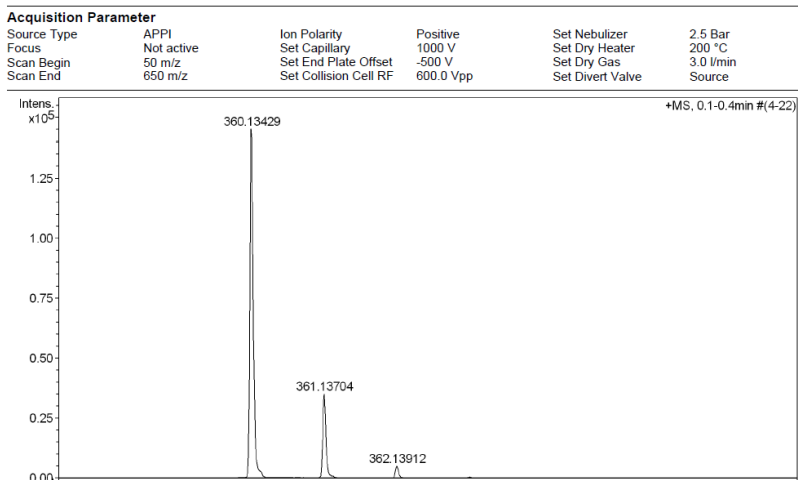


Figura 194. Espectro de massas de alta resolução do composto **9k**.

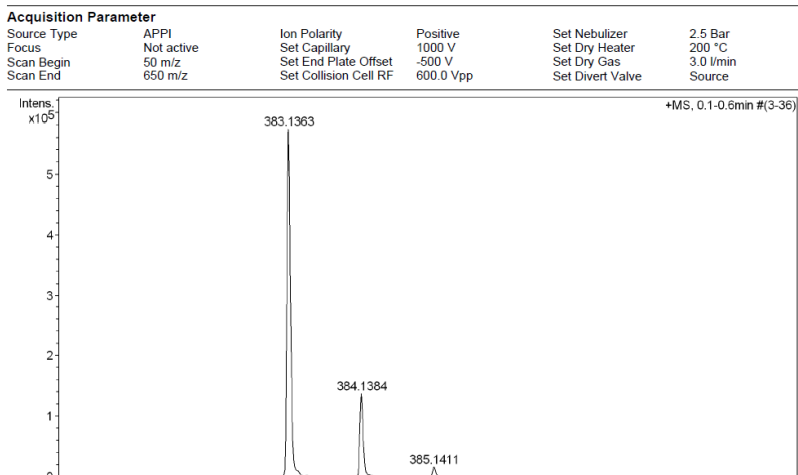


Figura 195. Espectro de massas de alta resolução do composto **9l**.

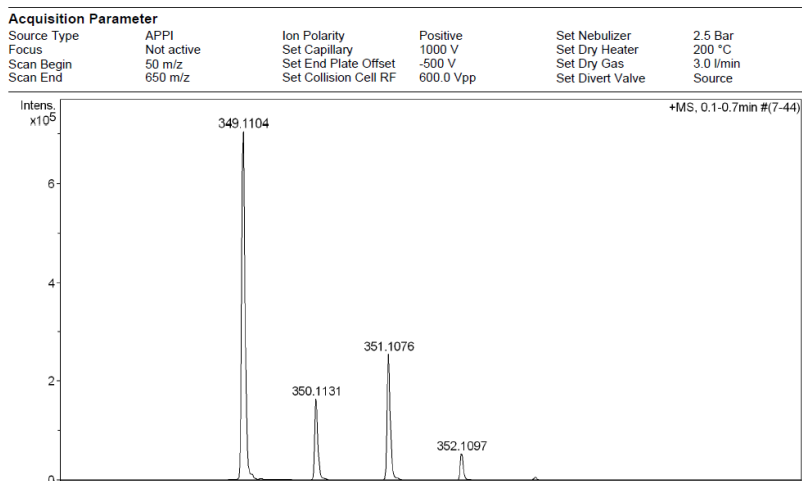


Figura 196. Espectro de massas de alta resolução do composto **9m**.

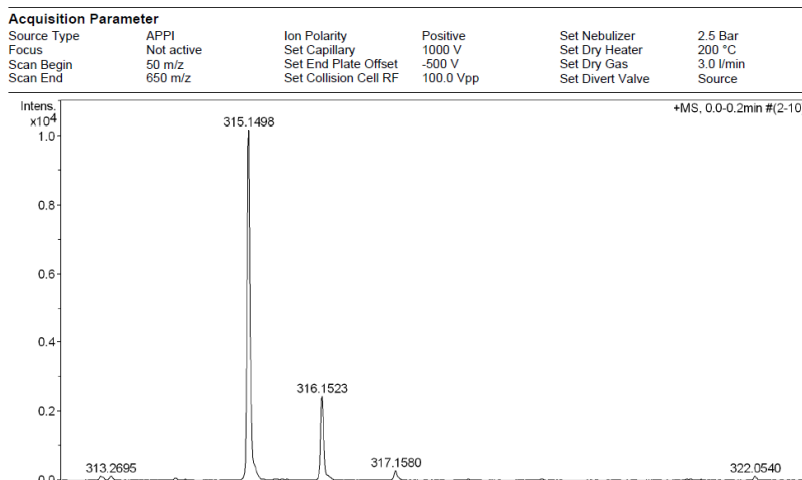


Figura 197. Espectro de massas de alta resolução do composto **9n**.

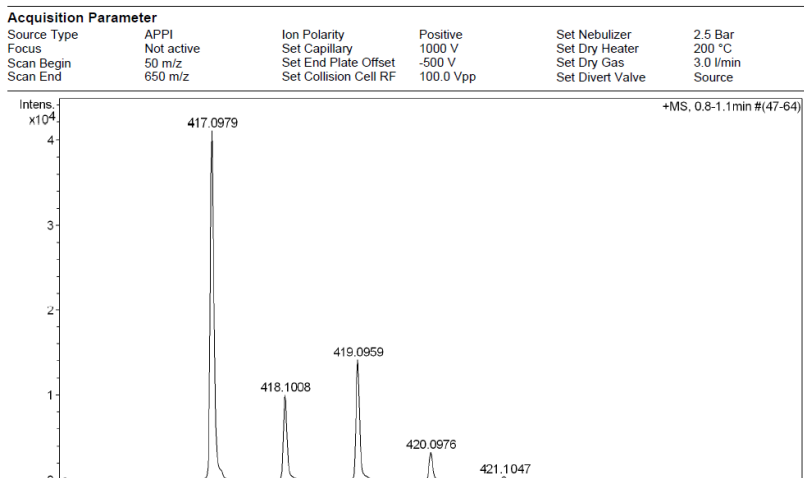


Figura 198. Espectro de massas de alta resolução do composto **9o**.

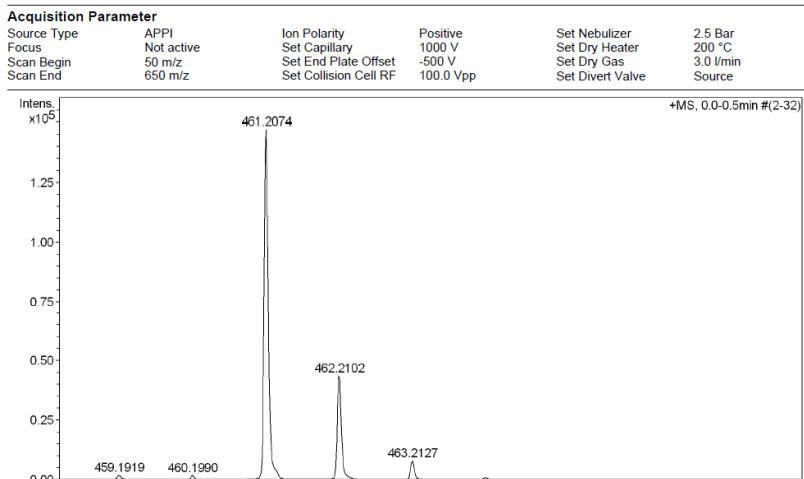


Figura 199. Espectro de massas de alta resolução do composto **9p**.

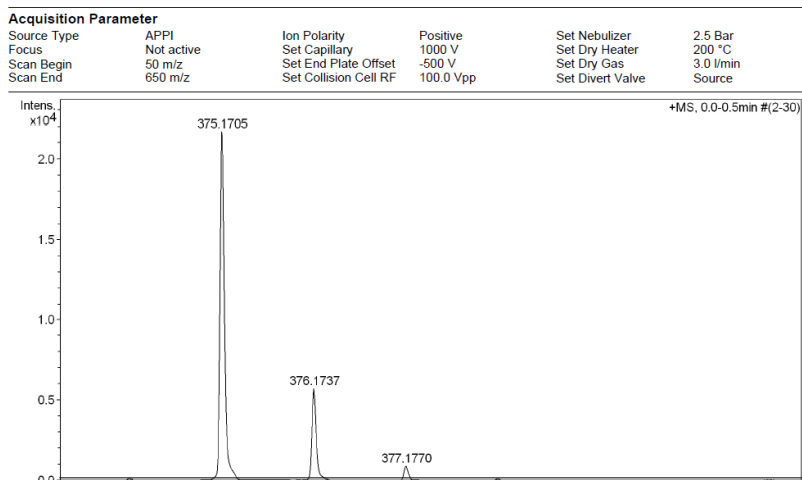


Figura 200. Espectro de massas de alta resolução do composto **9q**.

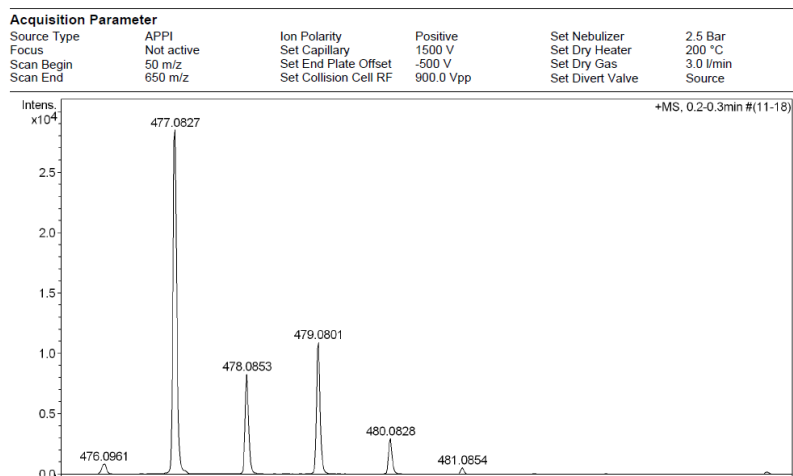


Figura 201. Espectro de massas de alta resolução do composto **9r**.

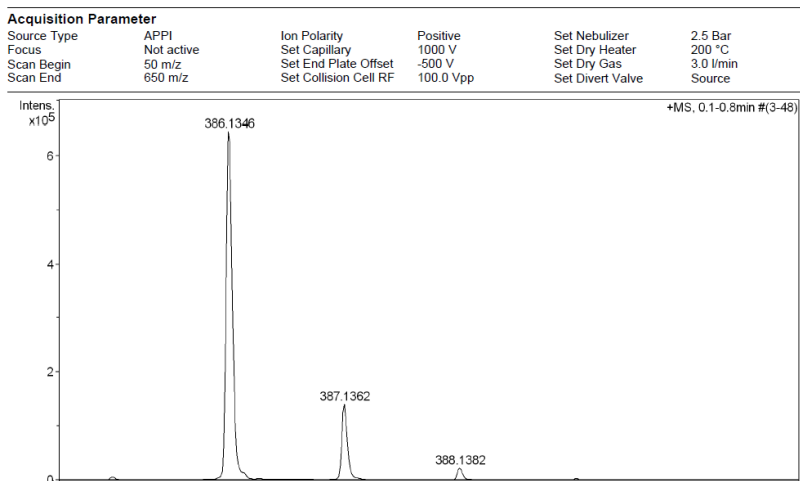


Figura 202. Espectro de massas de alta resolução do composto **9s**.

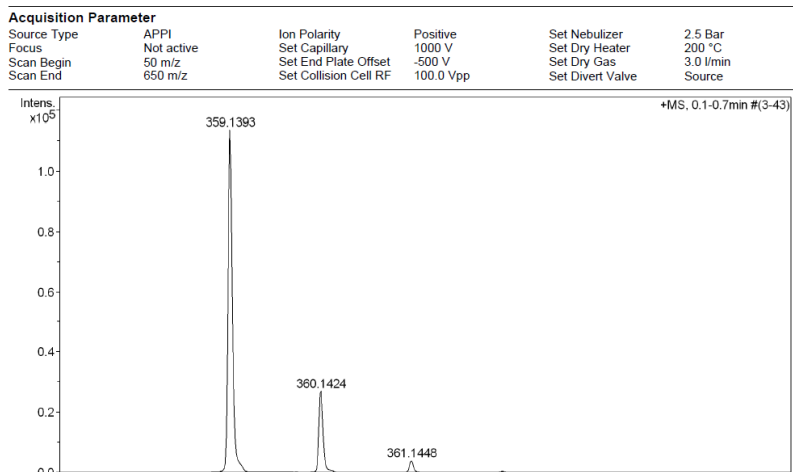


Figura 203. Espectro de massas de alta resolução do composto **9t**.

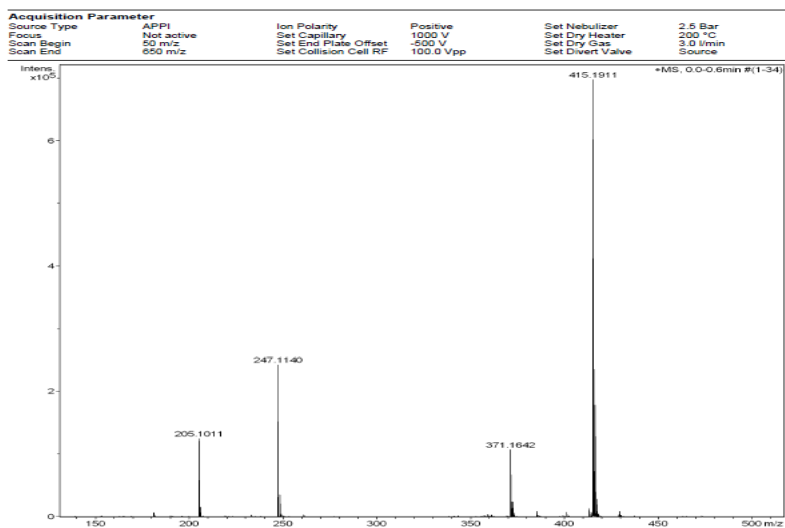


Figura 204. Espectro de massas de alta resolução do composto **9u**.

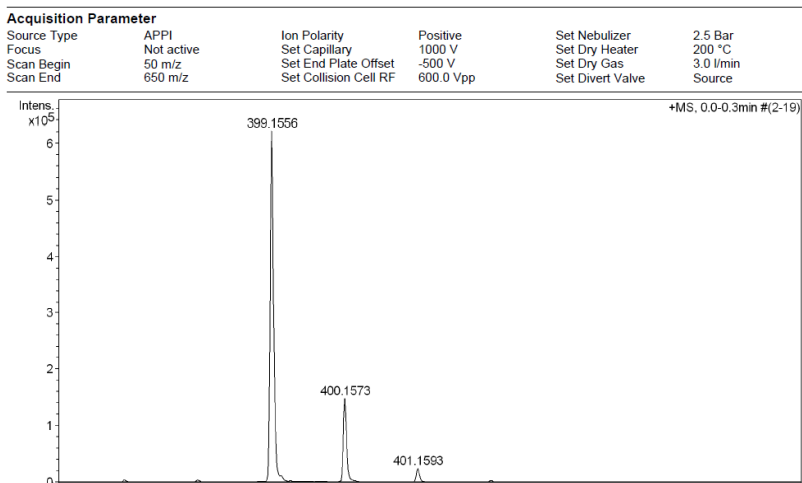


Figura 205. Espectro de massas de alta resolução do composto **9v**.

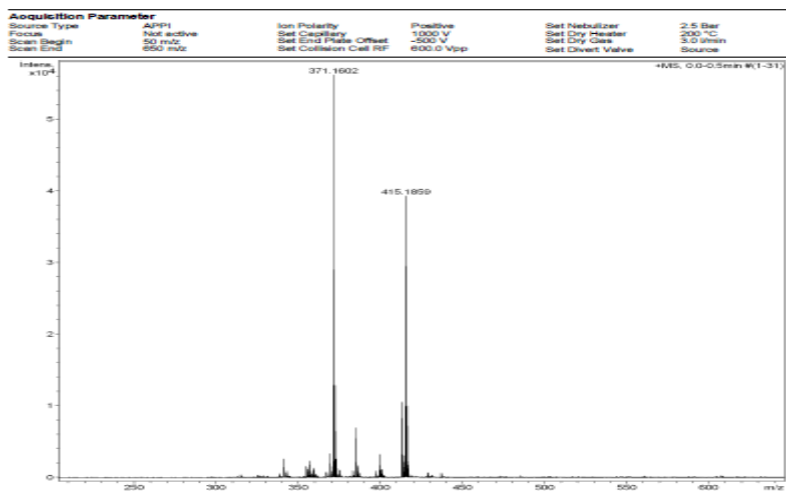


Figura 206. Espectro de massas de alta resolução do composto **9w**.

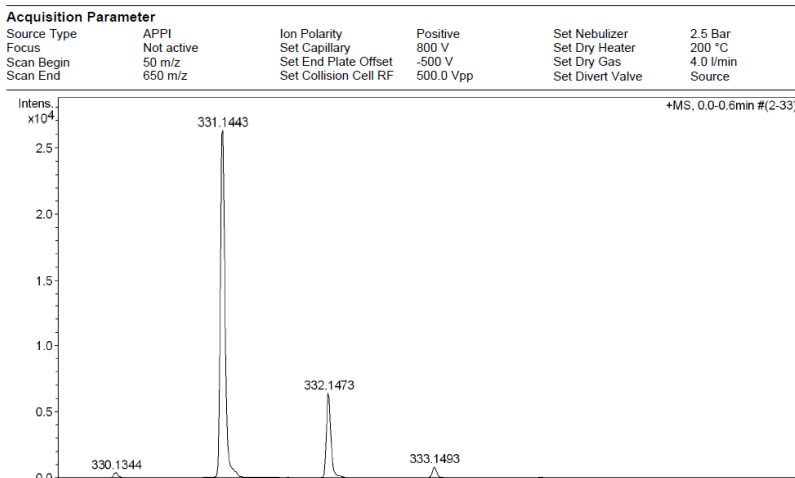
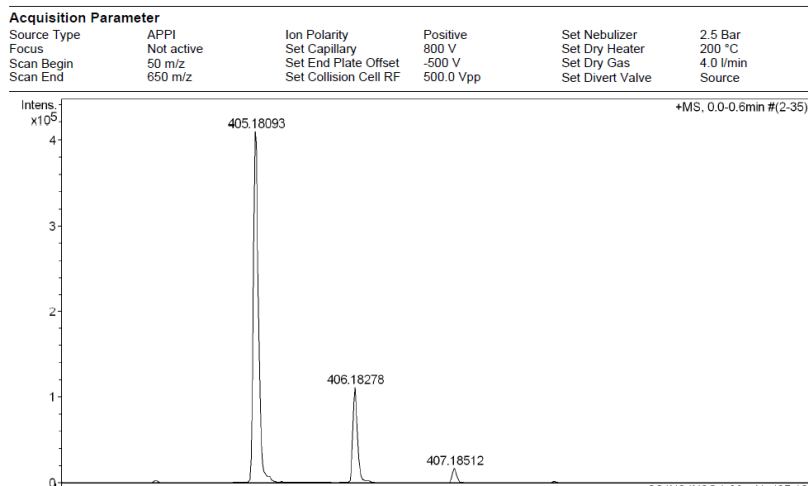


Figura 207. Espectro de massas de alta resolução do composto **9x**.



APÊNDICE III –
Artigos publicados
e em fase de submissão
relacionados à tese.

Symmetric Bis-chalcones as a New Type of Breast Cancer Resistance Protein Inhibitors with a Mechanism Different from That of Chromones

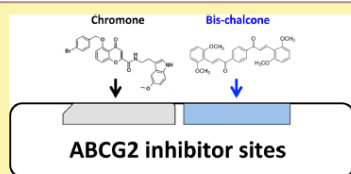
Evelyn Winter,^{†,‡} Patrícia Devantier Neuenfeldt,[§] Louise Domeneghini Chiaradia-Delatorre,[§] Charlotte Gauthier,[†] Rosendo Augusto Yunes,[§] Ricardo José Nunes,[§] Tânia Beatriz Creczynski-Pasa,[‡] and Attilio Di Pietro^{*,†}

[†]Equipe Labélisée Ligue 2014, BMSSI UMR5086 CNRS/Université Lyon 1, IBCP, 69367 Lyon, France

[‡]Department of Pharmaceutical Sciences, PGFAR, Federal University of Santa Catarina, 88040-900 Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

[§]Department of Chemistry, Federal University of Santa Catarina, 88040-900 Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

ABSTRACT: Potent ABCG2 inhibitors were recently identified as asymmetric chromones with different types of substituents. We here synthesized symmetric bis-chalcones that were differently substituted and screened for their ability to inhibit mitoxantrone efflux from ABCG2-transfected HEK293 cells. Potent bis-chalcone inhibitors were identified, the efficiency depending on both positions of the central ketone groups and the number and positions of lateral methoxy substituents. The best derivative, namely, **1p**, was selective for ABCG2 over P-glycoprotein and MRP1, appeared not to be transported by ABCG2, and was as potent as various drug-selected cancer cells overexpressing ABCG2. Compound **1p** stimulated the ABCG2 basal ATPase activity by contrast to a chromone lead that inhibited it, suggesting different mechanisms of interaction. Combination of both types of inhibitors produced synergistic effects, leading to complete inhibition at very low concentrations.



INTRODUCTION

One major obstacle for treating tumors by chemotherapy is cancer cell multidrug resistance, which may be caused by several factors including the overexpression of ATP-binding cassette (ABC) transporters. These transporters are transmembrane proteins working as efflux pumps to reduce the intracellular concentration of drugs.^{1,2} A total of 48 genes encode ABC transporters in humans, of which only three are recognized to be associated with low prognostic in cancer patients: ABCB1/P-glycoprotein, ABCG1/MRP1 (multidrug resistance protein 1), and ABCG2/BCRP (breast cancer resistance protein).³ P-glycoprotein (P-gp) was the first multidrug ABC transporter to be discovered and extensively studied.⁴ MRP1 was later also associated with multidrug resistance,⁵ while BCRP was more recently identified.^{6–8}

One of the strategies to eliminate resistant tumors is to use inhibitors of the multidrug ABC transporters. Combination of inhibitors with anticancer drugs should increase drug accumulation inside the cell. In vitro, a number of P-gp inhibitors have been optimized up to third- or fourth-generation compounds, but their intrinsic toxicity and low in vivo activity prevented finalizing of clinical trials.^{9–11}

ABCG2 is a protein composed of 655 aminoacids, constituting a “half-transporter” containing only one cytosolic

nucleotide-binding domain and one transmembrane domain with six α -helical spans. This transporter is present in various membrane barriers protecting sensitive organs, as well as in many types of cancer concerning breast, lung, pancreas, colon, and leukemias.^{12,13} The first specific ABCG2 inhibitor of natural origin was fumitremorgin C (FTC), which displayed a serious neurotoxicity.¹⁴ Synthetic derivatives were developed resulting in highly potent Ko143, which still retained some residual toxicity.^{15,16} New-generation inhibitors of other types have been developed, but very few have been tested with in vivo animal models.¹⁷

Screening of different classes of flavonoids identified interesting inhibitors such as hydrophobic flavones^{18,19} and asymmetric chalcones with a variety of substituents^{20–22} for establishing structure–activity relationships. The best compound recently identified to be nearly as potent as Ko143 was chromone **6g**,²³ which in this work was renamed as chromone **1** (Figure 1) for the comparative study with a number of derivatives to characterize the inhibition mechanism toward both drug efflux and ATPase activity.²⁴ In the present work, to better understand the structure–activity relationships and their

Received: December 6, 2013

Published: March 10, 2014

**Synthetic 1,3,5-triaryl-2-pyrazolines derived from chalcones as a new class
of tyrosine phosphatase inhibitors**

Patrícia Devantier Neuenfeldt^{a#}, Louise Domeneghini Chiaradia-Delatorre^{a,b#},
Deise Juliana Kolling^{b#}, Priscila Graziela Alves Martins^b, Angela Camila Orbem
Menegatti^b, Mattia Mori^d, Lorenzo Botta^e, Alessandra Mascarello^a, Paulo César
Leal^b, Wilson Cunico,^c Ricardo José Nunes^{a,*}, Hernán Terenzi^{b,*}

*^aLaboratório Estrutura e Atividade – LEAT, Departamento de Química, Centro
de Ciências Físicas e Matemáticas; Universidade Federal de Santa Catarina,
Campus Trindade, 88040–900, Florianópolis–SC, Brasil.*

*^bCentro de Biologia Molecular Estrutural – CEBIME; Universidade Federal de
Santa Catarina, Campus Trindade, 88040–900, Florianópolis–SC, Brasil.*

*^cLaboratório de Química Aplicada à Bioativos – LaQuiABio; Centro de Ciências
Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos; Universidade Federal de Pelotas,
Campus Universitário SN, 96160-000, Capão do Leão –RS, Brasil.*

*^dCenter for Life NanoScience@LaSapienza, Istituto Italiano di Tecnologia, Viale
Regina Elena 291, 00161 Rome, Italy.*

*^eDipartimento di Biotecnologie, Chimica e Farmacia, Università degli studi di
Siena, via Aldo Moro 2, 53100 Siena, Italy*

These authors contributed equally in this study.

***Corresponding Authors:**

Prof. Dr. Hernán Terenzi
Centro de Biologia Molecular Estrutural
Departamento de Bioquímica

Universidade Federal de Santa Catarina
Campus Trindade
CEP: 88040–900
Florianópolis – SC, Brasil
Tel.: +55 48 3721 6426
Fax: +55 48 3721 9672

E-mail: hterenzi@ccb.ufsc.br

Prof. Dr. Ricardo José Nunes
Departamento de Química
Universidade Federal de Santa Catarina
Campus Trindade
CEP: 88040-900
Florianópolis – SC, Brasil
Tel.: +55 48 3721 6844 r.236
Fax: +55 48 3721 6850
E-mail: nunes@qmc.ufsc.br

Abstract

Protein tyrosine phosphatases (PTPs) constitute a family of closely related regulatory enzymes that, together with the protein tyrosine kinases (PTKs), plays a key role in controlling the state of phosphorylation of tyrosine residues within the cell. Disorders of the human PTPs activity cause diseases such as cancer, diabetes, neurological disorders and autoimmune diseases. On the other hand, the bacterial PTPs play an important role in determining bacterial pathogenicity, by interfering with the cellular signaling of the macrophage. Thus, the search for inhibitors of PTPs appears as a new strategy to combat diseases related to human PTPs and for the treatment of bacterial infections. In this study, we synthesized a series of 1,3,5-triaryl-2-pyrazolines derived from chalcones that had already shown activity as inhibitors of PtpA and PtpB from *Mycobacterium tuberculosis* or of YopH from *Yersinia enterocolitica*. The synthesized compounds were assayed against these same proteins, and also against the human PTP1B. The structural modification of the chalcones, which have a flexible and planar structure, to a more rigid structure like that of pyrazolines, might provoke changes in activity and in the mechanism of action of the new compounds.

(ARTIGO EM FASE DE SUBMISSÃO PARA A REVISTA *JOURNAL MEDICINAL CHEMISTRY*)