

Jéssica Berens

Síntese de pirazolinas via reação *one-pot* irradiada por micro-ondas e avaliação da atividade inibitória frente à PtpA de *Mycobacterium tuberculosis*

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Química

Área de concentração: Química Orgânica

Orientador: Prof. Dr. Ricardo José Nunes

Co-orientadora: Profa. Dra. Patrícia Devantier Neuenfeldt

Florianópolis
2017

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

Berens, Jéssica

Síntese de pirazolinias via reação one-pot irradiada por micro-ondas e avaliação da atividade inibitória frente à PtpA de Mycobacterium tuberculosis / Jéssica Berens ; orientador, Ricardo José Nunes, coorientadora, Patrícia Devantier Neuenfeldt, 2017.
110 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Programa de Pós-Graduação em Química, Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

1. Química. 2. Química. 3. Química Medicinal. 4. Síntese Orgânica. I. Nunes, Ricardo José. II. Neuenfeldt, Patrícia Devantier. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Química. IV. Título.

Jéssica Berens

Síntese de pirazolinias via reação one-pot irradiada por micro-ondas e avaliação da atividade inibitória frente à PtpA de *Mycobacterium tuberculosis*

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de Mestre em Química e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 4 de agosto de 2017.

Prof. Dr. Vanderlei Gageiro Machado
Coordenador do Programa de Pós Graduação em Química

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Ricardo José Nunes
Orientador

Prof.^a Dr.^a Maria da Graça
Nascimento
(QMC-UFSC)

Prof.^a Dr.^a Patrícia Devantier
Neuenfeldt
Coorientadora

Prof. Dr. Rogerio Correa
(UNIVALI)

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, Professor Ricardo José Nunes, pela oportunidade de fazer parte do LEAT (Laboratório de Estrutura e Atividade), pela orientação, ensinamentos e parceria durante a Iniciação Científica e Mestrado.

À minha co-orientadora, Professora Patrícia D. Neuenfeldt, por toda ajuda, paciência, ensinamentos, amizade e incentivo, és um exemplo para mim.

Ao Prof. Dr. Hernán Terenzi e às meninas do CEBIME (Centro de Biologia Molecular Estrutural) para que os testes biológicos fossem possíveis.

A todos do LEAT; Dalila, Jéssica, Larissa, Lucas e Luiz por toda parceria no dia a dia, troca de conhecimentos e convívio no laboratório, contribuindo em minha vida profissional e pessoal.

Aos meus pais, Valéria e Bennie, por todo apoio e incentivo durante toda minha vida. A toda minha família e ao meu noivo, Áthila, pelo companheirismo, apoio e imensa paciência.

Aos professores da banca examinadora Dra. Maria da Graça Nascimento, Dra. Inês Maria Costa Brighente e Dr. Rogério Corrêa, por todas as contribuições para este trabalho.

Ao Departamento de Química da UFSC, à Central de Análises pelas análises espectroscópicas e à CAPES pelo suporte financeiro.

RESUMO

Neste trabalho foi desenvolvida uma rota sintética para obtenção de diferentes pirazolinas via reação *one-pot* irradiada por micro-ondas, visando melhor eficiência e diminuição de quantidade de resíduo gerado. A metodologia envolve na primeira etapa a adição da 2,5-dimetoxiacetofenona e o 2-naftaldeído em etanol e KOH 50% a 50 °C por 5 minutos sob irradiação de micro-ondas. Após este período, foi adicionado hidrazina hidratada e a reação foi mantida por mais 10 minutos a 75 °C irradiada por micro-ondas, obtendo o produto em bom rendimento. Aplicando a metodologia desenvolvida, onze pirazolinas foram planejadas visando atividade inibitória frente à proteína tirosina fosfatase A de *Mycobacterium tuberculosis* (PtpA de Mtb), sendo 7 delas inéditas na literatura (**5a**, **5b**, **5c**, **5e**, **5f**, **5i** e **5j**), onde foram determinados os valores de IC₅₀ de nove delas (IC₅₀ entre 11,4 e 66,7 μM). Com isto a pirazolina **5c**, que obteve menor valor de IC₅₀, foi submetida a testes de seletividade frente a inibição de outras fosfatases (PtpB, YopH, PEST e LYP) onde demonstrou ser seletiva para PtpA com índice de seletividade (SI) superiores a 1. Ensaios de reversibilidade mostrou que a pirazolina **5c** é um inibidor rapidamente reversível, sendo submetida a determinação da cinética enzimática mostrando ser um inibidor não-competitivo.

Palavras chaves: pirazolina, micro-ondas, tuberculose.

ABSTRACT

In this work a synthetic route was developed to obtain different pyrazolines via *one-pot* reaction irradiated by microwave, seeking better efficiency and decrease of the amount of generated waste. The methodology involves in the first step the addition of 2,5-dimethoxyacetophenone and 2-naphthaldehyde in ethanol and a solution of KOH (50%) at 50 °C for 5 minutes under microwave irradiation. After this time, hydrazine hydrate was added and the reaction was maintained for 10 minutes at 75 °C irradiated by microwave, obtaining the product in good yield. Applying the methodology, eleven pyrazolines were designed for inhibition activity of protein tyrosine phosphatase A from *Mycobacterium tuberculosis* (PtpA de Mtb), 7 of them unpublished in the literature (**5a**, **5b**, **5c**, **5e**, **5f**, **5i** e **5j**) where the IC₅₀ values of nine of them were determined (IC₅₀ between 11.4 - 66.7 μM). Therefore, the pyrazoline **5c** which obtained a lower IC₅₀ value, was submitted to selectivity tests against the inhibition of other protein phosphatases (PtpB, YopH, PEST and LYP) and the results showed that the pyrazoline **5c** is selective for PtpA with selectivity index (SI) above 1. Reversibility assays showed that pyrazoline **5c** is a rapidly reversible inhibitor, and then submitted to enzyme kinetics studies showing to be a non-competitive inhibitor.

Key words: pyrazoline, microwave, tuberculosis.

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 3. Síntese de chalconas via condensação de Claisen-Schmidt.....	28
Esquema 4. Síntese de chalconas via acoplamento de Suzuki-Miyaura (A) e acoplamento de Heck (B).....	29
Esquema 1. Síntese multicomponente para obtenção da pirazolina 4	35
Esquema 2. Síntese one-pot para obtenção da pirazolina 5a ...	35
Esquema 5. Mecanismo proposto para síntese da chalcona 8a	43
Esquema 6. Mecanismo proposto para a síntese da pirazolina 4	43
Esquema 7. Síntese dos subprodutos 6 e 7	46
Esquema 8. Síntese da pirazolina 5a via reação one-pot.	47

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura geral das pirazolinas.	20
Figura 2. Fármacos de primeira escolha.....	23
Figura 3. Fármacos de segunda escolha.....	24
Figura 4. Inibidores de PtpA de Mtb: (1) análogo da roseofilina, (2) análogo da prodigiosina, (3) análogo da estevastelina.	26
Figura 5. Chalconas ativas em PtpA de Mtb derivadas do 1- e 2-naftaldeído.....	27
Figura 6. Estrutura geral das chalconas.	27
Figura 7. Estrutura geral das pirazolinas.	30
Figura 8. Pirazolinas ativas em PtpA, PtpB e YopH.	30
Figura 9. Síntese de pirazolina em refluxo.....	31
Figura 10. Comparação entre aquecimento via irradiação de micro-ondas (A) e aquecimento convencional (B).	34
Figura 11. Espectro de RMN de ¹ H da pirazolina 4 (400 MHz, CDCl ₃).....	40
Figura 12. Ampliação do espectro de RMN de ¹ H da pirazolina 4 (400 MHz, CDCl ₃).....	41
Figura 13. Espectro de RMN de ¹³ C da pirazolina 4 (200 MHz, CDCl ₃).....	42
Figura 14. Cromatograma de HPLC da mistura obtida.....	44
Figura 15. Espectro de RMN de ¹ H da mistura obtida (200 MHz, CDCl ₃).....	45
Figura 16. Espectro de RMN de ¹ H da pirazolina 5a (200 MHz DMSO).....	51
Figura 17. Ampliação do espectro de RMN de ¹ H da pirazolina 5a (2,0 – 5,5 ppm) (200 MHz, DMSO).	52
Figura 18. Espectro de DEPT-135 da pirazolina 5a (50 MHz, CDCl ₃).....	53
Figura 19. Ampliação do espectro de DEPT-135 da pirazolina 5a (50 MHz, CDCl ₃).....	53
Figura 20. Ampliação do espectro de RMN de ¹³ C da pirazolina 5a (110 – 155 ppm) (50 MHz, CDCl ₃).....	54
Figura 21. Conversão do pNPP em pNP.	55
Figura 22. Resultados de reversibilidade esperados para: Curva a) representa o esperado para o controle na ausência de inibidor; b) rapidamente reversível; c) lentamente reversível e d) irreversível ou muito lentamente reversível.	61
Figura 23. Teste de reversibilidade da pirazolina 5c	62
Figura 24. Perfil cinético para o composto 5c	64

Figura 25. Metodologia para obtenção da pirazolina 5a	65
Figura 26. Espectro de RMN de ^1H da pirazolina 4 (400 MHz, CDCl_3).	93
Figura 27. Espectro de RMN de ^{13}C da pirazolina 4 (50 MHz, CDCl_3).	93
Figura 28. Espectro de RMN de ^1H da pirazolina 5a (200 MHz, CDCl_3).	94
Figura 29. Espectro de RMN de ^{13}C da pirazolina 5a (50 MHz, CDCl_3).	94
Figura 30. Espectro de massas de alta resolução da pirazolina 5a	95
Figura 31. Espectro de RMN de ^1H da pirazolina 5b (200 MHz, CDCl_3).	95
Figura 32. Espectro de RMN de ^{13}C da pirazolina 5b (50 MHz, CDCl_3).	96
Figura 33. Espectro de massas de alta resolução da pirazolina 5b	96
Figura 34. Espectro de RMN de ^1H da pirazolina 5c (200 MHz, CDCl_3).	97
Figura 35. Espectro de RMN de ^{13}C da pirazolina 5c (50 MHz, CDCl_3).	97
Figura 36. Espectro de massas de alta resolução da pirazolina 5c	98
Figura 37. Espectro de RMN de ^1H da pirazolina 5d (200 MHz, CDCl_3).	98
Figura 38. Espectro de RMN de ^{13}C da pirazolina 5d (50 MHz, CDCl_3).	99
Figura 39. Espectro de massas de alta resolução da pirazolina 5d	99
Figura 40. Espectro de RMN de ^1H da pirazolina 5e (200 MHz, CDCl_3).	100
Figura 41. Espectro de RMN de ^{13}C da pirazolina 5e (50 MHz, CDCl_3).	100
Figura 42. Espectro de massas de alta resolução da pirazolina 5e	101
Figura 43. Espectro de RMN de ^1H da pirazolina 5f (200 MHz, CDCl_3).	101
Figura 44. Espectro de RMN de ^{13}C da pirazolina 5f (50 MHz, CDCl_3).	102
Figura 45. Espectro de massas de alta resolução da pirazolina 5f	102

Figura 46. Espectro de RMN de ^1H da pirazolina 5g (200 MHz, CDCl_3).....	103
Figura 47. Espectro de RMN de ^{13}C da pirazolina 5g (50 MHz, CDCl_3).....	103
Figura 48. Espectro de massas de alta resolução da pirazolina 5g	104
Figura 49. Espectro de RMN de ^1H da pirazolina 5h (200 MHz, CDCl_3).....	104
Figura 50. Espectro de RMN de ^{13}C da pirazolina 5h (50 MHz, CDCl_3).....	105
Figura 51. Espectro de massas de alta resolução da pirazolina 5h	105
Figura 52. Espectro de RMN de ^1H da pirazolina 5i (200 MHz, CDCl_3).....	106
Figura 53. Espectro de RMN de ^{13}C da pirazolina 5i (50 MHz, DMSO).....	106
Figura 54. Espectro de massas de alta resolução da pirazolina 5i	107
Figura 55. Espectro de RMN de ^1H da pirazolina 5j (200 MHz, CDCl_3).....	107
Figura 56. Espectro de RMN de ^{13}C da pirazolina 5j (50 MHz, CDCl_3).....	108
Figura 57. Espectro de massas de alta resolução da pirazolina 5j	108
Figura 58. Espectro de RMN de ^1H da pirazolina 5k (200 MHz, CDCl_3).....	109
Figura 59. Espectro de RMN de ^{13}C da pirazolina 5k (50 MHz, DMSO).....	109
Figura 60. Espectro de massas de alta resolução da pirazolina 5k	110

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Influência do catalisador para obtenção de 4	37
Tabela 2. Influência dos parâmetros reacionais para obtenção de 4	38
Tabela 3. Influência dos parâmetros reacionais para obtenção de 5a	48
Tabela 4. Rendimentos e p.f. obtidos para as pirazolinas 5a-k	50
Tabela 5. Atividade de inibição de PtpA (%) na presença de 25 uM das pirazolinas.	56
Tabela 6. Valores de IC ₅₀ das pirazolinas 5a-k frente a inibição da PtpA.....	57
Tabela 7. Valores de IC ₅₀ dos compostos 5a-k , 9a-k , 10a-k e 8a-k frente a inibição da PtpA de Mtb.....	58
Tabela 7. Valores de IC ₅₀ dos compostos 5a-k , 9a-k , 10a-k e 8a-k frente a inibição da PtpA de Mtb (<i>continuação</i>).....	59
Tabela 8. Valores de IC ₅₀ da pirazolina 5c frente a inibição da YopH, PtpB, Lyp e Pest e índice de seletividade.	60

LISTA DE ABREVIATURAS

δ	Deslocamento químico
Δ	Aquecimento
Ar	Aril
BCG	Bacilo de Calmette-Guérin
BK	Bacilo de Koch
CCD	Cromatografia em camada delgada
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
CEBIME	Centro de biologia molecular e estrutural
d	Dupleto
dd	Duplo dupleto
DEPT	Do inglês, Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Desvio padrão
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
GHz	Gigahertz
HIV	Do inglês, <i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HPLC	Do inglês, <i>High performance liquid chromatography</i>
Hz	Hertz
IC ₅₀	Concentração inibitória de 50%
IMAC	Do inglês, <i>Immobilized-metal affinity chromatography</i>
IPTG	Isopropil- α -D-tiogalactopiranosideo

IS	SI - do inglês <i>selectivity index</i>
IUPAC	Do inglês, <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
<i>J</i>	Constante de acoplamento
LB	Luria-Bertani
MDR	Tuberculose multirresistente
MO	Micro-ondas
Mtb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
p.f.	Ponto de fusão
PMSF	Do inglês, <i>Phenylmethylsulfonyl fluoride</i>
<i>p</i> NP	<i>p</i> -nitrofenol
<i>p</i> NPP	<i>p</i> -nitrofenilfosfato
ppm	Partes por milhão
PTP	Proteína Tirosina Fosfatase
PtpA	Proteína tirosina fosfatase A de <i>M. tuberculosis</i>
PtpB	Proteína tirosina fosfatase B de <i>M. tuberculosis</i>
pTSA	Ácido <i>p</i> -toluenossulfônico
rf	Fator de retenção
RMN de ¹³ C	Ressonância magnética de carbono
RMN de ¹ H	Ressonância magnética de hidrogênio
s	Simpleto
t	Tripleto
T	Temperatura
t.a.	Temperatura ambiente
TB	Tuberculose
TMS	Tetrametilsilano
UV	Ultravioleta

VPS33B	Do inglês, <i>Vacuolar protein sorting 33B</i> . Regulador de membrana de fusão, substrato da PtpA de <i>M. tuberculosis</i> .
W	Watt
XDR	Tuberculose Extensivamente Resistente
YopH	Do inglês, <i>Yersinia outer protein H</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1. QUÍMICA MEDICINAL	18
1.2. TUBERCULOSE	19
1.3. CHALCONAS E PIRAZOLINA	20
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	22
2.1. TUBERCULOSE	22
2.1.1. Inibidores de PtpA e PtpB de Mtb	26
2.2. CHALCONAS E PIRAZOLINAS.....	27
2.3. QUÍMICA VERDE	32
2.3.1. Micro-ondas (MO).....	33
3. OBJETIVOS	35
3.1. OBJETIVO GERAL	35
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	35
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
4.1. PREPARAÇÃO DA PIRAZOLINA 4 VIA REAÇÃO MULTICOMPONENTE	37
4.2. ATIVIDADE BIOLÓGICA	55
4.2.1. Medidas da atividade residual de PtpA das pirazolinas 5a-k.....	55
4.2.2. Determinação dos valores de IC₅₀ das pirazolinas	56
4.2.3. Ensaios de seletividade da pirazolina 5c	60
4.2.4. Teste de reversibilidade da pirazolina 5c frente à inibição da PtpA	61
4.2.5. Avaliação dos parâmetros cinéticos da PtpA e mecanismo de inibição da pirazolina 5c.....	62
5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	65
6. SEÇÃO EXPERIMENTAL.....	67
6.1. INSTRUMENTAÇÃO E REAGENTES.....	67
6.2. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	68

6.2.1.	<i>Procedimento geral para obtenção da pirazolina 4</i>	68
6.2.2.	<i>Procedimento geral para obtenção das chalconas 8a-k</i>	69
6.2.3.	<i>Procedimento geral para obtenção das pirazolinas 5a-k sob refluxo</i>	69
6.2.4.	<i>Procedimento geral para obtenção das pirazolinas 5a-k sob irradiação de micro-ondas</i>	70
6.2.5.	<i>Expressão e purificação da PtpA</i>	76
6.2.6.	<i>Medidas da atividade residual de PtpA das pirazolinas</i>	78
6.2.7.	<i>Determinação dos valores de IC₅₀ das pirazolinas</i>	78
6.2.8.	<i>Ensaio de seletividade da pirazolina 5c</i>	79
6.2.9.	<i>Ensaio de reversibilidade da pirazolina 5c</i>	79
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81
	APÊNDICE	93

1. INTRODUÇÃO

1.1. QUÍMICA MEDICINAL

A química medicinal, de acordo com a IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry), é uma área de estudo que envolve a descoberta, planejamento, síntese, estudo de relação entre a estrutura química e atividade, e determinação do mecanismo de ação de compostos capazes de constituírem novos fármacos. Assim sendo, a química medicinal engloba conhecimentos de diversas áreas como química orgânica, físico-química, bioquímica, biologia, matemática, entre outras.^{1,2}

Esta descoberta de novos fármacos inclui três fases importantes: I. etapa de descobrimento – consiste na identificação e produção de novas substâncias ativas (originadas da síntese orgânica ou de produtos naturais); II. etapa de otimização – baseia-se nas modificações sintéticas da estrutura química (a fim de aumentar a potência, seletividade e diminuir a toxicidade); III. etapa de desenvolvimento – visa a otimização das rotas sintéticas para viabilizar a produção em larga escala.³

De maneira geral, os fármacos utilizados hoje em dia são de origem sintética (aproximadamente 85%) e uma das estratégias que vem sendo utilizadas no planejamento de novos fármacos é a hibridização molecular. Esta, abrange a união estrutural de fragmentos bioativos de diferentes compostos visando obter um novo composto com maior atividade biológica.⁴

1.2. TUBERCULOSE

A *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) é uma bactéria patogênica causadora da tuberculose (TB); doença infecciosa a qual a transmissão ocorre de pessoa para pessoa por via aérea.⁵

Constantemente a TB é vista como uma doença do passado; onde ficou conhecida como “peste branca” ou “peste cinzenta” devido aos altos índices de mortalidade durante o século XIX e XX. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), apesar de já existir tratamento quase 2 milhões de mortes ao ano são relacionadas a TB atualmente. O tratamento inicialmente é feito por até quatro comprimidos diários do Coxcip 4 (comprimido contendo rifampicina, isoniazida, pirazinamida e etambutol) por dois meses, e mais quatro meses com dois comprimidos diários de rifampicina e isoniazida. Na falha deste tratamento, outros medicamentos são utilizados (com maior risco de efeito tóxico e menor potência terapêutica) por 12 meses. Deste modo, a OMS estima que 49 milhões de vidas foram salvas entre 2000-2015. Porém, somente no ano de 2015, cerca de meio milhão de pessoas desenvolveram resistência a múltiplos medicamentos (MDR-TB) durante o tratamento.⁶⁻¹⁰

No hospedeiro, o Mtb libera duas proteínas: a proteína tirosina fosfatase A (PtpA) e a proteína tirosina fosfatase B (PtpB), sendo essas duas proteínas responsáveis pela sobrevivência do Mtb.¹¹

Com isto, aumenta a busca por caminhos alternativos no tratamento da TB como a inibição das duas proteínas chaves, a PtpA e PtpB. Deste modo, nosso grupo de pesquisa vem

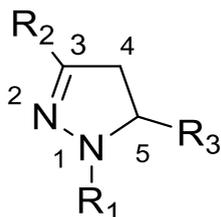
estudando a inibição dessas proteínas por chalconas sintéticas, as quais vem demonstrando ser uma classe promissora de compostos para a inibição da PtpA e PtpB.^{12,13}

1.3. CHALCONAS E PIRAZOLINA

Chalconas são cetonas aromáticas α,β -insaturadas e já são reportados na literatura diversas atividades biológicas.¹⁴⁻²⁵ Variadas metodologias são reportadas na literatura para obtenção dessa classe de compostos,²⁶⁻³⁰ sendo a mais utilizada a condensação aldólica descrita por Vogel em 1989.³¹

Além disto, por meio da ciclização de chalconas pode-se obter as pirazolinis; heterociclos de 5 membros, as quais possuem diversas aplicações na química medicinal (Figura 1).³²⁻³⁷

Figura 1. Estrutura geral das pirazolinis.



Frequentemente as pirazolinis são obtidas por meio de chalconas em refluxo de ácido acético, o que leva a acetilação da pirazolina e tempos reacionais consideravelmente elevados.³⁸⁻⁴⁰ Também é reportado na literatura a síntese de pirazolinis sob irradiação de micro-ondas, levando a diminuição do tempo de reação, porém, acetilando o produto final.⁴¹

Desta forma, tendo em vista a importância biológica de diferentes pirazolininas e levando em consideração a necessidade prévia de obtenção da chalcona correspondente, planejou-se o desenvolvimento de uma nova metodologia para obtenção destas (sem ocorrer a acetilação *in situ*) não sendo necessário isolar a chalcona previamente, levando a diminuição do tempo reacional. Além disto, avaliar a atividade inibitória das pirazolininas obtidas frente a PtpA de Mtb.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. TUBERCULOSE

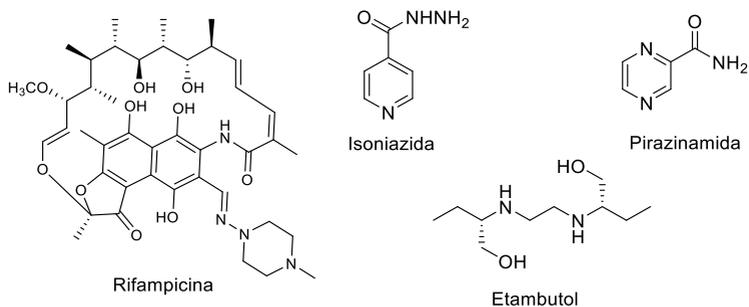
A tuberculose é uma doença infecciosa grave, causada pela bactéria *Mycobacterium tuberculosis* ou Bacilo de Koch (BK), que afeta principalmente os pulmões. É uma doença de transmissão aérea, ocorrendo pela inalação de gotículas contendo bacilos expelidos pela fala, espirro e tosse de pessoas com tuberculose ativa.⁴²

Os sintomas mais comuns da TB são tosse crônica, febre, suor noturno, perda de apetite, dor no torax e falta de disposição.⁴³

Atualmente a vacina BCG (bacilo de Calmette-Guérin) é uma forma de proteção da TB em sua forma mais grave, porém esta não garante 100% da prevenção da tuberculose pulmonar. Apesar de grave, a TB é uma doença da qual existe cura. Hoje em dia os fármacos utilizados no tratamento da TB podem ser divididos em dois grupos: os fármacos de primeira escolha e os fármacos de segunda escolha.⁴³⁻⁴⁵

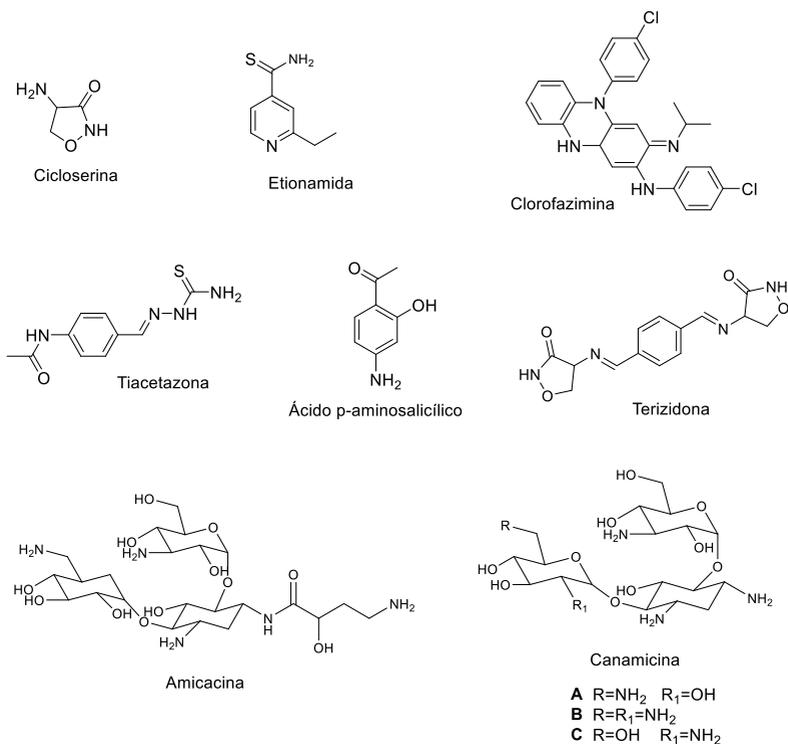
Os fármacos de primeira escolha são a primeira opção para o tratamento da TB e incluem a isoniazida, a rifampicina, o etambutol e a pirazinamida (Figura 2). São fármacos de baixo custo e na maioria dos casos apresentam alto índice de sucesso.⁴³

Figura 2. Fármacos de primeira escolha.



Já os fármacos de segunda escolha são utilizados no caso de insucesso dos fármacos utilizados anteriormente e/ou resistência do bacilo e incluem a amicacina, cicloserina, etionamida, canamicina, clorofazimina, tioacetazona, clorofazimina, ácido p-aminosalicílico e terizidona, estes são fármacos mais caros e associados a maiores efeitos colaterais (Figura 3).⁴³

Figura 3. Fármacos de segunda escolha.



Embora a doença seja curável, o tratamento da TB apresenta diversos obstáculos, como a longa duração terapêutica (ultrapassando 12 meses de tratamento quando necessário a utilização dos fármacos de segunda escolha), a falta de informação e de acompanhamento ao paciente e os diversos efeitos colaterais dos medicamentos utilizados como náuseas, asma, vômitos, alterações visuais, diminuição da audição, e até mesmo cegueira, responsáveis estes pela não adesão por parte dos pacientes ao tratamento e o aumento de cepas Resistentes a

Múltiplas Drogas (MDR) (quando apresentam resistência à isoniazida e rifampicina) e Extremamente Resistentes a Medicamentos (XDR) (quando também apresentam resistência à fluorquinolonas, capreomicina, canamicina ou amicacina).^{5,43,46,47}

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, provocando o aparecimento de cepas resistentes.^{44,48}

A Organização Mundial da Saúde (OMS) registrou somente no ano de 2015, 10,4 milhões de novos casos de TB e quase 2 milhões de mortes, sendo quase um quarto das mortes pessoas contaminadas com o vírus do HIV (*Human Immunodeficiency Virus*).⁵

Estudos mostram que a Mtb é capaz de detectar o engolfamento por macrófagos e interferir nas vias de sinalização do hospedeiro para promover sua sobrevivência no hospedeiro. Um desses mecanismos de ação, é a liberação de duas proteínas fosfatase: a proteína tirosina fosfatase A (PtpA) de baixo peso molecular e a proteína tirosina fosfatase B (PtpB). A PtpA consegue atravessar a membrana celular do hospedeiro e desfosforila a VPS33B (proteína citoplasmática), inibindo a maturação dos fagossomos, impedindo assim a fusão destes com os lisossomos, mecanismo pelo qual os macrófagos atuam como microbicida.⁴⁸⁻⁵¹

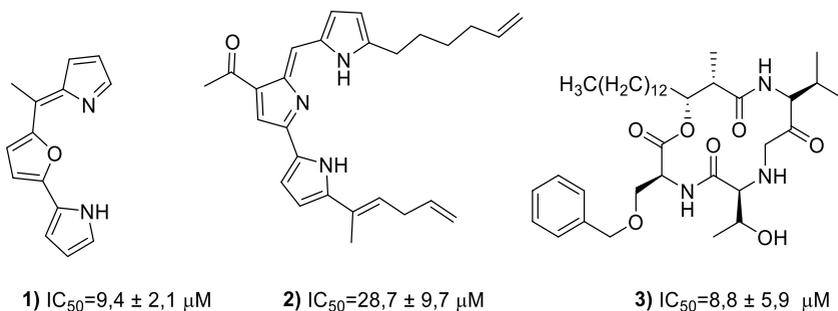
O entendimento dos processos metabólicos e intracelulares do Mtb permite o desenvolvimento de estratégias para a síntese

de novos compostos, que possam agir por mecanismos diferentes daqueles conhecidos para os fármacos atuais, inibindo enzimas chaves nos processos de sinalização celular, como por exemplo, PtpA e B PtpB.⁴⁸

2.1.1. Inibidores de PtpA e PtpB de Mtb

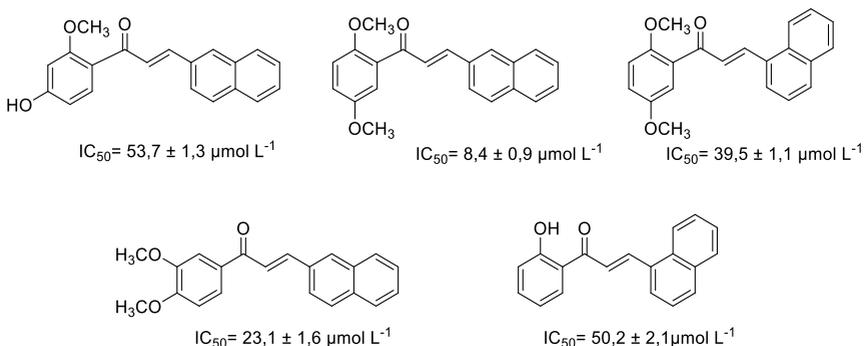
Análogos dos produtos naturais estevastelinas, roseofilinas e prodigiosinas foram os primeiros inibidores de PtpA de Mtb descritos na literatura, com IC_{50} entre 8,8 e 28,7 μ M. (Figura 4).⁵²

Figura 4. Inibidores de PtpA de Mtb: (1) análogo da roseofilina, (2) análogo da prodigiosina, (3) análogo da estevastelina.



Nosso grupo de pesquisa observou que, chalconas sintéticas derivadas do 1- e 2-naftaldeído apresentaram importante inibição da PtpA com IC_{50} de até 8,4 μ M (Figura 5).^{12,13}

Figura 5. Chalconas ativas em PtpA de Mtb derivadas do 1- e 2-naftaldeído.

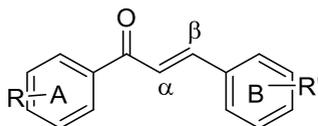


Estudos de relação estrutura-atividade revelam que a presença de um anel hidrofóbico próximo a instauração e de grupos que possam fazer ligações de hidrogênio com resíduos de aminoácidos da enzima próximos à carbonila parecem ser essenciais para a atividade destes compostos na inibição da PtpA.

2.2. CHALCONAS E PIRAZOLINAS

Chalconas são cetonas aromáticas α,β -insaturadas. É uma família de compostos que possui o núcleo 1,3-diarilprop-2-en-1-ona, onde tanto a carbonila quanto a porção olefínica estão ligadas diretamente aos anéis A e B, respectivamente (Figura 6).

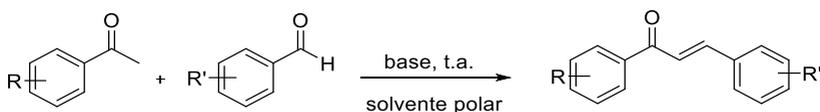
Figura 6. Estrutura geral das chalconas.



As chalconas e seus derivados são de grande interesse na química medicinal pois apresentam diversas atividades biológicas, as quais variam conforme seus substituintes. São reportadas na literatura diversas atividades biológicas, como anti-inflamatória,^{14,15} antileishmaniose,¹⁶ antibacteriana,¹⁷ anticâncer,^{18,19} antioxidante,²⁰⁻²² antifúngica,^{14,23,24} anti-HIV²⁵ e inibidora da tirosina fosfatase A e B de Mtb.^{12,13}

Usualmente as chalconas são obtidas por meio da condensação de uma acetofenona e um benzaldeído via condensação de Claisen-Schmidt descrita por Vogel,³¹ empregando uma base forte como catalisador e solvente polar (Esquema 1).

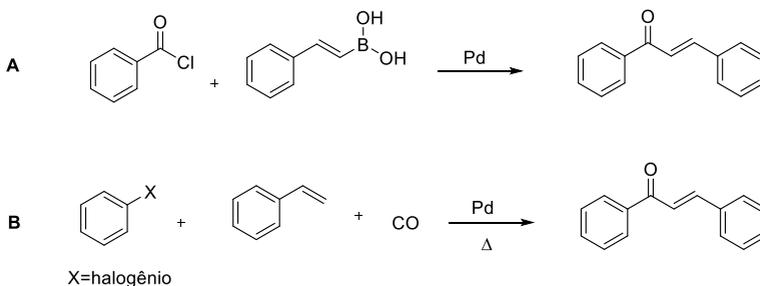
Esquema 1. Síntese de chalconas via condensação de Claisen-Schmidt.



Outras metodologias para a síntese de chalconas também são reportadas na literatura, como a de acoplamento cruzado de Suzuki-Miyaura,²⁶ onde é utilizado ácido fenilvinilborânico e cloreto de benzoíla empregando paládio como catalisador e carbonato de céσιο (Esquema 2 - A) e reação de acoplamento de Heck, fazendo uso de haleto de arila, estireno e paládio na presença de monóxido de carbono (Esquema 2 - B).²⁷ Porém, a reação de condensação aldólica entre benzaldeídos e

acetofenonas é hoje o método mais utilizado devido as condições reacionais mais brandas empregadas.

Esquema 2. Síntese de chalconas via acoplamento de Suzuki-Miyaura (A) e acoplamento de Heck (B).

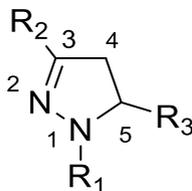


Além do método convencional descrito por Vogel³¹ em 1989 para síntese de chalconas em temperatura ambiente e meio básico por algumas horas, Konieczny e colaboradores²⁸ descreveram em 2007 a síntese de chalconas em meio ácido, empregando ácido acético e ácido sulfúrico em refluxo de 3-24 horas. Buscando otimizar a síntese de chalconas por meio da condensação de Claisen-Schmidt, Srivastava²⁹ publicou em 2008 a obtenção de chalconas empregando carbonato de potássio anidro como catalisador sob irradiação de micro-ondas por 3-5 minutos e Gall e colaboradores em 1999³⁰ publicaram a síntese, também sob irradiação de micro-ondas, em 8 minutos utilizando *p*TSA (ácido *p*-tolueno sulfônico) como catalisador ácido.

Além de relatado na literatura diversas atividades biológicas dos derivados de chalconas, estas também são precursoras para síntese de pirazolinas. Pirazolinas, forma reduzida dos pirazóis, são heterociclos de cinco membros que possuem dois átomos de

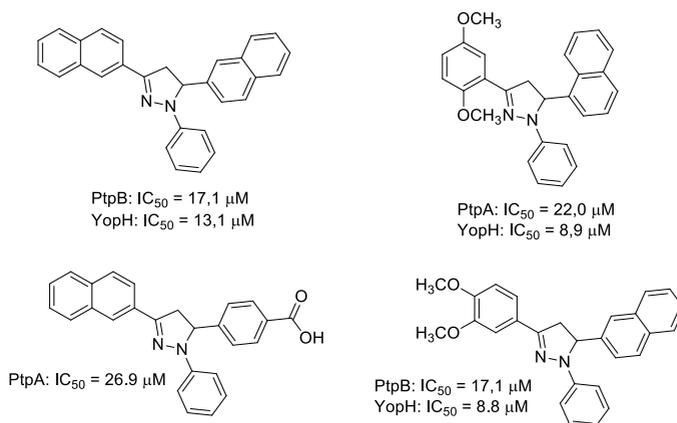
nitrogênios vizinhos e uma instauração. Apresentam formas tautoméricas, sendo geralmente a instauração entre o nitrogênio 2 e o carbono 3 a mais estável (Figura 7).^{53,54}

Figura 7. Estrutura geral das pirazolinas.



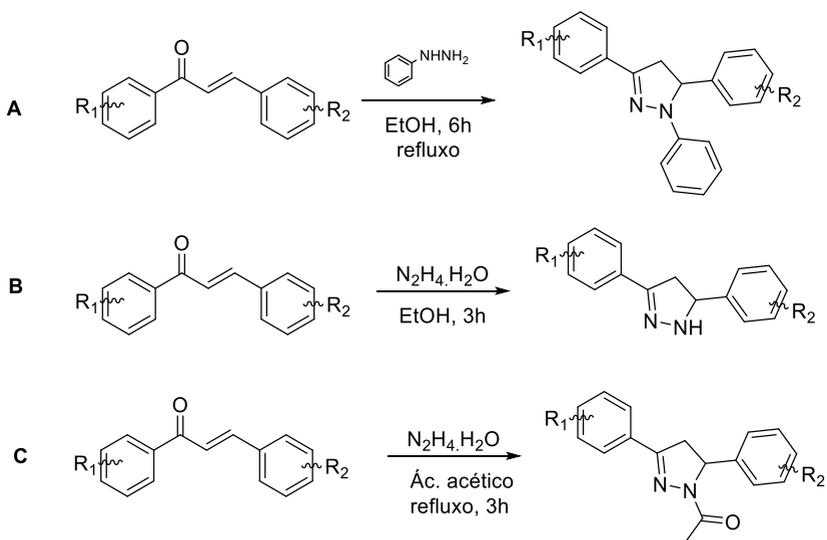
Derivados de pirazolinas vem atraindo atenção na química medicinal pois estão associadas a diversas atividades biológicas, dentre elas atividade antimicrobiana,^{32,33} antidepressiva,³⁴ antibacteriana,³⁵ anti-inflamatória³⁶ e recentemente nosso grupo de pesquisa analisou a atividade inibitória de uma série de pirazolinas frente a inibição da PtpA, PtpB e *Yersinia enterocolitica* (YopH) (Figura 8).³⁷

Figura 8. Pirazolinas ativas em PtpA, PtpB e YopH.



Pirazolinas são obtidas via ciclização de chalconas na presença de hidrazina. Raghav e Singh³⁸ publicaram recentemente a síntese de uma série de pirazolinas, tanto fazendo uso da fenilhidrazina (Figura 9 - A) quanto da hidrazina, em etanol e ácido acético em refluxo (Figura 9 - B e C, respectivamente) por um período de até 6 horas em alto rendimento.

Figura 9. Síntese de pirazolina em refluxo.



Quando realizada a síntese empregando ácido acético como solvente (Figura 9 - C), ocorre a acetilação *in situ*, levando a obtenção de um produto diferente quando na ausência deste (Figura 9 - B).

Também em refluxo e a fim de obter a pirazolina derivada da hidrazina, foram reportadas algumas metodologias na literatura. Kavitha e colaboradores³⁹ publicaram a síntese de pirazolinas, partindo da chalcona correspondente, com hidrazina hidratada e etanol em refluxo por um período de até 10 horas.

A fim de otimizar a síntese para obtenção de pirazolinas é reportado na literatura a síntese de pirazolinas partindo da chalcona correspondente com fenilhidrazina ou hidrazina hidratada e ácido acético sob irradiação de micro-ondas (quando empregado a hidrazina hidratada ocorre a acetilação in situ).^{41,55}

Desta forma, é relevante do ponto de vista ambiental a busca por metodologias limpas para obtenção de pirazolinas fazendo uso de solventes menos nocivos e em menores tempos reacionais.

2.3. QUÍMICA VERDE

Nos dias atuais aumentou consideravelmente a preocupação da população mundial em relação a problemas ambientais. Do ponto de vista químico foi criado o conceito “Química Verde” o qual visa o desenho de novos produtos e processos químicos que sejam mais benéficos para o meio ambiente e que reduzam o impacto para a saúde humana e meio ambiente. Basicamente, são 12 os princípios da química verde: I. Prevenção; II. Economia de átomos; III. Síntese de produtos menos perigosos; IV. Desenho de produtos seguros; V. Solventes e auxiliares mais seguros; VI. Busca pela eficiência de energia; VII. Uso de fontes renováveis de matéria-prima; VIII. Evitar a

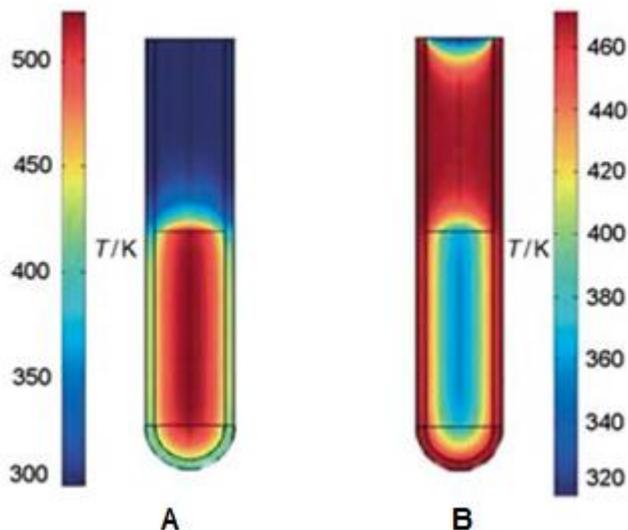
formação de derivados; IX. Catálise; X. Desenho para a degradação; XI. Análise em tempo real para a prevenção da poluição; XII. Química segura para a prevenção de acidentes.^{56,57}

2.3.1. Micro-ondas (MO)

Um método que se enquadra em vários princípios da Química Verde é o uso da irradiação de micro-ondas como fonte alternativa para o aquecimento.

A irradiação de micro-ondas é uma forma de energia eletromagnética com frequência entre 0,3 e 300 GHz. A utilização destas no lugar do aquecimento convencional leva a uma diminuição dos tempos de reação, uma vez que as reações aceleradas por micro-ondas promovem o aquecimento interno dos reagentes mais homoganeamente (Figura 10 - A), diferente do método convencional onde depende da condutividade térmica de vários materiais que devem ser penetrados, o que resulta na temperatura do recipiente de reação superior à da mistura reacional (Figura 10 - B).⁵⁸

Figura 10. Comparação entre aquecimento via irradiação de micro-ondas (A) e aquecimento convencional (B).



Fonte: KAPPE, C. O. Controlled Microwave Heating in Modern Organic Synthesis. **Angew. Chem.**, v. 43, p. 6250-6284, 2004.

Com base no que foi exposto a cerca de chalconas, pirazolinas e química verde, nesse trabalho busca-se a otimização e síntese de pirazolinas com potencial atividade inibitoria frente a PtpA de Mtb.

3. OBJETIVOS

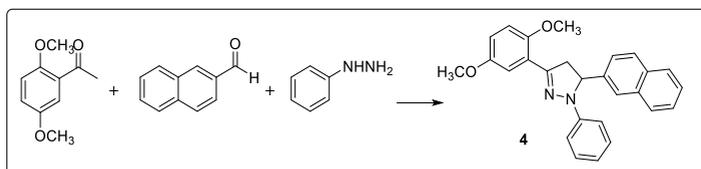
3.1. OBJETIVO GERAL

O trabalho apresenta como objetivo principal o desenvolvimento de uma metodologia simples, rápida e eficiente para obtenção de pirazolinas com potencial atividade inibitória frente à PtpA de Mtb.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver e otimizar a síntese multicomponente para obtenção da pirazolina **4** em micro-ondas (Esquema 3);

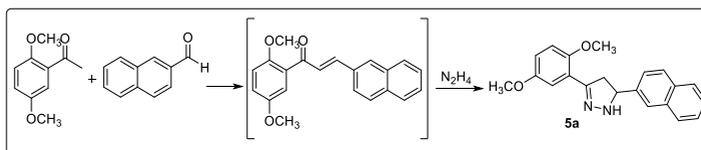
Esquema 3. Síntese multicomponente para obtenção da pirazolina **4**.



- Aplicar a metodologia desenvolvida para obtenção de uma série de pirazolinas baseadas nas estruturas já publicadas;

- Desenvolver e otimizar a síntese *one-pot* de pirazolinas sob irradiação de micro-ondas (Esquema 4);

Esquema 4. Síntese *one-pot* para obtenção da pirazolina **5a**.



- Aplicar a metodologia desenvolvida para obtenção das pirazolininas **5a-k**;

- Purificar e caracterizar as pirazolininas **5a-k** por p.f., RMN de ^1H e ^{13}C e massas de alta resolução;

- Estudar a atividade inibitória das moléculas obtidas frente à proteína tirosina fosfatase A de *Mycobacterium tuberculosis*.

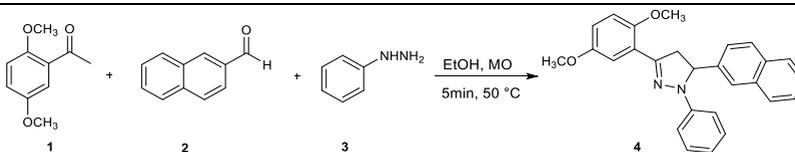
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 PREPARAÇÃO DA PIRAZOLINA **4** VIA REAÇÃO MULTICOMPONENTE

A síntese da pirazolina **4** fez parte da Tese de Doutorado da Dra. Patrícia D. Neuenfeldt³⁷ onde foi obtida com alto rendimento (93%) bem como sua chalcona precursora (83%),⁵⁹ sendo adotada neste trabalho para otimização reacional.

Inicialmente analisou-se a obtenção da pirazolina **4** via reação multicomponente onde todos os reagentes são adicionados ao mesmo tempo ao meio reacional empregando base ou ácido como catalisador (Tabela 1, Entrada 1 e 2 respectivamente) e sem a presença de catalisador (Tabela 1, Entrada 3). Porém, somente na presença de hidróxido de potássio (Tabela 1, Entrada 1) foi observada a formação do produto desejado **4**.

Tabela 1. Influência do catalisador para obtenção de **4**.

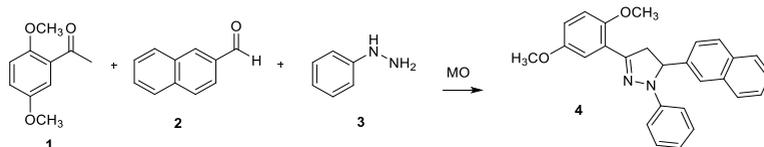


Entrada	Catalisador	Rendimento (%)
1	KOH 50%	60
2	Ác. Acético	NO
3	----	NO

Nota: NO = não obtido. MO = micro-ondas. Condições de reação: 1 mmol de 2,5-dimetoxiacetofenona (**1**), 1 mmol de 2-naftaldeído (**2**), 4 mmol de fenilhidrazina (**3**).

Assim sendo, foram variados parâmetros do equipamento como tempo e temperatura, e também quantidade de fenilhidrazina, etanol, água e KOH empregados visando menor tempo reacional e melhor conversão do produto (Tabela 2).

Tabela 2. Influência dos parâmetros reacionais para obtenção de **4**.



Entrada	T (°C)	t. (min)	 (mL)	EtOH (mL)	H ₂ O (mL)	KOH 50% (mL)	Rend. (%)
1	50	5	0,4	5,0	5,0	10,0	61
2	50	5	0,4	5,0	10,0	5,0	37
3	50	5	0,4	1,0	9,0	10,0	NO
4	50	5	0,2	5,0	5,0	10,0	27
5	50	2	0,4	5,0	5,0	10,0	22
6	50	10	0,4	5,0	5,0	10,0	62
7	25	10	0,4	5,0	5,0	10,0	16
8	75	10	0,4	5,0	5,0	10,0	80
9	75	5	0,4	5,0	5,0	10,0	54

Nota: NO = não obtido. MO = micro-ondas. Condições de reação: 1 mmol de 2,5-dimetoxiacetofenona (**1**), 1 mmol de 2-naftaldeído (**2**).

Tendo em vista uma síntese onde fosse gerado resíduos menos agressivos ao meio ambiente e em menor quantidades, buscou-se utilizar maior proporção de água, diminuindo assim a quantidade de KOH 50% (Tabela 2, Entrada 2) e etanol (Tabela 2, Entrada 3), porém neste último, o produto desejado não foi obtido. Minimizar a quantidade de fenilhidrazina e tempo reacional

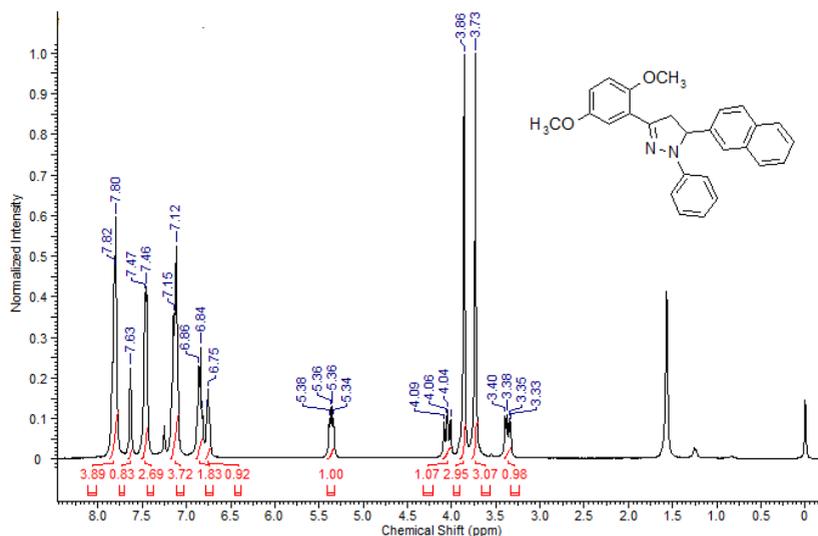
também foram propostos neste trabalho (Tabela 2, Entrada 4 e 5 respectivamente), mas devido ao baixo rendimento obtido em ambos (27 e 22% respectivamente), optou-se por aumentar o tempo reacional para 10 minutos (Tabela 2, Entrada 6). Contudo, não houve acréscimo do rendimento quando comparado com a Entrada 1 onde o tempo de reação foi de 5 minutos. Diferentes temperaturas foram aplicadas (25 °C na Entrada 7 e 75 °C na Entrada 8) no entanto quando realizada a 25 °C o rendimento obtido foi muito baixo quando comparado ao realizar a síntese a 75 °C (16 e 80% respectivamente). Por fim, na Entrada 9, a reação foi realizada com os mesmos parâmetros utilizados na Entrada 8, mas em menor tempo, obtendo maior rendimento quando realizada em um intervalo de tempo maior.

Foram testadas diferentes temperaturas e, com base nos rendimentos obtidos na Tabela 1, pode-se estabelecer que o aquecimento favorece a formação do produto desejado, assim sendo, a metodologia desenvolvida usando as condições da Entrada 8 foi mais eficiente e escolhida para futura aplicação.

Após purificada por recristalização utilizando etanol a pirazolina **4** foi caracterizada por RMN de ^1H , ^{13}C e ponto de fusão.

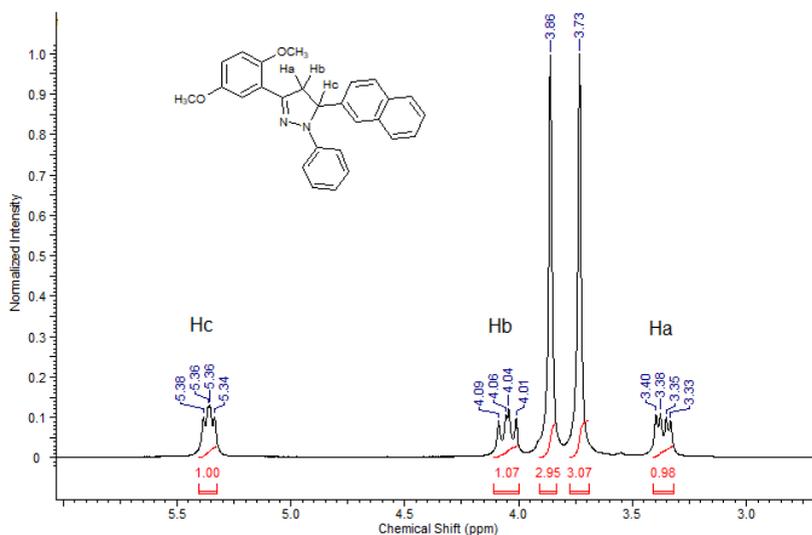
Por meio do espectro de RMN de ^1H , é possível observar na região dos hidrogênios aromáticos os sinais referentes aos 15 hidrogênios da pirazolina **4**, além dos três duplos dupletos em 5,36, 4,05 e 3,37 ppm, comprovando a obtenção do produto desejado (Figura 11).

Figura 11. Espectro de RMN de ^1H da pirazolina **4** (400 MHz, CDCl_3).



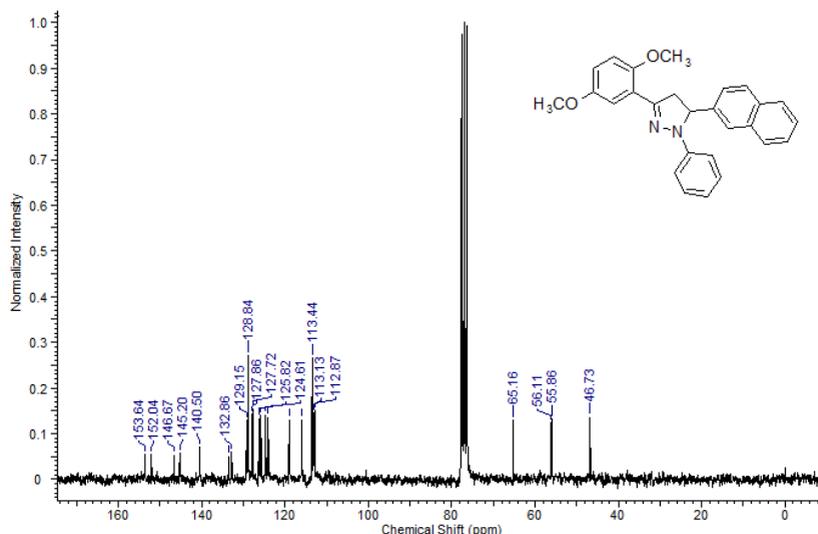
Analisando a ampliação do espectro de RMN de ^1H (3,0 – 6,0 ppm) (Figura 12) é possível observar em 5,36 ppm o sinal referente ao Hc com constantes de acoplamento de $J_{ca} = 8,2$ Hz e $J_{cb} = 12,2$ Hz, características dos acoplamentos com os hidrogênios Ha e Hb, respectivamente. Em 4,05 ppm pode-se observar o sinal do hidrogênio Hb com constantes de acoplamento com o hidrogênio Hc de $J_{bc} = 12,5$ Hz e com o hidrogênio Ha de $J_{ba} = 18,0$ Hz. O duplo duplete em 3,37 ppm é associado ao hidrogênio Ha, apresentando constante de acoplamento de $J_{ac} = 7,7$ Hz e $J_{ab} = 18,0$ Hz (acoplamento com o hidrogênio Hc e Hb, respectivamente). Também é possível observar os dois simpletos em 3,86 e 3,73 ppm com integração de três hidrogênios cada referente às duas metoxilas.

Figura 12. Ampliação do espectro de RMN de ^1H da pirazolina **4** (400 MHz, CDCl_3).

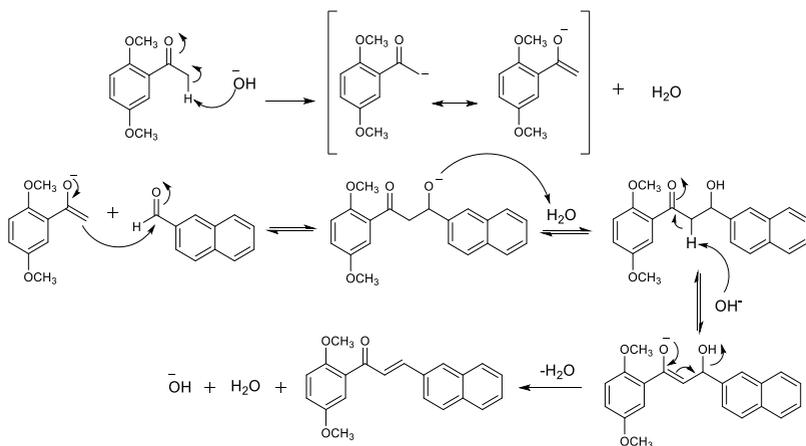


No espectro de RMN de ^{13}C da pirazolina **4** (Figura 13) pode-se observar em 46,7 ppm o sinal do carbono metilênico, em 55,9 e 56,1 ppm os dois sinais referentes as duas metoxilas e em 65,2 ppm o sinal do carbono metínico. Entre 112,9 - 128,8 ppm os sinais dos carbonos aromáticos e 129,1 - 153,6 ppm os sinais dos carbonos quaternários.

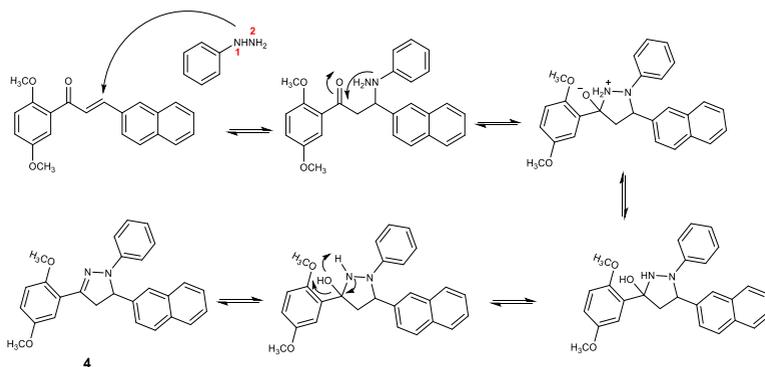
Figura 13. Espectro de RMN de ^{13}C da pirazolina **4** (200 MHz, CDCl_3).



O mecanismo proposto para a síntese da pirazolina **4** inicia-se pela formação da chalcona (intermediário da síntese da pirazolina), mecanismo este conhecido por condensação aldólica de Claisen-Schmidt. A reação inicia-se pela remoção do hidrogênio ácido alfa à carbonila da cetona pela base, formando um carbânion estabilizado por ressonância. O carbânion ataca o carbono carbonílico do aldeído formando um íon alcóxido. A protonação do alcóxido forma o intermediário enol que posteriormente sofre desidratação levando a formação da chalcona, regenerando o catalisador básico.⁶⁰ O Esquema 5 mostra o mecanismo proposto para obtenção da chalcona **8a**.

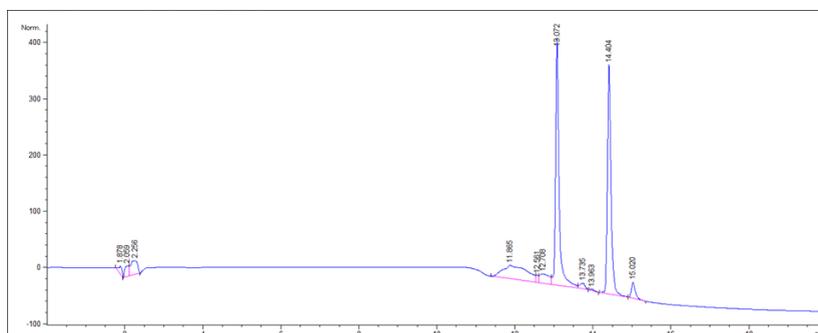
Esquema 5. Mecanismo proposto para síntese da chalcona **8a**.

A partir da chalcona propõe-se a formação da pirazolina iniciado pelo ataque nucleofílico do nitrogênio 1 da hidrazina ao carbono β da chalcona seguido da ciclização por meio do ataque do nitrogênio 2 ao carbono carbonílico da chalcona e posterior desidratação, levando a formação do anel pirazolínico (Esquema 6).

Esquema 6. Mecanismo proposto para a síntese da pirazolina **4**.

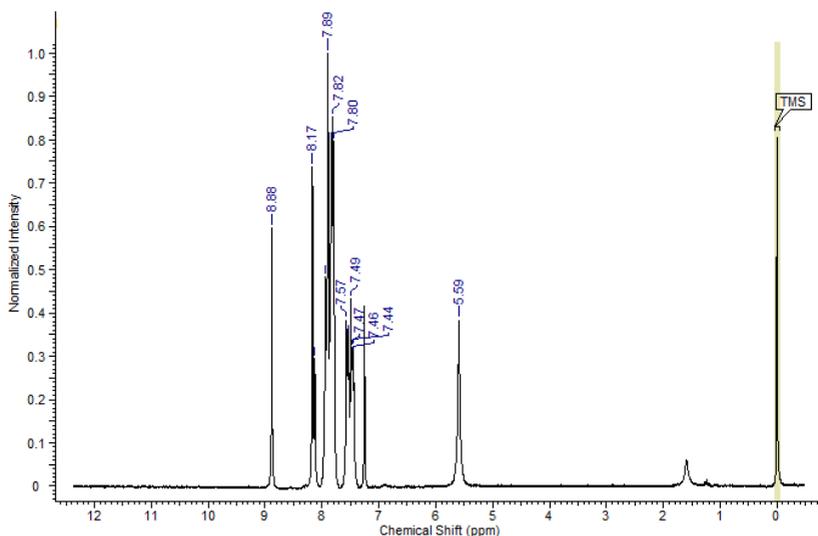
A condição experimental apresentada na Entrada 8 da Tabela 2 também foram empregadas para a obtenção da pirazolina **5a** (obtida pela reação do 2-naftaldeído com a 2,5-dimetoxiacetofenona e hidrazina), porém por meio de CCD foi observado a presença de dois compostos com fatores de retenção (RF) diferente dos materiais de partida. Podendo ser confirmado por meio da análise de HPLC (Figura 14).

Figura 14. Cromatograma de HPLC da mistura obtida.



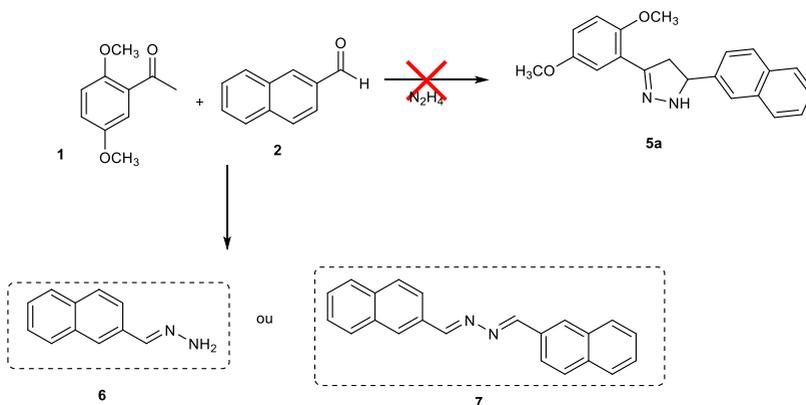
Pela análise do espectro de RMN de ^1H do composto obtido (Figura 15) foi confirmado que não houve a formação do produto desejado, uma vez que não é observado a presença dos três duplos dupletos característicos da pirazolina.

Figura 15. Espectro de RMN de ^1H da mistura obtida (200 MHz, CDCl_3).



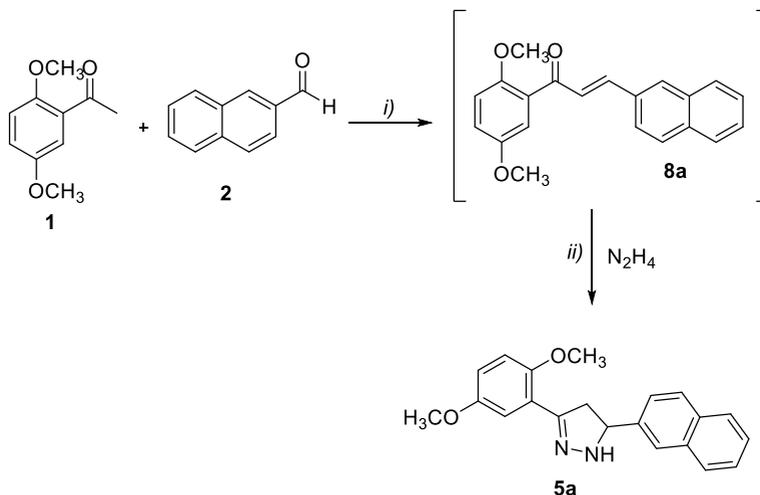
Deste modo, dois subprodutos (**6** e **7**) seriam possíveis, uma vez sendo a hidrazina um nucleófilo mais forte quando comparada à fenilhidrazina, fazendo com que esta ataque o carbono carbonílico do 2-naftaldeído, antes da formação da chalcona. (Esquema 7).

Esquema 7. Síntese dos subprodutos **6** e **7**.



Deste modo, notou-se a importância da obtenção prévia da chalcona **8a** para obtenção da pirazolina **5a**. Assim sendo, foi avaliada a obtenção da pirazolina **5a** via reação *one-pot*, onde a 2,5-dimetoxiacetofenona e o 2-naftaldeído são adicionados simultaneamente a um balão de duas bocas, levando a formação da chalcona **8a** e após determinado tempo, sem isolar a chalcona obtida, a hidrazina é adicionada levando a obtenção do produto desejado (Esquema 8).

Esquema 8. Síntese da pirazolina **5a** via reação *one-pot*.



Parâmetros do micro-ondas como tempo e temperatura e também quantidade de hidrazina empregada foram variadas.

Inicialmente, na primeira etapa (i), a reação foi realizada a 50 °C por 5 minutos sob irradiação de micro-ondas. Na segunda etapa (ii), a hidrazina foi adicionada (1,0 mL) e a reação mantida por mais 5 minutos, obtendo-se o produto desejado com 72% de rendimento (Tabela 3, Etapa 1). O acréscimo no tempo reacional da segunda etapa também foi analisado (10 minutos) também foram estudados obtendo rendimento semelhante (76%) (Tabela 3, Entrada 2).

Tabela 3. Influência dos parâmetros reacionais para obtenção de **5a**.

Entrada	i)		ii)		Hidrazina (mL)	Rend. (%)
	Tempo (min)	T (°C)	Tempo (min)	T (°C)		
1	5	50	5	50	1,0	72
2	5	50	10	50	1,0	76
3	5	50	5	75	1,0	68
4	10	50	5	75	1,0	53
5	5	50	10	75	1,0	92
6	5	75	5	75	1,0	57
7	5	50	5	50	0,5	61
8	5	50	10	75	0,5	90

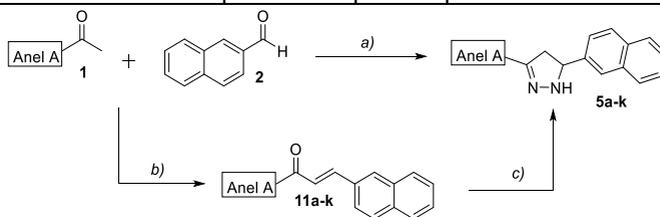
Condições de reação: *i*) 2,5-dimetoxiacetofenona, 2-naftaldeido, 10 mL etanol, 10 mL KOH 50%, MO, Δ. *ii*) Hidrazina, MO, Δ.

Usando as condições das Entradas 3, 4 e 5 da Tabela 3 a reação ocorreu na temperatura de 75 °C após a adição da hidrazina (50 °C na primeira etapa) por 5 minutos nas Entradas 3 e 4, e 10 minutos na Entrada 5, sendo nesta última melhor rendimento obtido (92%). A reação em 75 °C por 5 minutos em ambas etapas também foi estudada (Tabela 3, Entrada 6), porém o rendimento obtido foi inferior quando comparado às condições empregadas na Entrada 3 onde foi utilizado 50 °C na primeira etapa (75 °C na segunda). A proporção de hidrazina (0,5 mL) também foi um parâmetro analisado na Entrada 7 e 8 obtendo rendimentos de 61 e 90% respectivamente. Os rendimentos obtidos nas condições das Entradas 5 e 8 são similares. Portanto, a condição reacional utilizada na Entrada 8 foi adotada para aplicação futura, uma vez que faz uso de quantidade menor de hidrazina.

Deste modo, foram sintetizadas as pirazolinas **5a-k**, das quais 7 são inéditas na literatura (**5a**, **5b**, **5c**, **5e**, **5f**, **5i** e **5j**), e os compostos **5d**, **5g**, **5h** e **5k** já foram reportados previamente.⁶¹⁻⁶⁴ A nível de comparação, além de obtidas via reação *one-pot*, as pirazolinas **5a-k** foram obtidas também utilizando metodologia convencional utilizando refluxo de etanol por 3 a 5 horas. Rendimentos e p.f. das pirazolinas obtidas estão listados na Tabela 4.

Das onze pirazolinas obtidas empregando a metodologia desenvolvida neste trabalho, todas obtiveram rendimento superior quando comparado à metodologia convencional onde a chalcona é isolada, com exceção do composto **5f**, e em rendimentos moderados (22 - 90%).

Tabela 4. Rendimentos e p.f. obtidos para as pirazolinas 5a-k.

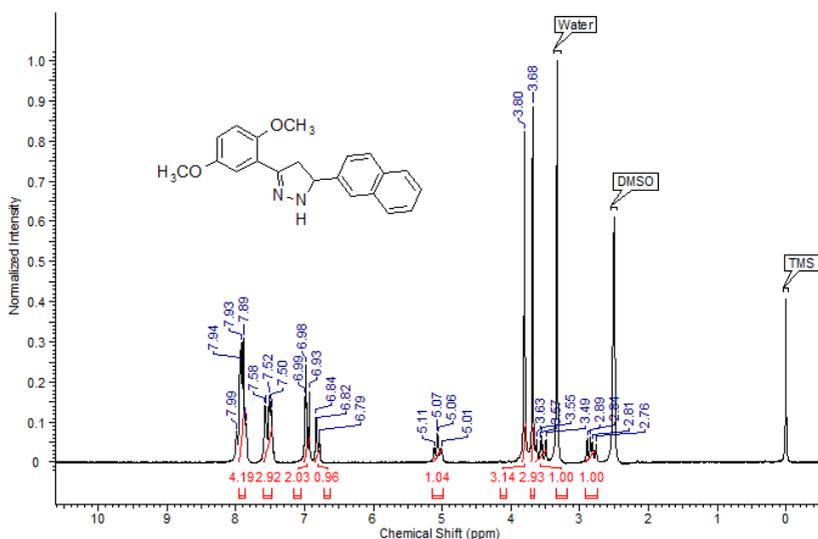


Composto	Anel A	p.f. (°C)	Rendimento	
			a)	b) e c)*
5a		82,7 - 83,9	90	58
5b		70,9 - 72,3	34	29
5c		110,3 - 112,1	59	52
5d		139,0 - 140,4	90	48
5e		103,1 - 104,9	90	77
5f		164,3 - 165,4	24	29
5g		79,8 - 81,4	70	64
5h		79,0 - 80,5	22	20
5i		132,8 - 134,4	72	56
5j		64,4 - 65,7	34	31
5k		81,5 - 82,9	88	42

Notas: *Rendimento global. a) Síntese *one-pot* sendo, primeira etapa: etanol, KOH 50%, MO, 50 °C, 5 min e segunda etapa: hidrazina (0,5 mL), MO, 75 °C, 10 min. b) Etanol, KOH 50%, t.a. 24 h. c) Etanol, hidrazina, refluxo, 3-5 h (metodologia convencional).

Todas as pirazolininas de **5a-k** foram caracterizadas por RMN de ^1H e ^{13}C e em todos os espectros de RMN de ^1H analisados foram observados três duplos dupletos, sinais estes característicos de pirazolininas. No espectro de RMN de ^1H da pirazolinina **5a** (Figura 16) pode-se observar os sinais dos 10 hidrogênios aromáticos na região de 7,99 a 6,79 ppm.

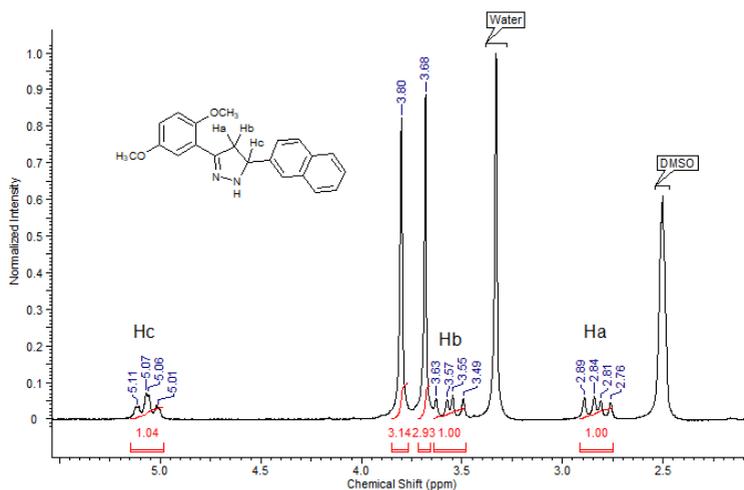
Figura 16. Espectro de RMN de ^1H da pirazolinina **5a** (200 MHz DMSO).



Na ampliação do espectro de RMN de ^1H da pirazolinina **5a** (2,0 – 5,5 ppm) (Figura 17) é possível observar em 5,07 ppm o duplo duplete referente ao Hc com constantes de acoplamento de $J_{ca} = 8,8$ Hz e $J_{cb} = 11,3$ Hz, referente aos acoplamentos com os hidrogênios diastereotópicos, Hb e Ha respectivamente. O duplo duplete em 3,56 ppm é referente ao Hb com constante de

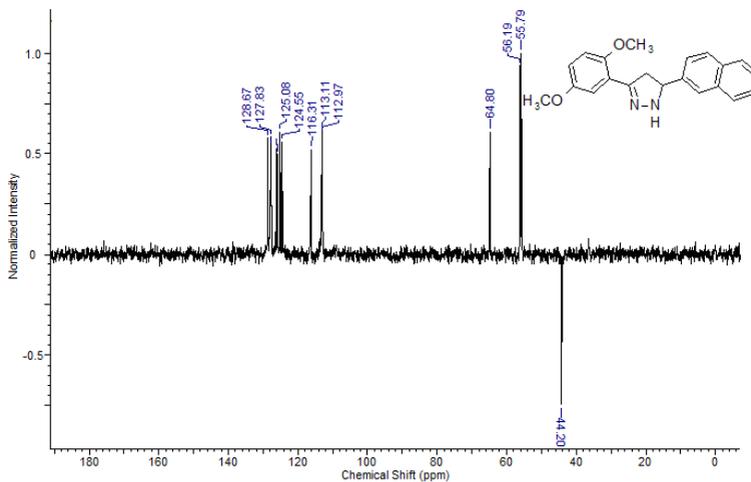
acoplamento de $J_{ba} = 16,6$ Hz (do acoplamento com Ha) e $J_{bc} = 11,0$ Hz (do acoplamento com Hc). Em 2,83 ppm observa-se a presença de mais um duplo duplete referente ao Ha, o qual possui constantes de acoplamento de $J_{ac} = 9,7$ Hz e $J_{ab} = 16,3$ Hz referente aos acoplamentos com Hc e Hb, respectivamente. Os hidrogênios das metoxilas apresentam dois simpletos em 3,80 e 3,68 ppm.

Figura 17. Ampliação do espectro de RMN de ^1H da pirazolina **5a** (2,0 – 5,5 ppm) (200 MHz, DMSO).



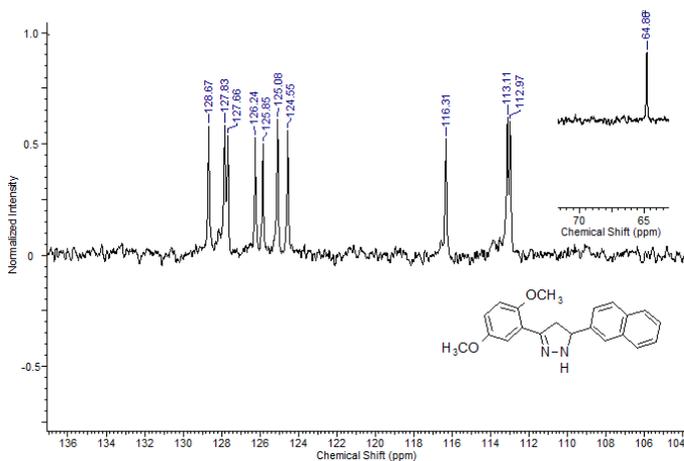
Com o auxílio do DEPT-135 (Figura 18), onde os carbonos metilênicos apresentam valores negativos, e carbonos metínicos e metilas sinais positivos foi possível observar em 44,2 ppm o CH_2 da pirazolina e em 56,2 e 55,8 ppm as duas metoxilas.

Figura 18. Espectro de DEPT-135 da pirazolina **5a** (50 MHz, CDCl₃).



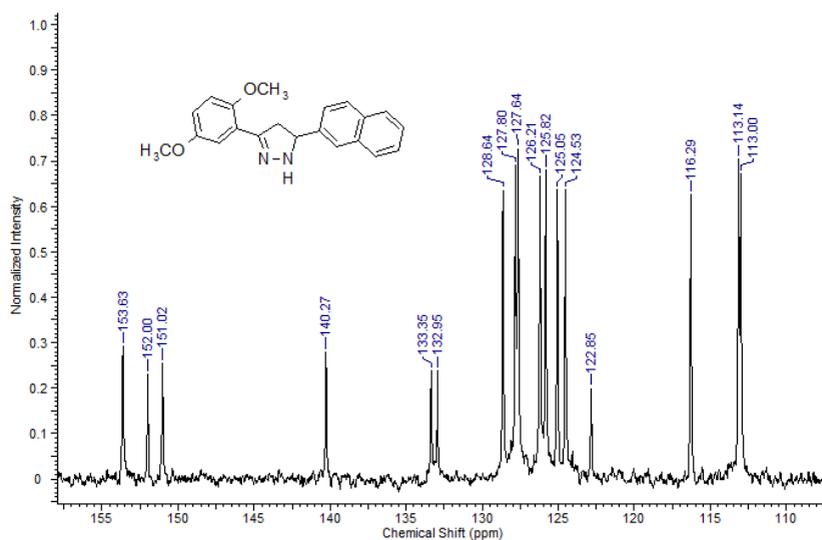
Ampliando o espectro de DEPT-135 da pirazolina **5a** (Figura 19), nota-se a presença de 11 carbonos com sinal positivo, de acordo com o número de carbonos metínicos aromáticos.

Figura 19. Ampliação do espectro de DEPT-135 da pirazolina **5a** (50 MHz, CDCl₃).



Na ampliação do espectro de RMN de ^{13}C da pirazolina **5a**, é possível observar 7 sinais de carbonos quaternários (153,6, 152,0, 151,0, 140,3, 133,3, 132,9 e 122,9 ppm) coerente com a estrutura da pirazolina (Figura 20).

Figura 20. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C da pirazolina **5a** (110 – 155 ppm) (50 MHz, CDCl_3).



Deste modo, todas as pirazolinas obtidas neste trabalho foram caracterizadas por RMN de ^1H e ^{13}C .

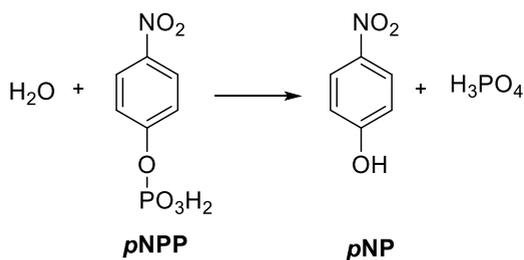
4.2. ATIVIDADE BIOLÓGICA

4.2.1. Medidas da atividade residual de PtpA das pirazolinas 5a-k

Os testes biológicos foram realizados no CEBIME (Centro de Biologia Molecular e Estrutural) sob coordenação do Prof. Dr. Hernan F. Terenzi.

Inicialmente foi realizada uma triagem utilizando uma única concentração (25 μM) para cada composto (**5a-k**), a PtpA e *p*-nitrofenilfosfato (*p*NPP) como substrato artificial de fosfatase. Este quando clivado libera o *p*-nitrofenol (*p*NP), de coloração amarela (Figura 21). A absorbância do *p*-nitrofenol foi quantificada por UV-Vis a 410 nm, a qual é proporcional a sua concentração.

Figura 21. Conversão do *p*NPP em *p*NP.



Com isto, foram calculadas as porcentagens de inibição da PtpA de Mtb e os dados obtidos estão listados na **Tabela 5**, onde quanto maiores os valores de porcentagem obtido, melhor a pirazolina inibe a atividade da PtpA.

Tabela 5. Atividade de inibição de PtpA (%) na presença de 25 μ M das pirazolininas.

Composto	% inibição (% \pm DP)	Composto	% inibição (% \pm DP)
5a	52,6 \pm 5,2	5g	29,4 \pm 5,1
5b	74,8 \pm 2,1	5h	62,1 \pm 2,1
5c	78,7 \pm 3,4	5i	38,9 \pm 3,0
5d	33,7 \pm 6,9	5j	63,7 \pm 1,4
5e	36,0 \pm 1,3	5k	48,7 \pm 3,7
5f	51,5 \pm 4,0		

Nota: Os resultados são apresentados como média \pm DP (desvio padrão) de três experimentos feito em triplicata.

4.2.2. Determinação dos valores de IC₅₀ das pirazolininas

Baseando-se na triagem inicial, foram determinados os valores de IC₅₀ frente à inibição da PtpA para os compostos que apresentaram inibição \geq 40% quando comparados com o controle (**5a**, **5b**, **5c**, **5d**, **5f**, **5h**, **5i**, **5j** e **5k**). Foram utilizadas onze concentrações diferentes de cada composto e os resultados obtidos estão listados na Tabela 6.

As pirazolininas **5c**, **5h** e **5j** obtiveram melhores resultados de IC₅₀ frente a inibição da PtpA (IC₅₀ = 11,4 μ M \pm 3,4, IC₅₀ = 18,9 μ M \pm 2,3 e IC₅₀ = 17,5 μ M \pm 4,3 respectivamente). Apesar de nenhum dos três apresentarem melhor valor de IC₅₀ que a chalcona **11a** (IC₅₀ = 8,4 μ M \pm 0,9).

Tabela 6. Valores de IC₅₀ das pirazolininas **5a-k** frente a inibição da PtpA.

Composto	IC₅₀ μM ± DP	Composto	IC₅₀ μM ± DP
5a	27,7 ± 2,1	5h	18,9 ± 2,3
5b	23,4 ± 2,9	5i	38,2 ± 6,0
5c	11,4 ± 3,4	5j	17,5 ± 4,3
5d	33,9 ± 6,4	5k	66,7 ± 7,8
5f	23,1 ± 4,5		

Nota: Os resultados são apresentados como média ± DP (desvio padrão) de três experimentos feito em triplicata.

Os compostos **5d** e **5k** que contém o grupo 2-naftila e fenila no anel A respectivamente, apresentaram valores de inibição frente a PtpA de IC₅₀ = 33,9 μM ± 6,4 e IC₅₀ = 66,7 μM ± 7,8 respectivamente, assim sendo, a presença de grupos hidrofóbicos nos dois anéis não apresentou significante atividade inibitória.

Comparando os valores de IC₅₀ das pirazolininas obtidas (**5a-k**) com as pirazolininas contendo o grupo fenil e acetil no anel pirazolínico (**8a-k** e **9a-k**, respectivamente)³⁷ pode-se observar que todas as pirazolininas obtidas neste trabalho (**5a-k**) obtiveram melhores resultados quando comparadas às pirazolininas correspondentes **8a-k** e **9a-k**, mas não em todos os casos quando comparados às chalconas **11a-k**.

Tabela 7. Valores de IC₅₀ dos compostos **5a-k**, **9a-k**, **10a-k** e **8a-k** frente a inibição da PtpA de Mtb.

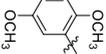
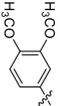
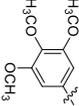
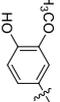
Compostos	a	b	c	d	e	f	g
Anel A							
5a-k	27,7 ± 2,1	23,4 ± 2,9	11,4 ± 3,4	33,9 ± 6,4	n.d.	23,1 ± 4,5	n.d.
9a-k	>100*	58,4 ± 9,5*	37,6 ± 3,3*	>100*	66,7 ± 11,9*	36,5 ± 5,3*	97,9 ± 4,3*
10a-k	n.d.*	n.d.*	n.d.*	n.d.*	n.d.*	n.d.*	n.d.*
8a-k	8,4 ± 0,9 [†]	23,1 ± 1,6 [†]	32,1 ± 4,0 ^{&}	93,3 ± 5,7 ^{&}	n.d. [†]	53,7 ± 1,3 [†]	>50 [†]

Tabela 8. Valores de IC₅₀ dos compostos **5a-k**, **9a-k**, **10a-k** e **8a-k** frente a inibição da PtpA de Mtb (*continuação*).

n.d. [†]	n.d.	n.d.	18,9 ± 2,3		h
n.d. [†]	n.d.	n.d.	38,2 ± 6,0		i
n.d. ^{&}	n.d.	n.d.	17,5 ± 4,3		j
n.d. [†]	n.d.	n.d.	66,7 ± 7,8		k

Nota: n.d. = não determinado; *mostrados anteriormente na referência 38; [†]mostrados anteriormente na referência 12; [&]mostrados anteriormente na referência 65.

Assim como nas chalconas **11a** e **11b**, as pirazolininas que contem grupos metoxilas no anel A (**5a**, **5b**, e **5j**) apresentaram bons valores de IC₅₀ na inibição enzimática da PtpA (IC₅₀ = 27,7 μM ± 2,1, IC₅₀ = 23,4 μM ± 2,9 e IC₅₀ = 18,9 μM ± 2,3 respectivamente) mostrando que a presença do anel hidrofóbico (Anel B) e o hidrogênio ligado ao nitrogênio (NH) do anel pirazolínico promovem maior potencial inibitório frente a PtpA de Mtb.

Para as três séries de pirazolininas (**5**, **9** e **10**) não foi observado correlação dos melhores valores de IC₅₀ com os das chalconas correspondentes.

4.2.3. Ensaios de seletividade da pirazolina 5c

A pirazolina **5c** apresentou menor valor de IC_{50} dentre as pirazolinas analisadas ($IC_{50} = 11,4 \pm 3,4 \mu M$) e foi submetida a testes de seletividade frente às outras fosfatases. Este ensaio tem por finalidade averiguar se determinado composto apresenta uma maior preferência por uma enzima frente às outras enzimas da mesma família. Para isto, determina-se o valor de IC_{50} do composto frente a diferentes fosfatases e faz-se a relação do valor encontrado com o valor da enzima na qual se deseja verificar se o composto apresenta uma maior preferência. Deste modo determina-se o chamado índice de seletividade (SI - do inglês *selectivity index*), neste trabalho calculado pela razão do $IC_{50}^{PTP}/IC_{50}^{PtpA}$. Valores de índice de seletividade maiores que 1 indicam compostos mais seletivos, enquanto valores iguais a 1 mostram igual seletividade por ambas enzimas e valores inferiores a 1 indicam que o composto é mais seletivo para a outra enzima da mesma família.

Portanto, foi determinado o IC_{50} da pirazolina **5c** frente a inibição da PtpB de Mtb, YopH, PEST e LYP (fosfatases humanas) e então calculado o índice de seletividade (Tabela 9).

Tabela 9. Valores de IC_{50} da pirazolina **5c** frente a inibição da YopH, PtpB, Lyp e Pest e índice de seletividade.

YopH		PtpB		LYP		PEST	
IC_{50}	SI	IC_{50}	SI	IC_{50}	SI	IC_{50}	SI
$18,8 \pm 4,3$	1,6	$25,8 \pm 6,3$	2,3	$97,9 \pm 3,7$	8,6	$62,6 \pm 2,2$	5,5

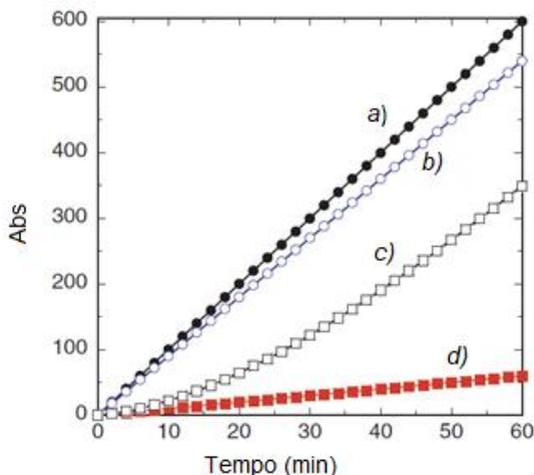
Nota: Os resultados de IC_{50} são apresentados como média em $\mu M \pm DP$ (desvio padrão) de três experimentos feito em triplicata.

Dentre as fosfatases analisadas, a pirazolina **5c** demonstrou boa seletividade para a inibição da PtpA (SI maiores que 1), sendo para a inibição da LYP a com maior índice de seletividade, sendo cerca de 8 vezes mais seletivo para PtpA. Já para a YopH a pirazolina **5c** apresentou a menor seletividade, com índice de seletividade de 1,6.

4.2.4. Teste de reversibilidade da pirazolina **5c** frente à inibição da PtpA

Após ser determinado o IC_{50} e seletividade, foi realizado o teste de reversibilidade a fim de determinar se a inibição causada pelo inibidor é rapidamente reversível, lentamente reversível ou irreversível Figura 22.⁶⁵

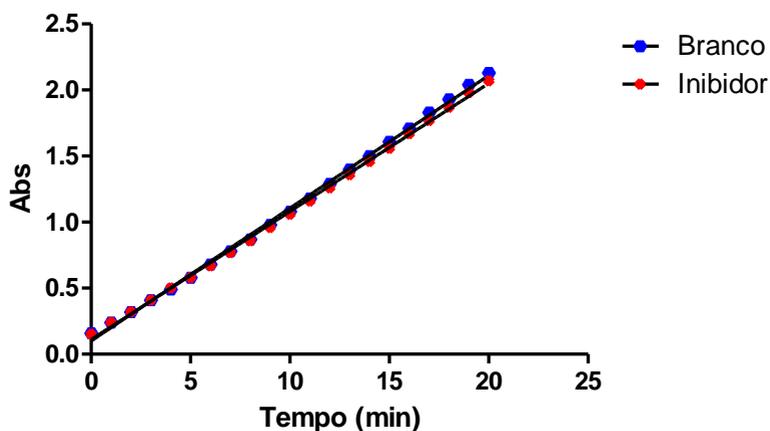
Figura 22. Resultados de reversibilidade esperados para: Curva a) representa o esperado para o controle na ausência de inibidor; b) rapidamente reversível; c) lentamente reversível e d) irreversível ou muito lentamente reversível.



Fonte: COPELAND, R. A. **Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery**. New Jersey: Wiley, 2005. 126 p.

Deste modo, a enzima foi incubada por um período de 15 minutos na presença (vermelho) e ausência da pirazolina **5c** (azul) a temperatura ambiente e após este período foi realizada leitura da absorbância em 410 nm a cada minuto, por 21 minutos (Figura 23).

Figura 23. Teste de reversibilidade da pirazolina **5c**.



De acordo com a equação da reta obtida por meio da Figura 23 para o branco ($0,1005 \pm 0,0009407$) e para a PtpA na presença do inibidor ($0,09692 \pm 0,0007351$), a pirazolina **5c**, frente à inibição da PtpA, é um inibidor totalmente reversível, sendo a reta do inibidor 96,44% de atividade em relação a reta do branco, demonstrando ser um inibidor rapidamente reversível.

4.2.5. Avaliação dos parâmetros cinéticos da PtpA e mecanismo de inibição da pirazolina **5c**

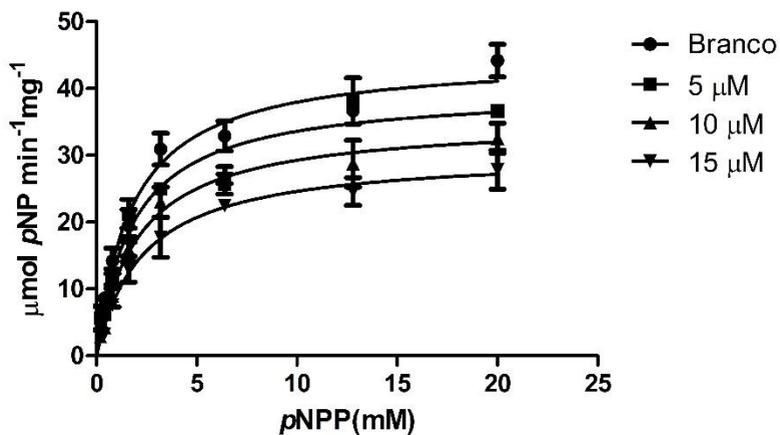
Estudos de cinética enzimática são empregados para determinação das propriedades de um inibidor, os quais podem afetar uma reação enzimática de duas formas: como inibidor reversível ou irreversível. Inibidor reversível é aquele que pode ligar-se à enzima e ser liberado em seguida, deixando-a em sua condição original e inibidor irreversível aquele que reage com a enzima resultando em uma modificação, normalmente formando uma ligação covalente tornando-a inativa de modo que sua atividade original não é regenerada ou regenerada muito lentamente.^{66,67}

Inibidores reversíveis dividem-se em três grupos: inibição competitiva, não-competitiva e incompetitiva. Um inibidor competitivo concorre com o substrato pelo sítio ativo da enzima e bloqueiam o acesso do substrato a ela. Já o inibidor não-competitivo é aquele que se liga em um sítio diferente daquele onde o substrato se liga, ele não bloqueia o acesso do substrato à enzima, porém é inativada quando o inibidor está ligado a ela. O inibidor incompetitivo também se liga a um sítio diferente daquele em que o substrato se liga, no entanto, um inibidor incompetitivo somente se liga ao complexo enzima-substrato.^{67,68}

Experimentos *in vitro* foram realizados para investigar o mecanismo de ação em relação ao substrato artificial das PTPs (*p*NPP) da pirazolina **5c** (melhor IC₅₀) utilizando diferentes concentrações de *p*NPP. O gráfico de Michaelis–Menten foi obtido com três concentrações diferentes do inibidor (Figura 24), sendo observado um decréscimo no valor de V_{max} com o aumento da concentração do inibidor e o valor de K_{mapp} constante, indicando

ser um inibidor não-competitivo com afinidade pela enzima livre e pelo complexo enzima-substrato e valor de K_i de $31,1 \pm 1,14$.

Figura 24. Perfil cinético para o composto **5c**.

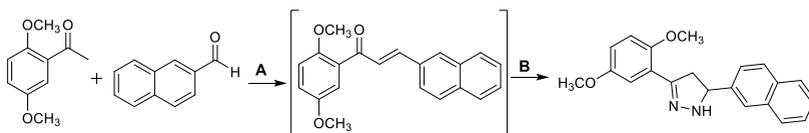


5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O desenvolvimento de uma metodologia multicomponente para a síntese da pirazolina **4** sob irradiação de micro-ondas foi realizada com sucesso, obtendo o produto desejado com alto rendimento (90%) de forma rápida e eficiente.

Deste modo, buscou-se aplicar a metodologia desenvolvida para obtenção de pirazolinas mantendo o hidrogênio ligado ao nitrogênio do anel pirazolinico (NH), porém com insucesso devido ao ataque da hidrazinha ao carbono carbonílico do aldeído previamente a formação da chalcona. Assim sendo, foi estudada a síntese *one-pot* da pirazolina **5a** sob irradiação de micro-ondas, levando a obtenção desta em baixo tempo reacional (15 minutos) e bom rendimento (90%) (Figura 25).

Figura 25. Metodologia para obtenção da pirazolina **5a**.



A: Etanol, KOH 50%, 5 min., 50 °C, MO
B: N₂H₄, 10 min., 75 °C, MO

Por meio da metodologia *one-pot* desenvolvida para obtenção da pirazolina **5a**, 11 pirazolinas (7 inéditas) foram obtidas com rendimentos moderados (22 – 90%), porém na maioria dos compostos melhores rendimentos quando comparado a metodologia convencional (20 – 77%).

Os compostos **5a-k** foram submetidos a teste de inibição da atividade da proteína tirosina fosfatase A, onde três deles, **5c**,

5h e **5j**, foram identificados como inibidores promissores, com valores de IC_{50} de 11,4, 18,9 e 17,5 μ M, respectivamente. Foram realizados testes de seletividade e determinado o índice de seletividade frente à inibição de outras fosfatases para a pirazolina **5c**, mostrando-se um inibidor seletivo ($SI > 1$). Ensaio de reversibilidade e estudos cinéticos foram realizados, sendo a pirazolina **5c** um inibidor rapidamente reversível e não-competitivo.

Como perspectivas futuras, pretende-se estudar por meio de modelagem molecular o mecanismo de ação do composto **5c**, dar continuidade aos ensaios de seletividade, reversibilidade e cinéticos para os compostos **5h** e **5j**, bem como modelagem molecular. Além disso, separar os enantiômeros R e S das pirazolinas **5c**, **5h** e **5j** e avaliar sua atividade inibitória frente a PtpA.

6. SEÇÃO EXPERIMENTAL

6.1. INSTRUMENTAÇÃO E REAGENTES

Os espectros de RMN de ^1H e RMN de ^{13}C foram obtidos em espectrômetros da marca Bruker AC-200F (200 e 50 MHz, respectivamente) ou Bruker Avance Drx (400 MHz), utilizando como solvente CDCl_3 ou DMSO. Os deslocamentos químicos foram registrados em ppm referentes ao TMS (0,00 ppm), CDCl_3 (77,0 ppm) ou DMSO (39,5 ppm). Os espectros de massas de alta resolução foram obtidos a partir de um aparelho micrOTOF Q-II (Bruker Daltonics) do Centro de Biologia Molecular Estrutural (CEBIME) utilizando acetonitrila como solvente grau LCMS. Os pontos de fusão foram medidos em um aparelho digital Microquímica MQAPF-301 e não foram corrigidos. A análise de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) foi realizada em um equipamento da Agilent Technologies 1200 séries equipado com DAD (detector de arranjo de diodos), injetor automático e uma coluna Phenomenex Sinergy Polar-RP80A (2,00 mm x 150 mm, 5 μm). Como fase móvel foram utilizadas misturas de: H_2O /ácido acético 0,1% (C), Acetonitrila/ H_2O 95:5 (D). A programação de eluição foi a seguinte: 0-5 min, 5% (D) isocrático; 5-8 min, de 5% a 95% D gradiente; 8-20 min 95% (D) isocrático. A análise foi monitorada a 240 nm. O volume de injeção foi de 4 μL .

As reações assistidas por micro-ondas foram realizadas em um aparelho modelo Start Synth da MILESTONE. As reações foram acompanhadas por CCD em placas de sílica gel utilizando

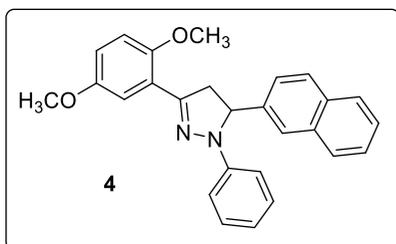
UV como revelador. Todos os solventes utilizados foram obtidos de fontes comerciais.

6.2. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

6.2.1. Procedimento geral para obtenção da pirazolina 4

Em um balão de 50 mL contendo etanol (5 mL) foi adicionado o 2-naftaldeído (1 mmol), a 2,5-dimetoxiacetofenona (1 mmol), KOH 50% (10 mL), H₂O (5 mL) e a fenilhidrazina (4 mmol). O balão foi levado ao micro-ondas e irradiado a uma temperatura de 75 °C por 10 minutos. Para atingir esta temperatura, foi programado uma rampa de aquecimento no aparelho de micro-ondas por um minuto. Em seguida, o meio reacional foi vertido em um béquer contendo água e o precipitado formado filtrado a vácuo. O produto obtido foi recristalizado em etanol a quente.

1-fenil-3-(2,5-dimetoxifenil)-5-(naftalen-2-il)-4,5- dihidro-1H-



pirazol, sólido amarelo, p.f. 147 – 148 °C, RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 7,84 – 7,80 (m, 4H), 7,63 (s, 1H), 7,47 – 7,46 (m, 3H), 7,15 – 7,10 (m, 4H), 6,85 (m, 2H), 6,75 (dd, *J* =

8,0/8,0 Hz, 1H), 5,36 (dd, *J* = 8,2/12,2 Hz, 1H, H_c), 4,05 (dd, *J* = 12,5/18,0 Hz, 1H, H_b), 3,86 (s, 3H), 3,73 (s, 3H), 3,37 (dd, *J* = 7,7/18,0 Hz, 1H, H_a).

RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) δ /ppm: 46,7 (CH_2), 55,9 (CH_3), 56,1 (CH_3), 65,2 (CH), 112,9 (CH-Ar), 113,1 (CH-Ar), 113,4 (2 x CH-Ar), 116,0 (CH-Ar), 119,0 (CH-Ar), 124,0 (CH-Ar), 126,6 (CH-Ar), 125,8 (CH-Ar), 126,2 (CH-Ar), 127,7 (CH-Ar), 127,9 (CH-Ar), 128,8 (2 x CH-Ar), 129,1 (CH-Ar), 132,9 (C-Ar), 133,5 (C-Ar), 140,5 (C-Ar), 145,2 (C-Ar), 146,7 (C=N^*), 152,0 (C^*), 153,6 (C^*).

* C intercambiáveis.

6.2.2. Procedimento geral para obtenção das chalconas 8a-k

Em um balão de 50 mL foi adicionado a acetofenona (1 mmol), o 2-naftaldeído (1 mmol) e 20 mL de etanol. Sob agitação magnética, foi acrescentado hidróxido de potássio 50% v/v (1 mL). A reação foi deixada sob agitação magnética, a temperatura ambiente por 24 horas. Em seguida, a reação foi vertida em um béquer contendo água e neutralizada com ácido clorídrico 10%. O precipitado formado foi filtrado a vácuo. Todas as chalconas foram obtidas de forma semelhante, e quando necessário, o produto obtido foi recristalizado utilizando como solvente acetato de etila a quente e hexano. Essas chalconas fizeram parte da Tese de Doutorado da Dra. Louise Domeneghini Chiaradia Delatorre e da Dissertação de Mestrado da Dra. Alessandra Mascarello e foram re-sintetizadas para este trabalho.

6.2.3. Procedimento geral para obtenção das pirazolinas 5a-k sob refluxo

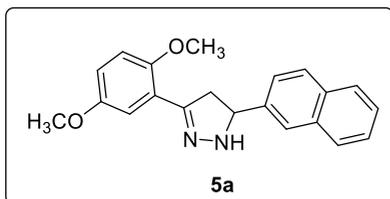
Em um balão de 50 mL foi adicionado a chalcona (1 mmol), a hidrazina hidratada (≈ 4 mmol) e 20 mL de etanol sob agitação magnética em refluxo. A reação foi acompanhada por CCD e após

formação do produto (3-5 horas) este foi vertido em um bquer contendo água e o precipitado formado foi filtrado a vácuo.

6.2.4. Procedimento geral para obtenção das pirazolinas 5a-k sob irradiação de micro-ondas

Em um balão de duas bocas de 50 mL contendo etanol (10 mL) foi adicionado o 2-naftaldeído 2 (1 mmol), a respectiva acetofenona (1 mmol) e KOH 50% (10 mL). O balão foi levado ao micro-ondas e irradiado em uma temperatura de 50 °C por 5 minutos. Para atingir esta temperatura, foi programado uma rampa de aquecimento no aparelho de micro-ondas por um minuto. Após esse período foi adicionado a hidrazina hidratada (≈ 4 mmol). A reação foi irradiada no micro-ondas em uma temperatura de 75 °C por 10 minutos. Também foi programado uma rampa de aquecimento no aparelho de micro-ondas por um minuto para atingir a temperatura desejada. Em seguida, o meio reacional foi vertido em um bquer contendo água e o precipitado formado filtrado a vácuo.

3-(2,5-dimetoxifenil)-5-(naftalen-2-il)-4,5-dihidro-1H-pirazol,



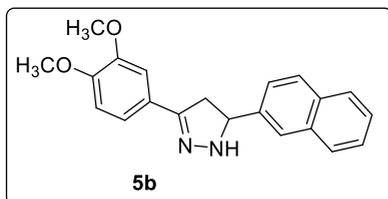
sólido amarelo; rendimento 90%; p.f. 82,7 – 83,9 °C; RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) δ /ppm: 7,99 – 7,85 (m, 4H), 7,58 – 7,48 (m, 3H), 6,99 – 6,93 (m, 2H),

6,80 (dd, $J = 3,0/8,8$ Hz, 1H), 5,07 (dd, $J = 8,8/11,3$ Hz, 1H Hc), 3,80 (s, 3H), 3,68 (s, 3H), 3,56 (dd, $J = 11,0/16,6$ Hz, 1H Hb), 2,83 (dd, $J = 9,7/16,3$ Hz, 1H, Ha).

RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) δ /ppm: 153,6 (C-Ar*), 152,0 (C-Ar*), 151,0 (C=N*), 140,3 (C), 133,3 (C-Ar), 132,9 (C-Ar), 128,6 (CH-Ar), 127,8 (CH-Ar), 127,6 (CH-Ar), 126,2 (CH-Ar), 125,8 (CH-Ar), 125,0 (CH-Ar), 124,5 (CH-Ar), 122,8 (C-Ar), 116,3 (CH-Ar), 113,1 (CH-Ar), 113,0 (CH-Ar), 64,8 (CH), 56,2 (CH₃), 55,8 (CH₃), 44,2 (CH₂).

* C intercambiáveis.

3-(3,4-dimetoxifenil)-5-(naftalen-2-il)-4,5-dihidro-1H-pirazol,



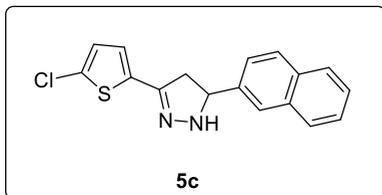
sólido marrom; rendimento 34%;
p.f. 70,9 – 72,3 °C; RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) δ /ppm: 7,86 - 7,81 (m, 4H), 7,54 - 7,45 (m, 4H),

7,07 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H), 6,85 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H), 5,10 (dd, $J = 9,1/10,2$ Hz, 1H, Hc), 3,54 (dd, $J = 10,6/16,5$ Hz, 1H, Hb), 3,12 (dd, $J = 8,8/16,5$ Hz, 1H, Ha).

RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) δ /ppm: 151,5 (C=N*), 149,9 (C-Ar), 149,1 (C-Ar), 140,0 (C-Ar), 133,3 (C-Ar), 132,9 (C-Ar), 128,8 (CH-Ar), 127,8 (CH-Ar), 127,6 (CH-Ar), 126,3 (CH-Ar), 125,9 (CH-Ar), 125,8 (C-Ar), 125,0 (CH-Ar), 124,3 (CH-Ar), 119,4 (CH-Ar), 110,5 (CH-Ar), 108,2 (CH-Ar), 64,3 (CH), 55,9 (2 x CH₃), 41,5 (CH₂).

* C intercambiáveis.

3-(5-clorotiofen-2-il)-5-(naftalen-2-il)-4,5-dihidro-1H-pirazol,

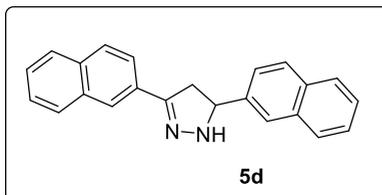


sólido bege; rendimento 59%;
p.f. 110,3 – 112,1 °C; RMN ¹H
(200 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 7,87 –
7,89 (m, 4H), 7,51 – 7,46 (m,
3H), 6,83 (s, 1H), 6,82 (s, 1H),

5,10 (dd, *J* = 9,5/10,5 Hz, 1H, Hc), 3,49 (dd, *J* = 10,7/16,4 Hz, 1H,
Hb), 3,07 (dd, *J* = 9,0/16,4 Hz, 1H, Ha).

RMN de ¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 146,6 (C=N), 139,3 (C),
135,5 (C), 133,3 (C), 133,0 (C), 131,4 (C), 129,0 (CH), 127,8 (CH),
127,7 (CH), 126,4 (2 x CH), 126,1 (CH), 125,4 (CH), 125,2 (CH),
124,2 (CH), 64,7 (CH), 41,6 (CH₂).

3,5-di(naftalen-2-il)-4,5-dihidro-1H-pirazol, sólido bege;

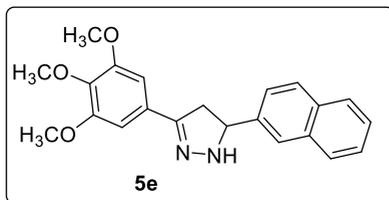


rendimento 90%; p.f. 139,0 –
140,4 °C; RMN ¹H (200 MHz,
CDCl₃) δ/ppm: 8,06 (d, *J* = 8 Hz,
1H), 7,87 – 7,83 (m, 8H), 7,56 –
7,46 (m, 5H), 5,18 (dd, *J* =

9,2/9,6 Hz, 1H, Hc), 3,70 (dd, *J* = 10,1/15,6 Hz, 1H Hb), 3,28 (dd,
J = 8,8/16,1 Hz, 1H, Ha).

RMN de ¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 151,4 (C=N), 140,0 (C-Ar),
133,5 (C-Ar), 133,3 (C-Ar), 133,2 (C-Ar), 133,2 (C-Ar), 133,0 (C-
Ar), 130,4 (C-Ar), 128,9 (CH-Ar), 128,3 (CH-Ar), 128,2 (CH-Ar),
127,8 (2 x CH-Ar), 127,7 (CH-Ar), 126,4 (2 x CH-Ar), 126,0 (CH-
Ar), 125,7 (CH-Ar), 125,1 (CH-Ar), 124,3 (CH-Ar), 123,5 (CH-Ar),
64,5 (CH), 41,3 (CH₂).

5-(naftalen-2-il)-3-(3,4,5-trimetoxifenil)-4,5-dihidro-1H-pirazol,

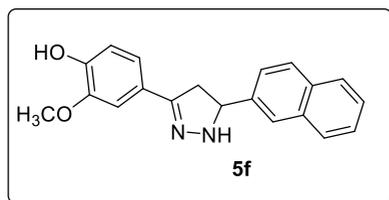


sólido amarelo; rendimento 90%; p.f. 103,1 – 104,9 °C; RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 7,85 – 7,81 (m, 4H), 7,53 – 7,43 (m, 3H), 6,94 (s, 1H), 5,13 (dd, *J*

= 9,2/10,6 Hz, 1H, Hc), 3,90 (s, 6H), 3,88 (s, 3H), 3,56 (dd, *J* = 10,5/16,3 Hz, 1H, Hb), 3,13 (dd, *J* = 8,7/16,7 Hz, 1H, Ha).

RMN de ¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 153,3 (2 x C-Ar), 151,1 (C=N), 140,0 (C-Ar), 139,0 (C-Ar), 133,3 (C-Ar), 133,0 (CH-Ar), 128,9 (C-Ar), 128,4 (CH-Ar), 127,8 (CH-Ar), 127,7 (CH-Ar), 126,4 (CH-Ar), 126,0 (CH-Ar), 125,0 (CH-Ar), 124,2 (CH-Ar), 103,3 (2 x CH-Ar), 64,5 (CH), 60,9 (CH₃), 56,2 (2 x CH₃), 41,2 (CH₂).

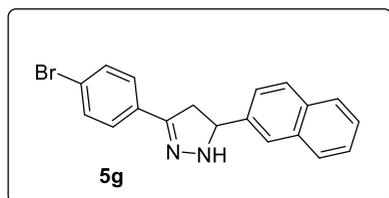
3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-5-(naftalen-2-il)-4,5-dihidro-1H-



pirazol, sólido bege; rendimento 24%; p.f. 164,3 – 165,4 °C; RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 7,86 – 7,80 (m, 4H), 7,52 – 7,45 (m, 4H), 7,01 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H),

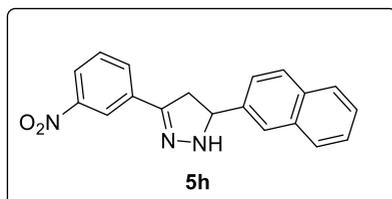
6,90 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H), 5,09 (dd, *J* = 9,3/10,3 Hz, 1H, Hc), 3,95 (s, 3H), 3,53 (dd, *J* = 10,5/ 16,2 Hz, 1H, Hb), 3,12 (dd, *J* = 8,5/16,2 Hz, 1H, Ha).

RMN de ¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 151,7 (C=N), 146,8 (2 x C-Ar), 140,1 (C-Ar), 133,4 (C-Ar), 133,0 (C-Ar), 128,8 (CH-Ar), 127,8 (CH-Ar), 127,7 (CH-Ar), 126,3 (CH-Ar), 126,0 (CH-Ar), 125,4 (C-Ar), 125,1 (CH-Ar), 124,3 (CH-Ar), 120,2 (CH-Ar), 114,0 (CH-Ar), 107,8 (CH-Ar), 64,3 (CH), 56,0 (CH₃), 41,6 (CH₂).

3-(4-bromofenil)-5-(naftalen-2-il)-4,5-dihidro-1H-pirazol, sólido

bege; rendimento 70%; p.f. 79,8 – 81,4 °C; RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 7,86 – 7,79 (m, 4H), 7,54 – 7,46 (m, 7H), 5,12 (dd, *J* = 9,7 Hz, 1H, Hc), 3,52

(dd, *J* = 10,7/16,4 Hz, 1H, Hb), 3,11 (dd, *J* = 8,6/16,3 Hz, 1H, Ha).
 RMN de ¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 150,2 (C=N), 139,6 (C-Ar), 133,3 (C-Ar), 133,0 (C-Ar), 132,0 (C-Ar), 131,7 (2 x 131,7), 128,9 (CH-Ar), 127,8 (CH-Ar), 127,7 (CH-Ar), 127,5 (2 x CH-Ar), 126,4 (CH-Ar), 126,0 (CH-Ar), 125,1 (CH-Ar), 124,2 (CH-Ar), 122,8 (C-Ar), 64,5 (CH), 41,2 (CH₂).

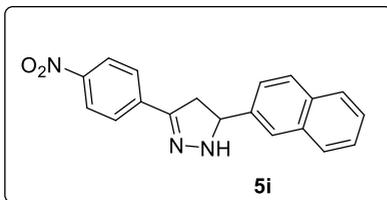
5-(naftalen-2-il)-3-(3-nitrofenil)-4,5-dihidro-1H-pirazol, sólido

amarelo; rendimento 22%; p.f. 79,0 - 80,5 °C; RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 8,45 (s, 1H), 8,17 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H),

8,05 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H), 7,88 – 7,80 (m, 4H), 7,60 – 7,47 (m, 4H), 5,20 (dd, *J* = 9,2/10,6 Hz, 1H, Hc), 3,61 (dd, *J* = 11,0/16,5 Hz, 1H, Hb), 3,17 (dd, *J* = 8,9/16,7 Hz, 1H, Ha).

RMN de ¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 148,5 (C=N), 139,3 (C-Ar), 134,8 (C-Ar), 133,3 (C-Ar), 133,1 (C-Ar), 131,4 (CH-Ar), 129,5 (CH-Ar), 129,0 (CH-Ar), 127,8 (CH-Ar), 127,7 (CH-Ar), 126,5 (CH-Ar), 126,2 (CH-Ar), 125,1 (CH-Ar), 124,1 (CH-Ar), 123,0 (CH-Ar), 120,7 (CH-Ar), 64,9 (CH), 41,0 (CH₂).

5-(naftalen-2-il)-3-(4-nitrofenil)-4,5-dihidro-1H-pirazol, sólido



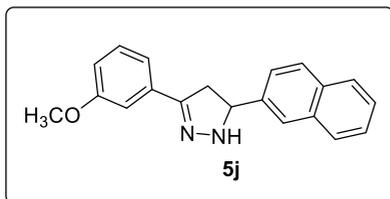
amarelo; rendimento 72%; p.f. 132,8 - 134,4 °C; RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 8,24 (d, *J* = 8,5 Hz, 2H), 7,88 – 7,79 (m, 6H), 7,52 – 7,49 (m, 3H), 6,37

(s, 1H, NH), 5,21 (dd, *J* = 9,6/10,7 Hz, 1H, Hc), 3,59 (dd, *J* = 10,9/16,7 Hz, 1H, Hb), 3,15 (dd, *J* = 9,3/16,7 Hz, 1H, Ha).

RMN de ¹³C (50 MHz, DMSO) δ/ppm: 146,1 (C=N*), 145,8 (C-Ar), 140,0 (C-Ar), 139,7 (C-Ar), 132,8 (C-Ar), 132,3 (C-Ar), 128,2 (CH-Ar), 127,6 (CH-Ar), 127,5 (CH-Ar), 126,2 (CH-Ar), 125,8 (3 x CH-Ar), 124,9 (2 x CH-Ar), 123,8 (2 x CH-Ar), 64,2 (CH), 39,7 (CH₂).

* C intercambiáveis.

3-(3-metoxifenil)-5-(naftalen-2-il)-4,5-dihidro-1H-pirazol, sólido



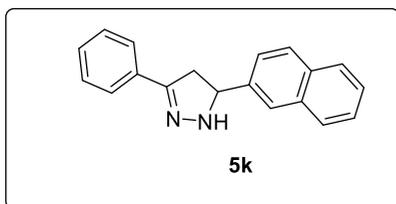
amarelo; rendimento 34% ; p.f. 64,4 - 65,7 °C; RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 7,86 – 7,80 (m, 4H), 7,52 – 7,48 (m, 3H), 7,33 – 7,30 (m, 3H), 6,96 (d, *J* =

8 Hz, 1H), 5,12 (dd, *J* = 9,3/9,9 Hz, Hc), 3,85 (s, 3H), 3,56 (dd, *J* = 10,4/16,4 Hz, Hb), 3,14 (dd, *J* = 9,1/16,6 Hz, Ha).

RMN de ¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 151,3 (C-Ar*), 150,1 (C=N*), 140,0 (C-Ar), 134,1 (C-Ar), 133,0 (C-Ar), 129,5 (CH-Ar), 128,9 (C-Ar), 127,8 (CH-Ar), 127,7 (CH-Ar), 126,3 (CH-Ar), 126,0 (CH-Ar), 125,1 (CH-Ar), 124,3 (CH-Ar), 118,8 (CH-Ar), 115,3 (CH-Ar), 110,6 (CH-Ar), 64,4 (CH), 55,3 (CH₃), 41,5 (CH₂).

* C intercambiáveis.

3-fenil-5-(naftalen-2-il)-4,5-dihidro-1H-pirazol, sólido amarelo;



rendimento 88%; p.f. 81,5 – 82,9 °C; RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) δ /ppm: 7,86 – 7,81 (m, 4H), 7,73 – 7,68 (m, 2H), 7,53 – 7,37 (m, 6H), 5,12 (dd, $J =$

8,7/10,0 Hz, 1H, Hc), 7,57 (dd, $J = 10,8/16,4$ Hz, 1H, Hb), 3,15 (dd, $J = 8,6/16,3$ 1H, Ha).

RMN de ^{13}C (50 MHz, DMSO) δ /ppm: 148,7 (C=N), 140,5 (C-Ar), 133,3 (CH-Ar), 132,9 (C-Ar), 132,4 (C-Ar), 128,6 (2 x CH-Ar), 128,2 (2 x CH-Ar), 127,7 (CH-Ar), 127,6 (CH-Ar), 126,3 (CH-Ar), 125,8 (CH-Ar), 125,5 (2 x CH-Ar), 125,2 (CH-Ar), 125,0 (CH-Ar), 63,8 (CH), 40,6 (CH_2).

6.2.5. Expressão e purificação da PtpA

Para expressar as enzimas PtpA foi feito pré inóculo de 10 mL de meio LB (Luria-Bertani) suplementado com 50 $\mu\text{g/mL}$ de canamicina. A este meio foi adicionada separadamente, uma colônia bacteriana obtida durante o processo de transformação. O pré inóculo da enzima foi mantido sob agitação (150 rpm) a 37 °C por um período de 16 horas. Após a primeira etapa de incubação, 5 mL da suspensão bacteriana foi transferido para uma garrafa de cultivo contendo 250 mL de meio LB suplementado com 50 $\mu\text{g/mL}$ de canamicina. A garrafa de cultivo da enzima foi mantida sob agitação (150 rpm) a 37 °C até que o valor de 0,6 de densidade óptica a 600 nm fosse atingido. Em seguida, a garrafa de cultivo da enzima foi incubada por 20 minutos a 15 °C antes do acréscimo

de IPTG à concentração final de 0,5 mM. O cultivo da fosfatase foi mantido a 15 °C por um período de 16 horas sob agitação (150rpm). O cultivo foi centrifugado a 5.000 x g por 20 min a 4 °C. O sedimento obtido após a centrifugação do cultivo foi homogeneizado com o tampão de lise (20 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,5 M NaCl, 10 mM imidazol e 10% glicerol) acrescido de inibidor de protease PMSF (40 µg/mL) e sonificados em gelo. Em seguida, realizou-se a centrifugação 16.000 x g por 40 minutos a 4°C. Separou-se as frações solúveis para proceder com o processo de purificação.

A PtpA possui um grupo com seis histidinas em sua parte N-terminal (His-Tag) o qual facilita a sua purificação pela de cromatografia de afinidade a metal imobilizado (IMAC, do inglês *Immobilized Metal Affinity Chromatography*). As frações solúveis anteriormente obtidas foram eluídas em colunas HisTrap (colunas contendo níquel como metal imobilizado, Amersham Biosciences) com o uso dos tampões A (Tris-HCl 20mM pH 8,0, NaCl 0,5 M, glicerol 10%) e tampão B (Tris-HCl 20 mM pH 8,0, NaCl 0,5 M, glicerol 10%, Imidazol 0,5 mM, 1 β-mercaptoetanol 1 mM). Por possuir uma estrutura química semelhante à histidina, o imidazol contido no tampão B compete pelo níquel presente na coluna com a cauda de histidina das proteínas recombinantes, logo, a medida que a concentração do imidazol aumenta, as proteínas de interesse são eluídas.

A pureza das frações foi analisada por SDS-PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio) e as frações contendo a proteína purificada foram reunidas e

dializadas a 4 °C em tampão de diálise (tampão D) contendo 20 mM Tris-HCl pH = 8,0, 50 mM NaCl, 5 mM EDTA, 20% glicerol e 5 mM DTT.

Após, a proteína foi concentrada por ultrafiltração utilizando membrana porosa e a concentração da proteína foi determinada por ensaio de Bradford.⁶⁹

Posteriormente, a proteína foi fracionada e armazenada a -80 °C.

6.2.6. Medidas da atividade residual de PtpA das pirazolinas

Os ensaios de triagem foram feitos em microplacas de 96 poços tendo 200 µL de volume final onde foi adicionado 5 µL do composto (concentração final de 25 µM), 165 µL de água Mili-Q, 20 µL de tampão imidazol e 2 µL da proteína a 5 µM (concentração final de 50nM). A microplaca foi incubada por 10 minutos a 37 °C. Após, foi adicionado 5 µL de pNPP (substrato sintético de fosfatase).

A absorbância foi medida a 410 nm em espectrofotômetro de placas ELISA (TECAN) por 10 minutos a 37 °C com leituras a cada minuto. Controle positivo foi feito na presença de DMSO no lugar do composto. O percentual de atividade inibitória foi calculado pela média de três experimentos feitos em triplicata em dias distintos.

6.2.7. Determinação dos valores de IC₅₀ das pirazolinas

O potencial de inibição das moléculas foi determinado por meio do cálculo do valor de IC₅₀ (concentração inibitória

necessária para cada inibidor diminuir em 50% a atividade da enzima original). Os valores de IC_{50} foram determinados graficamente usando concentrações crescentes de inibidor *versus* porcentagem de inibição (11 concentrações diferentes). A atividade enzimática é expressa em valores de percentual de atividade residual comparada ao controle sem inibidor. Os dados experimentais foram analisados por meio do programa Microsoft Office Excel 2016 e os valores de IC_{50} determinados graficamente por regressão linear de melhor ajuste. Os ensaios foram realizados em triplicata em três dias distintos.

6.2.8. Ensaios de seletividade da pirazolina 5c

Para a determinação do índice de seletividade determinou-se os valores de IC_{50} do inibidor frente às outras fosfatases (PtpB de Mtb, PEST e LYP). As mesmas condições empregadas na determinação do IC_{50} da PtpA foram empregadas exceto pela concentração das enzimas utilizadas (PtpB 3 μ M, PEST 14 μ M, YopH 1,5 μ M e LYP 160 nM). Posteriormente foi calculado o índice de seletividade para cada fosfatase ($IC_{50}^{PTP} / IC_{50}^{PtpA}$). Os ensaios foram realizados em triplicata em três dias distintos.

6.2.9. Ensaio de reversibilidade da pirazolina 5c

Para o ensaio de reversibilidade, foi utilizado 100 vezes a concentração da PtpA utilizada para determinação do IC_{50} (5 μ M) e 10 vezes a concentração do IC_{50} do inibidor (114 μ M). A enzima foi encubada na presença e ausência do inibidor (utilizando DMSO no lugar do inibidor) por 15 minutos a temperatura ambiente. Após,

foi adicionado 2 μL dessa mistura à placa de ELISA contendo 5 μL de *p*NPP, 50 μL de água Mili-Q e 5 μL de tampão imidazol. Foi realizada leitura da absorbância a 410 nm a 37 °C com leituras a cada minuto por 21 minutos. Os dados obtidos foram analisados no GraphPad Prism 5.0 por meio do gráfico Abs *versus* tempo.⁶⁶

6.2.10. Cinética enzimática

Para determinar o mecanismo de inibição foram usadas três concentrações de cada inibidor (5, 10 e 15 μM) e oito concentrações de *p*NPP (0,2, 0,4, 0,8, 1,6, 3,2, 6,4, e 12,8 e 20 mM). As velocidades de reação foram expressas como a atividade específica da proteína ($\mu\text{mol.pNP.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$). A produção de *p*-nitrofenol foi quantificada e analisada pelo gráfico de Michaelis-Menten no GraphPad Prism 5.0. O valor de K_i foi determinado pelo inverso da velocidade *versus* concentração do inibidor (gráfico de Dixon).⁷⁰ Todos os ensaios foram realizados em triplicata em três experimentos independentes.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. GUIDO, R. V. C.; ANDRICOPULO, A. D.; G., O. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. **Estudos Avançados**, v. 24, p. 81-98, 2010.
2. WERMUTH, C. G. et al. Glossary of terms used in Medicinal Chemistry. **Internacional Union of Pure and Applied Chemistry**, v. 70, p. 1129-1143, 1998.
3. AMARAL, A. T. D. Química medicinal: 25 anos de planejamento racional de fármacos. **Química Nova**, v. 25, p. 39-44, 2002.
4. BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química medicinal: bases moleculares da ação dos fármacos**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2015.
5. WHO. **Tuberculosis**, 2017. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/en/>>. Acesso em: 29 março 2017.
6. ADERLAINE DE MELO MENDES, L. M. F. Tuberculose: porque os pacientes abandonam o tratamento? **Boletim de Pneumologia Sanitária**, v. 12, p. 25-36, 2004.

7. TUBERCULOSE: doença do passado e do presente. **http://www.ensp.fiocruz.br/portal-ensp/informe/site/materia/detalhe/4586**, p. 197-199, 2007. Acesso em: 3 junho 2017.
8. VRANJAC, A. **Mudanças no tratamento da tuberculose**. Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. Sao Paulo, p. 3. 2010.
9. CAMPOS, H. S. Tratamento da tuberculose. **Pulmão RJ**, v. 16, p. 21-31, 2007.
10. PAI, M. et al. Tuberculosis. **Nature**, v. 2, p. 1-23, 2016.
11. KOUL, A. et al. Cloning and Characterization of Secretory Tyrosine Phosphatases of Mycobacterium tuberculosis. **Journal of Bacteriology**, v. 182, p. 5425-5432, 2000.
12. CHIARADIA, L. D. et al. Synthetic chalcones as efficient inhibitors of Mycobacterium tuberculosis protein tyrosine phosphatase PtpA. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 18, p. 6227-6230, 2008.
13. MASCARELLO, A. et al. Inhibition of Mycobacterium tuberculosis tyrosine phosphatase PtpA by synthetic chalcones: Kinetics, molecular modeling, toxicity and effect on growth. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 18, p. 3783-3789, 2010.

14. NOWAKOWSKA, Z. A review of anti-infective and anti-inflammatory chalcones. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 42, p. 125-137, 2007.
15. DIMMOCK, J. R. et al. Bioactivities of chalcones. **Current Medicinal Chemistry**, v. 6, n. 12, p. 1125-1149, 1999.
16. BOECK, P. E. A. Synthesis of chalcone analogues with increased antileishmanial activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 14, p. 1538-1545, 2006.
17. PINGAEW, R. E. A. Synthesis, biological evaluation and molecular docking of novel chalcone–coumarin hybrids as anticancer and antimalarial agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 85, p. 65-76, 2014.
18. KUMAR, S. K. et al. Design, synthesis, and evaluation of novel boronic-chalcone derivatives as antitumor agentes. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, p. 2813-2815, 2003.
19. KAMAL, A. et al. Design, synthesis and biological evaluation of imidazopyridine/pyrimidine-chalcone derivatives as potencial anticâncer agentes. **Medicinal Chemical Communication**, v. 1, p. 355-360, 2010.
20. DOAN, T. N.; TRAN, D. T. Synthesis, Antioxidant and Antimicrobial Activities of a Novel Series of Chalcones,

- Pyrazolic Chalcones, and Allylic Chalcones. **Pharmacology & Pharmacy**, v. 2, p. 282-288, 2012.
21. NARSINGHANI, T.; SHARMA, M. C.; BHARGAV, S. Synthesis, docking studies and antioxidant activity of some chalcone and aurone derivatives. **Medicinal Chemistry Research**, v. 22, p. 4059-4068, 2012.
22. SIVAKUMAR, P. M.; PRABHAKAR, P. K.; DOBLE, M. Synthesis, antioxidant evaluation, and quantitative structure–activity relationship studies of chalcones. **Medicinal Chemistry Research**, v. 20, n. 4, p. 482-492, 2010.
23. LÓPEZ, S. N. E. A. In vitro antifungal evaluation and structure–activity relationships of a new series of chalcone derivatives and synthetic analogues, with inhibitory properties against polymers of the fungal cell wall. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 9, p. 1999-2013, 2001.
24. RAO, N. S.; KISTAREDDY, C.; BALRAM BHAVANI, R. B. Synthesis, Antibacterial and Antifungal Activity of Some Novel Chalcone Derivatives Derived from Apocynin. **Chemistry Journal**, v. 3, p. 143-148, 2013.
25. CHEENPRACHA, S. E. A. Anti-HIV-1 protease activity of compounds from *Boesenbergia pandurata*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 14, p. 1710-1714, 2006.

26. EDDARIR, S. et al. An efficient synthesis of chalcones based on the Suzuki reaction. **Tetrahedron Letters**, v. 44, p. 5359–5363, 20003.
27. DYRAGER, C. **Design and Synthesis of Chalcone and Chromone Derivatives as Novel Anticancer Agents**. Doctoral Thesis Department of Chemistry University of Gothenburg. Göteborg., p. 89. 2012.
28. KONIECZNY, M. T. et al. Acid-catalyzed synthesis of oxathiolone fused chalcones. Comparison of their activity toward various microorganisms and human cancer cells line. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 42, p. 729-733, 2007.
29. SRIVASTAVA, Y. K. Ecofriendly microwave assisted synthesis of some chalcones. **Rasayan Journal of Chemistry**, v. 1, n. 4, p. 884-886, 2008.
30. ERWAN LE GALL, F. T.-B. J. H. Synthetic Communications: An International Journal for Rapid Communication of Synthetic Organic Chemistry. **Synthetic**, v. 29, p. 3651-3657, 1999.

31. VOGEL, A. I. et al. **Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry**. 5. ed. Londres: Technical, Longman Scientific &, 1989. 1033 p.
32. KARTHIKEYAN, M. S.; HOLLA, B. S.; KUMARI, N. S. Synthesis and antimicrobial studies on novel chloro-fluorine containing hydroxy pyrazolines. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 42, n. 1, p. 30-36, 2007.
33. ÖZDEMİR, A. E. A. Synthesis and antimicrobial activity of 1-(4-aryl-2-thiazolyl)-3-(2-thienyl)-5-aryl-2-pyrazoline derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 42, n. 3, p. 403-409, 2007.
34. PALASKA, E. E. A. Synthesis and antidepressant activities of some 3,5-diphenyl-2-pyrazolines. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 36, n. 6, p. 539-543, 2001.
35. KHAN, S. A. E. A. Green synthesis, antibacterial activity and computational study of pyrazoline and pyrimidine derivatives from 3-(3,4-dimethoxy-phenyl)-1-(2,5-dimethylthiophen-3-yl)-propenone. **European Journal of Chemistry**, v. 5, p. 85-90, 2014.
36. CHANDRA, T. E. A. Synthesis of substituted acridinyl pyrazoline derivatives and their evaluation for anti-

- inflammatory activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 5, p. 1772-1776, 2010.
37. NEUENFELDT, P. D. **Planejamento, Síntese e Avaliação Biológica de Derivados Pirazolínicos e Bis-chalconas Simétricas: Estudos de Correlação Estrutura/Atividade**. Tese de doutorado Programa de Pós-Graduação em Química Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, p. 355. 2015.
38. RAGHAV, N.; SINGH, M. SAR studies of differently functionalized chalcones based hydrazones and their cyclized derivatives as inhibitors of mammalian cathepsin B and cathepsin H. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 22, p. 4233-4245, 2014.
39. KAVITHA, N. V. E. A. Synthesis and antimicrobial activities of some new pyrazole derivatives. **Der Pharma Chemica**, v. 3, p. 55-62, 2011.
40. RANGANATHAN, K. et al. SOCl₂ catalyzed cyclization of chalcones: synthesis and spectral studies of some bio-potent 1h pyrazoles. **Bulletin of the Chemical Society of Ethiopia**, v. 28, p. 271-288, 2014.

41. SWARNKAR, D. E. A. Microwave assisted synthesis of some pyrazole derivatives and their antibacterial and antifungal activity. **The Pharma Innovation Journal**, v. 3, p. 5-9, 2014.
42. **Portal da Saude**, 2014. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/741-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/tuberculose/11481-descricao-da-doenca>>. Acesso em: 21 abril 2017.
43. SOUZA, M. V. N. D.; VASCONCELOS, T. R. A. Fármacos no combate à tuberculose: passado, presente e futuro. **Química Nova**, v. 28, p. 678-682, 2005.
44. WHO. **Tuberculosis**, 2017. Disponível em: <<http://www.who.int/tb/en/>>. Acesso em: 13 março 2017.
45. RUIZ-MANZANO, J. et al. Diagnóstico y tratamiento de la tuberculosis. **Archivos De Bronconeumologia**, v. 44, p. 551-566, 2008.
46. CHIANG, C. Y. E. A. Challenges to the global control of tuberculosis. **Respirology**, v. 18, p. 596-604, 2013.
47. CRUZ-KNIGHT, W.; BLAKE-GUMBS, L. Tuberculosis: An overview. **Primary Care**, v. 40, p. 743-756, 2013.

48. HESTVIK, A. L. K.; HMAMA, Z.; AV-GAY, Y. Kinome Analysis of Host Response to Mycobacterial Infection: a Novel Technique in Proteomics. **Infection and Immunity**, v. 71, p. 5517-5522, 2003.
49. WONG, D. E. A. Mycobacterium tuberculosis protein tyrosine phosphatase (PtpA) excludes host vacuolar-H(+)-ATPase to inhibit phagosome acidification. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, p. 19371-19376, 2011.
50. MADHURANTAKAM, C. E. A. Crystal Structure of Low-Molecular-Weight Protein Tyrosine Phosphatase from Mycobacterium tuberculosis at 1.9-Å Resolution. **Journal of Bacteriology**, v. 187, p. 2175-2181, 2005.
51. BACH, H. E. A. Mycobacterium tuberculosis virulence is mediated by PtpA dephosphorylation of human vacuolar protein sorting 33B. **Cell Host Microbe**, v. 3, p. 316-322, 2008.
52. MANGER, M. E. A. Discovery of Mycobacterium tuberculosis protein tyrosine phosphatase A (MtpA) inhibitors based on natural products and a fragment-based approach. **Chembiochem**, v. 6, p. 1749-1753, 2005.
53. ÖZDEMİR, A.; AL., E. Synthesis and Biological Evaluation of a New Series of Pyrazolines as New Anticandidal Agents.

Pharmaceutical Chemistry Journal, v. 48, n. 9, p. 603-612, 2014.

54. RAHMAN, M. A.; SIDDIQUI, A. A. Pyrazoline Derivatives: A Worthy Insight into the Recent Advances and Potential Pharmacological Activities. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research**, v. 2, p. 165-175, 2010.
55. ABDULLAH, S. A. Microwave-assisted synthesis of chalcones, flavanones and 2-Pyrazolines: theoretical and experimental study. **Letters in Organic Chemistry**, v. 9, p. 530-537, 2012.
56. ANASTAS, P. T.; WARNER, J. C. **Green Chemistry Theory and Practice**. New York: [s.n.], 1998.
57. LENARDÃO, E. J. E. A. "Green chemistry" – Os 12 princípios da química verde e sua inserção nas atividades de ensino e pesquisa. **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 123-129, 2003.
58. KAPPE, C. O. Controlled Microwave Heating in Modern Organic Synthesis. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 43, p. 6250-6284, 2004.
59. CHIARADIA, L. D. **Síntese, caracterização e estudo da relação estrutura-atividade (rea) de chalconas e de**

- compostos heterocíclicos biologicamente ativos em doenças negligenciadas, hiperglicemia e leucemia.** Tese de doutorado programa de pós-graduação em química universidade federal de santa catarina. [s.l.], p. 524. 2010.
60. MCMURRY, J. **Química Orgânica – COMBO.** Tradução de Ana Flávia Nogueira e Izilda Aparecida Begatin. São Paulo: Learning, Pioneira Thomson, 2005. 843-847 p.
61. REGAILA, H. A. A.; LATIF, N.; IBRAHIM, I. H. Synthesis of newer naphthylpyrazolines, pyrazoles and chalcone epoxides of expected biological activity. **Egyptian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 30, p. 179-192, 1989.
62. REGAILA, H. A. A. Synthesis of newer N-acetyl-, N-arylpyrazoline, -isoxazole, and -benzodioxane derivatives of biological activity. **Egyptian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 29, p. 191-206, 1988.
63. EL-BAYOUKI, K. A. H. M.; ABDEL HAMID, M. M. Synthesis and biological screening of some new naphthyl-pyrazolines, pyrazoles and their carbanilide derivatives. **Egyptian Journal of Chemistry**, v. 22, p. 37-48, 1981.
64. MONGA, V. et al. Synthesis and evaluation of new chalcones, derived pyrazoline and cyclohexenone derivatives as potent

- antimicrobial, antitubercular and antileishmanial agents. **Medicinal Chemistry Research**, v. 23, p. 2019-2032, 2014.
65. CHIARADIA, L. D. et al. Synthesis, Biological Evaluation, And Molecular Modeling of Chalcone Derivatives As Potent Inhibitors of Mycobacterium tuberculosis Protein Tyrosine Phosphatases (PtpA and PtpB). **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, p. 390–402, 2012.
66. COPELAND, R. A. **Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery**. New Jersey: Wiley, 2005. 125-128 p.
67. NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger – Principles of Biochemistry**. 4. ed. [S.l.]: Freeman, W. H., 2008.
68. VOET, D.; VOET, J. G. **Biochemistry**. 4. ed. Danvers: [s.n.], 2011.
69. BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.
70. DIXON, M. The determination of Enzyme Inhibitor Constants. **Biochemical Journal**, v. 55, p. 170-171, 1953.

APÊNDICE

Figura 26. Espectro de RMN de ^1H da pirazolina **4** (400 MHz, CDCl_3).

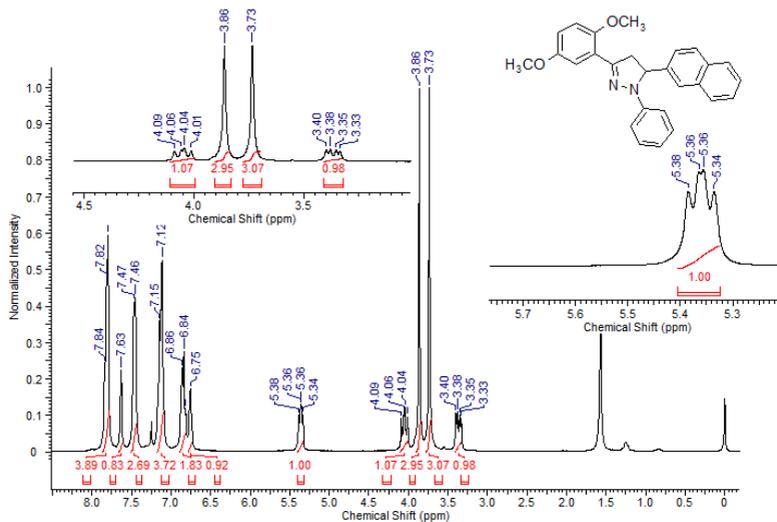


Figura 27. Espectro de RMN de ^{13}C da pirazolina **4** (50 MHz, CDCl_3).

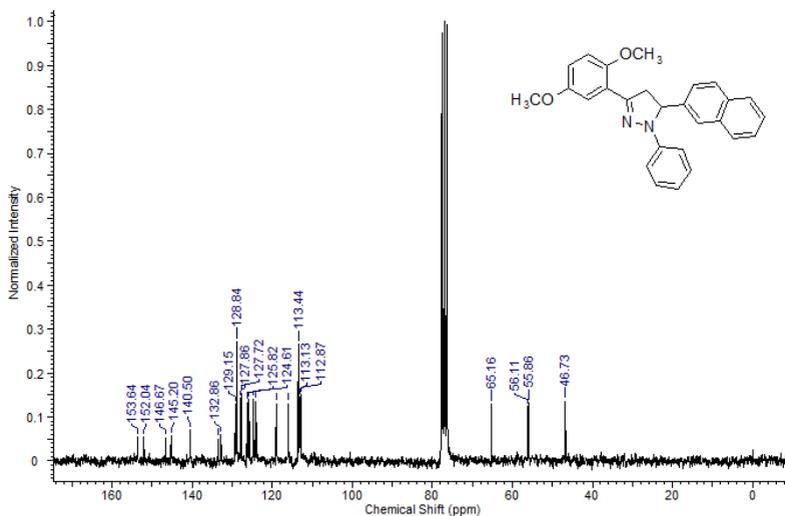


Figura 28. Espectro de RMN de ^1H da pirazolina **5a** (200 MHz, CDCl_3).

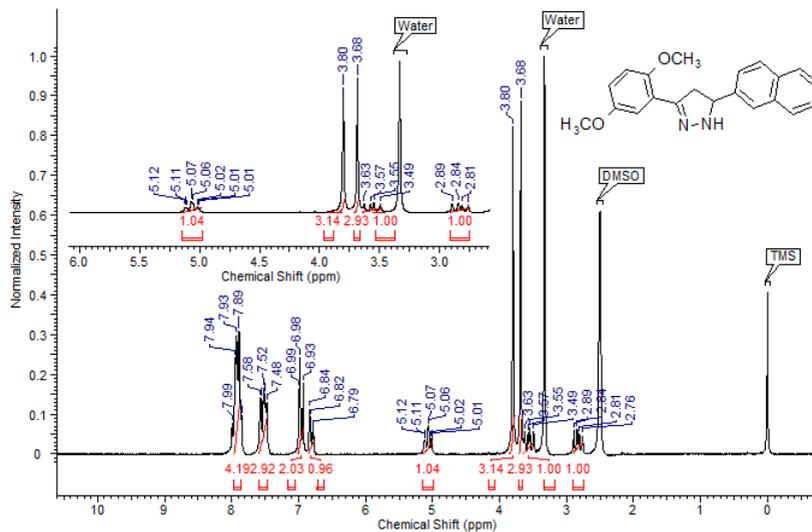


Figura 29. Espectro de RMN de ^{13}C da pirazolina **5a** (50 MHz, CDCl_3).

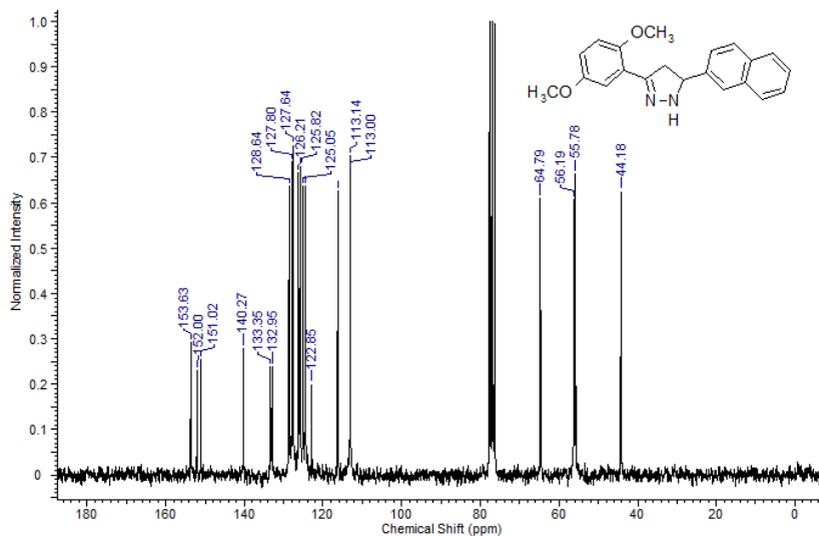


Figura 30. Espectro de massas de alta resolução da pirazolina **5a**

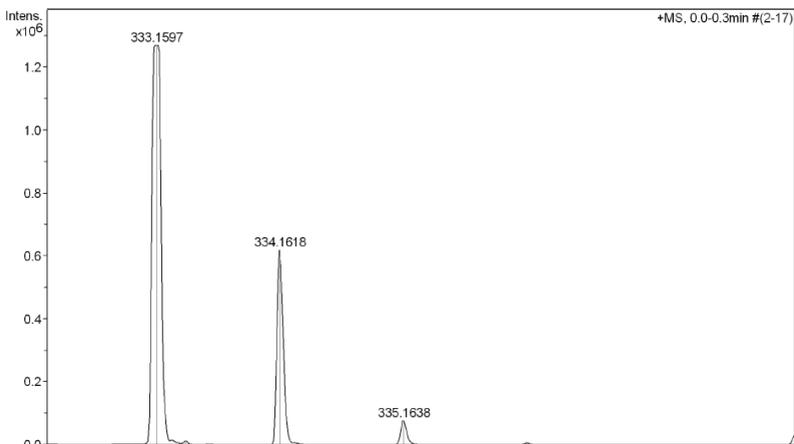


Figura 31. Espectro de RMN de ¹H da pirazolina **5b** (200 MHz, CDCl₃).

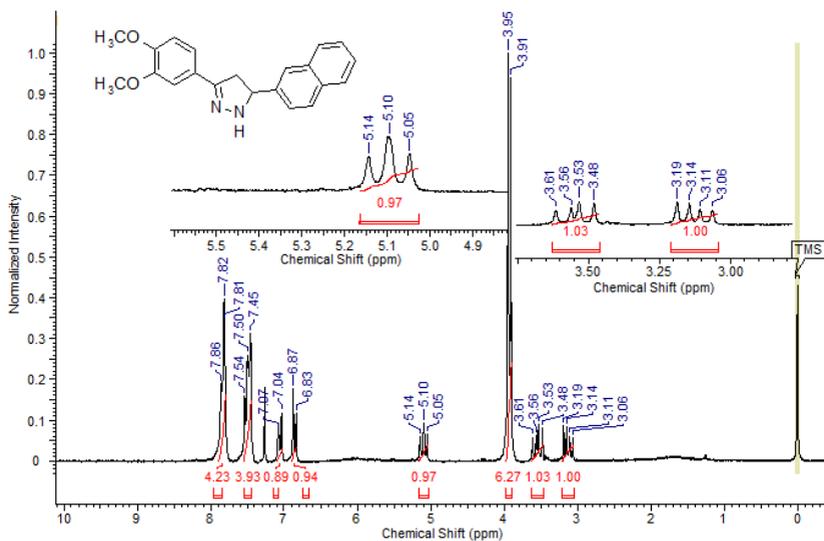


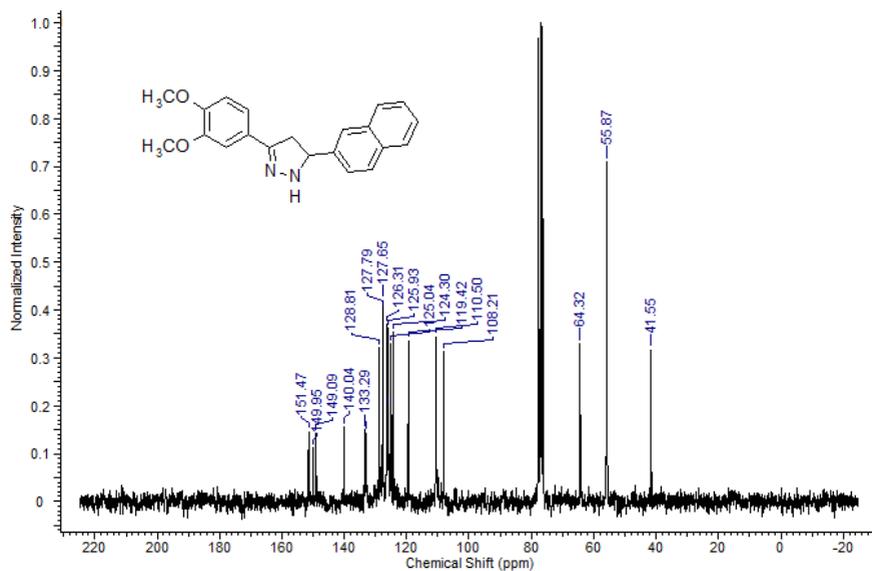
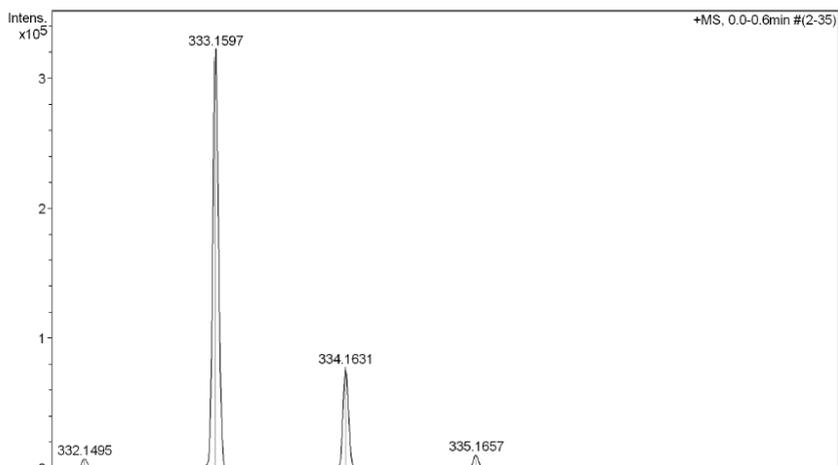
Figura 32. Espectro de RMN de ^{13}C da pirazolina **5b** (50 MHz, CDCl_3).**Figura 33.** Espectro de massas de alta resolução da pirazolina **5b**

Figura 34. Espectro de RMN de ^1H da pirazolina **5c** (200 MHz, CDCl_3).

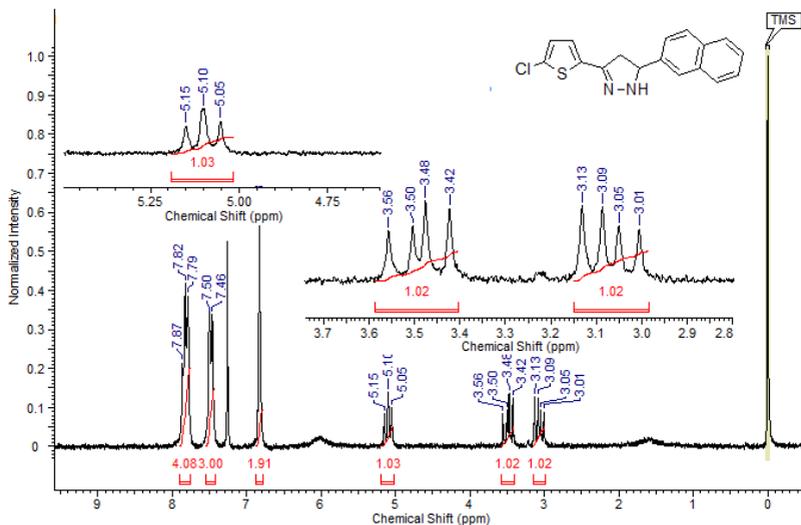


Figura 35. Espectro de RMN de ^{13}C da pirazolina **5c** (50 MHz, CDCl_3).

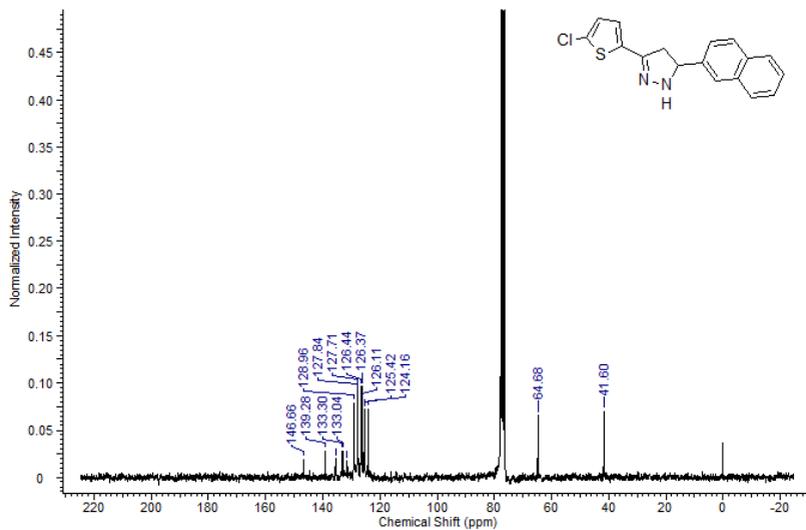


Figura 36. Espectro de massas de alta resolução da pirazolina **5c**

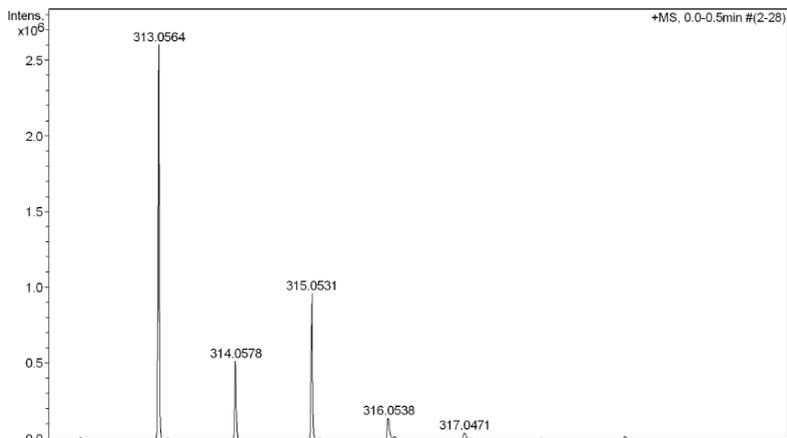


Figura 37. Espectro de RMN de ¹H da pirazolina **5d** (200 MHz, CDCl₃).

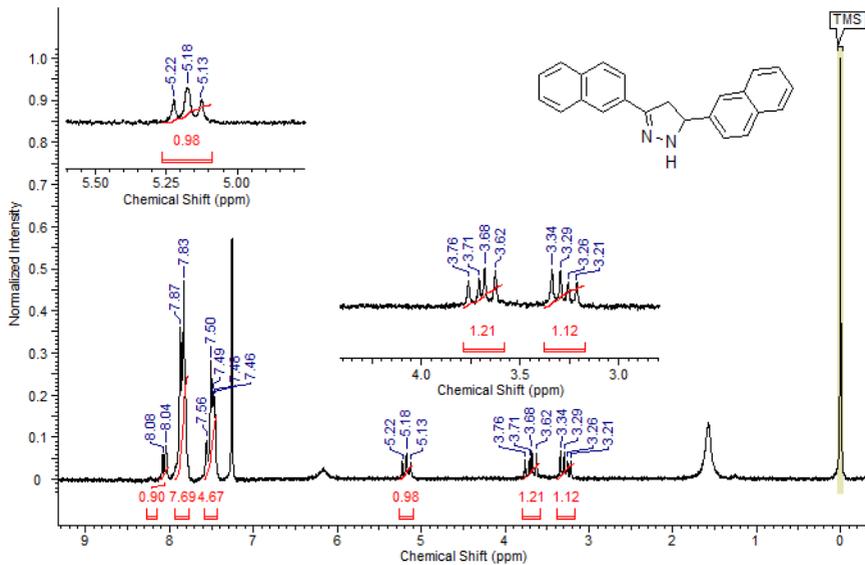


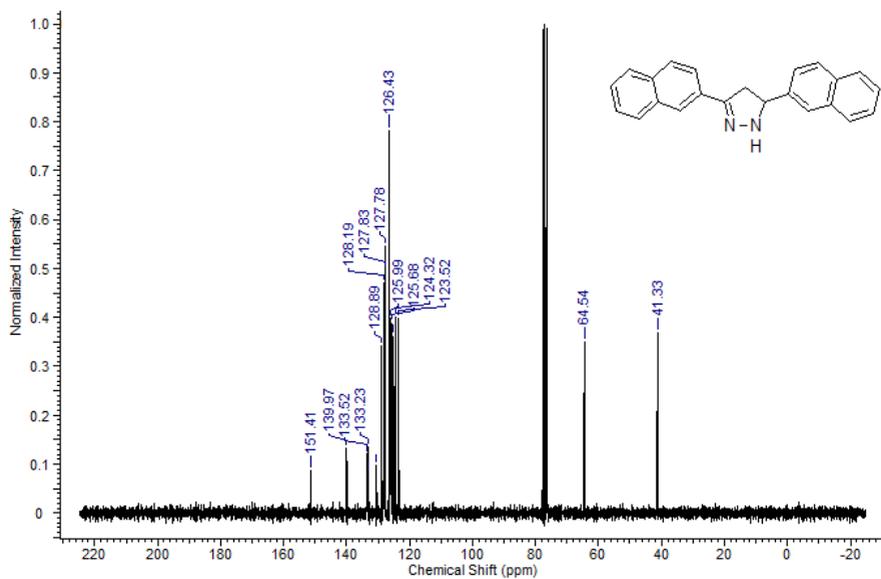
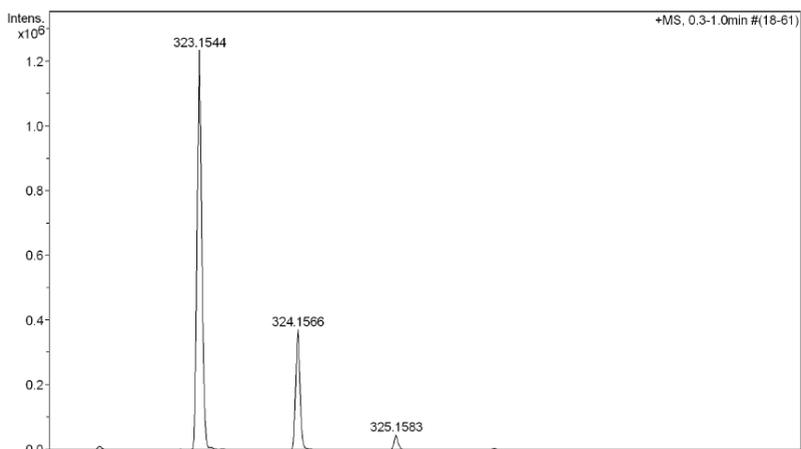
Figura 38. Espectro de RMN de ^{13}C da pirazolina **5d** (50 MHz, CDCl_3).**Figura 39.** Espectro de massas de alta resolução da pirazolina **5d**

Figura 40. Espectro de RMN de ^1H da pirazolina **5e** (200 MHz, CDCl_3).

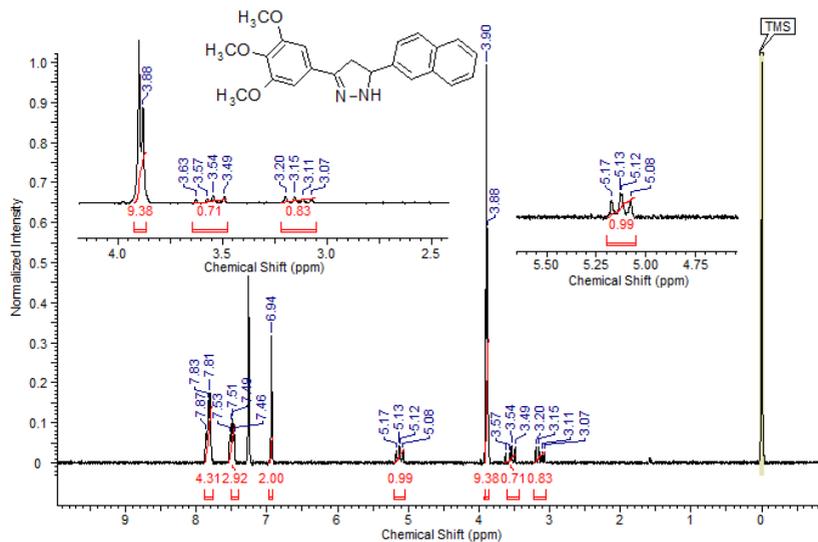


Figura 41. Espectro de RMN de ^{13}C da pirazolina **5e** (50 MHz, CDCl_3).

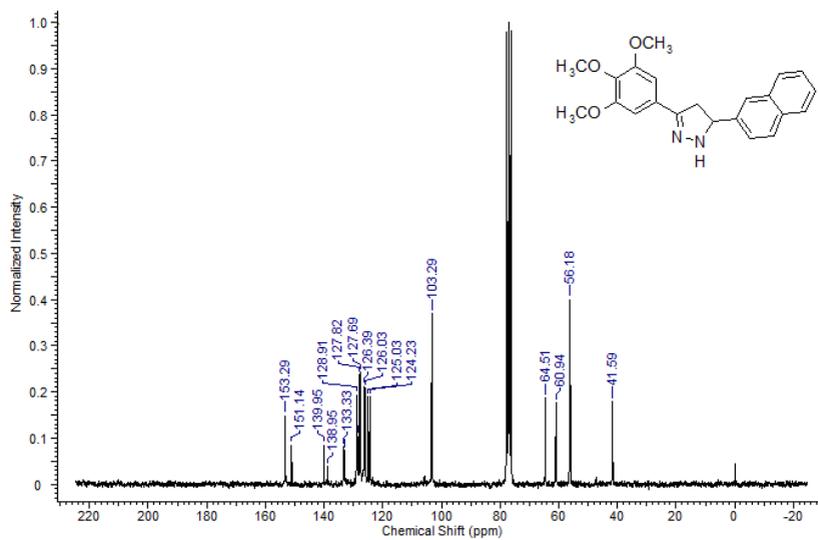


Figura 42. Espectro de massas de alta resolução da pirazolina **5e**

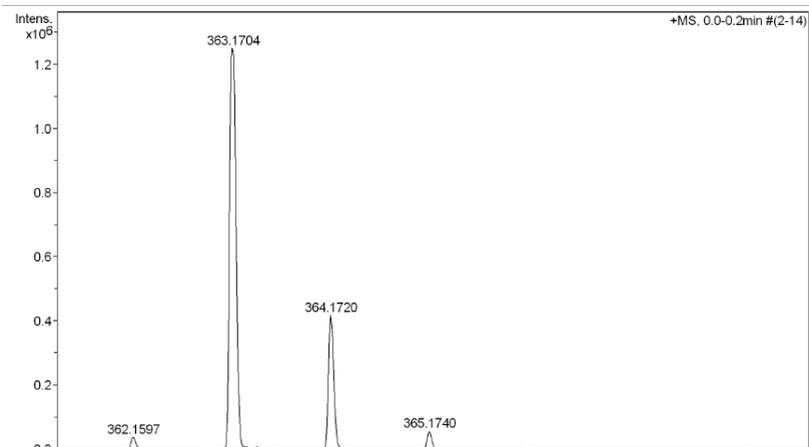


Figura 43. Espectro de RMN de ¹H da pirazolina **5f** (200 MHz, CDCl₃).

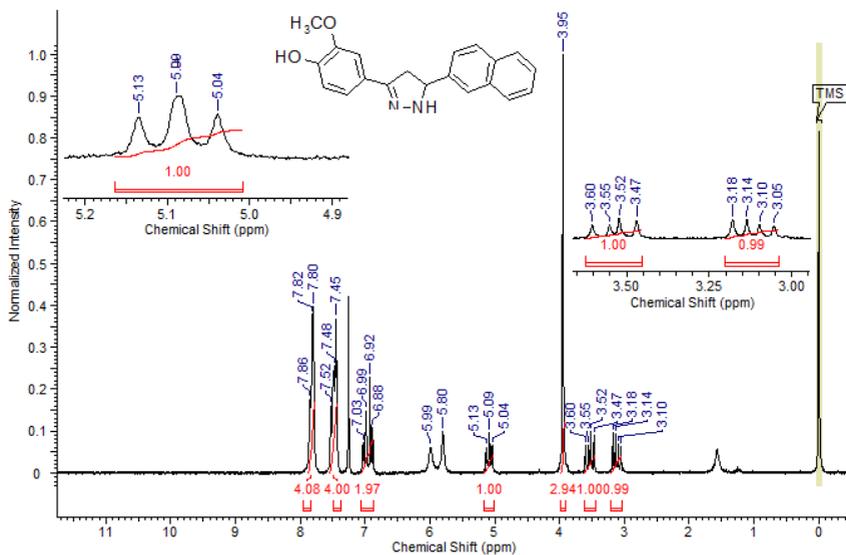


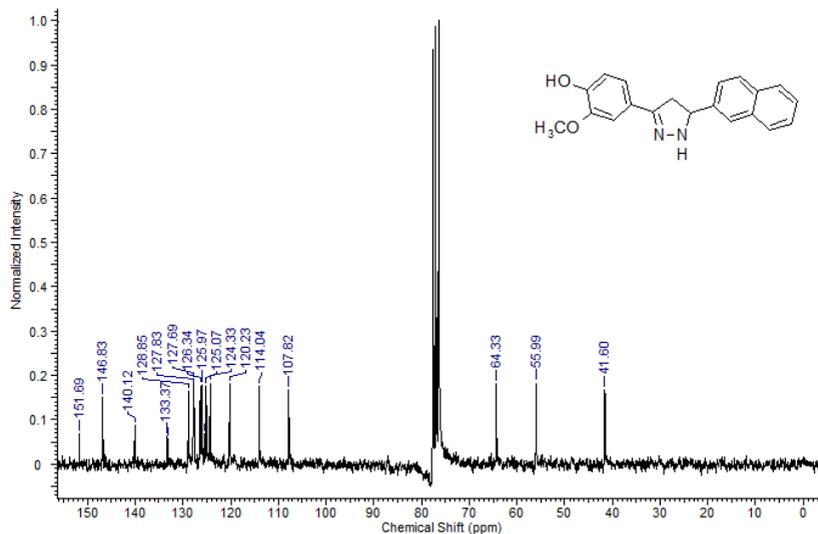
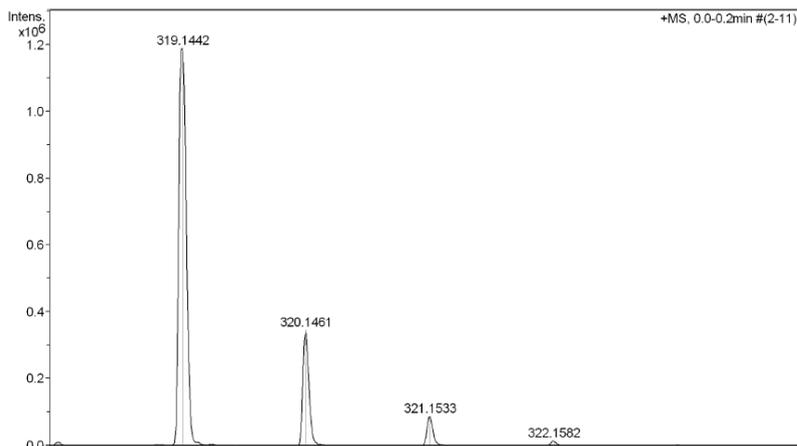
Figura 44. Espectro de RMN de ^{13}C da pirazolina **5f** (50 MHz, CDCl_3).**Figura 45.** Espectro de massas de alta resolução da pirazolina **5f**

Figura 46. Espectro de RMN de ^1H da pirazolina **5g** (200 MHz, CDCl_3).

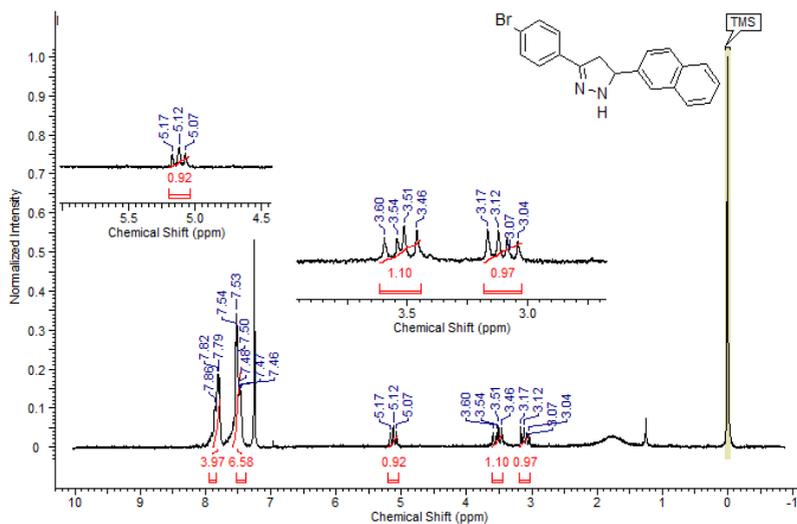


Figura 47. Espectro de RMN de ^{13}C da pirazolina **5g** (50 MHz, CDCl_3).

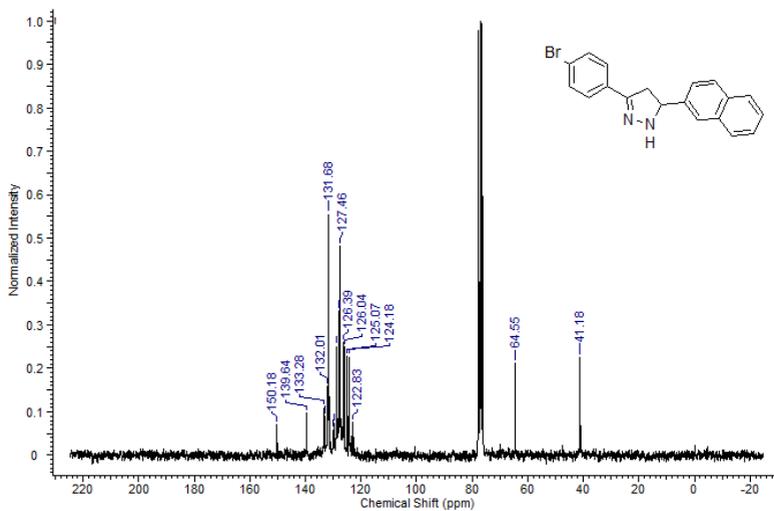


Figura 48. Espectro de massas de alta resolução da pirazolina **5g**

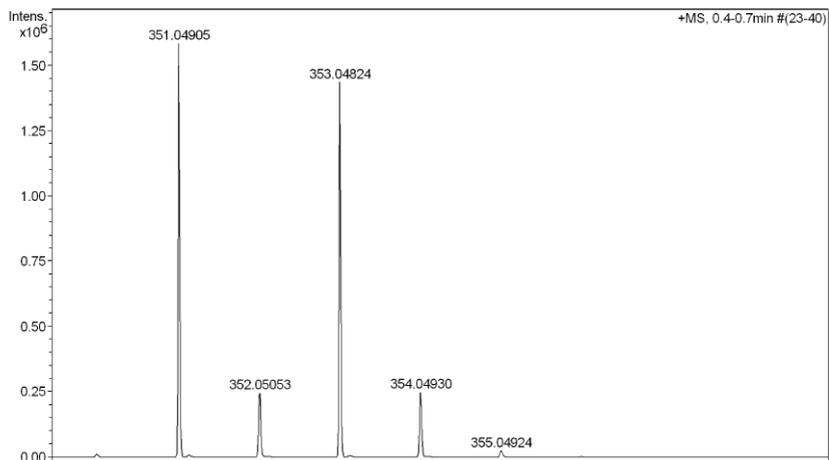


Figura 49. Espectro de RMN de ^1H da pirazolina **5h** (200 MHz, CDCl_3).

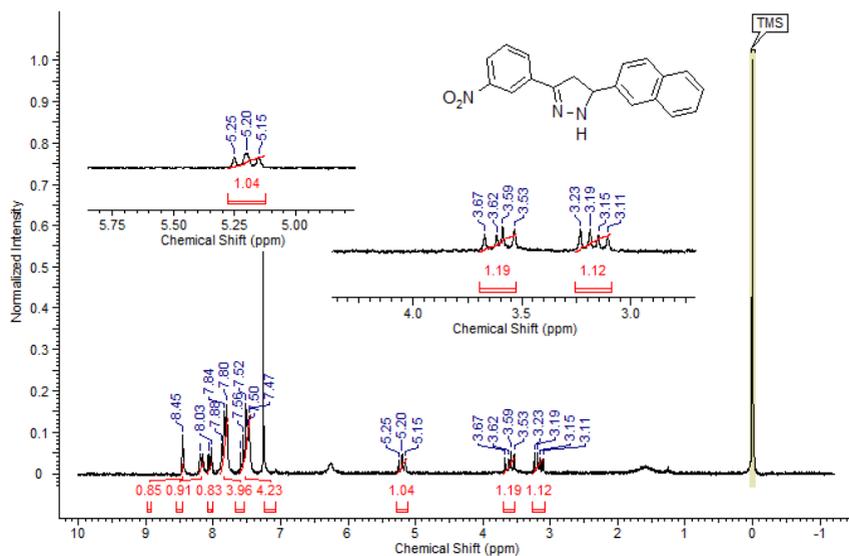


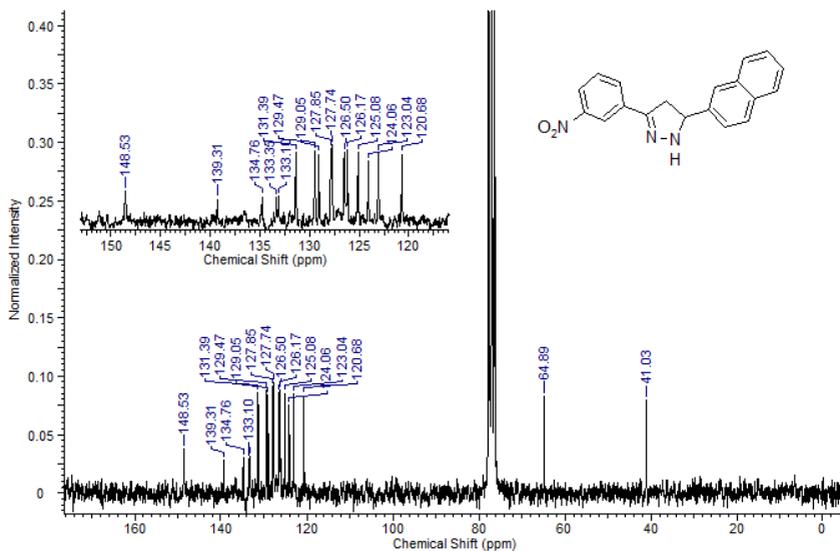
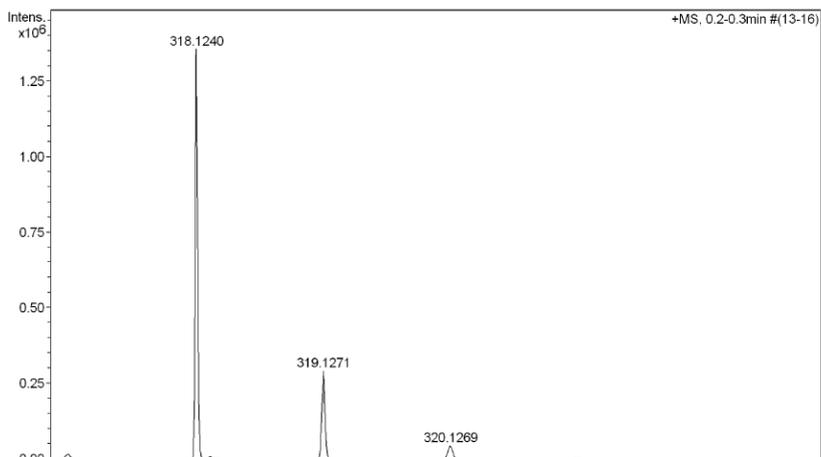
Figura 50. Espectro de RMN de ^{13}C da pirazolina **5h** (50 MHz, CDCl_3).**Figura 51.** Espectro de massas de alta resolução da pirazolina **5h**

Figura 52. Espectro de RMN de ^1H da pirazolina 5i (200 MHz, CDCl_3).

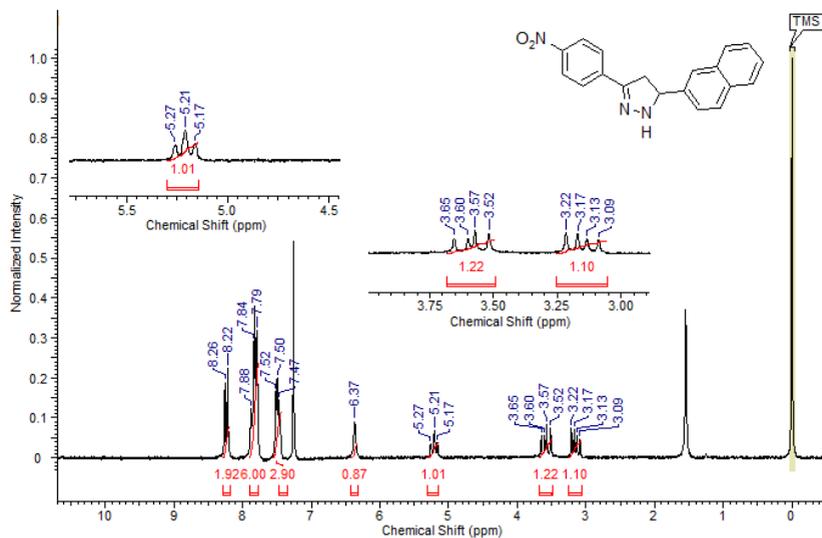


Figura 53. Espectro de RMN de ^{13}C da pirazolina 5i (50 MHz, DMSO).

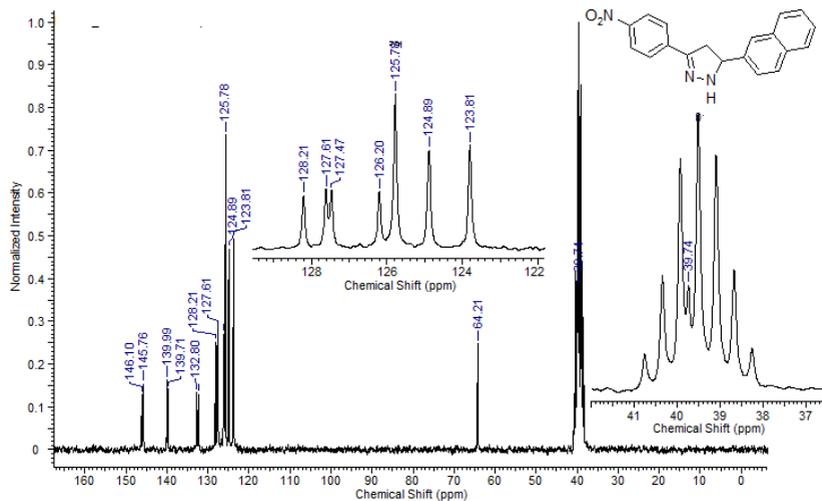


Figura 54. Espectro de massas de alta resolução da pirazolina **5i**

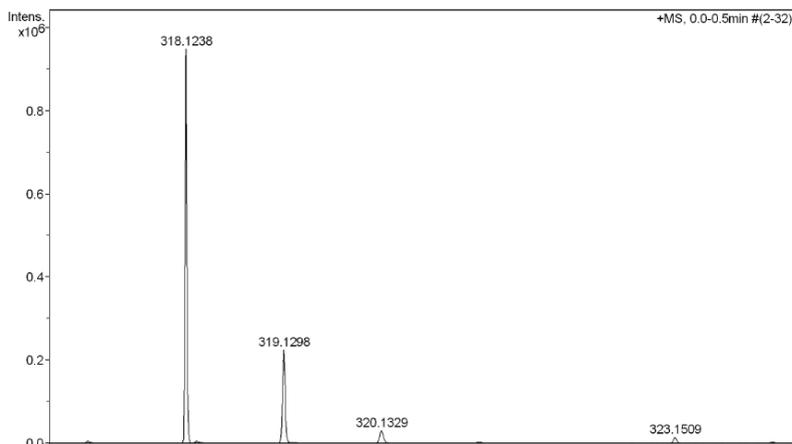


Figura 55. Espectro de RMN de ¹H da pirazolina **5j** (200 MHz, CDCl₃).

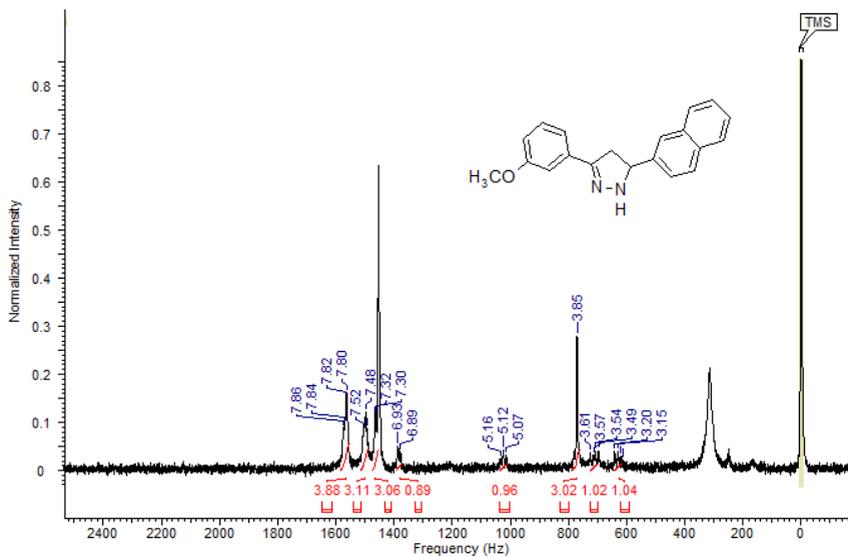


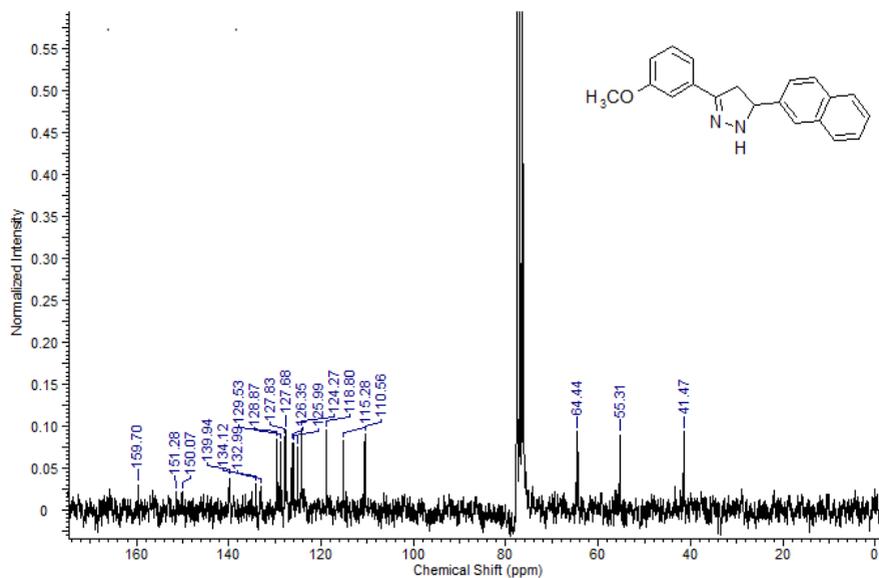
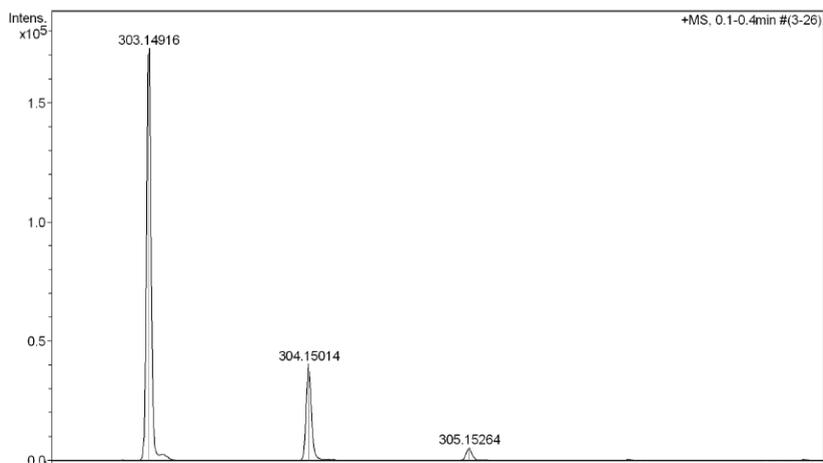
Figura 56. Espectro de RMN de ^{13}C da pirazolina **5j** (50 MHz, CDCl_3).**Figura 57.** Espectro de massas de alta resolução da pirazolina **5j**

Figura 58. Espectro de RMN de ^1H da pirazolina **5k** (200 MHz, CDCl_3).

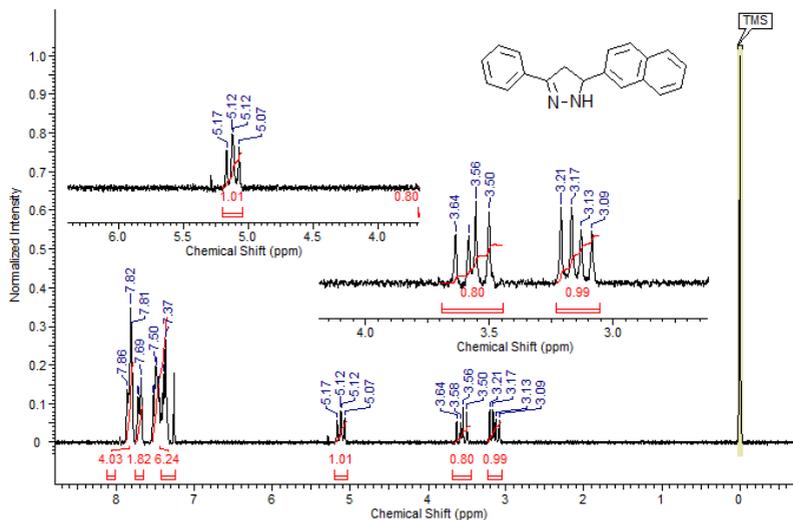


Figura 59. Espectro de RMN de ^{13}C da pirazolina **5k** (50 MHz, DMSO).

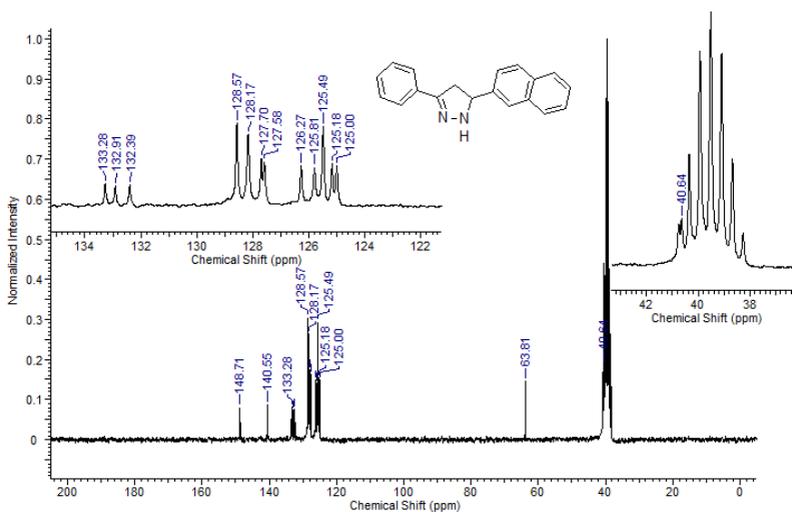


Figura 60. Espectro de massas de alta resolução da pirazolina **5k**