

UFRRJ
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

DISSERTAÇÃO

**Síntese, Caracterização e Avaliação *in silico* e *in vitro* do Efeito Anti-leucemia de
Pirazóis Tetra-substituídos sobre Células Jurkat**

Felipe Pires Machado

2024



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Síntese, Caracterização e Avaliação *in sílico* e *in vitro* do Efeito Anti-leucemia de
Pirazóis Tetra-substituídos sobre Células Jurkat

FELIPE PIRES MACHADO

Sob a Orientação da Professora
Dra Aurea Echevarria Aznar Neves Lima

e Co-orientação do Professor
Dr Diego Pereira Sangi

Dissertação submetida como requisito
parcial para obtenção do grau de **Mestre em
Química**, no Programa de Pós-Graduação em
Química, Área de Concentração em Química.

Seropédica
Janeiro de 2024

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

M149s Machado, Felipe Pires, 1988-
Síntese, Caracterização e Avaliação in sílico e in vitro do Efeito Anti-leucemia de Pirazóis Tetra substituídos sobre Células Jurkat / Felipe Pires Machado. - VOLTA REDONDA, 2024.
127 f.

Orientadora: Aurea Echevarria Aznar Neves Lima.
Coorientador: Diego Pereira Sangi.
Dissertação(Mestrado). -- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós -graduação em Química, 2024.

1. Pirazol. 2. Compostos Heterocíclicos . 3. Síntese em Micro-ondas . 4. Atividade antileucêmica. I. Lima, Aurea Echevarria Aznar Neves, 1950-, orient. II. Sangi, Diego Pereira, 1986-, coorient. III Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós -graduação em Química. IV. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

FELIPE PIRES MACHADO

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Química, no Programa de Pós-Graduação em Química, Área de concentração Química.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 25/01/2024

Aurea Echevarria. Dr^a.UFRRJ (Orientadora)

Rosane Nora Castro Dr^a. UFRRJ

Felipe Vitorio Ribeiro Dr. SEDUCRJ



TERMO N° 24/2024 - PPGQ (12.28.01.00.00.00.60)

(N° do Protocolo: NÃO PROTOCOLADO)

(Assinado digitalmente em 26/01/2024 10:03)

AUREA ECHEVARRIA AZNAR NEVES LIMA

PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR

DQO (11.39.00.23)

Matrícula: ###71#9

(Assinado digitalmente em 26/01/2024 22:19)

ROSANE NORA CASTRO

PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR

DQO (11.39.00.23)

Matrícula: ###775#8

(Assinado digitalmente em 25/01/2024 18:03)

FELIPE VITÓRIO RIBEIRO

ASSINANTE EXTERNO

CPF: ###.###.327-##

Visualize o documento original em <https://sipac.ufrj.br/documentos/> informando seu número: **24**, ano: **2024**, tipo: **TERMO**, data de emissão: **25/01/2024** e o código de verificação: **8615062339**

AGRADECIMENTOS

A Deus por colocar em minha vida pessoas especiais que me ajudaram a chegar até aqui.

À minha orientadora, Profa. Dra. Aurea Echevarria, e ao meu Coorientador, Prof. Dr. Diego Sangi, por confiarem em mim, me aceitarem como aluno e por todo conhecimento passado.

À minha mãe, Terezinha, aos meus irmãos, Fábio e Fernanda e ao meu sobrinho e afilhado, Heitor, por estarem ao meu lado em todos os momentos, obrigado pelo amor e carinho de sempre.

Ao meu esposo, Leonardo e seus guias espirituais, por me incentivar e dar a força necessária para não desistir.

À Profa. Dra. Rosane Nora por toda atenção e apoio dados ao longo destes anos, pela pessoa e profissional admirável que é.

Às colaboradoras Profa. Dra. Juliana Echevarria e MSc. Maria Clara Campos por gentilmente cederem a linhagem de células e tornar possível os ensaios *in silico* e *in vitro*.

Aos colegas de laboratório, Igor, Geicy, Willian, Gabriela e Gabriel pelas palavras de apoio e toda ajuda gentilmente dada a mim.

À amiga Dandara por se fazer presente, me apoiar e principalmente por acreditar em mim ao me incentivar em momentos de fragilidade.

Aos técnicos da Central Analítica por realizarem as análises espectroscópicas dos compostos sintetizados.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, ao Programa de Pós-graduação em Química e à Universidade Federal Fluminense.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

MACHADO, Felipe Pires. **Síntese, Caracterização e Avaliação *in silico* e *in vitro* do Efeito Anti-leucemia de Pirazóis Tetra-substituídos sobre Células Jurkat**. 2024. 118p. Dissertação de Mestrado em Química. Instituto de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2024.

Pirazóis são compostos heterocíclicos aromáticos de cinco membros dos quais três são átomos de carbono e os outros dois são átomos de nitrogênio que, por convenção, assumem as posições 1 e 2 do anel. Dado seu amplo espectro de atividades biológicas relatadas na literatura, como analgésica e anti-inflamatória, bactericida, fungicida, antiviral, antitumoral entre outras, esta classe de compostos heterocíclicos tem despertado o interesse das indústrias químicas e farmacêuticas que buscam continuamente novas substâncias que sejam potencialmente mais eficazes no combate às doenças e, ao mesmo tempo, apresentem menor toxicidade. O câncer é uma doença que constitui a segunda maior causa de morte no Brasil e no mundo. As leucemias são um grupo de neoplasias malignas que tem como principal característica a proliferação descontrolada de células progenitoras hematopoiéticas imaturas. Uma vez produzidas, essas células se acumulam na medula óssea (MdO) causando uma série de danos e comprometimento de suas funções normais. Neste contexto, empregando três precursores nitrilados (**47-49**) previamente sintetizados e quatro nucleófilos distintos, este trabalho teve como objetivo a preparação de uma família de dez pirazóis (**53-62**), sendo dois deles inéditos (**56** e **59**). Foram empregadas técnicas espectroscópicas tais como infravermelho, ressonância magnética nuclear de hidrogênio e de carbono-13 para confirmação das estruturas propostas. Uma vez confirmadas, as dez estruturas foram submetidas a testes *in silico* por meio dos *softwares* LCL-Pred e AdmetSAR no intuito de realizar uma triagem para posterior avaliação biológica destes compostos. Deste modo, a partir dos dados gerados nessa análise, foi possível sugerir que os compostos **53** e **60** seriam aqueles com maior probabilidade de possuírem atividade antitumoral e ao mesmo tempo com chances de apresentarem níveis de baixa toxicidade. Uma vez selecionados, estes dois pirazóis foram submetidos a análises de toxicidade empregando o método da *Artemia salina* e seus efeitos na viabilidade de células cancerígenas da linhagem Jurkat. Estes estudos mostraram que ambos apresentaram efeitos sobre a inibição da viabilidade celular, tendo sido este mais ativo no composto **60**. Dada a semelhança estrutural entre estes compostos, sendo o substituinte ligado ao anel pirazólico na posição 4, ser a única diferença, foi possível sugerir

que o grupo nitrila desempenha um importante papel nesse mecanismo de ação sobre as células cancerígenas avaliadas.

Palavras-chave: Pirazol. Compostos heterocíclicos. Síntese em micro-ondas. Atividade antileucêmica.

ABSTRACT

MACHADO, Felipe Pires. **Synthesis, Characterization and In Silico and In Vitro Evaluation of the Anti-leukemia Effect of Tetra-substituted Pyrazoles on Jurkat Cells.** 2024. 1190. Master's Dissertation in Chemistry. Institute of Chemistry, University Federal Rural of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2024.

Pyrazoles are five-membered aromatic heterocyclic compounds of which three are carbon atoms and the other two are nitrogen atoms that, by convention, assume positions 1 and 2 of the ring. Given its wide spectrum of biological activities reported in the literature, such as analgesic and anti-inflammatory, bactericidal, fungicidal, antiviral, antitumor and others, this class of heterocyclic compounds has aroused the interest of chemical and pharmaceutical industries that continually search for new substances that are potentially more effective in combating diseases and, at the same time, have lower toxicity. Cancer is a disease that is the second cause of death in Brazil and worldwide. Leukemias are a group of malignant neoplasms whose main characteristic is the uncontrolled proliferation of immature hematopoietic progenitor cells. Once produced, these cells accumulate in the bone marrow (BM), causing a series of damages and compromising their normal functions. In this context, using three previously synthesized nitriled precursors (**47-49**) and four different nucleophiles, this work aimed to prepare a family of ten pyrazoles (**53-62**), two of which are new (**56** and **59**). Spectroscopic techniques such as infrared, hydrogen and carbon-13 nuclear magnetic resonance were used to confirm the proposed structures. Once confirmed, the ten structures were subjected to in silico tests using the LCL-Pred and AdmetSAR software in order to carry out screening for subsequent biological evaluation of these compounds. Thus, based on the data generated in this analysis, it was possible to suggest that compounds **53** and **60** would be those most likely to have antitumor activity and at the same time likely to present low toxicity levels. Once selected, these two pyrazoles were subjected to toxicity analyzes using the *Artemia salina* method and their effects on the viability of Jurkat cancer cells. These studies showed that both had effects on the inhibition of cell viability, with compound **60** being more active. Given the structural similarity between these compounds, with the substituent linked to the pyrazole ring in position 4 being the only difference, it was possible to suggest that the nitrile group plays an important role in this mechanism of action on the cancer cells evaluated.

Keywords: Pyrazole. Heterocyclic compounds. Microwave synthesis. Antileukemic activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Núcleos base pirrol (1), furano (2) e tiofeno (3).....	21
Figura 2. Estrutura do antimalárico quinina (4) e de seus análogos cloroquina (5) e mefloquina (6).....	22
Figura 3. Exemplos de fármacos mundialmente usados com destaque para a presença de sistemas heterocíclicos em suas estruturas.....	23
Figura 4. a) Estruturas dos núcleos pirrol (14), tiazol (15) e oxazol (16). b) Estruturas dos núcleos pirazol (17), imidazol (18), 1,2,3-triazol (19), 1,3,4-triazol (20), tetrazol (21) e pentazol (22), cujo nitrogênio se faz como único heteroátomo presente.....	24
Figura 5. a) Estrutura básica do núcleo pirazol; b) Caráter anfótero do pirazol.....	25
Figura 6. Núcleo pirazol com destaque para a coplanaridade dos orbitais <i>p</i> dos átomos de nitrogênio em azul e dos átomos de carbono em preto, conferindo aromaticidade ao anel.....	25
Figura 7. a) Tautômeros de pirazol não substituído; b) Tautômeros de pirazol monossustituído.....	26
Figura 8. Estruturas do celecoxibe (23), fenilbutazona (24) e rimonabanto (25), exemplos de fármacos comerciais derivados do pirazol.....	27
Figura 9. Estrutura molecular do naproxeno (26) e seu análogo sintético (26a) com uma porção contendo o anel pirazol.....	28
Figura 10. Estruturas do fármaco diclofenaco (27) e dos compostos 27a-b.....	29
Figura 11. Estruturas moleculares do composto 28 e dos fármacos de referência ampicilina (29) e cloranfenicol (30) com seus respectivos valores de CIM.....	29
Figura 12. Estrutura molecular do composto 31 e da estreptomicina (32).....	30
Figura 13. Estruturas moleculares dos compostos 33-36 com atividade antifúngica.....	31
Figura 14. Estrutura do composto 37 com atividade antiviral por inibição de uma proteína multifuncional essencial à virulência do HIV-1.....	31
Figura 15. Estruturas moleculares dos compostos 38 e 39 com atividade antitumoral e da doxorrubicina (40), fármaco de referência utilizado no estudo.....	32
Figura 16. Estruturas dos compostos 41, 42 e 43 com atividade inibitória do processo de metástase em câncer de pâncreas e estrutura da Gencitabina (44).....	33
Figura 17. Estrutura molecular do composto 45 com atividade antileucêmica e valores de IC ₅₀ apresentados para as linhagens HL60 e K562 relacionadas às leucemias mielóides aguda e crônica, respectivamente.....	34
Figura 18. a) Ilustração de um tumor benigno; b) Ilustração de um tumor maligno.....	37

Figura 19. O processo de carcinogênese resumidamente.....	38
Figura 20. a) Estágio de iniciação da carcinogênese; b) Estágio de promoção da carcinogênese; c) Estágio de progressão da carcinogênese.....	39
Figura 21. a) Classificação nacional do câncer como causa de morte de indivíduos com idade inferior a 70 anos em 2019; b) Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) de 2019, baseado em quatro níveis.....	40
Figura 22. Distribuição de casos e mortes para os 10 tipos de câncer mais comuns em 2020.....	41
Figura 23. Células-tronco hematopoiéticas e o processo de hematopoiese.....	42
Figura 24. Precursores 46-48 obtidos na forma de sólidos amarelos depois de isolados.....	48
Figura 25. Pirazóis 53-62 obtidos na forma sólida e com coloração variada após filtração a vácuo e recristalização em etanol.....	50
Figura 26. Precursores nitrilados obtidos e seus respectivos rendimentos.....	58
Figura 27. a) Recorte dos espectros de IV na faixa de 2500 cm^{-1} a 2100 cm^{-1} com destaque em azul para bandas de absorção compatíveis com estiramento $\text{C}\equiv\text{N}$ em 2210 cm^{-1} , 2220 cm^{-1} e 2210 cm^{-1} dos compostos 46 , 47 e 48 , respectivamente; b) Recorte dos espectros de IV na faixa de 900 cm^{-1} a 500 cm^{-1} com destaque em rosa para os conjuntos de duas ou mais bandas compatíveis com estiramento $\text{S}-\text{CH}_3$ entre 750 cm^{-1} e 600 cm^{-1}	60
Figura 28. Recorte dos espectros de IV na faixa de 2900 cm^{-1} e 1500 cm^{-1} com destaque em cinza para bandas de absorção compatíveis com estiramento $\text{C}=\text{O}$ em 1720 cm^{-1} e em 1650 cm^{-1} para os compostos 46 e 47 , respectivamente.....	61
Figura 29. a) Espectros de RMN de ^1H dos precursores nitrilados 46-48 na faixa 2,15-2,90 ppm mostrando sinais atribuídos aos grupos metilsulfanil ($\text{S}-\text{CH}_3$); b) Estrutura do precursor nitrilado 48 com destaque para o plano de simetria ao longo da dupla ligação vinílica.....	62
Figura 30. Comparação entre os espectros de RMN de ^1H dos intermediários 46 e 47 evidenciando a manutenção dos sinais atribuídos aos grupos metilsulfanil, indicado pela tarja azul, e troca do sinal da metoxila em 46 por sinais de aromáticos em 47 , indicados pela figura tracejada.....	63
Figura 31. Expansão do espectro de RMN de ^1H para o intermediário 47 na região entre 7,95-7,40 ppm correspondente aos hidrogênios de anel aromático.....	64
Figura 32. Sobreposição dos espectros de RMN de ^{13}C para os intermediários 46-48 com destaque para presença de grupos comuns a eles.....	65
Figura 33. Espectros de RMN de ^{13}C para os intermediários 46 e 47 com destaque para os sinais dos grupos $\text{C}=\text{O}$, $\text{C}=\text{C sp}^2$ em anel aromático e $\text{O}-\text{CH}_3$	66

Figura 34. Esquemas mecanísticos sugeridos envolvendo os ataques dos nucleófilos propostos para obtenção dos compostos a) 53-55 , b) 56-59 e c) 60-62 a partir dos precursores nitrilados 46 , 47 e 48 , respectivamente.....	68
Figura 35. Recorte dos espectros de infravermelho ($700\text{-}500\text{ cm}^{-1}$) com destaque para as bandas atribuídas ao substituinte metilsulfanil (SMe) ligado ao anel pirazólico na posição 3 e presente no pirazóis 53-62	70
Figura 36. Recorte dos espectros de infravermelho ($1900\text{-}900\text{ cm}^{-1}$) com destaque para as bandas atribuídas a carbonila (destaque rosa) e para as bandas atribuídas ao estiramento C-O de éster (destaque tracejado vermelho), presente no pirazóis 53-55	71
Figura 37. Recorte dos espectros de infravermelho ($3700\text{-}3300\text{ cm}^{-1}$) com destaque para as bandas atribuídas a estiramentos N-H de amins primárias, presentes no pirazóis 53-55	71
Figura 38. Recorte do espectro de IV para o pirazol 55 entre a) 3100-1700 cm^{-1} com destaque para bandas atribuídas a estiramento C-H em carbono sp^2 de anel aromático (destaque tarja rosa) e bandas harmônicas de aromático (destaque tarja azul); e entre b) 900-500 cm^{-1} com destaque para bandas de padrão monossustituído de anel aromático (destaque tarja lilás)....	72
Figura 39. Recorte dos espectros de IV ($2300\text{-}2100\text{ cm}^{-1}$) com destaque para bandas atribuídas ao estiramento $\text{C}\equiv\text{N}$ (tarja verde), presentes nos pirazóis 56-59	73
Figura 40. Recorte dos espectros de IV ($3100\text{-}2900\text{ cm}^{-1}$) com destaque para bandas imediatamente acima de 3000 cm^{-1} compatíveis com estiramento C-H em carbono sp^2 de aromáticos.....	73
Figura 41. Recortes dos espectros de IV entre $1700\text{-}700\text{ cm}^{-1}$ dos pirazóis 56-59 com destaque para as bandas atribuídas a estiramentos $\text{C}=\text{C}$ de anel aromático (destaque tarja lilás) bem como pares de bandas compatíveis com anel monossustituído (destaque tracejado azul)....	74
Figura 42. Recorte do espectro de IV entre $3700\text{-}300\text{ cm}^{-1}$ com destaque para um par de bandas (tarja verde) compatível com estiramento N-H em amins primárias.....	75
Figura 43. Recorte dos espectros de IV ($2300\text{-}2100\text{ cm}^{-1}$) dos pirazóis 60-62 com destaque para bandas compatíveis com estiramento de $\text{C}\equiv\text{N}$	75
Figura 44. Recorte dos espectros de IV ($3500\text{-}3100\text{ cm}^{-1}$) dos pirazóis 60-62 com destaque para pares de bandas (tarjas rosa e azul) compatíveis com estiramento N-H de amins primárias.....	76
Figura 45. Recortes do espectro de IV para o pirazol 62 nas faixas $3100\text{-}2900\text{ cm}^{-1}$ (tarja rosa), $1700\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$ (tarja lilás) e $900\text{-}500\text{ cm}^{-1}$ (tarja azul) com destaque para bandas compatíveis com os estiramentos de C-H de carbono sp^2 e de $\text{C}=\text{C}$ aromático e padrão de anel monossustituído, respectivamente.....	77

Figura 46. Recortes dos espectros de RMN ^1H (3,00-2,00 ppm) dos pirazóis 53-62 evidenciando singletos integrados para 3 hidrogenios (tarja azul), compatíveis com núcleos do grupo metilsulfanil (substituinte na posição 3 do anel pirazólico). Setas vermelhas indicam sinais do solvente (DMSO- d_6).....	78
Figura 47. Recortes dos espectros de RMN ^1H (4,00-3,00 ppm) dos pirazóis 53-55 evidenciando singletos integrados para 3 hidrogênios (tarja lilás), compatíveis com núcleos de grupo metoxila no grupo éster (substituinte na posição 4 do anel pirazólico).....	79
Figura 48. Recortes dos espectros de RMN ^1H para os pirazóis 53 (10,00-9,00 ppm, tarja rosa), 54 e 55 (6,50-5,00 ppm, tarja azul), evidenciando singletos integrados para 2 hidrogênios, compatíveis com núcleos em grupos aminas.....	79
Figura 49. Estrutura do pirazol 54 (à esquerda) e recorte do espectro de RMN ^1H (7,60-7,35 ppm) evidenciando sinais na forma de multipeto integrados para 5 hidrogênios em região de aromático, compatíveis com núcleos de hidrogênio em uma estrutura aromática (tarja lilás).....	80
Figura 50. Recortes dos espectros de RMN ^1H na região de aromáticos para os pirazóis 56-59 evidenciando sinais na forma de multipletos integrados para 5 hidrogenios (destaque em verde) e 10 hidrogenios (destaque em rosa), compatíveis com núcleos em um anel aromático.....	81
Figura 51. Recorte do espectro de RMN ^1H para o pirazol 59 evidenciando o singlete integrado para 3 hidrogênios em 3,98 ppm, compatível com núcleos em um grupo metila.....	82
Figura 52. Recorte dos espectros de RMN ^1H (7,00-6,00 ppm) dos pirazóis 60-62 evidenciando sinais na forma de singletos integrados para 2 hidrogênios, compatíveis com núcleos de hidrogênio em grupo amina.....	83
Figura 53. Recortes dos espectros de RMN ^1H dos pirazóis 61 , entre 13,0 ppm e 11,0 ppm com destaque (tarja verde) para singlete integrado para 1 hidrogênio e 62 , entre 7,5 ppm e 6,5 ppm com destaque para multipeto integrado para 5 hidrogênios.....	84
Figura 54: Recortes dos espectros de RMN ^{13}C (20,00-10,00 ppm) dos pirazóis 53-62 com destaque para sinal compatível com S- CH_3	84
Figura 55: Recortes dos espectros de RMN ^{13}C entre 160,0 ppm e 70,0 ppm dos pirazóis 53-62 , evidenciando sinais compatíveis com o núcleo do carbono C3 e os carbonos vinílicos do anel pirazólico, C4 e C5.....	85
Figura 56. Recortes dos espectros de RMN ^{13}C de 60,0 ppm a 0,00 ppm dos pirazóis 53-55 com destaque para sinais compatíveis com núcleo de carbono em grupo O- CH_3	86

Figura 57. Recortes dos espectros de RMN ¹³ C entre 170,0 ppm e 150,0 ppm dos pirazóis 53-55 com destaque para sinais compatíveis com núcleo de carbono carboxílico.....	87
Figura 58. Recortes dos espectros de RMN ¹³ C entre 180,0 ppm e 150,0 ppm dos pirazóis 53, 56 e 60 , evidenciando sinais compatíveis com o núcleo de carbono em grupo tioamida.....	88
Figura 59. Recortes dos espectros de RMN ¹³ C dos pirazóis 56-62 com destaque para os sinais atribuídos aos núcleos de carbono em grupos nitrila, anel aromático e metila.....	89
Figura 60. Resultados da predição com o número total de linhagens celulares de câncer a partir da análise empregando CLC-Pred. Valores de $Pa > Pi$	90
Figura 61. Propriedades ADMET (absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade) previstas pelo software AdmetSAR ©.....	92
Figura 62. Efeitos dos pirazóis 53 e 60 na viabilidade de <i>A. salina</i> . Percentual de náuplios vivos (n=12) após o tratamento por 24h com diferentes concentrações de 53 e 60 (200, 100, 50 e 25 µM). CTRL = náuplios somente em solução salina; DMSO = náuplios tratados com DMSO 4% e 0,4%.....	94
Figura 63. Efeitos dos pirazóis 53 e 60 na viabilidade de células leucêmicas da linhagem Jurkat.....	95

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. O método de Knorr para síntese do núcleo pirazol.....	34
Esquema 2. Síntese de 3,5-dimetil-1 <i>H</i> -pirazóis utilizando TSA como catalisador verde.....	35
Esquema 3. Síntese de pirazóis catalisada por cloreto de níquel através do método de Knorr.....	35
Esquema 4. O método de Pechmann para síntese do núcleo pirazol.....	36
Esquema 5. Síntese de 1,3,5-trifenil-4-trifluorometilsulfonilpirazol.....	36
Esquema 6. Síntese “one-pot” em três etapas dos precursores nitrilados 46 , 47 e 48	47
Esquema 7. Síntese dos pirazóis.....	50
Esquema 8. Etapa I – desprotonação.....	57
Esquema 9. Etapa II – adição de dissulfeto de carbono e desprotonação do segundo hidrogênio.....	57
Esquema 10. Etapa III – alquilação dos átomos de enxofre por adição de iodeto de metila....	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Reagentes utilizados para síntese dos intermediários 46-48 e suas respectivas quantidades.....	48
Tabela 2. SMILES e estrutura molecular dos pirazóis.....	54
Tabela 3. Valores de pontos de fusão (°C) determinados experimentalmente e descritos na literatura para os compostos nitrilados 46-48 e seus respectivos rendimentos.....	59
Tabela 4. Deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C , em ppm, observados para o precursor nitrilado 46	66
Tabela 5. Valores de rendimentos para as sínteses assistidas por micro-ondas dos pirazóis 53-62 e por refluxo dos pirazóis 60-61 bem como seus pontos de fusão determinados experimentalmente e os valores descritos na literatura.....	69
Tabela 6. Análise <i>in silico</i> de atividade antitumoral obtida com o CLC-Pred (Way2Drug ©).....	91
Tabela 7. Predição de baixa citotoxicidade contra células não tumorais.....	92

LISTA DE ABREVIÇÕES E SÍMBOLOS

FDA: Food and Drug Administration.

EMA: Agência Europeia de Avaliação de Produtos Medicinais.

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

AIN: Anti-inflamatório não esteroide.

COX-1: Ciclooxigenase 1.

COX-2: Ciclooxigenase 2.

PGs: Prostaglandinas.

AVC: Acidente vascular cerebral.

CIM: Concentração Inibitória Mínima.

FOA: *Fusarium oxysporum Albedenis*.

SAR: Relação estrutura-atividade.

SNC: Sistema nervoso central.

MdO: Medula óssea.

MO: Micro-ondas.

LMA: Leucemia Mielóide Aguda.

LMC: Leucemia Mielóide Crônica.

INCA: Instituto Nacional de Câncer.

MS: Ministério da Saúde.

OMS: Organização Mundial da Saúde.

DNA: Ácido desoxirribonucleico.

FAB: Grupo Franco-Americano-Britânico.

GSCB; Grupo de Síntese de Compostos Bioativos.

DMF: Dimetilformamida.

CCD: Cromatografia em Camada Delgada.

TMS: Tetrametilsilano.

RPMI: Roswell Park Memorial Institute.

SFB: Soro fetal bovino.

MTT: Brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio.

ppm: Parte por milhão;

δ : Deslocamento químico;

RMN: Ressonância Magnética Nuclear;

IV: Infravermelho;

PF: Ponto de Fusão;

SMe: Metilsulfanil;

P_a : Probabilidade de ser ativo;

P_i : Probabilidade de ser inativo;

CYP: Citocromo P450 humano;

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	21
1.1	Compostos Heterocíclicos	21
1.2	O Núcleo Pirazol	24
1.2.1	Principais aspectos estruturais	24
1.2.2	Principais atividades relatadas na literatura	26
1.2.2.1	Atividade analgésica e anti-inflamatória	27
1.2.2.2	Atividade antibacteriana	29
1.2.2.3	Atividade antifúngica	30
1.2.2.4	Atividade antiviral	31
1.2.2.5	Atividade anticâncer	32
1.2.3	Principais metodologias para a síntese do núcleo pirazol	34
1.3	Câncer	37
1.4	Leucemias	41
1.4.1	Classificação das leucemias	42
1.4.1.1	Leucemia linfoblástica aguda (LLA)	43
1.4.1.2	Leucemia linfoblástica crônica (LLC)	43
1.4.1.3	Leucemia mieloblástica aguda (LMA)	44
1.4.1.4	Leucemia mieloblástica crônica (LMC)	44
2.	OBJETIVOS	44
2.1	Objetivo Geral	44
2.2	Objetivos Específicos	44
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	45
3.1.	Equipamentos e Materiais	45
3.1.1	Síntese e análise dos produtos	45
3.1.2	Caraterização dos precursores nitrilados e dos pirazóis	46

3.1.3 Avaliação dos efeitos biológicos	46
3.1.3.1 Triagem <i>in silico</i> dos compostos pirazólicos.....	46
3.1.3.2 Avaliação <i>in vitro</i> do efeito antiproliferativo e de toxidez geral.....	46
3.2 Sínteses	47
3.2.1 Procedimento geral para a síntese dos intermediários nitrilados.....	47
3.2.2 Procedimento geral para a síntese dos pirazóis	49
3.3 Triagem <i>in silico</i> dos pirazóis.....	54
3.4 Ensaios Biológicos	55
3.4.1 Análise de toxicidade com <i>Artemia salina</i>	55
3.4.2 Avaliação da viabilidade celular	55
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
4.1 Síntese dos Precursores Nitrilados (46 – 48).....	56
4.2 Caracterização dos Precursores Nitrilados (46-48)	59
4.2.1 Caracterização por Infravermelho (IV)	59
4.2.2 Caracterização por Ressonância Magnética Nuclear de ^1H (RMN ^1H).....	61
4.3 Síntese dos Pirazóis (53 - 62)	67
4.4 Caracterização dos Pirazóis 53-62.....	69
4.4.1 Caracterização por Infravermelho (IV)	69
4.4.2 Caracterização por Ressonância Magnética Nuclear de ^1H (RMN ^1H).....	77
4.2.3 Caracterização por Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C (RMN ^{13}C)	83
4.5 Triagem <i>in silico</i> da possível atividade biológica dos pirazóis tetra-substituídos.....	89
4.6 Ensaios Biológicos	93
4.6.1 Análise da toxicidade com <i>Artemia salina</i>	94
4.6.2 Avaliação da viabilidade celular	95
5. CONCLUSÕES	96
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	98

1. INTRODUÇÃO

1.1 Compostos Heterocíclicos

Os compostos heterocíclicos constituem um diversificado grupo de substâncias de origem natural ou sintética cuja representatividade corresponde a cerca de dois terços de todas as moléculas orgânicas descritas na literatura (MONDINO, 2014). Estruturalmente são moléculas que apresentam pelo menos um heteroátomo em um sistema cíclico, sendo mais frequentemente observados os átomos de nitrogênio, oxigênio e enxofre (FROMTLING, 1988) como ocorre, por exemplo, nos núcleos pirrol (1), furano (2) e tiofeno (3) respectivamente (Figura 1). Para fins didáticos são classificados em heterociclos alifáticos, cujas propriedades físico-químicas são similares às dos hidrocarbonetos cíclicos ou acíclicos, e em heterociclos aromáticos que, por sua vez, têm tais propriedades e reações equiparadas às daquelas dos compostos aromáticos benzenóides (MONDINO, 2014; SANGI, 2016).

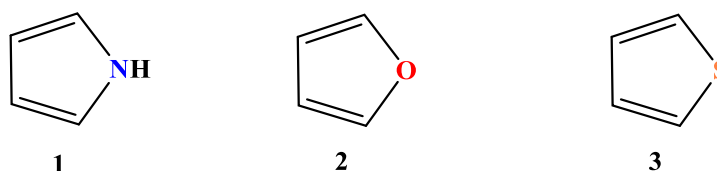


Figura 1: Núcleos base pirrol (1), furano (2) e tiofeno (3).

Fonte: Próprio autor.

Historicamente, moléculas contendo unidades heterocíclicas têm sido utilizadas pela humanidade há muitos séculos (SILVA, 2006), como é o caso da quinina (4), um produto natural extraído de árvores do gênero *Cinchona*. Tendo sido por quase 300 anos o único princípio ativo empregado na prevenção e no tratamento da malária, a quinina, após sua elucidação estrutural no período seguinte a Segunda Guerra Mundial, inspirou a síntese de análogos antimaláricos como a cloroquina (5) e a mefloquina (6), além de impulsionar e estimular os químicos orgânicos sintéticos da época na busca por novas substâncias biologicamente ativas (Figura 2; ALMEIDA *et al.*, 2017; OLIVEIRA *et al.*, 2009; VIEGAS *et al.*, 2006).

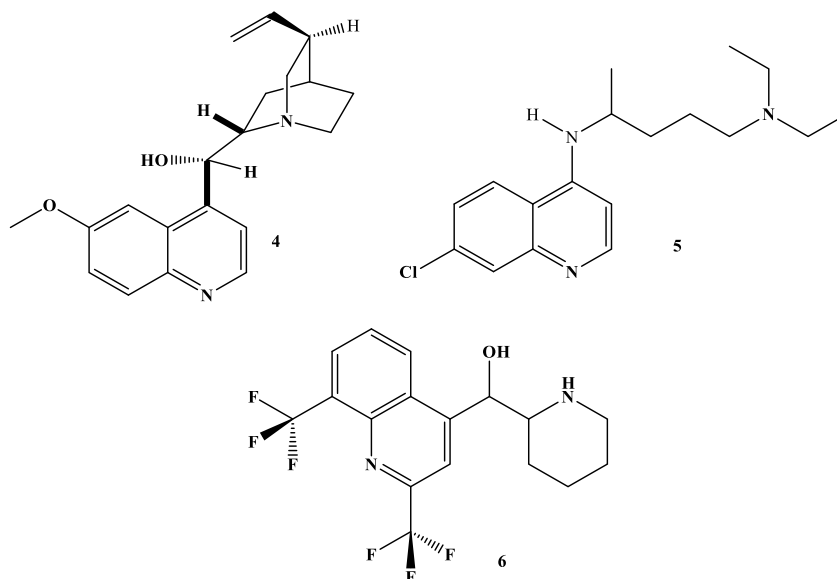


Figura 2: Estrutura do antimalárico quinina (4) e de seus análogos cloroquina (5) e mefloquina (6).

Fonte: Próprio autor.

A possibilidade de realizar modificações estruturais a partir da substituição e/ou da adição de novos grupos funcionais, eventualmente promovendo alterações interessantes em suas propriedades físico-químicas, bem como o seu amplo espectro de atividades biológicas, tornam estes compostos um arcabouço de relevada importância para as indústrias químicas e farmacêuticas (MUHAMMAD, 2022; KATRITZKY, RACHWAL, 2011). É graças a essas características que o termo “estruturas privilegiadas” é comumente empregado para designar tais moléculas (DUARTE *et al.*, 2007).

A distribuição irregular de cargas decorrente da presença do heteroátomo e a alta estabilidade conformacional garantida pela privação do grau de liberdade nas ligações estabelecidas entre os átomos que constituem o sistema cíclico promovem uma melhor e mais eficiente interação dessas estruturas privilegiadas com os sítios receptores de macromoléculas reguladoras de funções biológicas (MELO *et al.*, 2006). Assim, é possível propor sínteses de moléculas com elevado grau de seletividade e eficiência da atividade biológica a partir do emprego de estratégias de modificação estrutural, seja por uma simples troca de determinados grupos funcionais ou pela inserção destes (DUARTE *et al.*, 2007).

A química dos compostos heterocíclicos desempenha um papel cada vez mais importante em nosso cotidiano, sobretudo em relação à saúde humana e animal. Isso porque um número expressivo, cerca de 70%, dos fármacos já disponíveis para uso compreende moléculas cujas estruturas apresentam unidades heterocíclicas. Neste contexto, é possível

citar como exemplos a losartan (**7**), a ribavirina (**8**), o carbamato de fluorouracila (**9**), o fluconazol (**10**), a dipirona (**11**), o metronidazol (**12**) e a benzilpenicilina (**13**), empregados por suas atividades anti-hipertensiva, antiviral, antitumoral, antifúngica, anti-inflamatória e analgésica, antiprotozoária e antibacteriana, respectivamente (Figura 3: NEVES, 2018; MELO *et al.*, 2006).

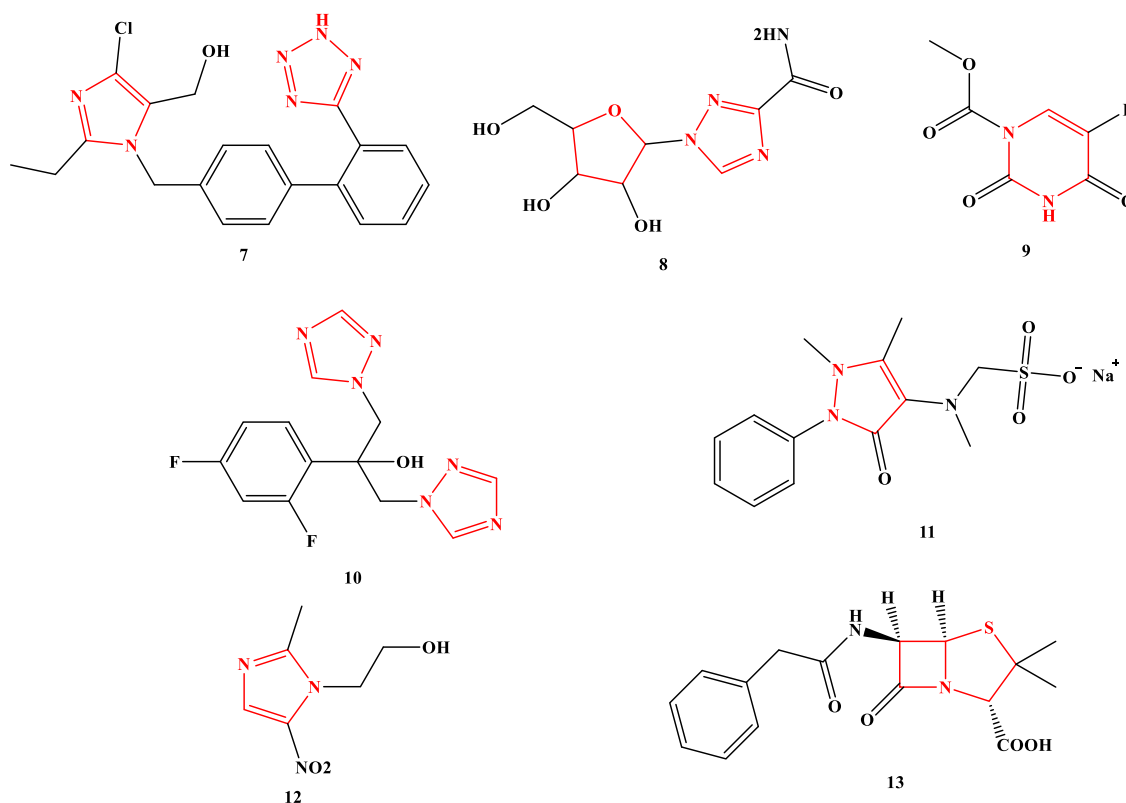


Figura 3: Exemplos de fármacos mundialmente usados com destaque para a presença de sistemas heterocíclicos em suas estruturas.

Fonte: Próprio autor.

Dentre os compostos heterocíclicos, os aromáticos nitrogenados de cinco membros, genericamente denominados de azóis, merecem destaque. Estes heterociclos estão presentes em diversos produtos naturais e têm aplicações nas sínteses de agroquímicos, na química de materiais e, sobretudo na química medicinal com o planejamento racional de moléculas bioativas sendo, portanto, foco de estudo nas pesquisas de diversos grupos científicos (LIO- LIANG *et al.*, 2023; SAINI *et al.*, 2013). É importante ressaltar que os membros deste grupo de substâncias podem ainda apresentar, além do átomo de nitrogênio, outros heteroátomos em seus sistemas cíclicos, como oxigênio e enxofre, sendo assim denominados respectivamente

de oxazóis e tiazóis (MELO *et al.*, 2006). Dentre seus membros estruturalmente mais simples podemos citar o pirrol (**14**), o tiazol (**15**) e o oxazol (**16**) (Figura 4a). Além do núcleo pirrol, o pirazol (**17**), o imidazol (**18**), o 1,2,3-triazol (**19**), o 1,3,4-triazol (**20**), o tetrazol (**21**) e o pentazol (**22**) compreendem outros heterociclos de cinco membros, cujo heteroátomo é exclusivamente o nitrogênio (Figura 4b).

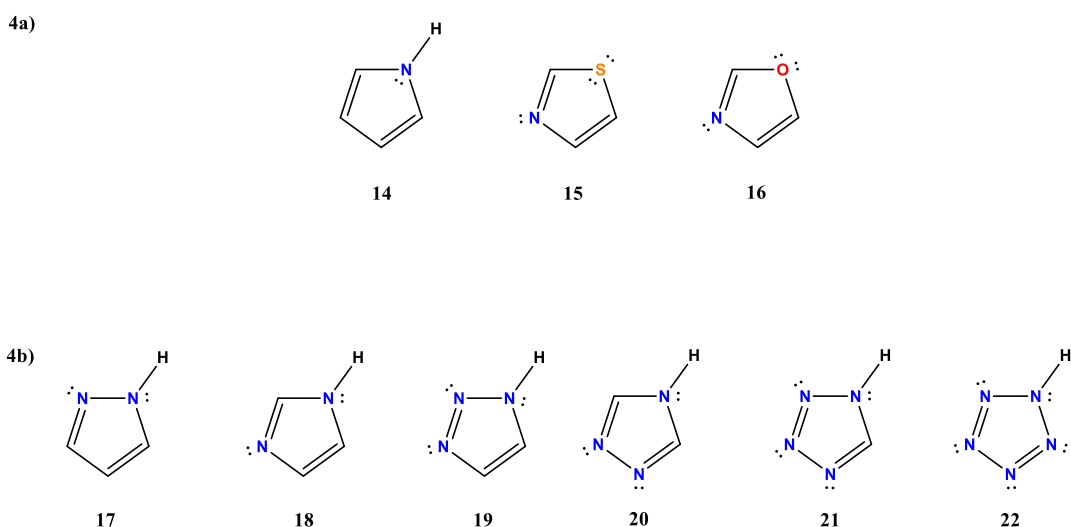


Figura 4: a) Estruturas dos núcleos pirrol (**14**), tiazol (**15**) e oxazol (**16**). b) Estruturas dos núcleos pirazol (**17**), imidazol (**18**), 1,2,3-triazol (**19**), 1,3,4-triazol (**20**), tetrazol (**21**) e pentazol (**22**), cujo nitrogênio se faz como único heteroátomo presente.

Fonte: Próprio autor.

1.2 O Núcleo Pirazol

1.2.1 Principais aspectos estruturais

Pirazóis são sistemas heterocíclicos aromáticos de cinco membros extraordinariamente versáteis e com notáveis efeitos terapêuticos, cuja estrutura básica contém dois átomos de nitrogênio adjacentes. Dada às características que o assemelham ao sistema pirrol, N1 é comumente denominado de “pirrólico” ao passo que N2, em função de suas características similares às do núcleo piridina o faz ser frequentemente chamado de “piridínico” (Figura 5a). A natureza distinta destes átomos permite ao núcleo pirazol atuar como doador ou aceitor de hidrogênios segundo o meio reacional (Figura 5b; XU, 2023; FARIA *et al.*, 2017; ALAN, 2015).

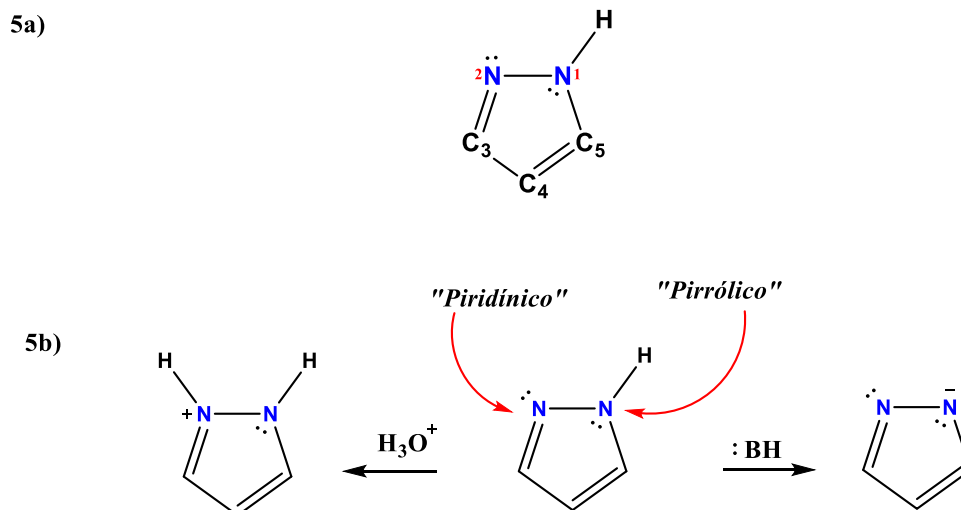


Figura 5: a) Estrutura básica do núcleo pirazol; b) Caráter anfótero do pirazol.

Fonte: Próprio autor.

Sua aromaticidade está relacionada à coplanaridade existente entre os orbitais *p* formadores das ligações π carbono-carbono entre C4 e C5 e nitrogênio-carbono entre N2 e C3 com o orbital *p* contendo par de elétrons não compartilhados em N1 (Figura 6; FARIA *et al.*, 2017).

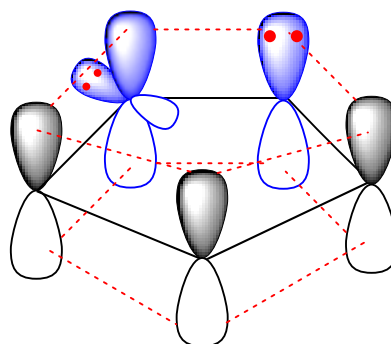


Figura 6: Núcleo pirazol com destaque para a coplanaridade dos orbitais *p* dos átomos de nitrogênio em azul e dos átomos de carbono em preto, conferindo aromaticidade ao anel.

Fonte: Adaptado de Faria *et al.*, 2017.

Outra característica estrutural importante atribuída aos pirazóis é o tautomerismo prototrópico. Observa-se neste caso, a possibilidade de três (Figura 7a) e cinco (Figura 7b) formas tautoméricas respectivamente para os núcleos não substituídos e monossustituídos (Figura 7b; FARIA *et al.*, 2017).

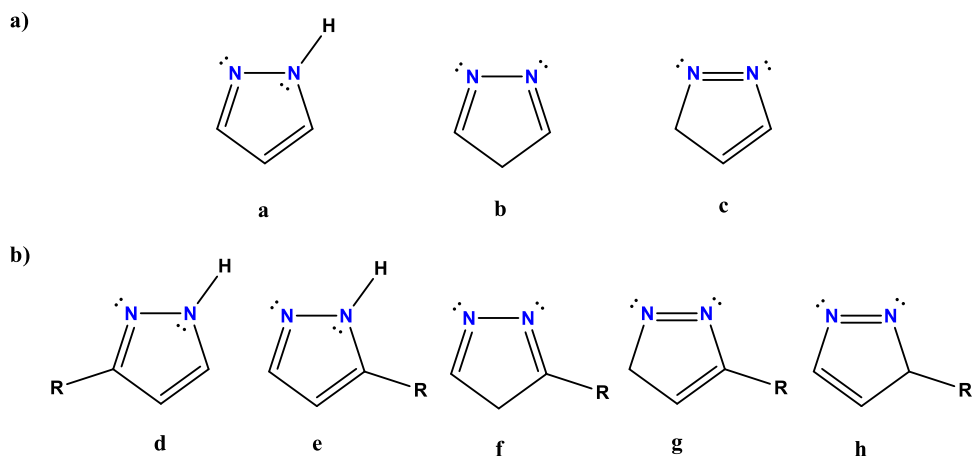


Figura 7: a) Tautômeros de pirazol não substituído; b) Tautômeros de pirazol monossustituído.

Fonte: Adaptado de Faria *et al.*, 2017.

1.2.2 Principais atividades relatadas na literatura

O caráter anfótero do núcleo pirazol lhe confere uma característica importante do ponto de vista sintético, uma vez que facilita a introdução de grupos funcionais interessantes permitindo melhorar aspectos de polaridade e solubilidade em água e conferir propriedades biológicas de amplo espectro, como analgésica, anti-inflamatória, antibacteriana, antifúngica, antiviral e antitumoral (XU *et al.*; 2023).

Dada a notoriedade do núcleo pirazol para a química medicinal, muitos pesquisadores têm aplicado significativos esforços no estudo e na síntese de novos compostos monossustituídos ou sistemas mais complexos onde se percebe, principalmente, anéis heterocíclicos nas posições 1, 3 e 4 (SELVAN *et al.*, 2014).

É interessante observar que muitos medicamentos contendo o núcleo pirazol já foram aprovados por órgãos regulatórios como Food and Drug Administration (FDA) nos Estados Unidos, a Agência Europeia de Avaliação de Produtos Medicinais (EMA) na Europa e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), aqui no Brasil. São alguns exemplos destes medicamentos já disponíveis, o celecoxibe (**23**), indicado para o tratamento sintomático da osteoartrite e artrite reumatoide, o fenilbutazona (**24**), um anti-inflamatório não esteroidal (AINE) com atividade analgésica e antipirética e o rimonabanto (**25**), empregado no tratamento da obesidade ou nos casos de pacientes com sobrepeso, onde haja fatores de risco cardiometabólico, como por exemplo, diabetes do tipo 2 ou dislipidemia (Figura 8; FARIA *et al.*, 2017).

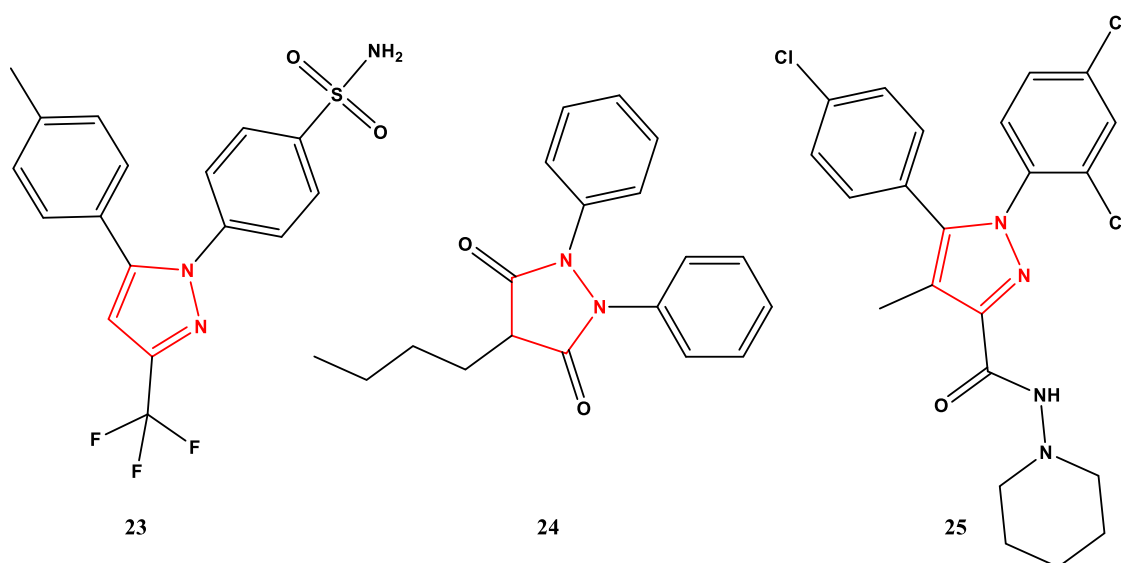


Figura 8: Estruturas do celecoxibe (**23**), fenilbutazona (**24**) e rimonabanto (**25**), exemplos de fármacos comerciais derivados do pirazol.

Fonte: Próprio autor.

1.2.2.1 Atividade analgésica e anti-inflamatória

Os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) desencadeiam atividade biológica por inibição das enzimas ciclooxygenases 1 e 2 (COx-1 e COx-2) relacionadas à produção de prostaglandinas (PGs) (LARENTIS, 2018). Um exemplo é o celecoxibe (**23**) que, por esse mecanismo de ação, é capaz de promover ação analgésica e anti-inflamatória e é usado, principalmente, para tratar osteoartrite e artrite reumatoide (ZHANG *et al.*, 2022). Contudo, há relatos de que o uso de AINEs esteja associado a graves efeitos colaterais como sangramento gastrointestinal e até mesmo acidente vascular cerebral (AVC) (FARIA *et al.*, 2017).

Em 2014, El-Sehemi e colaboradores obtiveram uma série de compostos contendo o núcleo pirazol a partir da substituição do grupo funcional ácido carboxílico do naproxeno (**26**) (Figura 9), um fármaco comercial da classe dos AINEs. Dentre a série obtida, concluíram que o composto **26a** se mostrou bastante promissor, com significativa atividade analgésica e sem exibir efeito ulcerogênico (EL-SEHEMI *et al.*, 2014).

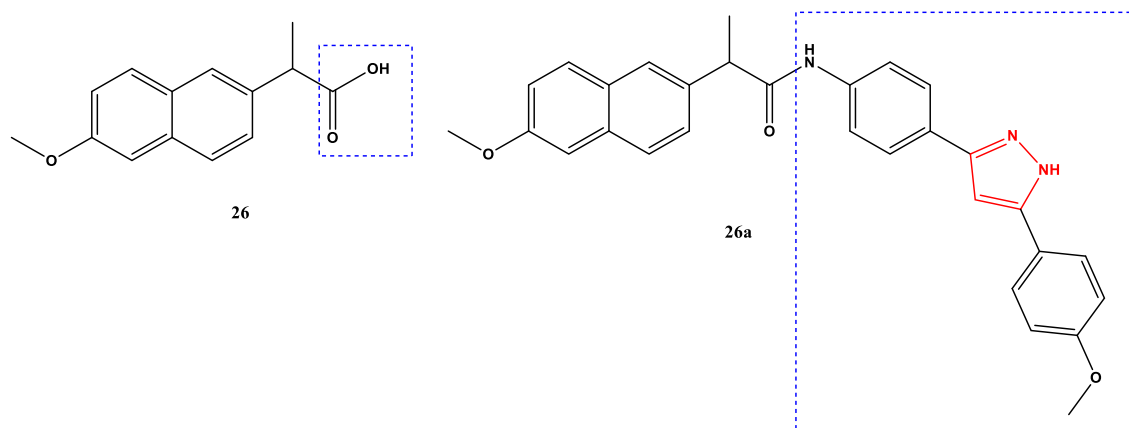


Figura 9: Estrutura molecular do naproxeno (26) e seu análogo sintético (26a) com uma porção contendo o anel pirazol.

Fonte: Adaptado de El-Sehemi, 2014.

Também em 2014, Alegaon e colaboradores investigaram a atividade anti-inflamatória de vinte e dois derivados de pirazol 1,3,4-trissubstituídos sintéticos (ALEAGAON *et al.*, 2014). Em suas avaliações empregaram o modelo de edema de pata de rato induzido por carragenina, concluindo que os compostos **27a-b** (> 84,2% de inibição) foram bem sucedidos em relação ao fármaco de referência diclofenaco (27) (86,72%) (Figura 10).

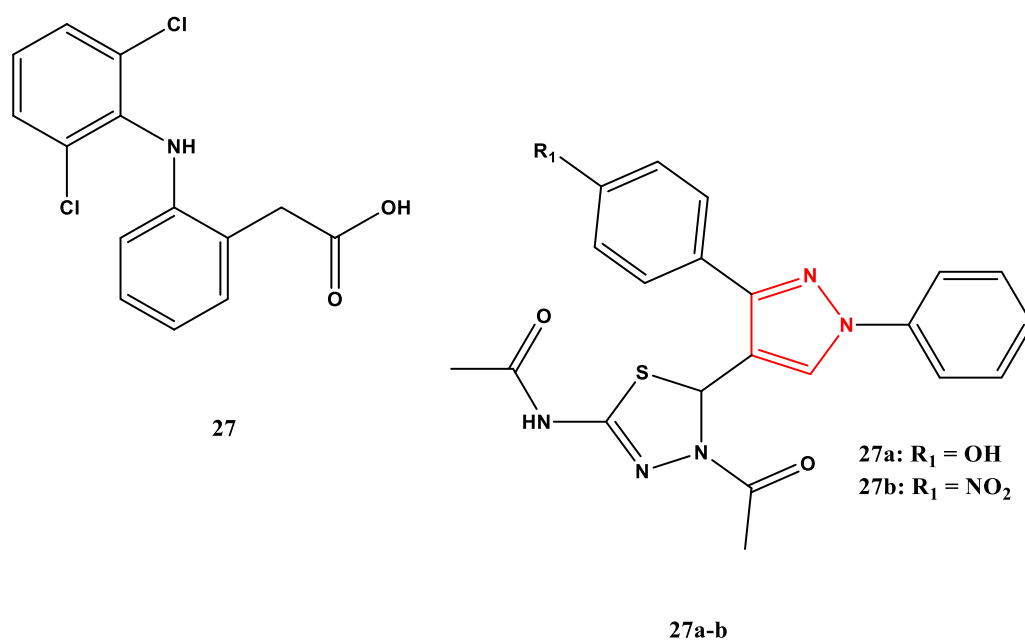


Figura 10: Estruturas do fármaco diclofenaco (27) e dos compostos 27a-b.

Fonte: Adaptado de Alegaon *et al.*, 2014.

1.2.2.2 Atividade antibacteriana

Inegavelmente estamos diante de um grave problema de saúde pública ao nos depararmos com as questões que envolvem a resistência bacteriana à medicamentos já disponíveis no mercado. Assim, estudos e pesquisas com foco para o desenvolvimento de novas moléculas com maior atividade bactericida e menor toxicidade, têm se mostrado extremamente necessários (KADAM, *et al.*, 2015).

Alguns grupos de pesquisa têm relatado significativa atividade antibacteriana em compostos pirazólicos ou em seus derivados. Observou-se que a presença do grupo trifluorometil (CF_3) nestes compostos contribui para um aumento desta atividade. Em 2014, por exemplo, Aggarwal e colaboradores sintetizaram uma série de quinze compostos e os avaliaram frente à algumas cepas bacterianas. Esse estudo mostrou o composto **28** (Figura 11) como o mais potente frente à *Pseudomonas aeruginosa* em uma concentração inibitória mínima (CIM) de $0,022\ \mu\text{M}$, quando comparado à ampicilina (**29**) e o cloranfenicol (**30**) com $0,004\ \mu\text{M}$ e $0,003\ \mu\text{M}$, respectivamente (AGGAWAL *et al.*, 2014).

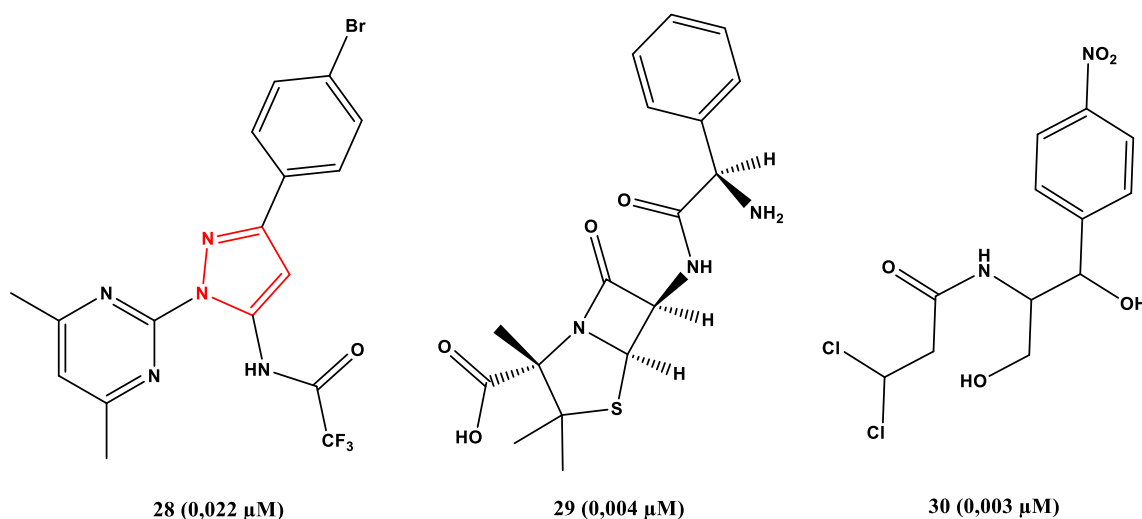


Figura 11: Estruturas moleculares do composto **28** e dos fármacos de referência ampicilina (**29**) e cloranfenicol (**30**) com seus respectivos valores de CIM.

Fonte: Adaptado de Aggarwal *et al.*, 2014.

Paralelamente a esse trabalho, Malladi e colaboradores investigaram a atividade antibacteriana frente à *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* de uma nova série de pirazóis contendo também o núcleo oxadiazol. Seus estudos mostraram que

o composto **31** (Figura 12) apresentou atividade frente à *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* equipotente à da estreptomicina (**32**) (500 µg/mL) (MALLADI *et al.*, 2014).

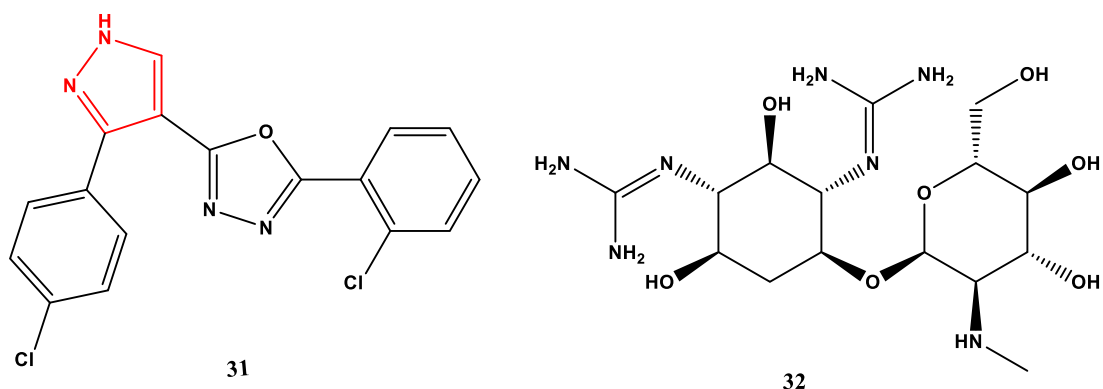


Figura 12: Estrutura molecular do composto **31** e da estreptomicina (**32**).

Fonte: Adaptado de Malladi *et al.*, 2014.

1.2.2.3 Atividade antifúngica

Os fungos são microrganismos eucarióticos onipresentes cuja maioria não apresenta perigo significativo. Contudo, algumas variedades podem ser prejudiciais aos seres humanos, animais e alimentos, e causar doenças como candidíase, pneumocistose, coccidioidomicose, aspergilose entre outras (FARIA *et al.*, 2017).

Em 2022, Abderrahim e colaboradores prepararam uma família de pirazóis e a avaliaram quanto às suas propriedades antifúngicas frente ao *Fusarium oxysporum Albedinis* (FOA), um patógeno fúngico capaz de infectar raízes no solo causando prejuízos a diversas culturas como tomates, bananas, cereais, batatas e melancias. Além do prejuízo agrícola, suas micotoxinas podem se acumular em organismos animais por ingestão de plantas acometidas por esse fungo e, em longo prazo, causar desde sintomas alérgicos até condições clínicas mais graves como o câncer. Os resultados biológicos mostraram que os compostos **33**, **34**, **35** e **36** (Figura 13), dentre os dez sintetizados, tiveram boa atividade antifúngica (ABDERRAHIM *et al.*, 2022).

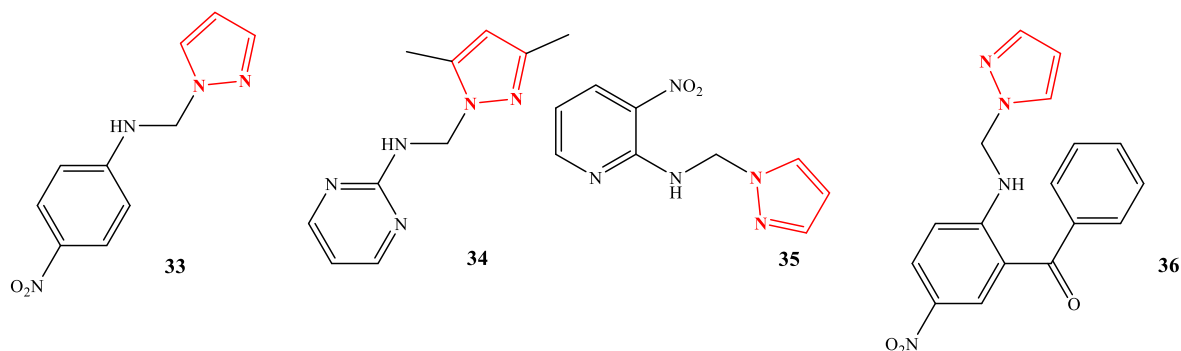


Figura 13: Estruturas moleculares dos compostos **33-36** com atividade antifúngica.

Fonte: Próprio autor.

1.2.2.4 Atividade antiviral

Grande parte das doenças infecciosas é causada por vírus, sendo alguns responsáveis por sérios problemas de saúde pública e causadores de doenças crônicas com altas taxas de morbidade e mortalidade, como por exemplo, os vírus das hepatites B e C e o da imunodeficiência humana (HIV, do inglês Human Immunodeficiency Virus) (ANURADA, 2014). Neste sentido, alguns grupos de pesquisa vêm estudando e relatando a atividade antiviral associada a compostos pirazólicos ou a seus derivados.

Em 2014, Iyer e colaboradores sintetizaram o composto **37** (Figura 14) e avaliaram sua atividade frente à inibição de uma proteína multifuncional essencial à virulência do HIV-1, mostrando um bom resultado. Neste trabalho, estudos da relação estrutura-atividade (SAR, do inglês Structure Activity Relationship) sugerem a importância do núcleo pirazol presente na substância avaliada para atividade antiviral (IYER *et al.*, 2014).

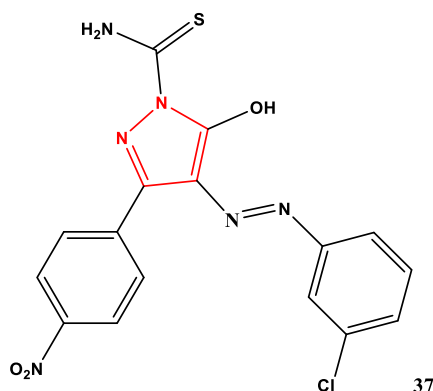


Figura 14: Estrutura do composto **37** com atividade antiviral por inibição de uma proteína multifuncional essencial à virulência do HIV-1.

Fonte: Adaptado de Iyer *et al.*, 2014.

1.2.2.5 Atividade anticâncer

Diversos grupos de pesquisa têm sintetizado e avaliado moléculas das mais variadas classes na busca por novas substâncias capazes de interromper o crescimento tumoral ou mesmo matar as células cancerosas sem prejuízo para as células normais. Neste sentido, há relatos na literatura de moléculas com o núcleo pirazol em sua estrutura ou derivadas deste, com significativa atividade antitumoral.

Em 2014, por exemplo, Mohareb e colaboradores sintetizaram e avaliaram a atividade anticâncer de uma série de compostos pirazólicos. Neste estudo foi avaliada a inibição do crescimento celular de três tipos de células tumorais: adenocarcinoma de mama (MCF-7), câncer de pulmão (NCI-H460) e câncer do sistema nervoso central (SNC) (SF-268). Segundo o grupo de pesquisa, os compostos **38** e **39** (Figura 15) tiveram boa inibição quando comparado ao fármaco de referência doxorrubicina (**40**) (MOHARED *et al.*, 2014).

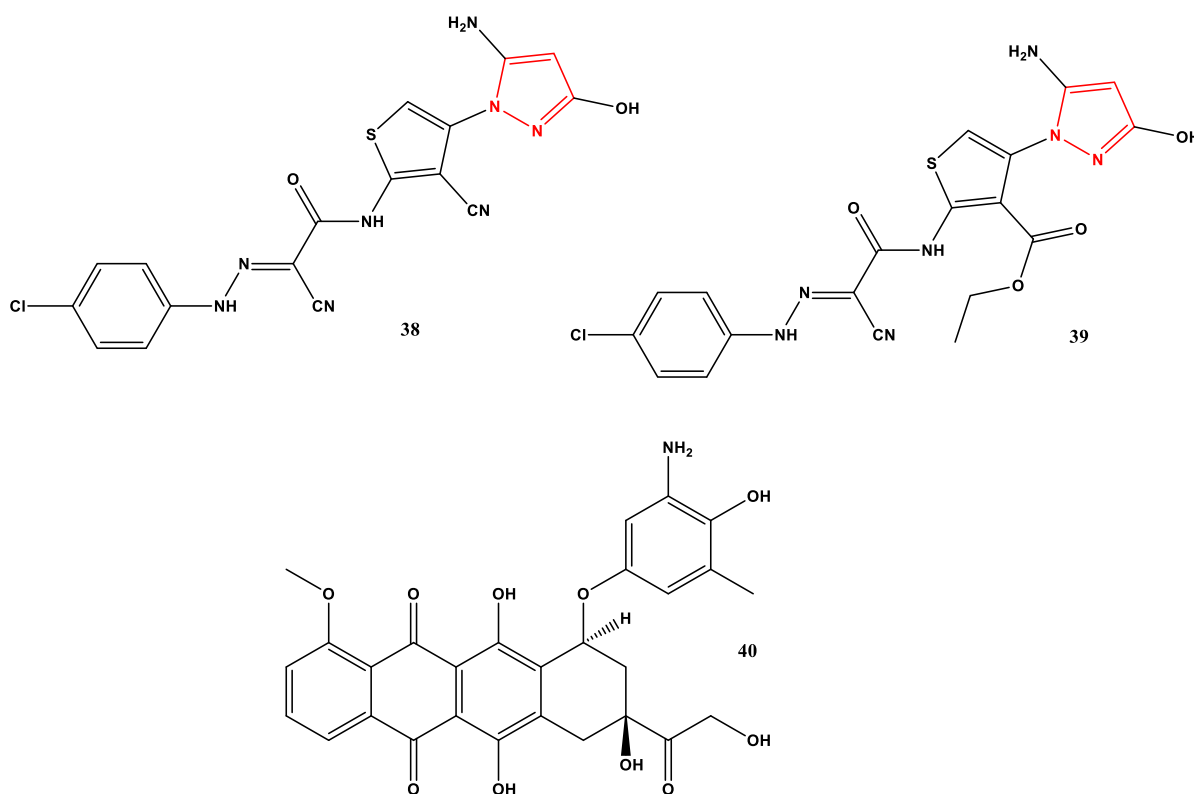


Figura 15: Estruturas moleculares dos compostos **38** e **39** com atividade antitumoral e da doxorrubicina (**40**), fármaco de referência utilizado no estudo.

Fonte: Adaptado de Mohared *et al.*, 2014.

Em 2022, Okamoto e colaboradores, inicialmente empregando ferramentas de simulação computacional, chegaram a quatro compostos potencialmente promissores na

inibição do crescimento e metástase de células cancerígenas pancreáticas, dos quais três, **41**, **42** e **43** (Figura 16) eram pirazóis. Após a etapa sintética, estes compostos foram submetidos a ensaios *in vitro* utilizando a linhagem celular BxPc-3 relacionada ao câncer pancreático humano, confirmando os resultados *in silico*. A partir de então, o grupo prosseguiu com a inoculação destas células cancerosas na região dorsal de camundongos machos com 5 a 6 semanas de idade. O composto **43** foi administrado por via oral uma vez por semana, respeitando a dose de 40 mg/Kg, sem a observação de metástase no grupo tratado por sete semanas. Os resultados mostraram, com base no volume tumoral, que esse composto foi capaz de inibir a migração celular impedindo o processo de metástase de forma mais eficaz que a Gencitabina (**44**) (Figura 16) utilizada como referência (OKAMOTO *et al*, 2022).

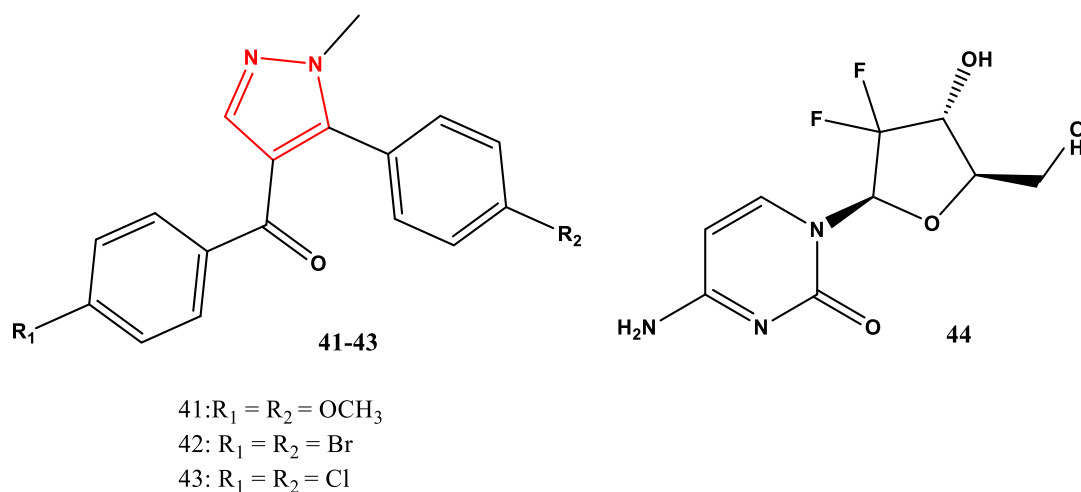


Figura 16: Estruturas dos compostos **41**, **42** e **43** com atividade inibitória do processo de metástase em câncer de pâncreas e estrutura da Gencitabina (**44**).

Fonte: Adaptado de Okamoto *et al.*, 2022.

Recentemente, em 2023, Alves e colaboradores, utilizando a ferramenta de hibridação molecular, sintetizaram um composto heterocíclico inédito (**45**, Figura 17) contendo em sua estrutura as unidades piridina, pirazol e pirrol, conectadas consecutivamente. Neste estudo, o grupo teve como objetivo examinar o potencial antitumoral e imunomodulador deste composto frente às linhagens celulares HL60 e K562 relacionadas à leucemia mielóide aguda (LMA) e à leucemia mielóide crônica (LMC), respectivamente. Dados os resultados obtidos, o grupo concluiu que o composto 45 apresenta citotoxicidade seletiva para as linhagens de células cancerosas avaliadas sem efeito citotóxico significativo para as células saudáveis sendo, portanto, um candidato promissor para o tratamento de LMA e LMC.

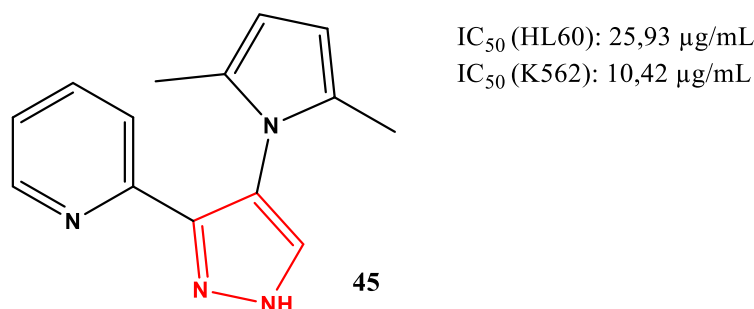


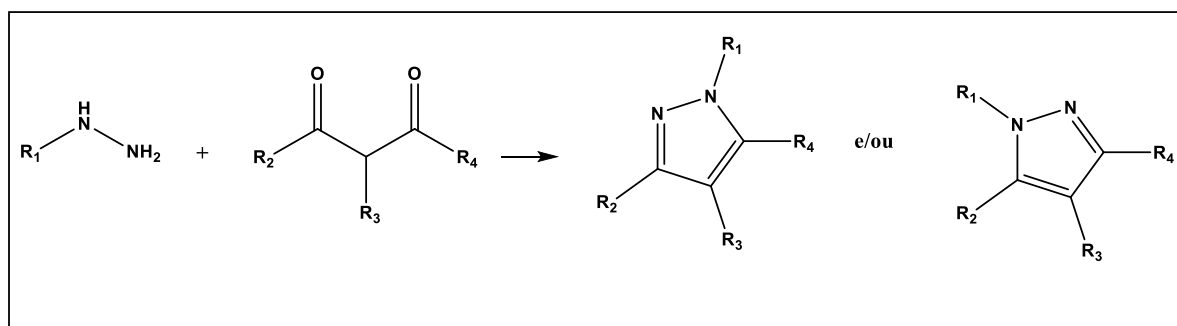
Figura 17: Estrutura molecular do composto **45** com atividade antileucêmica e valores de IC₅₀ apresentados para as linhagens HL60 e K562 relacionadas às leucemias mielóides aguda e crônica, respectivamente.

Fonte: Adaptado de Alves *et al.*, 2023.

1.2.3 Principais metodologias para a síntese do núcleo pirazol

O núcleo pirazol está presente em muitos compostos bioativos e pode ser obtido por rotas sintéticas versáteis que permitem a inserção de variados grupos funcionais capazes de melhorar a potência biológica (KONWAR *et al.*, 2021)

A síntese de Knorr compreende um dos métodos clássicos para a obtenção do núcleo pirazol e consiste em uma reação de ciclocondensação entre compostos 1,3-dicarbonílicos e hidrazinas. Sua principal limitação está na possibilidade de haver formação de mistura de produtos isoméricos quando R₂ e R₄ são diferentes (Esquema 1; RAJ, 2018; FARIA, 2017; KÜÇÜKGÜZEL, 2015).

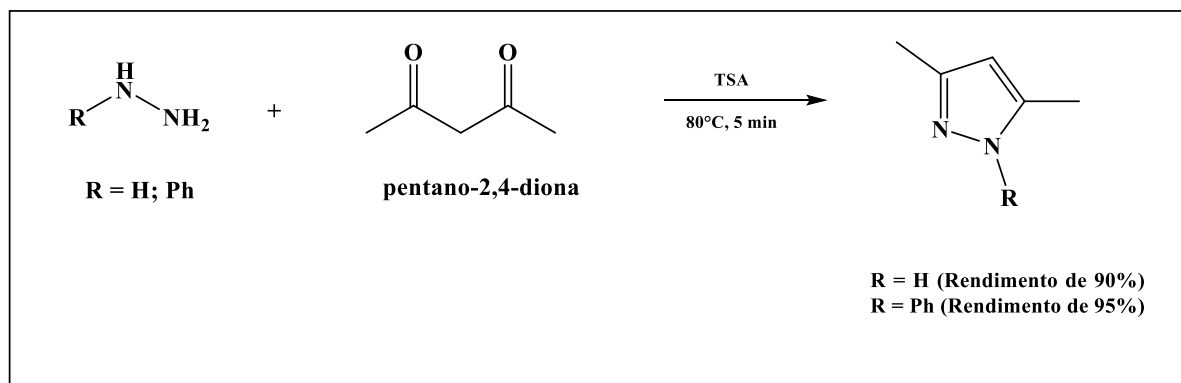


Esquema 1: O método de Knorr para síntese do núcleo pirazol.

Fonte: Adaptado de Faria, 2017.

Em 2015, Rahmatzadeh e colaboradores, empregando o método de Knorr, sintetizaram dois compostos pirazólicos com excelentes rendimentos. Neste trabalho, o uso de tungstato de ácido sulfúrico (TSA) permitiu que a reação entre pentano-2,4-diona e hidrazina/fenil-

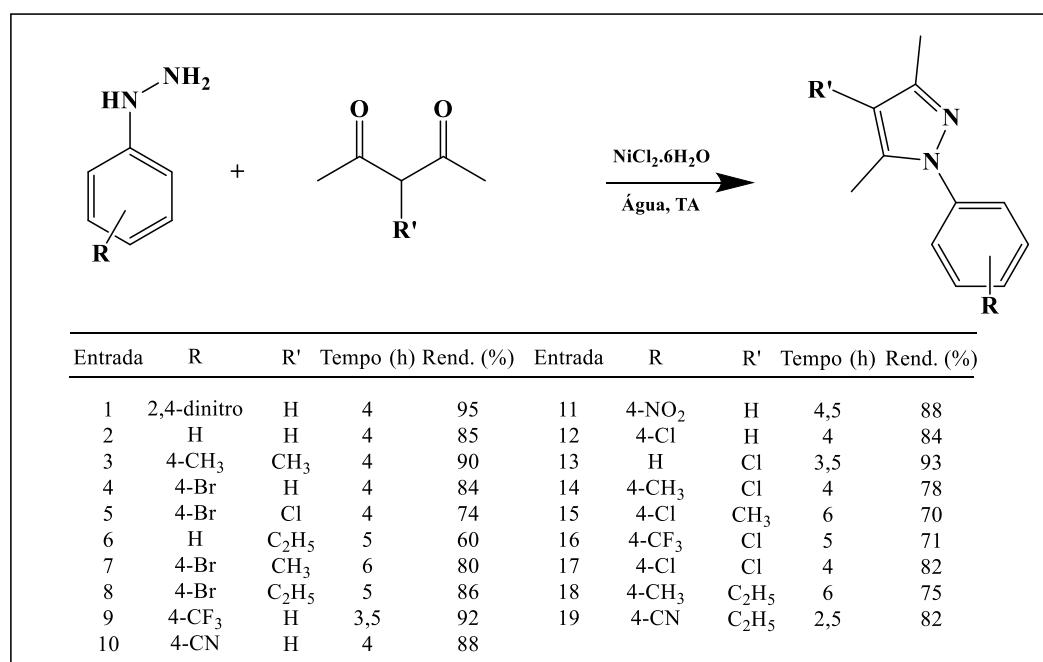
hidrazina ocorresse na ausência de solvente, em concordância com os princípios da Química Verde, levando a formação de 3,5-dimetil-1*H*-pirazóis como produtos (Esquema 2, RAHMATZADEH *et al.*, 2015).



Esquema 2: Síntese de 3,5-dimetil-1*H*-pirazóis utilizando TSA como catalisador verde.

Fonte: Adaptado de Rahmatzadeh *et al.*, 2015.

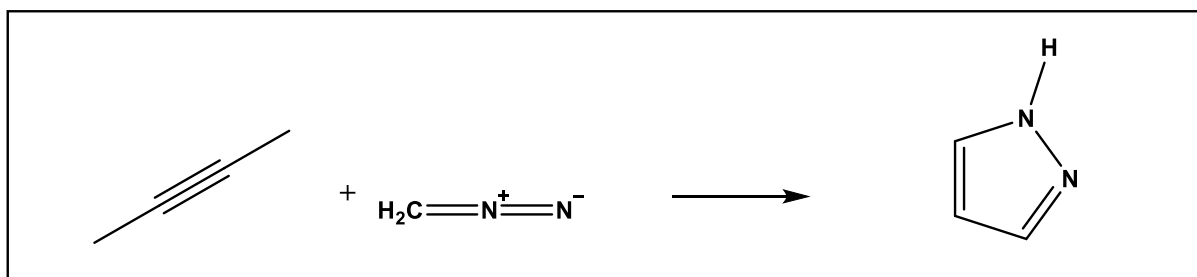
Recentemente em 2022, Konwar e colaboradores, após um estudo prévio com diferentes solventes e catalisadores, desenvolveram um protocolo e o empregaram nas reações entre 1,3-dicetona e hidrazinas obtendo uma série de compostos da família dos pirazóis com rendimentos bons a excelentes (Esquema 3, Konwar *et al.*, 2022).



Esquema 3: Síntese de pirazóis catalisada por cloreto de níquel através do método de Knorr.

Fonte: Adaptado de Konwar *et al.*, 2022.

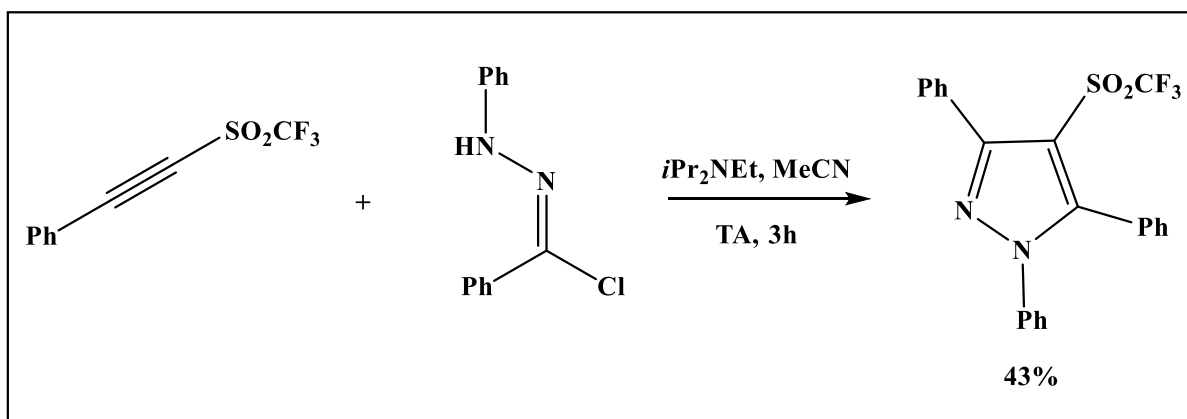
A síntese de Pechmann é outro método clássico para obtenção do núcleo pirazol a partir de uma cicloadição 1,3-dipolar entre alcinos e diazocompostos (Esquema 4). Entretanto, este método tem a desvantagem de formar subprodutos quando o alcino empregado apresenta grupos distintos ligados aos carbonos sp (AGGARWAL, 2003).



Esquema 4: O método de Pechmann para síntese do núcleo pirazol.

Fonte: Adaptado de Aggarwal, 2003.

Diversas moléculas contendo o núcleo pirazol têm sido sintetizadas a partir de alcinos e diazocompostos por meio de metodologias alternativas derivadas do método de Pechmann. Em 2012, Kawai e colaboradores, utilizando o [(trifluorometil)sulfonyl]etnilbenzeno e cloreto de (*E*)-*N*-fenilbenzodiazonila (Esquema 05) como materiais de partida em acetonitrila, sintetizaram uma molécula com o núcleo pirazol polissubstituído e rendimento de 43% (KAWAI *et al.*, 2012).



Esquema 5: Síntese de 1,3,5-trifenil-4-trifluorometilsulfonylpirazol.

Fonte: Adaptado de Kawai *et al.*, 2012.

Neste trabalho de dissertação os compostos pirazólicos foram investigados *in silico* e os mais promissores *in vitro* contra linhagens de células de leucemias humanas. Assim, a seguir será apresentada uma breve abordagem sobre o câncer e os tipos de leucemias.

1.3 Câncer

O crescimento e a multiplicação de novas células ocorrem naturalmente segundo a necessidade do organismo e, de modo geral, tem por objetivo promover a substituição daquelas mais antigas ou que foram por algum motivo danificadas. Nem sempre esse processo se desenvolve de modo ordenado e, por vezes, pode caminhar para um crescimento irregular e descontrolado que resultará na formação de uma massa de células disfuncionais, denominada tumor, cuja natureza pode ser benigna ou maligna (ALI *et al.*, 2023).

Os tumores benignos se desenvolvem a partir de um crescimento um pouco menos desordenado (Figura 18a), geralmente lento e com limites mais bem definidos, contudo, passíveis de comprimir órgãos. Em contrapartida, os tumores malignos se desenvolvem a partir do crescimento desordenado, rápido e autônomo de células anaplásicas, isto é, atípicas ao tecido normal, não se delimitando a uma região e, por isso, com a possibilidade de invadir tecidos adjacentes (Figura 18b). Neste caso, as células cancerosas se espalham para outras regiões do corpo, dando início a um processo conhecido como metástase (ALI *et al.*, 2023).

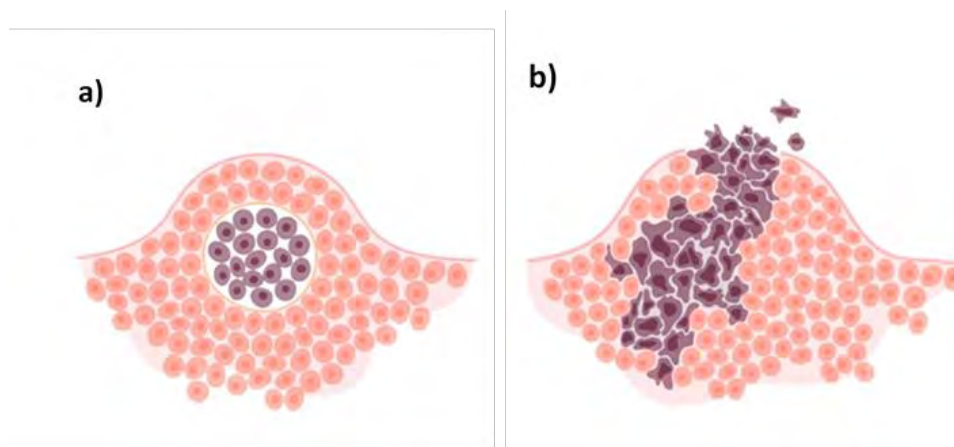


Figura 18: a) Ilustração de um tumor benigno; b) Ilustração de um tumor maligno.

Fonte: Equipare, 2023.

Assim, de acordo com o Instituto Nacional de Câncer (INCA), órgão auxiliar do Ministério da Saúde (MS), câncer ou neoplasia é o termo utilizado para designar o conjunto de mais de 100 patologias que têm em comum a proliferação desordenada de células, as quais podem afetar tecidos e órgãos e se espalhar por diferentes regiões do corpo.

O processo através do qual as células cancerosas são formadas é conhecido como carcinogênese ou oncogênese (Figura 19). Nele, genes especiais chamados proto-oncogenes, cuja função está relacionada ao crescimento, diferenciação e divisão celular, são afetados por agentes carcinogênicos e sofrem mutação, translocação ou rearranjo. A partir do momento em que são ativados, os proto-oncogenes se transformam em oncogenes, que serão os responsáveis por transformar células saudáveis em células cancerosas (INCA, 2023).

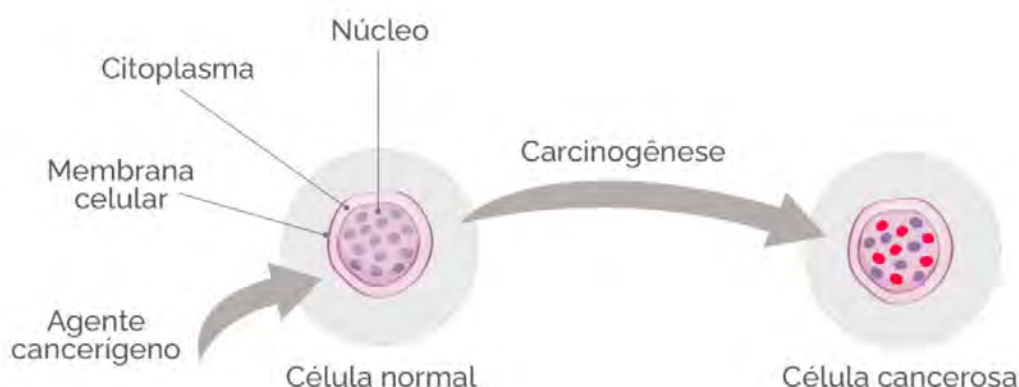


Figura 19: O processo de carcinogênese resumidamente.

Fonte: INCA, 2023.

Esse processo é lento e compreende três estágios consecutivos. O primeiro, denominado iniciação, se caracteriza pela ação dos agentes cancerígenos ou agentes iniciadores sobre os proto-oncogenes (Figura 20a). Neste estágio, as células estão apenas geneticamente alteradas e não há detecção clínica de tumor. O segundo estágio, conhecido como promoção, é marcado pela transformação lenta e gradual da célula iniciada no estágio anterior em célula maligna, e tem por característica a ação de outros agentes cancerígenos denominados oncopromotores (Figura 20b). Geralmente, a ruptura do contato com esses agentes pode interromper o processo oncogênico no estágio de promoção. No último estágio, ou estágio de progressão, o câncer já está instalado. Nele, se observa a evolução do paciente para o aparecimento das primeiras manifestações clínicas, onde a proliferação de células

alteradas se dá de maneira descontrolada e irreversível (Figura 20c) (INCA, 2023, ALI *et al.*, 2023).

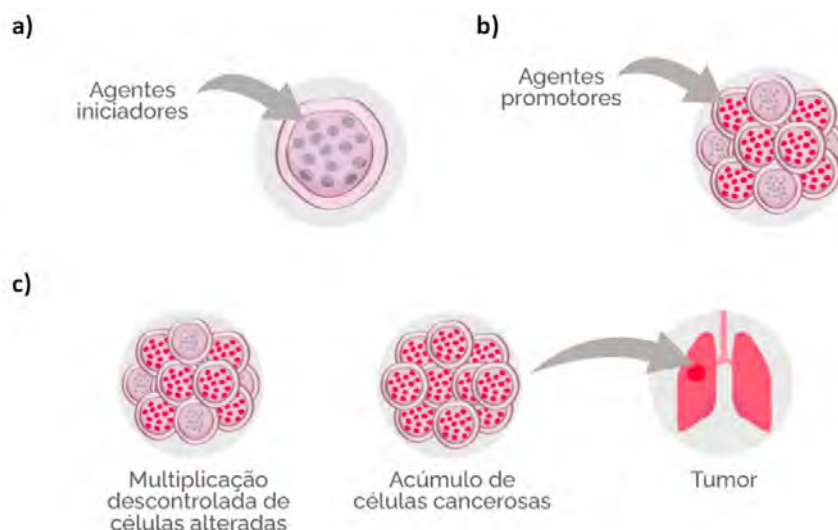


Figura 20: a) Estágio de iniciação da carcinogênese; b) Estágio de promoção da carcinogênese; c) Estágio de progressão da carcinogênese.

Fonte: INCA, 2023.

A classificação dos diferentes tipos de cânceres se dá a partir da localização primária do tumor e por sua origem histológica. Deste modo, os cânceres mais comuns já diagnosticados são os de pulmão, mama, próstata, cólon, reto, brônquios, bexiga, pele, linfoma não-Hodgkin, pelve, rim, estômago, pâncreas, colo do útero e leucemias. (INCA, 2023; ALI *et al.*, 2023).

Notadamente, o século passado apresentou uma queda das taxas de mortalidade por doenças cardiovasculares elevando o câncer à principal causa de morte prematura por doenças não transmissíveis em muitos países, apesar dos avanços tecnológicos (ALI *et al.*, 2023; KE *et al.*, 2022). Conforme estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2019 o câncer ocupou a primeira ou a segunda posição dentre as principais causas de morte entre pessoas com menos de 70 anos em 112 países, incluindo o Brasil, e a terceira ou quarta em outros 23 (Figura 21 a).

O aumento do número de novos casos e da mortalidade por razão do câncer vem crescendo a cada ano como reflexo do envelhecimento e crescimento da população mundial. Com base nos quatro níveis (baixo, médio, elevado e muito elevado) do Índice de

Desenvolvimento Humano (IDH), estabelecido pela Organização das Nações Unidas (ONU) em seu Relatório de Desenvolvimento Humano (Figura 21 b), é possível sugerir que há uma correlação entre os fatores de risco associados ao câncer com fatores socioeconômicos (SUNG *et al.*, 2021).

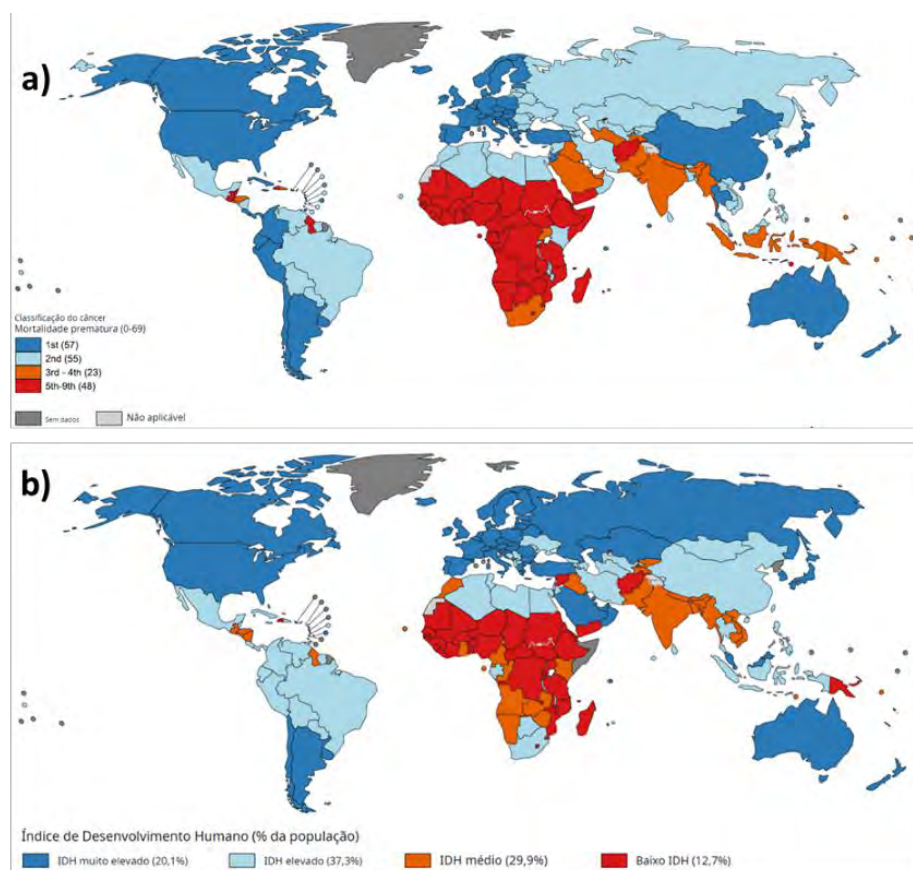


Figura 21: a) Classificação nacional do câncer como causa de morte de indivíduos com idade inferior a 70 anos em 2019; b) Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) de 2019, baseado em quatro níveis.

Fonte: Organização Mundial da Saúde, 2023; Sung *et al.*, 2021.

Considerando os 10 tipos de neoplasias mais comuns (**Figura 22**), sendo elas pulmão, colo retal, fígado, estômago, mama, esôfago, pâncreas, próstata, colo do útero e leucemia, a OMS, estimou que em 2020 foram diagnosticados cerca de 19,3 milhões de novos casos e quase 10 milhões de mortes em todo o mundo. Desses óbitos, 3,1% são atribuídos às leucemias (OMS, 2023; ALMEHMADI *et al.*, 2021).

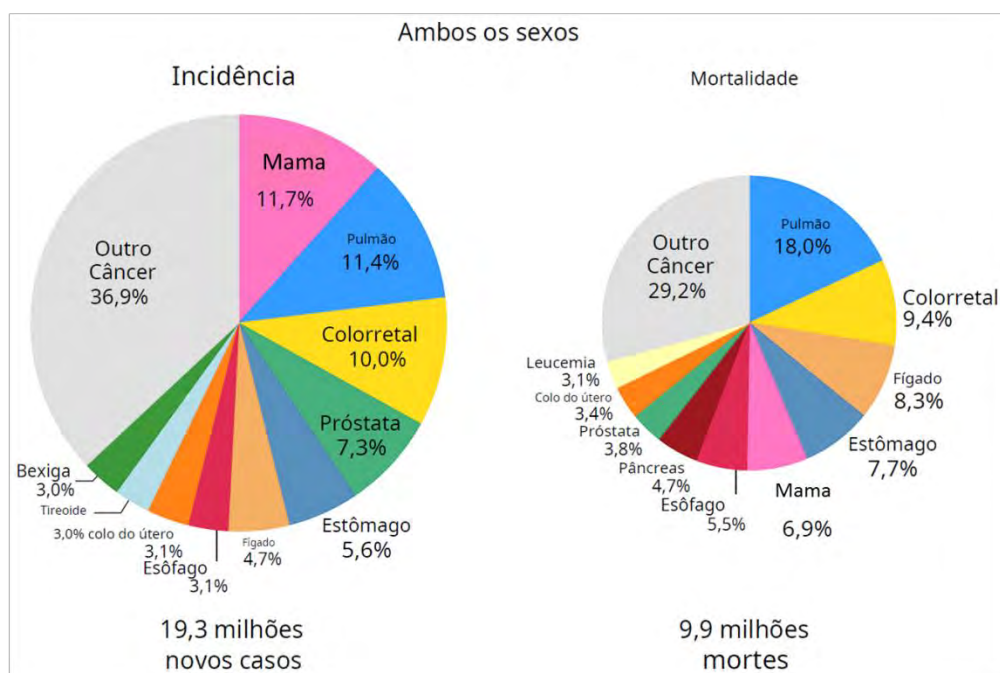


Figura 22: Distribuição de casos e mortes para os 10 tipos de câncer mais comuns em 2020.

Fonte: GLOBOCAN, 2020.

1.4 Leucemias

As leucemias são um grupo de neoplasias malignas que tem como principal característica a proliferação descontrolada de células progenitoras hematopoiéticas imaturas. Uma vez produzidas, essas células se acumulam na medula óssea (MdO) causando uma série de danos e comprometimento de suas funções normais (INCA, 2023).

A MO é um tecido gelatinoso encontrado na região interna dos ossos e é responsável pelo processo de produção, proliferação, maturação e renovação das células hematológicas através de um processo denominado hematopoiese (Figura 23). Nele, células-tronco hematopoiéticas com alto poder de renovação e pluripotentes, isto é, com capacidade de dar origem a qualquer tipo de tecido sem, no entanto, formar um organismo completo, se diferenciam em duas linhagens sanguíneas. A primeira linhagem, denominada linfóide, se torna responsável pela produção dos linfócitos B e T, enquanto a segunda linhagem, denominada mielóide, passa por múltiplas etapas adicionais e ciclos de ampliação antes de formarem eritrócitos ou hemácias, plaquetas, monócitos, neutrófilos, eosinófilos e basófilos (INCA, 2023; MERDAD *et al.*, 2023; OLIVEIRA *et al.*, 2021).

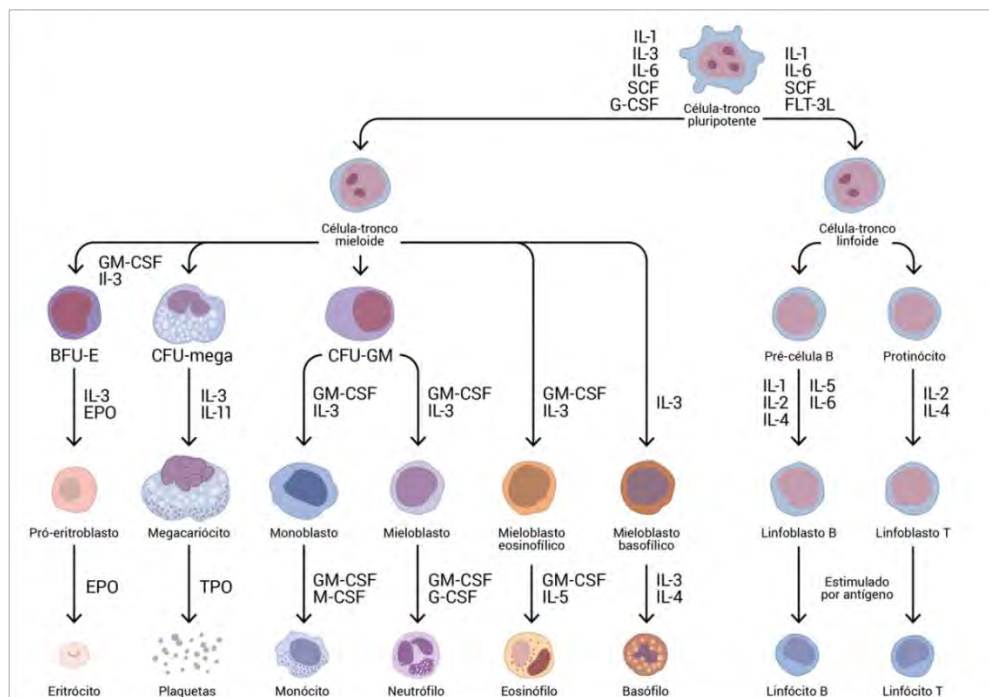


Figura 23: Células-tronco hematopoiéticas e o processo de hematopoiese.

Fonte: MedicinaNET, 2023.

Neste contexto, o microambiente da medula óssea é, portanto, um fator importante para o perfeito funcionamento da hematopoiese, uma vez que sua interação com as células sanguíneas irá determinar o controle da proliferação, diferenciação e maturação das mesmas segundo o que se espera dentro da normalidade (ANJOS *et al.*, 2000).

Segundo dados do INCA, entre os anos de 2020 e 2022, foram estimados 10.810 novos casos diagnosticados de leucemias entre os brasileiros, com prevalência de ocorrência em indivíduos do sexo masculino. Mulheres representaram aproximadamente 45,2% dos casos com um risco estimado de 4,56 novos casos para cada 100 mil mulheres, contrapondo o número de 5,67 novos casos para cada 100 mil homens.

1.4.1 Classificação das leucemias

As leucemias estão inseridas em um grupo vastamente diversificado e complexo de neoplasias relacionadas ao sistema hematológico e, por isso, sua classificação se tornou algo importante e necessária. Nesse sentido, há hoje sistemas internacionais de classificação, como o proposto pelo grupo Franco-Americano-Britânico (FAB), que as agrupa segundo critérios morfológicos da célula cancerosa, e a classificação segundo a OMS, baseada em uma

combinação de características clínicas, morfológicas, imunofenotípicas e genéticas (LENZI *et al.*, 2015).

Embora mais antigo, o sistema de classificação apresentado pelo FAB, proposto em 1982 e modificado em 1985, se tornou bastante difundido e aceito em todo o mundo, dada sua fácil compreensão. Dezesesseis anos mais tarde, a OMS, julgando necessário um melhor agrupamento das leucemias segundo comportamentos clínicos semelhantes, resolveu publicar modificações no sistema FAB inserindo subgrupos aos principais tipos de leucemias (BORTOLHHEIRO, 2006).

De um modo geral, as leucemias são classificadas em quatro tipos principais que consideram o grau de evolução da doença, sendo aguda ou crônica, e a linhagem celular que é acometida, isto é, linfóide ou mielóide. Os termos utilizados como aguda ou crônica referem-se ao percentual de blastos ou células leucêmicas encontradas na medula óssea ou no sangue, sendo este maior na classificação aguda, cuja evolução ocorre de maneira mais rápida. Deste modo, a combinação desses dois fatores resulta nos tipos: Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA), Leucemia Linfoblástica Crônica (LLC), Leucemia Mieloblástica Aguda (LMA) e Leucemia Mieloblástica Crônica (LMC) (LENZI *et al.*, 2015).

1.4.1.1 Leucemia linfoblástica aguda (LLA)

A LLA tem como principal característica o desenvolvimento do processo oncogênico relacionado à transformação maligna e à proliferação não controlada das células progenitoras hematopoiéticas linfóides, com rápida evolução do quadro para sintomas mais graves da doença. Este tipo de leucemia é mais frequente em crianças e menos comum em jovens adultos, entretanto, é possível observar um ligeiro aumento no número de casos em indivíduos após os 50 anos de idade (GENESCA *et al.*, 2015).

1.4.1.2 Leucemia linfoblástica crônica (LLC)

Afetando cerca de 75% dos pacientes leucêmicos, a LLC se caracteriza pelo acúmulo progressivo de linfócitos (B ou T, sendo mais comum o tipo B) malignos fenotipicamente maduros em regiões como a medula óssea, sangue periférico, baço e linfonodos. Ao contrário da LLA, a LLC é mais comum em adultos, cuja idade média dos pacientes, segundo a Sociedade Americana de Câncer (SAC), é de 70 anos, e menos frequentes em crianças (BARROS, 2009).

1.4.1.3 Leucemia mieloblástica aguda (LMA)

De modo semelhante à LLA, a LMA tem como causa uma série de modificações genéticas adquiridas, entretanto, se caracteriza principalmente pelo comprometimento do processo hematopoiético da linhagem mielóide de desenvolvimento celular, acarretando uma produção insuficiente de células sanguíneas maduras normais, as quais são substituídas por células cancerosas (LIMA *et al.*, 2016).

1.4.1.4 Leucemia mieloblástica crônica (LMC)

De maior incidência em indivíduos adultos e em idosos, a LMC tem como característica principal o acometimento de células da linhagem mielóide, tal como a LMA, entretanto, de desenvolvimento a princípio lento. Seu diagnóstico é facilitado graças a uma particularidade essencial relacionada a uma anormalidade citogenética específica conhecida como “o cromossomo Philadelphia” (LENZI *et al.*, 2015).

Essa anomalia citogenética é caracterizada pela translocação recíproca entre os cromossomos 9q32 e 22q11 que resulta em uma oncoproteína denominada BCR-ABL responsável pela liberação de efetores da proliferação celular e inibidores da apoptose ou “morte celular programada” (BORTOLHEIRO, CHIATTONE, 2008).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Sintetizar, caracterizar e avaliar os efeitos anticâncer de compostos pirazólicos tetra-substituído frente às células leucêmicas Jurkat.

2.2 Objetivos Específicos

- Sintetizar precursores nitrilados em uma reação “one-pot” em três etapas consecutivas sem o isolamento das espécies intermediárias, explorando a acidez dos hidrogênios α nitrila na adição sobre dissulfeto de carbono e posterior alquilação dos átomos de enxofre;

- Sintetizar uma série de compostos contendo o núcleo pirazol tetra-substituído a partir dos precursores nitrilados obtidos anteriormente empregando tiossemicarbazida, hidrazina hidratada, fenilhidrazina e metilhidrazina como nucleófilos;
- Caracterizar os compostos obtidos por técnicas espectroscópicas de rotina como infravermelho e ressonância magnética nuclear de ^1H e de ^{13}C .
- Realizar a triagem dos compostos pirazólicos obtidos aplicando testes *in silico* com o uso dos softwares CLC-Pred e AdmetSAR com base nas estruturas moleculares propostas.
- Avaliar a toxicidade dos compostos selecionados a partir dos testes *in silico* empregando ensaios com *Artemia salina*.
- Avaliar a citotoxicidade dos compostos selecionados *in silico* por meio de ensaios *in vitro* de viabilidade celular empregando a linhagem celular Jurkat.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Equipamentos e Materiais

3.1.1 Síntese e análise dos produtos

Todos os reagentes utilizados tiveram suas respectivas massas aferidas em balança analítica modelo M214-AIH BEL do Laboratório do Grupo de Síntese de Compostos Bioativos (GSCB), localizado na sala 104C do Instituto de Ciências Exatas (ICEx) da Universidade Federal Fluminense (UFF) no Campus Atterrado, Volta Redonda-RJ.

As sínteses dos pirazóis foram feitas com o emprego de micro-ondas científico modelo Anton Paar Monowave 300, localizado nesse mesmo laboratório.

As análises cromatográficas em camada delgada (CCD) foram realizadas em cromatofolhas de sílica gel 60 F254 (Aldrich) e reveladas sob luz UV (254 nm) e solução de vanilina sulfúrica para verificar qualitativamente a pureza dos produtos sintetizados e isolados.

Os solventes empregados nas sínteses, purificação, CCD e análises instrumentais eram de grau P.A. e foram utilizados como recebidos bem como os demais reagentes: dimetilformamida (Sigma-Aldrich), etanol (NEON), diclorometano (Dinâmica), dimetilsulfóxido hexadeuterado (Sigma-Aldrich), clorofórmio deuterado (Sigma-Aldrich), acetato de etila (NEON), 2-cianoetanoato de metila (Sigma-Aldrich), benzoilacetoneitrila

(Sigma-Aldrich), malononitrila (Sigma-Aldrich), dissulfeto de carbono (Sigma-Aldrich), carbonato de potássio (Dinâmica), sulfato de sódio anidro (Dinâmica), tiossemicarbazida (Sigma-Aldrich), hidrazina hidrato (Sigma-Aldrich), fenil-hidrazina (Sigma-Aldrich), metil-hidrazina (Sigma-Aldrich), iodeto de metila (Sigma-Aldrich), dimetilformamida (DMF) (Sigma-Aldrich) e água destilada.

3.1.2 Caracterização dos precursores nitrilados e dos pirazóis

Os pontos de fusão dos compostos foram determinados em um aparelho da marca Gehaka, modelo PF1500. Os espectros no infravermelho foram obtidos em espectrofotômetro Brüker, modelo FT-IR Vertex 70, usando o modo Attenuated Total Reflectance (ATR) na faixa de 400 a 4000 cm^{-1} . Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio a 500 MHz e carbono a 126 MHz foram registrados em um espectrômetro Brüker Ultrashield Plus em CDCl_3 ou DMSO-d_6 contendo tetrametilsilano (TMS) como referência interna. Os deslocamentos químicos (δ) foram registrados em parte por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz).

3.1.3 Avaliação dos efeitos biológicos

3.1.3.1 Triagem *in silico* dos compostos pirazólicos

Os ensaios *in silico* foram realizados com base nos softwares *online* gratuitos CLC-Pred e AdmetSAR

3.1.3.2 Avaliação *in vitro* do efeito antiproliferativo e de toxidez geral.

Foi utilizada como modelo a linhagem celular Jurkat, gentilmente cedida pela professora Dra. Juliana Echevarria-Lima do Instituto de Microbiologia Paulo Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). As análises de toxicidade foram realizadas utilizando *Artemia salina*, cujos cistos foram adquiridos da empresa Maramar Aquacultura Com. Imp. Exportação Ltda. A contagem do número de náuplios viáveis foi feita com auxílio de microscópio estereoscópico da marca Fisher Science Education.

O meio de cultivo celular utilizado foi Roswell Park Memorial Institute (RPMI) (Gibco TM/Thermo Fisher) suplementando com soro fetal bovino (SFB) (Gibco TM/Thermo Fisher) e penicilina-estreptomicina (LGC Biotecnologia). Para a avaliação da viabilidade

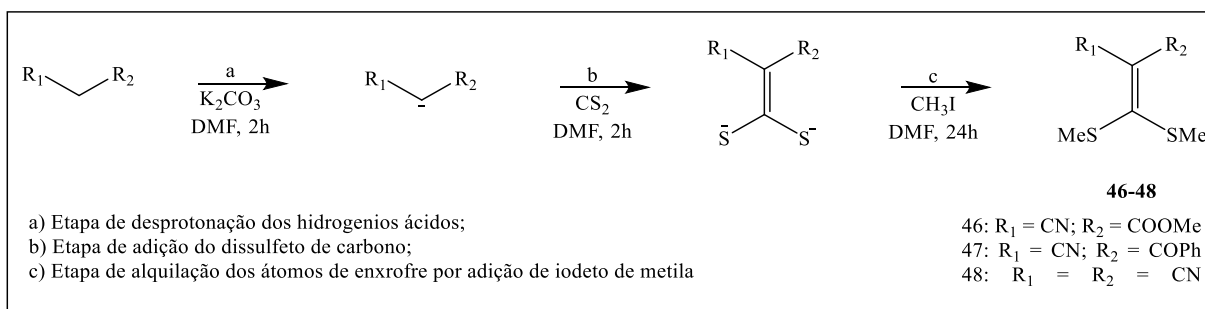
celular foi utilizado brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio (MTT) (Sigma-Aldrich) e sua leitura realizada em espectrofotômetro para microplacas (MolecularDevices SpectraMax ®; SoftMax ® Pro).

Os ensaios para a avaliação da toxicidade bem como para a avaliação da viabilidade celular foram realizados em colaboração com a MSc. Maria Clara Salgado Campos, também do Instituto de Microbiologia Paulo Góes da UFRJ.

3.2 Sínteses

3.2.1 Procedimento geral para a síntese dos intermediários nitrilados

Inicialmente, foram preparados três precursores nitrilados (**46**, **47** e **48**) por meio de uma síntese “one-pot” em três etapas consecutivas sem o isolamento das espécies intermediárias. Assim, em um balão de fundo redondo contendo dimetilformamida (DMF), sob agitação magnética à temperatura ambiente, foram adicionadas quantidades equimolares da substância contendo hidrogênios ativos e carbonato de potássio (K_2CO_3). Após duas horas o balão contendo a mistura reacional foi imerso em banho de gelo e a ela foi adicionado lentamente dissulfeto de carbono (CS_2) em quantidade equivalente ao número de mols dos reagentes anteriores. Manteve-se a mistura da reação a 0 °C e agitação constante por mais duas horas. Ao término deste tempo foi adicionado iodeto de metila (CH_3I) na quantidade de 1:2 (um para os reagentes anteriores e dois para CH_3I) deixando a mistura da reação sob agitação à temperatura ambiente por vinte e quatro horas. Estes procedimentos estão resumidamente descritos no Esquema 6 e as informações acerca dos reagentes utilizados e suas respectivas quantidades em número de mols podem ser visualizadas na Tabela 1.



Esquema 6: Síntese “one-pot” em três etapas dos precursores nitrilados **46**, **47** e **48**.

Fonte: Adaptado de Sangi, 2014

Tabela 1: Reagentes utilizados para síntese dos intermediários **46-48** e suas respectivas quantidades.

	Substância com hidrogênios ativos	K ₂ CO ₃ (n° de mol)	DMF (mL)	CS ₂ (n° de mol)	CH ₃ I (n° de mol)
46	2-cianoacetato de metila	0,03	40	0,03	0,06
47	Benzoilacetonitrila	0,014	16	0,014	0,028
48	Malononitrila	0,03	40	0,03	0,06

Após as vinte e quatro horas sob agitação à temperatura ambiente, a reação foi finalizada com adição de diclorometano (CH₂Cl₂) e a mistura transferida para um funil de separação, onde recolheu-se a fase inferior que foi submetida a sucessivas extrações com água destilada. Por fim, secou-se a fase orgânica com sulfato de sódio anidro, seguida de uma filtração simples e remoção do solvente em evaporador rotativo, obtendo-se os respectivos (Figura 24).

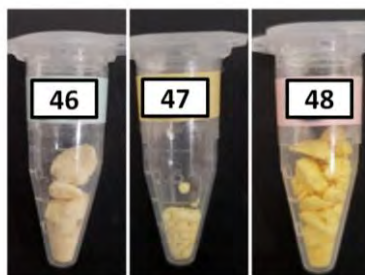
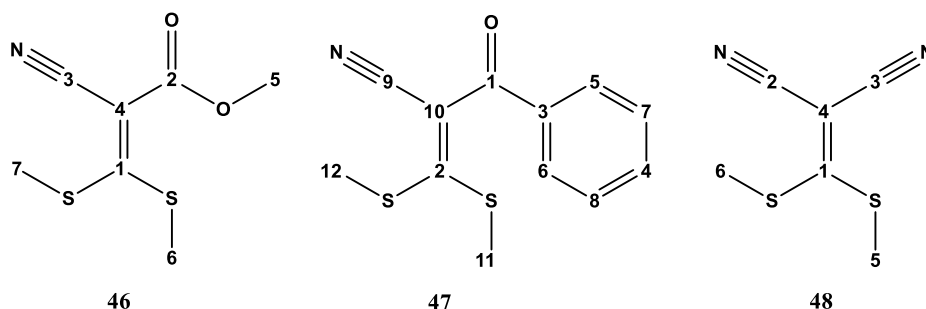


Figura 24: Precusores **46-48** obtidos na forma de sólidos amarelos depois de isolados.

Fonte: Próprio autor.

A pureza dos produtos obtidos foi previamente analisada de forma qualitativa empregando a técnica de cromatografia em camada delgada (CCD). Amostras dos produtos foram separadas, identificadas e posteriormente enviadas para análise espectral por ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono (RMN de ¹H e ¹³C). Os procedimentos supradescritos foram realizados no laboratório Grupo de Síntese de Compostos Bioativos (GSCB), sala 104C, do instituto de Ciências Exatas (ICEx) da Universidade Federal Fluminense (UFF), campus Aterrado na cidade de Volta Redonda, RJ.

Caracterização dos precursores nitrilados 46-48



3,3-bis(metilsulfanil)-2-cianoacrilato de metila (46): Sólido amarelo; Ponto de Fusão (°C): 98-100 (99-102; GOMPPER *et al.*, 1962); Rendimento: 92,0%; Infravermelho (ATR) cm^{-1} : 2210 ($\nu_{\text{C}\equiv\text{N}}$), 1720 ($\nu_{\text{C}=\text{O}}$ éster), 1460-1269 ($\nu_{\text{C}-\text{O}}$), 750 ($\nu_{\text{S}-\text{CH}_3}$); RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 3,76 (s, 3H, H_a), 2,68 (s, 3H, H_b), 2,53 (s, 3H, H_c); RMN de ^{13}C (126 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 181,6 (C1), 163,0 (C2), 116,3 (C3) 98,3 (C4), 52,8 (C5), 21,1 (C6), 19,1 (C7).

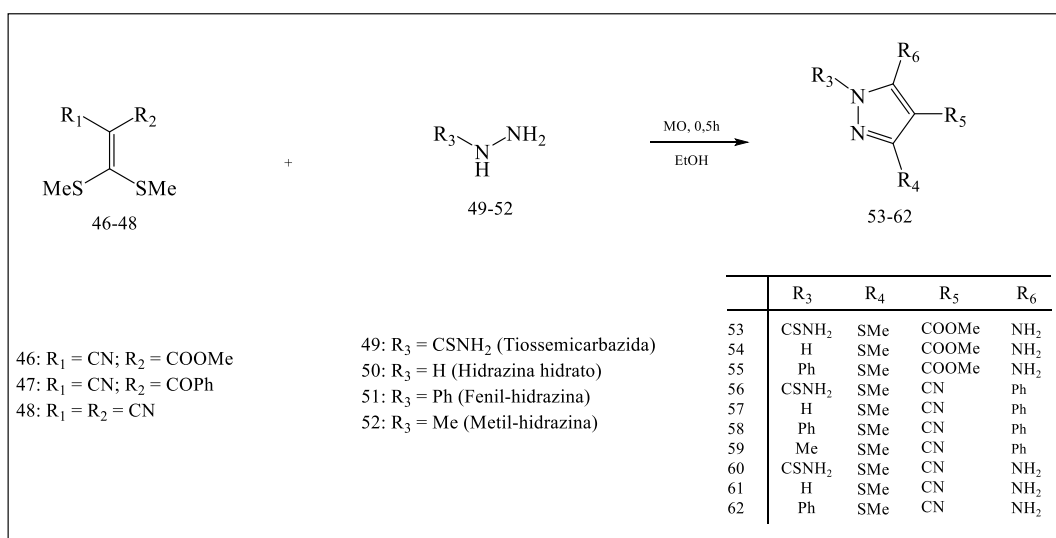
2-benzoil-3,3-bis(metilsulfanil)-acrilonitrila (47): Sólido amarelo; Ponto de Fusão (°C): 73-74 (70-71, ELGEMEIE *et al.*, 2017); Rendimento: 83,5%; Infravermelho (ATR) cm^{-1} : 3100-2900 ($\nu_{\text{C}-\text{H}}$ sp^2 aromático), 2200 ($\nu_{\text{C}\equiv\text{N}}$), 2000-1700 (bandas harmônicas de aromático); 1650 e 1600 ($\nu_{\text{C}=\text{C}}$ aromático); 1420 e 1400 ($\nu_{\text{C}=\text{C}}$ aromático); 750 e 700 (padrão monossustituído de anel aromático), 600 ($\nu_{\text{S}-\text{CH}_3}$); RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7,90-7,87 (m, 2H, H_a), 7,60-7,54 (tt, $J = 7,2$ e $1,5$ Hz, 1H, H_b), 7,50 – 7,44 (m, 2H, H_c), 2,77 (s, 3H, H_d); 2,49 (s, 3H, H_e); RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 187,3 (C1), 179,5 (C2), 136,6 (C3), 133,3 (C4), 129,1 (C5 + C6), 128,5 (C7 + C8), 117,5 (C9), 106,0 (C10), 20,2 (C11), 19,6 (C12).

2-((bis-metilsulfanil)metileno-malononitrila (48): Sólido amarelo ocre; Ponto de Fusão (°C): 76-79 (79-81, BARALDI *et al.*, 2003); Rendimento: 75,0%; Infravermelho (ATR) cm^{-1} : 2210 ($\nu_{\text{C}\equiv\text{N}}$), 1450 e 1400 ($\nu_{\text{C}=\text{C}}$), 700-600 ($\nu_{\text{S}-\text{CH}_3}$); RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 2,75 (s, 6H, H_a); RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 183,7 (C1), 112,7 (C2 + C3); não observado (C4), 19,2 (C5 + C6).

3.2.2 Procedimento geral para a síntese dos pirazóis

Em um tubo de micro-ondas científico contendo etanol (3,00 mL) foi preparada uma solução equimolar de cada precursor nitrilado (46-48) previamente preparado e uma dentre as

quatro espécies nucleofílicas: tiossemicarbazida (**49**), hidrazina hidratada (**50**), fenil-hidrazina (**51**) e metil-hidrazina (**52**) (Esquema 07). Após uma homogeneização prévia da solução, o tubo foi vedado e inserido em forno de micro-ondas científico ajustado com os parâmetros de temperatura e tempo para 80 °C e trinta minutos. A reação foi acompanhada por CCD em intervalos de dez minutos para verificar o progresso da reação. Utilizou-se uma mistura de eluentes entre diclorometano e acetato de etila (2:1) como fase móvel e cromatofolhas de sílica gel como fase estacionária.



Esquema 7: Síntese dos pirazóis.

Fonte: Próprio autor.

Passados 30 minutos sob irradiação com micro-ondas os pirazóis foram obtidos na forma sólida (Figura 25) após serem filtrados a vácuo, lavados com etanol gelado e recristalizados também em etanol.

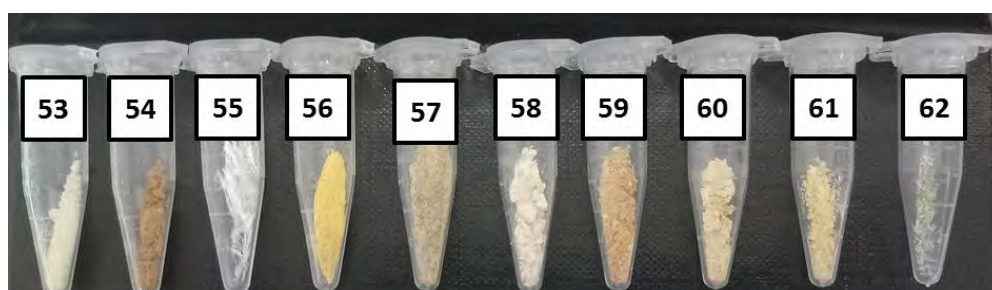
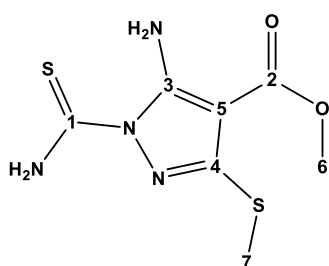
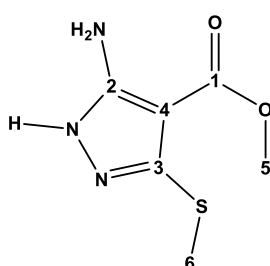


Figura 25: Pirazóis **53-62** obtidos na forma sólida e com coloração variada após filtragem à vácuo e recristalização em etanol.

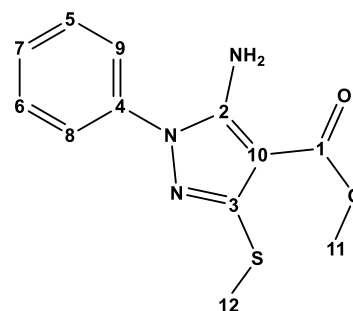
Fonte: Próprio autor.



53



54

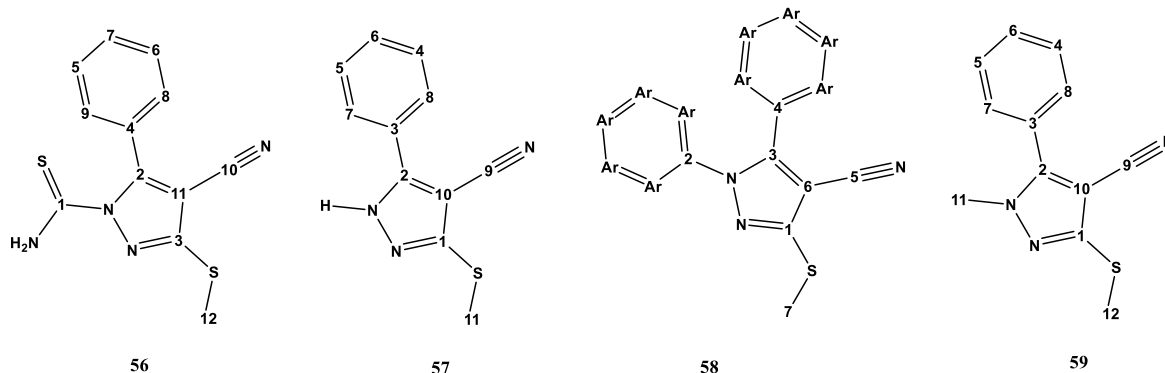


55

5-amino-1-carbamotioil-3-metilsulfanil-1H-pirazol-4-carboxilato de metila (53): Sólido amarelo claro; Ponto de Fusão (°C): 189-191; Rendimento: 82,3%. Infravermelho (ATR) ν cm^{-1} : 3450 e 3410 ($\nu_{\text{N-H}}$ amina primária livre); 3315 e 3270 ($\nu_{\text{N-H}}$ amina primária conjugada); 1860 ($\nu_{\text{C=O}}$ éster conjugado com anel aromático); 1300-1000 ($\nu_{\text{C-O}}$ de éster); 700-600 ($\nu_{\text{S-CH}_3}$). RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 9,76 (s, 2H, H_a), 9,14 (s, 2H, H_b), 3,73 (s, 3H, H_c), 2,46 (s, 3H, H_d). RMN ^{13}C (126 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 176,6 (C1), 163,4 (C2), 155,0 (C3), 151,9 (C4), 92,5 (C5), 51,3 (C6), 128,0 (C7).

5-amino-3-metilsulfanil-1H-pirazol-4-carboxilato de metila (54): Sólido marrom; Ponto de Fusão (°C): 171-174; Rendimento: 86,2%; Infravermelho (ATR) ν cm^{-1} : 3450 e 3300 ($\nu_{\text{N-H}}$ amina primária); 1750 ($\nu_{\text{C=O}}$ éster); 1350-1000 ($\nu_{\text{C-O}}$ éster); 700-600 ($\nu_{\text{S-CH}_3}$). RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 6,27 (s, 1H, H_a), 3,67 (s, 2H, H_b), 2,34 (s, 3H, H_c). RMN ^{13}C (126 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 164,1 (C1), 153,4 (C2), 147,6 (C3), 91,9 (C4), 50,7 (C5), 12,9 (C6).

5-amino-1-fenil-3-metilsulfanil-1H-pirazol-4-carboxilato de metila (55): Sólido branco aperolado; Ponto de Fusão (°C): 118-120 (114-115, GOMPPER *et al.*, 1962) ; Rendimento: 74,7%; Infravermelho (ATR) ν cm^{-1} : 3340 e 3320 ($\nu_{\text{N-H}}$ amina primária); 3100-3000 ($\nu_{\text{C-H}}$ sp^2 aromático), 2000-1700 (bandas harmônicas de aromático); 1680 ($\nu_{\text{C=O}}$ éster conjugado com anel aromático); 1600 e 1460 ($\nu_{\text{C=C}}$ aromático); 1300-1000 ($\nu_{\text{C-O}}$ éster); 900-800 ($\delta_{\text{C-H}}$ aromático); 750 e 690 (padrão de anel monossustituído); 700-600 ($\nu_{\text{S-CH}_3}$). RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 7,55 (d, 4H, J = 3.9 Hz, H_a), 7,54 (m, 1H, H_b), 6,41 (s, 2H, H_c), 3,74 (s, 3H, H_d), 2,40 (s, 3H, H_e). RMN ^{13}C (126 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 164,0 (C1), 151,4 (C2), 149,3 (C3), 138,2 (C4), 129,9 (C5), 128,0 (C6 + C7), 124,2 (C8 + C9), 92,9 (C10), 51,1 (C11), 12,8 (C12).

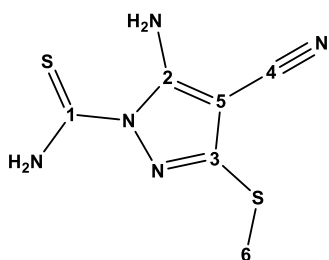


4-ciano-3-metilsulfanil-5-fenil-1H-pirazol-1-carbotioamida (56): Sólido amarelo; Ponto de Fusão (°C): 123-127; Rendimento: 72,0%; Infravermelho (ATR) cm^{-1} : 3460 e 3380 ($\nu_{\text{N-H}}$ amina primária); 2300 ($\nu_{\text{C}\equiv\text{N}}$); 1600 e 1500 ($\nu_{\text{C}=\text{C}}$ aromático); 750 e 690 (padrão de anel monossustituído); 700-600 ($\nu_{\text{S-CH}_3}$). RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 7,72-7,45 (m, 5H, $\text{H}_{\text{a-b}}$), 2,36 (s, 3H, H_{c}). RMN ^{13}C (126 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 176,4 (C1), 155,9 (C2), 151,4 (C3), 140,4 (C4), 131,4 (C5), 128,6 (C6), 128,4 (C7), 128,0 (C8), 127,7 (C9), 118,8 (C10), 70,9 (C11), 13,9 (C12).

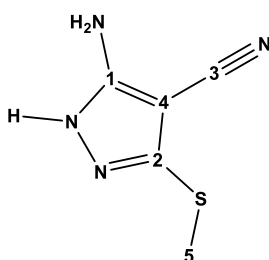
3-metilsulfanil-5-fenil-1H-pirazol-4-carbononitrila (57): Sólido bege; Ponto de Fusão (°C): 152-153 (147-149, ELGEMEIE *et al.*, 2017); Rendimento: 81,0%; Infravermelho (ATR) cm^{-1} : 2300 ($\nu_{\text{C}\equiv\text{N}}$); 1600 e 1550 ($\nu_{\text{C}=\text{C}}$ aromático); 750 e 690 (padrão de anel monossustituído); 700-600 ($\nu_{\text{S-CH}_3}$). RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 11,63 (s, 1H, H_{a}), 7,62 (m, 5H, H_{b}), 2,72 (s, 3H, H_{c}). RMN ^{13}C (126 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 151,4 (C1), 148,3 (C2), 139,3 (C3), 129,0 (C4), 128,1 (C5), 127,8 (C6), 127,5 (C7), 127,3 (C8), 117,0 (C9), 88,9 (C10), 12,8 (C11).

5-metilsulfanil-1,3-difenil-4-carbonitrila (58): Sólido branco rosado; Ponto de Fusão (°C): 115-117 (119-120, RUDORF *et al.*, 1978); Rendimento: 68,9%; Infravermelho (ATR) cm^{-1} : 3100-3000 ($\nu_{\text{C-H}}$ sp^2 aromático); 2225 ($\nu_{\text{C}\equiv\text{N}}$); 2000-1700 (bandas harmônicas de aromático); 1600-1555 e 1450 e 1430 ($\nu_{\text{C}=\text{C}}$ aromático); 760 e 700 (padrão de anel monossustituído); 655 ($\nu_{\text{S-CH}_3}$). RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 7,47 – 7,34 (m, 10H, H_{a}), 2,65 (s, 3H, H_{b}). RMN ^{13}C (126 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 151,3 (C1), 149,7 (C2), 138,6 (C3), 130,9 (C4), 129,7 (C5 + C6 + C7 + C8), 129,6 (C9), 129,5 (C10 + C11), 126,7 (C12 + C13), 126,1 (C14), 113,7 (C15), 92,8 (C16), 14,5 (C17).

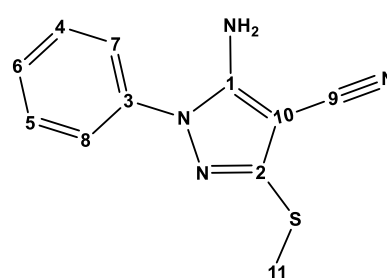
5-metilsulfanil-1-metil-3-fenil-1H-pirazol-4-carbonitrila (59): Sólido amarelo ocre; Ponto de Fusão (°C): 85-89; Rendimento: 90,8%; Infravermelho (ATR) cm^{-1} : 3100-3000 ($\nu_{\text{C-H}}$ sp^2 aromático); 2225 ($\nu_{\text{C}\equiv\text{N}}$); 2000-1700 (bandas harmônicas de aromático); 1650-1600 e 1500-1450 ($\nu_{\text{C}=\text{C}}$ aromático); 760 e 700 (padrão de anel monossustituído); 655 ($\nu_{\text{S-CH}_3}$). RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 7,86 – 7,48 (m, 5H, Há), 3,98 (s, 3H, H_b); 2,60 (s, 3H, H_c). RMN ^{13}C (126 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 1518 (C1), 144,1 (C2), 130,7 (C3), 130 (C4 + C5), 12,6 (C6), 126,4 (C7 + C8), 114,9 (C9), 93,8 (C10), 38,1 (C11) 18,4 (C12).



60



61



62

5-amino-4-ciano-3-metilsulfanil-1H-pirazol-1-carbotioamida (60): Sólido amarelo; Ponto de Fusão (°C): 147-151; Rendimento: 74,3%; Infravermelho (ATR) cm^{-1} : 3340 e 3250 ($\nu_{\text{N-H}}$ amina primária); 3200 e 3175 ($\nu_{\text{N-H}}$ amina primária); 2205 ($\nu_{\text{C}\equiv\text{N}}$); 730-600 ($\nu_{\text{S-CH}_3}$). RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 8,52 (s, 2H, Há), 6,95 (s, 2H, H_b), 2,54 (s, 3H, H_c). RMN ^{13}C (126 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 181,2 (C1), 150,0 (C2), 145,9 (C3), 113,4 (C4), 76,1 (C5), 18,6 (C6)

5-amino-3-metilsulfanil-1H-pirazol-4-carbonitrila (61): Sólido amarelo; Ponto de Fusão (°C): 149-150 (152, TOMINAGA *et al.*, 1990); Rendimento: 68,4%; Infravermelho (ATR) cm^{-1} : 3295 e 3127 ($\nu_{\text{N-H}}$ amina primária); 2290 ($\nu_{\text{C}\equiv\text{N}}$); 700-600 ($\nu_{\text{S-CH}_3}$). RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 12,0 (s, 1H, Há), 6,41 (s, 2H, H_b), 2,43 (s, 3H, H_c). RMN ^{13}C (126 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 155,1 (C1), 149,2 (C2), 115,3 (C3), 76,7 (C4), 14,3 (C5).

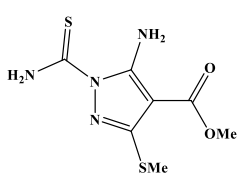
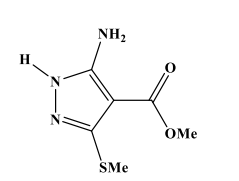
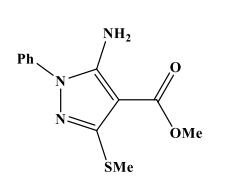
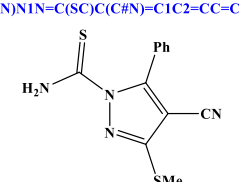
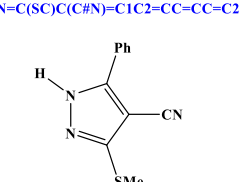
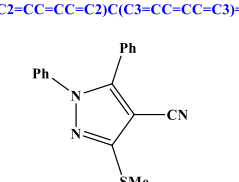
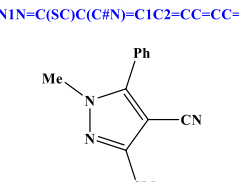
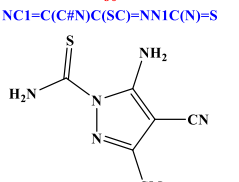
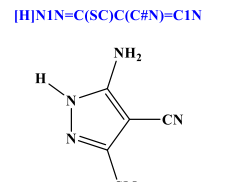
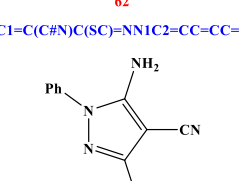
5-amino-3-metilsulfanil-1-fenil-1H-pirazol-4-carbonitrila (62): Sólido na forma de cristais translúcidos; Ponto de Fusão (°C): 129-134 (136, TOMINAGA *et al.*, 1990); Rendimento: 77,4%; Infravermelho (ATR) cm^{-1} : 3450 e 3330 ($\nu_{\text{N-H}}$ amina primária); 2305 ($\nu_{\text{C}\equiv\text{N}}$); 1620 e 1550 ($\nu_{\text{C}=\text{C}}$ aromático); 750 e 690 (padrão de anel monossustituído); 700-600 ($\nu_{\text{S-CH}_3}$). RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 7,47 (m, 5H, Há), 6,70 (s, 2H, H_b), 2,46 (s, 3H, H_c). RMN ^{13}C (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 155,1 (C1), 149,2 (C2), 115,3 (C3), 76,7 (C4), 14,3 (C5).

MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 152,7 (C1), 149,5 (C2), 137,4 (C3), 130,6 (C4 + C5), 128,6 (C6), 124,6 (C7 + C8), 114,5 (C9), 73,9 (C10), 13,8 (C11).

3.3 Triagem *in silico* dos pirazóis

Foram utilizados os softwares CLC-Pred e AdmetSAR empregando um método de representação das estruturas químicas denominado SMILES (do inglês Simplified Molecular-input Line-entry System), para a avaliação *in silico* do potencial de toxicidade, da toxicidade oral aguda, da carcinogenicidade e outros aspectos (LAGUNIN *et al.*, 2018; FILIMOV *et al.*, 2014; CHENG *et al.*, 2012; WEININGER, 1988). A Tabela 2 ilustra todos os SMILES que foram utilizados neste trabalho.

Tabela 2: SMILES e estrutura molecular dos pirazóis

Composto, SMILES e estrutura química		
<p>53</p> <p><chem>NC1=C(C(OC)=O)C(SC)=NN1C(N)=S</chem></p> 	<p>54</p> <p><chem>[H]N1N=C(SC)C(C(OC)=O)=C1N</chem></p> 	<p>55</p> <p><chem>NC1=C(C(OC)=O)C(SC)=NN1C2=CC=CC=C2</chem></p> 
<p>56</p> <p><chem>S=C(N)N1N=C(SC)C(C#N)=C1C2=CC=CC=C2</chem></p> 	<p>57</p> <p><chem>[H]N1N=C(SC)C(C#N)=C1C2=CC=CC=C2</chem></p> 	<p>58</p> <p><chem>CSC1=NN(C2=CC=CC=C2)C(C3=CC=CC=C3)=C1C#N</chem></p> 
<p>59</p> <p><chem>CN1N=C(SC)C(C#N)=C1C2=CC=CC=C2</chem></p> 	<p>60</p> <p><chem>NC1=C(C#N)C(SC)=NN1C(N)=S</chem></p> 	<p>61</p> <p><chem>[H]N1N=C(SC)C(C#N)=C1N</chem></p> 
<p>62</p> <p><chem>NC1=C(C#N)C(SC)=NN1C2=CC=CC=C2</chem></p> 		

3.4 Ensaios Biológicos

3.4.1 Análise de toxicidade com *Artemia salina*

O ensaio de toxicidade com *Artemia salina* foi realizado segundo a metodologia descrita por Meyer *et al.* (1982). Preparou-se uma solução salina artificial na concentração de 30 g.L⁻¹ cuja composição foi de 48 g de NaCl, 3 g de CaCl₂.2H₂O, 0,20 g de KBr, 1,40 g de KCl, 8 g de Na₂SO₄, 0,4 g de NaHCO₃ e 22 g de MgCl₂.6H₂O para 2 L de água destilada, e ajustou-se o pH entre 8-9 (LIBRALATO *et al.*, 2016). Colocaram-se os cistos (3 g) em placas de seis poços contendo 5 mL da solução por poço mantendo-os em temperatura ambiente com iluminação parcial e aeração por um período de 24 horas para que os mesmos eclodissem. Após este tempo, os náuplios foram transferidos para placas de 24 poços na presença ou ausência dos compostos. Os ensaios com os pirazóis foram realizados em duplicatas em quatro concentrações distintas, sendo elas de 25, 50, 100 e 200 µM. Como controle foram utilizados náuplios mantidos somente em solução salina e náuplios tratados com a mistura de solução salina e DMSO (0.4 e 4%). Aguardou-se o tempo de 24 horas de incubação para realizar a avaliação de sobrevivência dos náuplios, que foram observados com auxílio de microscópio estereoscópico. Foram considerados náuplios mortos aqueles sem movimentos internos ou externos por um tempo de 10 segundos (CARBALLO *et al.*, 2002). A partir da fórmula a seguir, dada pela relação entre o número de náuplios mortos observados após o período de incubação e o total de náuplios colocados no poço, foi possível calcular a taxa de mortalidade (WAGHULDE, KALE e PATIL, 2019).

$$\text{Taxa de mortalidade} = \frac{n^{\circ} \text{ de náuplios mortos}}{n^{\circ} \text{ total}} \times 100$$

O cálculo da dose letal para 50% da população (DL₅₀) foi feito utilizando o software GraphPadPrism 8, onde se considerou baixa toxidade os valores de DL₅₀ menores que 25 µM e muito tóxico os valores acima de 100 µM.

3.4.2 Avaliação da viabilidade celular

As células Jurkat, uma linhagem de células T leucêmicas cuja origem é o sangue periférico de um jovem paciente portador de LLA (MIYOSHI *et al.*, 1981; HAMANO *et al.*, 2012) foram cultivadas na concentração de 2 x 10⁵ células/mL em garrafas plásticas própria

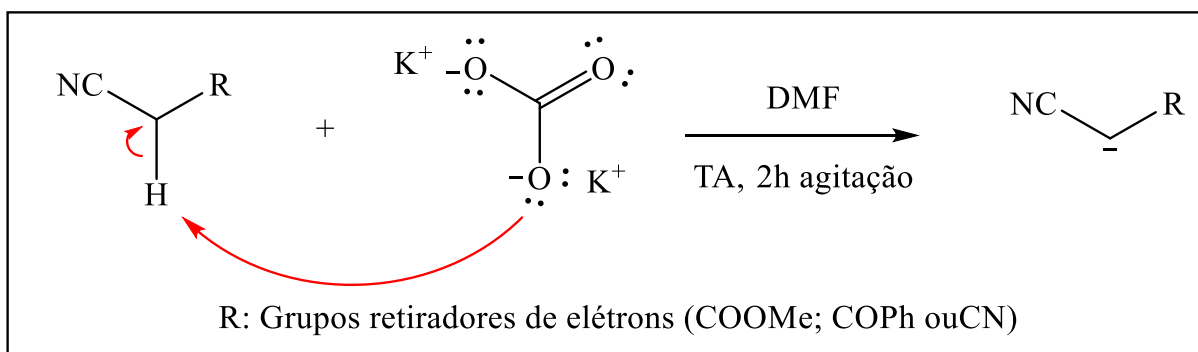
para o cultivo celular. Utilizou-se como meio de cultura Roswell Park Memorial Institute (RPMI) suplementado em 10% do volume com soro fetal bovino (SFB) inativado e 100 U/mL de penicilina-estreptomicina. As células foram incubadas em triplicata e cultivadas a 37 °C em atmosfera úmida com 5% de CO₂ na presença ou ausência dos pirazóis (1,56 a 100 µM). Os controles foram feitos a partir de células tratadas com DMSO (0,2 e 2%) e células tratadas somente com RPMI, enquanto que para o branco foram utilizados poços contendo somente o meio. A viabilidade celular foi analisada por meio do ensaio MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) após um período de 72 horas de tratamento com os pirazóis. Neste ensaio, foi analisada a capacidade que as células viáveis têm de metabolizar o MTT e formar cristais de formazana que apresentam a coloração púrpura. Para cada poço foram pipetados 20 µL de MTT na concentração de 5 mg mL⁻¹ aguardando um período de incubação de 3 horas. Ao término deste tempo, as células foram centrifugadas a 250 g por um período de cinco minutos, o sobrenadante desprezado e os cristais de formazana dissolvidos em 200 µL de DMSO. Por fim, em espectrofotômetro para microplacas, realizou-se a leitura por colorimetria no comprimento de onda de 490 nm.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Síntese dos Precursores Nitrilados (46 – 48)

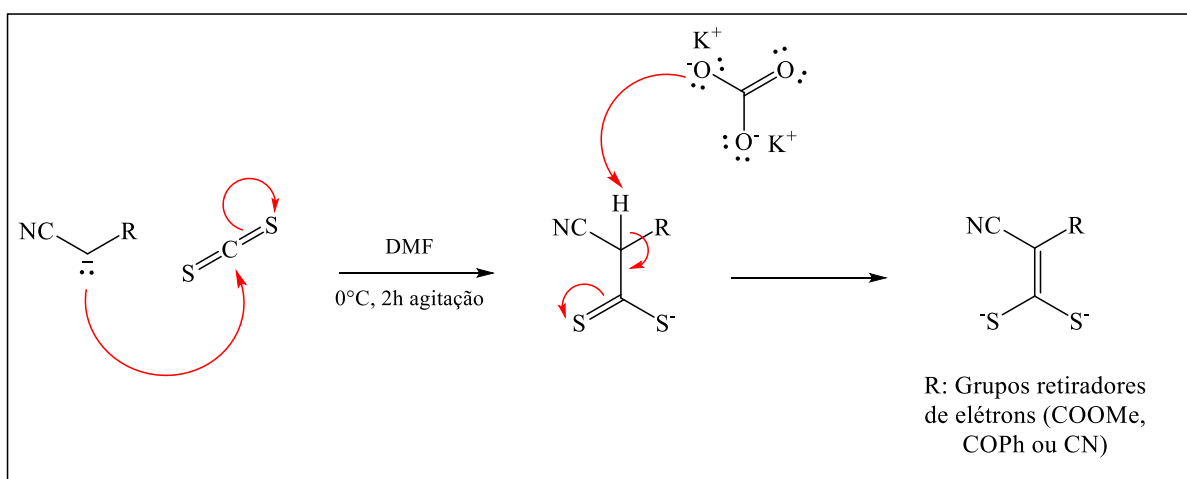
Inicialmente, este trabalho consistiu nas sínteses dos precursores nitrilados (**46-48**) a partir de uma reação “one-pot” em três etapas consecutivas sem isolamento dos intermediários (SANGI *et al.*, 2016).

Na primeira etapa destas reações foi explorado o caráter ácido dos hidrogênios α ao grupo nitrila em uma típica reação ácido-base, onde se utilizou carbonato de potássio para desprotonação destes hidrogênios. Nesta etapa, um par de elétrons não compartilhados do íon carbonato presente em solução promoveu a abstração de um dos hidrogênios α , levando a formação da espécie aniônica (**Esquema 08**). Visualmente observou-se a mudança da coloração da mistura reacional, que passou de esbranquiçada para um tom laranja avermelhado.



Esquema 8: Etapa I – Reação de desprotonação.

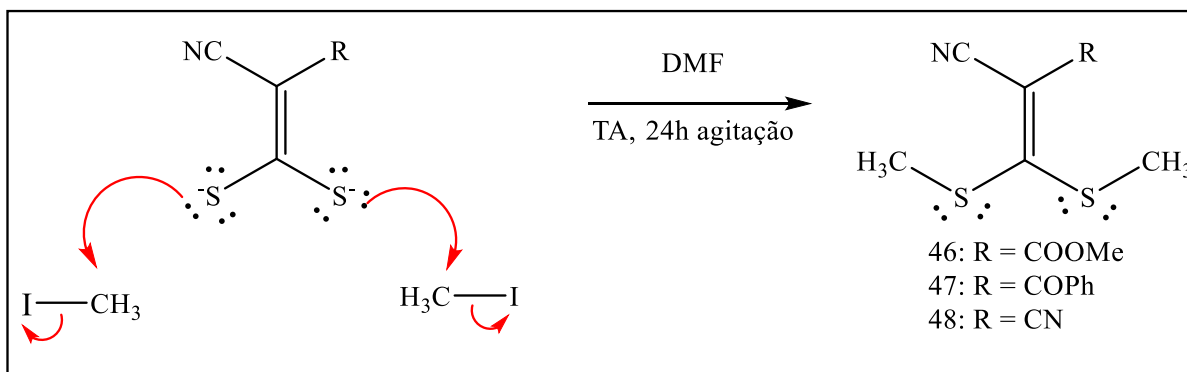
Após a desprotonação do primeiro hidrogênio ativo, foi adicionado dissulfeto de carbono à mistura reacional, iniciando a segunda etapa. Nesta, o par de elétrons não compartilhados do carbânion formado anteriormente, promoveu o ataque nucleofílico ao átomo de carbono parcialmente positivo do dissulfeto de carbono, como consequência da maior eletronegatividade dos enxofres aos quais se encontra ligado. Na sequência, o segundo hidrogênio foi desprotonado seguindo o mesmo mecanismo proposto na primeira reação, isto é, a partir do ataque de um par de elétrons não compartilhado presente no íon carbonato em solução (**Esquema 09**).



Esquema 9: Etapa II – adição de dissulfeto de carbono e desprotonação do segundo hidrogênio.

A terceira etapa da obtenção “one-pot” dos precursores nitrilados, consistiu em uma alquilação dos átomos de enxofre por adição de iodeto de metila. Esta reação se deu por um mecanismo de substituição nucleofílica bimolecular (S_N2) em que o iodeto de metila atuou

como eletrófilo e os sulfetos atuaram como centros nucleofílicos promovendo a substituição (**Esquema 10**).



Esquema10: Etapa III – alquilação dos átomos de enxofre por adição de iodeto de metila.

Após realizar uma extração com diclorometano e sucessivas lavagens com água destilada em um funil de separação, a fase orgânica foi seca com sulfato anidro, garantindo a remoção de qualquer resquício de água, e submetida a uma filtração simples. O filtrado foi recolhido e, então, levado ao rotaevaporador para remoção do solvente remanescente, onde se observou, após algum tempo, a formação de sólidos amorfos e coloração variando entre o amarelo e o ocre.

Após terem suas respectivas massas aferidas, foi possível verificar que os precursores nitrilados foram obtidos com bons rendimentos, tendo sido eles de 92%, 83,5% e 75% para os compostos **46**, **47** e **48**, respectivamente (**Figura 26**). Esses valores, bem como os pontos de fusão observados experimentalmente e aqueles descritos na literatura, podem ser observados na tabela 3.

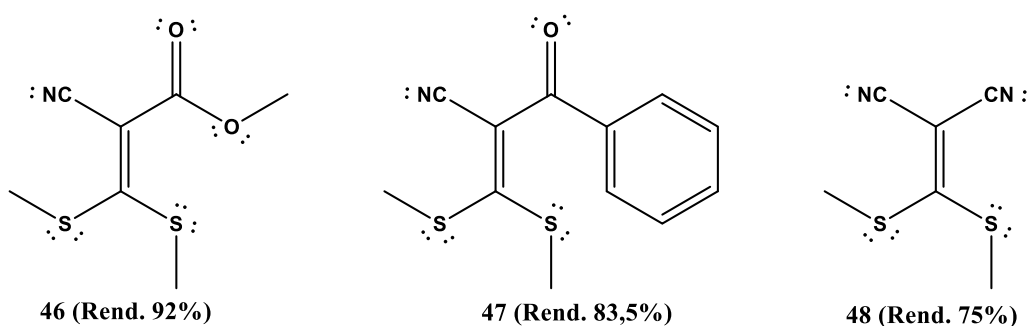


Figura 26: Precursores nitrilados obtidos e seus respectivos rendimentos.

Tabela 3: Valores de pontos de fusão (°C) determinados experimentalmente e descritos na literatura para os compostos nitrilados **46-48** e seus respectivos rendimentos.

Precursor Nitrilado	Rendimento (%)	Ponto de Fusão (°C) Experimental	Ponto de Fusão (°C) Literatura
46	92	98-100	99-102 ^a
47	83,5	73-74	70-71 ^b
48	75	76-79	79-81 ^c

^a GOMPPER *et al.*, 1962, ^b ELGEMEIE *et al.*, 2017; ^c BARALDI *et al.*, 2003.

4.2 Caracterização dos Precursores Nitrilados (46-48)

Os precursores nitrilados obtidos foram submetidos a técnicas espectroscópicas no intuito de terem suas respectivas estruturas confirmadas. Assim, foram realizadas análises de infravermelho (IV), ressonância magnética nuclear (RMN) de ¹H e de ¹³C.

4.2.1 Caracterização por Infravermelho (IV)

Os espectros no infravermelho obtidos permitiram a observação de bandas de absorção importantes e comuns aos três precursores nitrilados, sendo essas compatíveis com a presença de grupos funcionais que eram esperados. Deste modo, para cada um dos três compostos, foi observada uma banda de média a alta intensidade, relativamente fina e compreendida entre 2220 cm⁻¹ e 2210 cm⁻¹, compatíveis com a presença do grupo funcional nitrila (**Figura 27a**). Observaram-se, também, um conjunto de bandas finas e de intensidade variável entre 750 cm⁻¹ e 600 cm⁻¹, que sugeriram a presença de grupos metilsulfanil (**Figura 27b**).

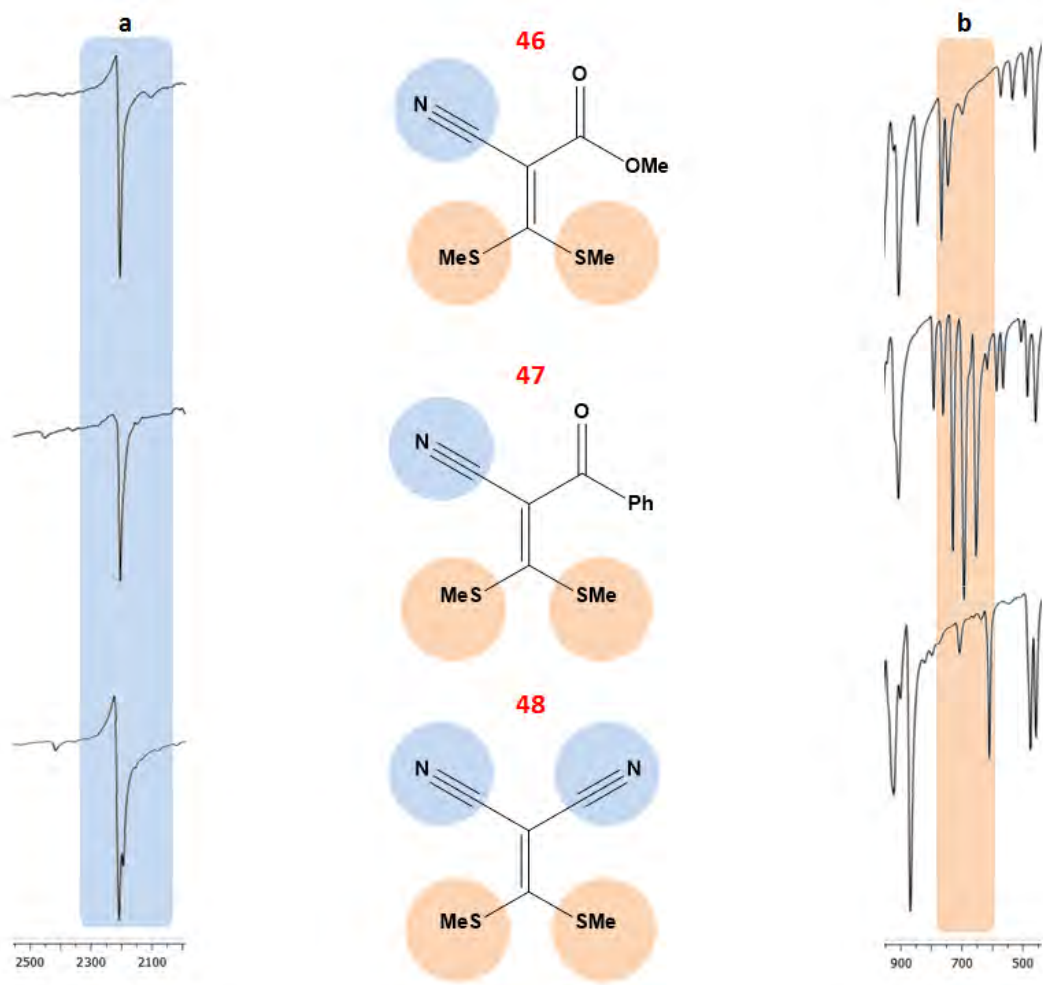


Figura 27: a) Recorte dos espectros de IV na faixa de 2500 cm^{-1} a 2100 cm^{-1} com destaque em azul para bandas de absorção compatíveis com estiramento $\text{C}\equiv\text{N}$ em 2210 cm^{-1} , 2220 cm^{-1} e 2210 cm^{-1} dos compostos 46, 47 e 48, respectivamente; b) Recorte dos espectros de IV na faixa de 900 cm^{-1} a 500 cm^{-1} com destaque em rosa para os conjuntos de duas ou mais bandas compatíveis com estiramento $\text{S}-\text{CH}_3$ entre 750 cm^{-1} e 600 cm^{-1} .

Para os compostos 46 e 47, os espectros de IV mostraram uma banda de média a alta intensidade e no aspecto relativamente fino em 1720 cm^{-1} e em 1650 cm^{-1} , respectivamente, sugerindo um estiramento $\text{C}=\text{O}$ (Figura 28). A absorção em menor comprimento de onda, observada para o estiramento $\text{C}=\text{O}$ no composto 47, quando comparado ao valor observado deste estiramento no composto 46, pode ser explicada pela conjugação com o anel aromático havendo efeito doador de elétrons por ressonância. Essas bandas de absorção, como esperado, estão ausentes no composto 48.

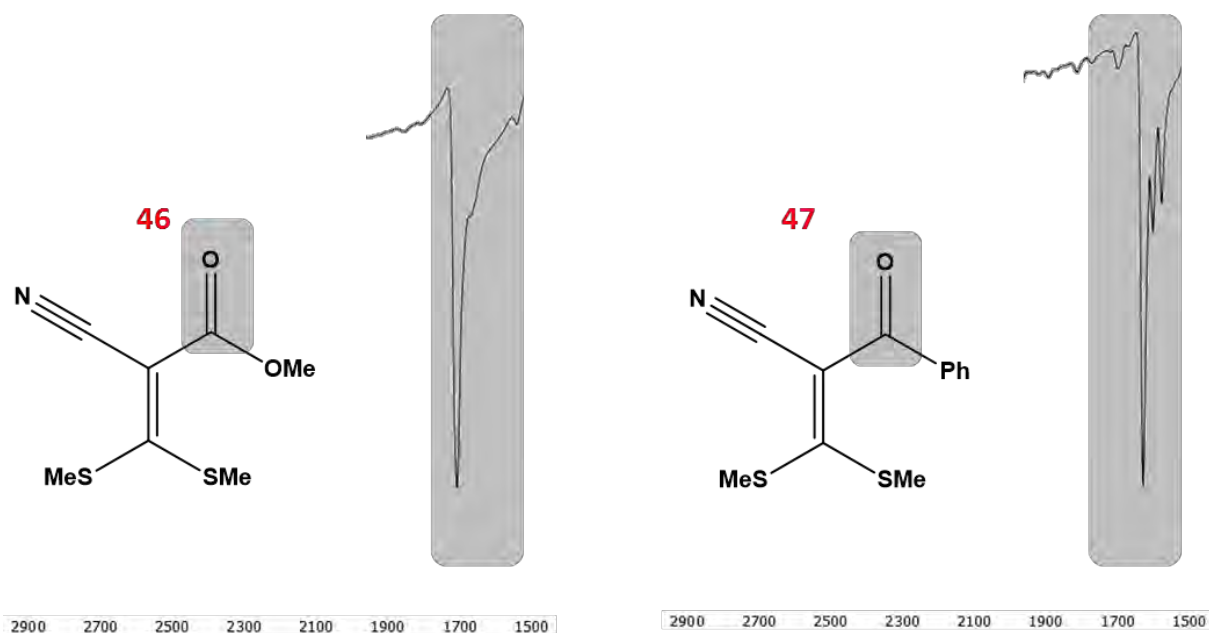


Figura 28: Recorte dos espectros de IV na faixa de 2900 cm^{-1} e 1500 cm^{-1} com destaque em cinza para bandas de absorção compatíveis com estiramento $\text{C}=\text{O}$ em 1720 cm^{-1} e em 1650 cm^{-1} para os compostos **46** e **47**, respectivamente.

4.2.2 Caracterização por Ressonância Magnética Nuclear de ^1H (RMN ^1H)

Os espectros de RMN de ^1H também mostraram alguns sinais comuns aos três precursores com pequenas variações em seus respectivos deslocamentos químicos. Foram observados, para os três intermediários, simpletos entre 2,77-2,49 ppm. Estes sinais foram compatíveis com deslocamentos químicos referentes aos hidrogênios metílicos. Nos casos dos compostos **46** e **47** foram observados dois simpletos, sendo cada um deles integrado para três hidrogênios. Devido a diferença de ambientes químicos em que os grupos metilsulfanil se encontravam, era esperado que os espectros mostrassem dois simpletos. Entretanto, o composto **48** mostrou em seu espectro um único singlete, cuja integração foi de 6 hidrogênios, já que esses grupos se encontram em um mesmo ambiente químico.

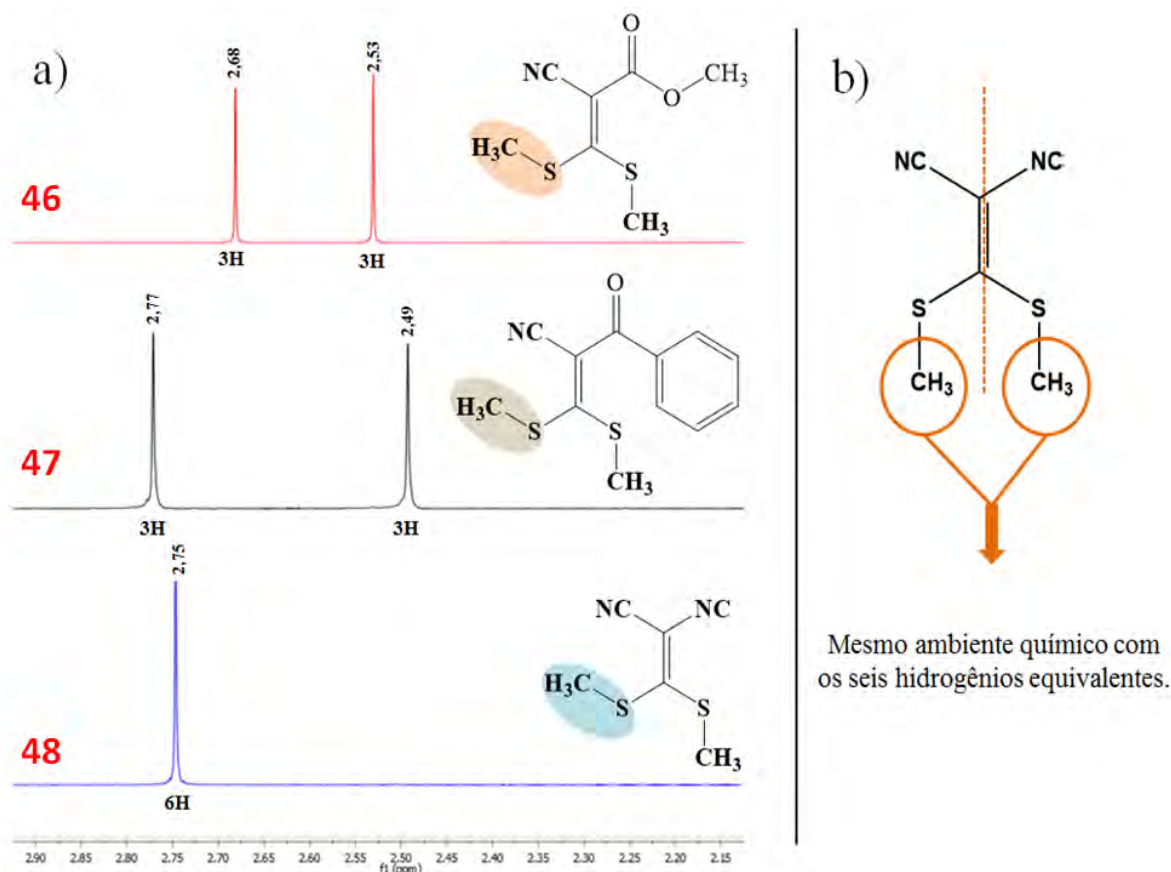


Figura 29: a) Espectros de RMN de ^1H dos precursores nitrilados **46-48** na faixa 2,15-2,90 ppm mostrando sinais atribuídos aos grupos metilsulfanil ($\text{S}-\text{CH}_3$); b) Estrutura do precursor nitrilado **48** com destaque para o plano de simetria ao longo da dupla ligação vinílica.

Considerando a diferença estrutural entre os precursores nitrilados, os espectros de RMN de ^1H mostraram algumas particularidades. Assim, no caso do composto **46**, foi observado um simpleto em 3,76 ppm integrado para três hidrogênios, que se encontrava ausente no espectro do composto **47**. Este sinal foi compatível com o deslocamento químico relacionado a presença de núcleos de H ligados a átomo de carbono no qual se liga um átomo de oxigênio de um grupo éster, ou seja, uma metoxila. Já o composto **47** mostrou sinais na forma de multiplete entre 7,90-7,47 ppm que, juntos integraram para cinco hidrogênios. Estes sinais se encontravam na região de aromáticos e estavam ausentes no espectro do composto **46**. Deste modo, dado o valor de sua integração e do deslocamento químico, foi possível atribuir a presença de um anel monossustituído em **47** (Figura 30).

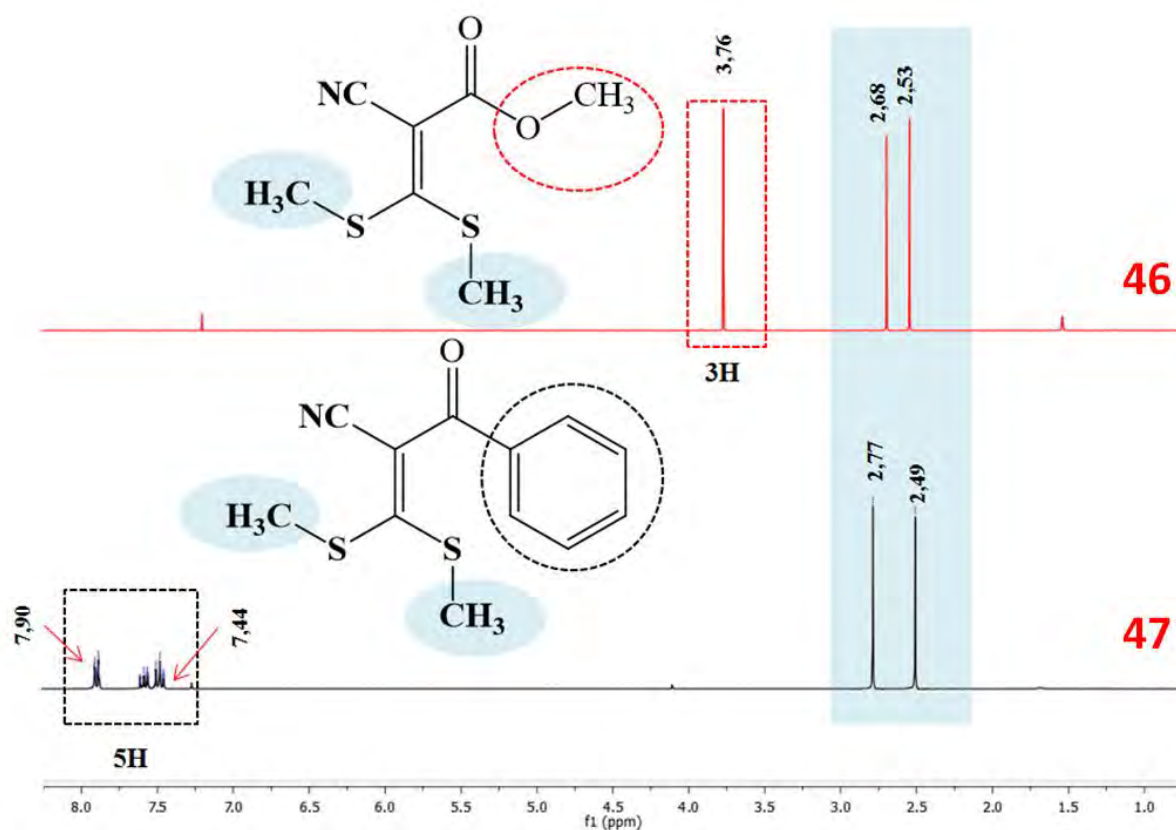


Figura 30: Comparação entre os espectros de RMN de ^1H dos intermediários **46** e **47** evidenciando a manutenção dos sinais atribuídos aos grupos metilsulfanil, indicado pela tarja azul, e troca do sinal da metoxila em **46** por sinais de aromáticos em **47**, indicados pela figura tracejada.

A expansão do espectro de RMN de ^1H na região de aromáticos para o intermediário **47** permite observar um padrão de multiplete disposto em três grupos distintos, característico de anel monossustituído (**Figura 31**). A carbonila conjugada ($\text{C}=\text{O}$) atua como grupo retirador de elétrons diminuindo a densidade eletrônica sobre as posições *orto* (*o*) e *para* (*p*) e, como consequência, foi possível observar os sinais com maior deslocamento químico para estes núcleos, ou seja, estão mais desblindados em relação ao núcleo de hidrogênio na posição *meta* (*m*).

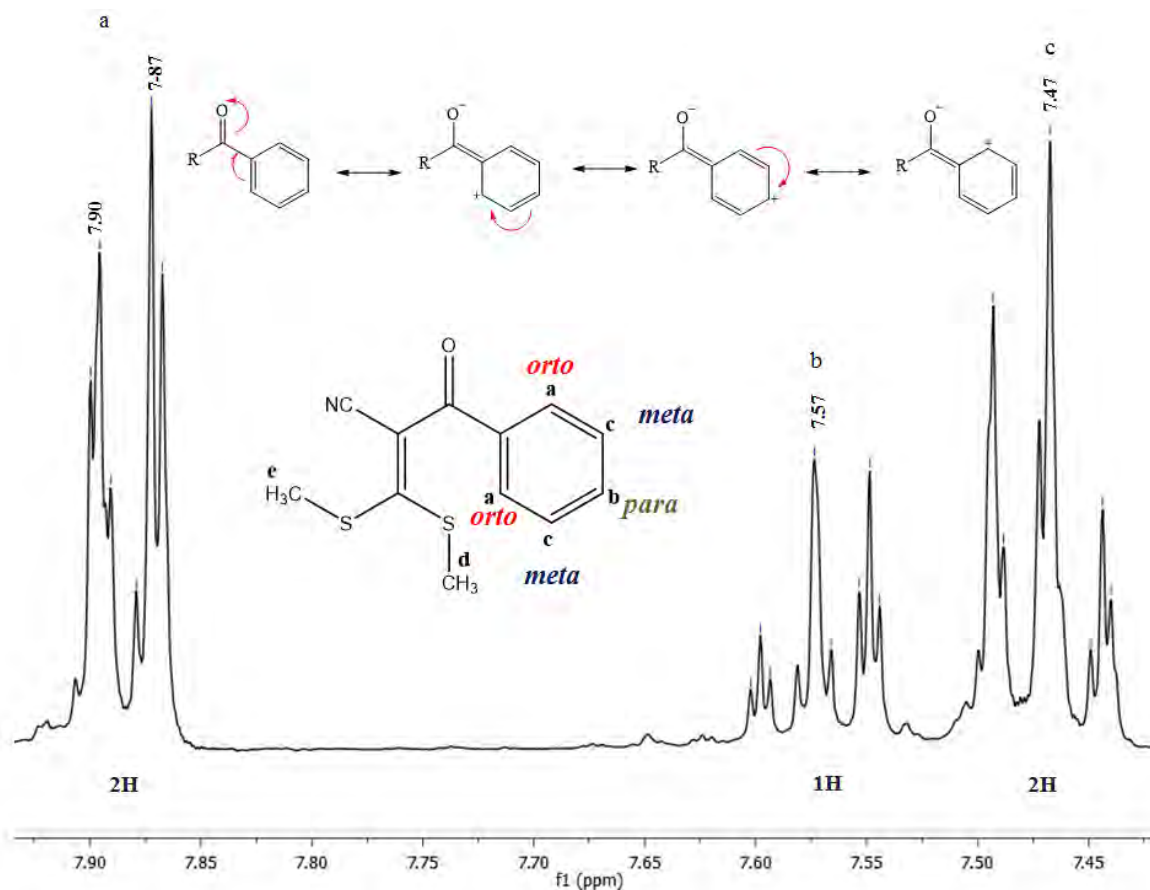


Figura 31: Expansão do espectro de RMN de ^1H para o intermediário **47** na região entre 7,95-7,40 ppm correspondente aos hidrogênios de anel aromático.

4.2.3 Caracterização por Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C (RMN ^{13}C)

Em relação aos espectros de RMN de ^{13}C foi possível observar alguns sinais comuns aos três precursores nitrilados com variação de seus deslocamentos químicos. Observaram-se entre 19,1-21,1 ppm sinais característicos de metila ligada a enxofre confirmando, portanto, a presença dos grupos S-CH_3 . Em **46** e **47**, estes sinais estavam dispostos aos pares, devido aos ambientes químicos diferentes, ao passo que para **48** estes grupos estavam em um mesmo ambiente químico gerando um sinal único. Os carbonos vinílicos na posição β aos grupos S-CH_3 foram atribuídos aos sinais entre 98,3-106,0 ppm para os intermediários **46** e **47**, entretanto, não foi possível observá-los no espectro de RMN de ^{13}C para o intermediário **48**. Os sinais correspondentes às nitrilas ($\text{C}\equiv\text{N}$) foram atribuídos com deslocamentos químicos na faixa de 112,7-117,5 ppm e os carbonos vinílicos α aos grupos S-CH_3 puderam ser observados com deslocamentos químicos entre 179,5-183,7 ppm (**Figura 32**).

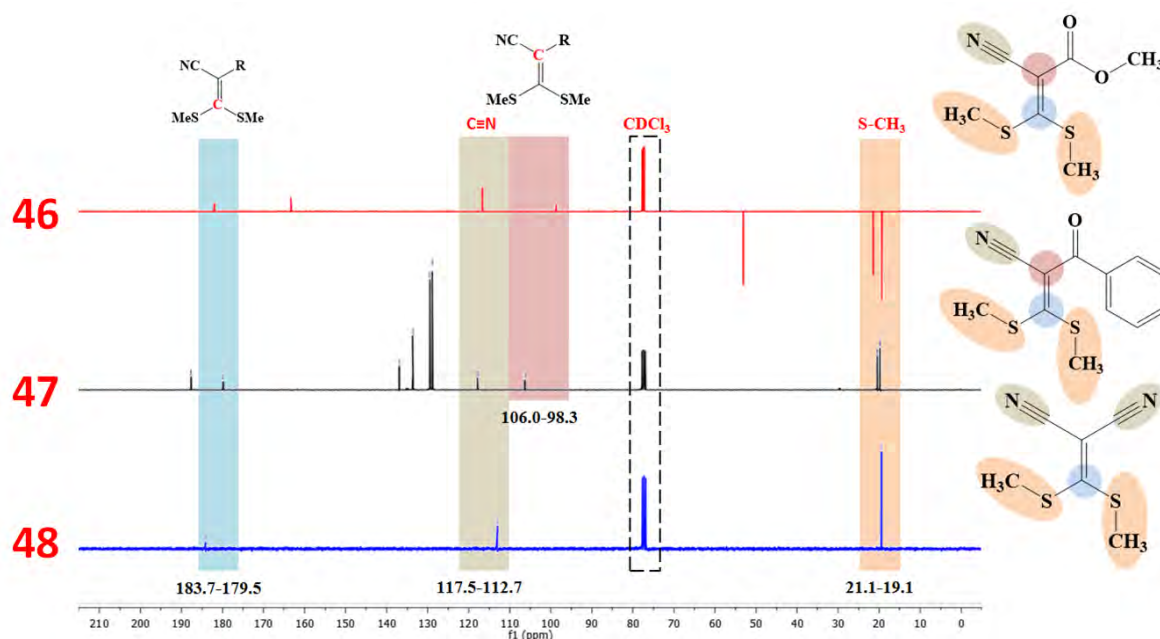


Figura 32: Sobreposição dos espectros de RMN de ^{13}C para os intermediários **46-48** com destaque para presença de grupos comuns a eles.

Os precursores nitrilados **46** e **47** apresentaram uma particularidade estrutural em relação a **48**, devido a presença da carbonila ($\text{C}=\text{O}$) em ambas as estruturas. A sobreposição de seus espectros de RMN de ^{13}C permitiu observar sinais atribuídos a este grupo em 163,0 ppm e em 183,7 ppm, respectivamente, para **46** e **47** (**Figura 33**). Atribuiu-se o maior deslocamento químico da $\text{C}=\text{O}$ cetônica em **47**, à conjugação com o anel aromático cuja corrente de elétrons do sistema π provoca o efeito de anisotropia desblindando, assim, este núcleo em relação à carbonila de éster em **46**. Além disso, um sinal em 52,8 ppm para **46** foi atribuído à metila ligada ao oxigênio que, por ser mais eletronegativo em relação carbono, desloca a nuvem eletrônica a seu favor e desblinda o núcleo do carbono metílico. Foi possível observar para **47**, a presença de quatro sinais na região de aromáticos entre 136,6 e 128,5 ppm, um padrão típico de anel aromático monossustituído, uma vez que os carbonos *orto* e *meta* são duplicados por simetria. Dentre estes sinais, atribui-se ao carbono *ipso* (*i*) o sinal de menor intensidade decorrente de seu longo tempo de relaxação.

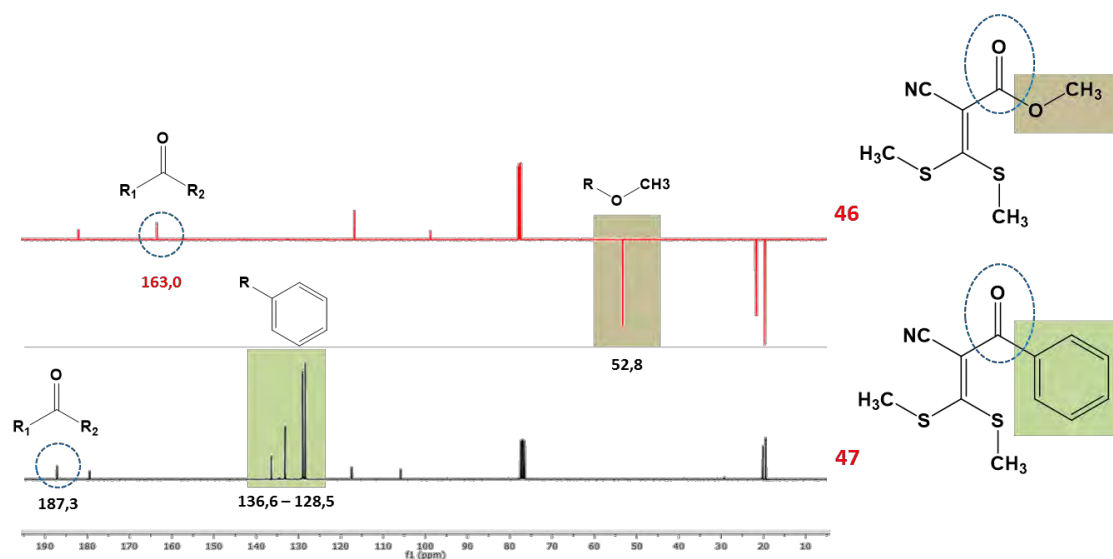


Figura 33: Espectros de RMN de ^{13}C para os intermediários **46** e **47** com destaque para os sinais dos grupos C=O, C=C sp^2 em anel aromático e O-CH₃.

A Tabela 4 mostra, resumidamente, os valores de deslocamentos químicos de hidrogênio (δ_{H}) e de carbono (δ_{C}) observados para os precursores nitrilados **46-47**.

Tabela 4: Deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C , em ppm, observados para o precursor nitrilado **46**.

46				47				48			
^1H	δ_{H} (ppm)	^{13}C	δ_{C} (ppm)	^1H	δ_{H} (ppm)	^{13}C	δ_{C} (ppm)	^1H	δ_{H} (ppm)	^{13}C	δ_{C} (ppm)
a	3,76 (s, 3H)	1	181,6	a	7,90-7,97 (m, 3H)	1	187,3	a	2,75 (s, 6H)	1	183,7
b	2,68 (s, 3H)	2	163,0	b	7,60-7,54 (m, 1H)	2	179,5	-	-	2 + 3	112,7
c	2,53 (s, 3H)	3	116,3	c	7,50-7,44 (m, 2H)	3	136,6	-	-	4	Não observado
-	-	4	98,3	d	2,77 (s, 3H)	4	133,3	-	-	5 + 6	19,2
-	-	5	52,8	e	2,49 (s, 3H)	5 + 6	129,1	-	-	-	-
-	-	6	21,1	-	-	7 + 8	128,5	-	-	-	-
-	-	7	19,1	-	-	9	117,5	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	10	106,0	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	11	20,2	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	12	19,6	-	-	-	-

4.3 Síntese dos Pirazóis (53 - 62)

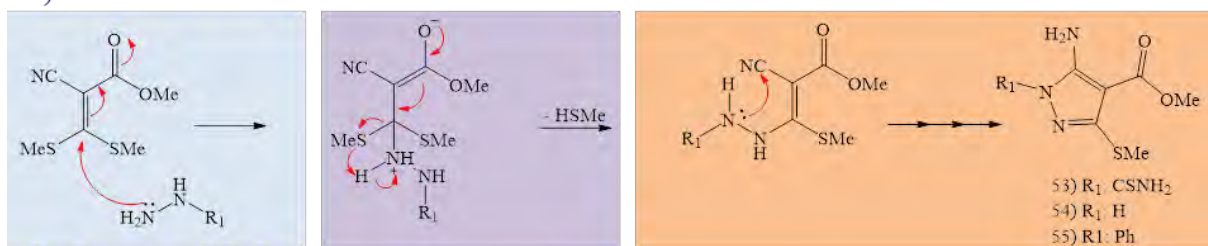
A segunda fase deste trabalho consistiu na síntese e caracterização de dez compostos pirazólicos (**53 – 62**) a partir dos precursores nitrilados (**46 – 48**), preparados anteriormente, e quatro compostos nucleofílicos, sendo eles a tiossemicarbazida (**49**), a hidrazina hidratada (**50**), a fenil-hidrazina (**51**) e a metil-hidrazina (**52**).

O mecanismo de síntese sugerido tem seu início com o ataque nucleofílico ao carbono vinílico em posição α aos grupos metilsulfanil, promovido pelo par de elétrons não compartilhado do nitrogênio terminal nas espécies nucleofílicas (Figura 34a-c, destaque tarja azul). Simultaneamente, a dupla ligação entre os carbonos vinílicos é rompida de modo que, por efeito de ressonância, a carga negativa resultante fique localizada no oxigênio carbonílico no caso dos compostos **46** e **47** (Figura 34a-b, destaque tarja lilás) ou no nitrogênio da nitrila no caso do composto **48** (Figura 34c, destaque tarja verde).

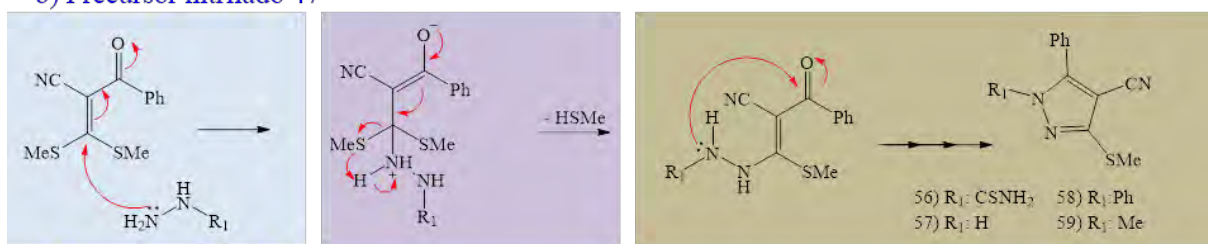
Posteriormente, ocorre o retorno do par de elétrons por ressonância, reestabelecendo a dupla ligação vinílica com eliminação de um dos grupos metilsulfanil (Figura 34a-c, destaque tarjas lilás e verde). A saída deste grupo se dá com uma carga negativa sobre o enxofre possibilitando, deste modo, a desprotonação de um dos hidrogênios ligados ao nitrogênio positivo e, assim, reestabelecendo sua neutralidade.

A ciclização com a formação dos anéis pirazólicos ocorre a partir de um segundo ataque nucleofílico, agora promovido pelo par de elétrons não compartilhados sobre o segundo nitrogênio. Os pirazóis obtidos a partir dos compostos **46** e **48** (**53, 54, 55, 60, 61** e **62**) tiveram esse ataque ocorrido no carbono da nitrila (Figura 34a e 34c, destaque tarja rosa), ao passo que aqueles cuja origem foi o composto **47** (**56, 57, 58** e **59**), formaram-se a partir do ataque ao carbono carbonílico (Figura 34b, destaque tarja cinza).

a) Precursor nitrilado 46



b) Precursor nitrilado 47



c) Precursor nitrilado 48

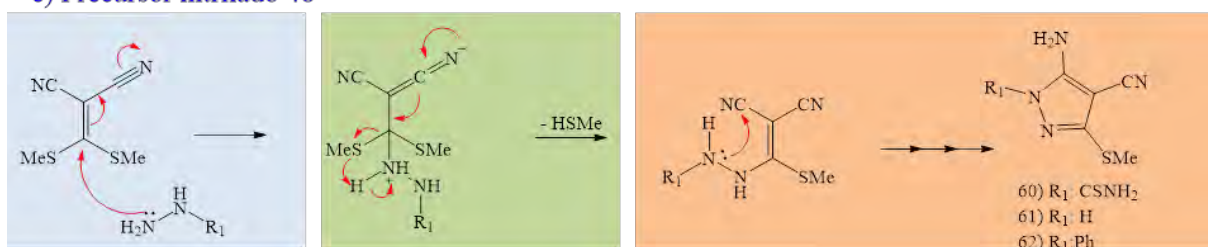


Figura 34: Esquemas mecanísticos sugeridos envolvendo os ataques dos nucleófilos propostos para obtenção dos compostos a) 53-55, b) 56-59 e c) 60-62 a partir dos precursores nitrilados 46, 47 e 48, respectivamente.

Assim como para seus precursores nitrilados, os pirazóis obtidos também tiveram seus pontos de fusão determinados experimentalmente e os respectivos valores comparados àqueles quando descritos na literatura. Contudo, dado seu ineditismo, os compostos **56** e **59** não apresentavam, até o momento, valores de referência e, embora não inéditos, os compostos **53**, **54** e **60**, não tiveram seus valores de ponto de fusão descritos na literatura.

As sínteses dos pirazóis **60**, **61** e **62**, além da metodologia utilizada com o uso de micro-ondas científico, também foram realizadas por meio de refluxo em etanol visando comparar os rendimentos obtidos por ambas as metodologias. Neste caso, pode-se observar que a metodologia empregada pouco influenciou nos rendimentos obtidos, uma vez que a variação dos valores para uma ou outra metodologia se mostrou praticamente desprezível. Contudo, ao analisar o tempo de reação, observou-se uma considerável vantagem da síntese assistida por micro-ondas em relação à metodologia convencional por refluxo, sendo ele de 0,5 hora e 24 horas, respectivamente.

Além de o tempo de reação ser consideravelmente menor na metodologia de síntese assistida por micro-ondas, esta se mostrou de acordo com os princípios da Química Verde, uma vez que o volume de solvente empregado foi significativamente reduzido.

A tabela 5 mostra os valores de pontos de fusão obtidos experimentalmente e aqueles encontrados na literatura, bem como os respectivos rendimentos com a distinção da técnica empregada no caso dos pirazóis **60-62**.

Tabela 5: Valores de rendimentos para as sínteses assistidas por micro-ondas dos pirazóis **53-62** e por refluxo dos pirazóis **60-61** bem como seus pontos de fusão determinados experimentalmente e os valores descritos na literatura.

Pirazol	Rendimento (%)		Ponto de Fusão (°C) Experimental	Ponto de Fusão (°C) Literatura
	Micro-ondas (0,5 h)	Refluxo (24 h)		
53	82,3	-	189-191	Não relatado
54	86,2	-	171-174	Não relatado
55	74,7	-	118-120	114-115 ^a
56	72,0	-	123-127	Inédito
57	81,0	-	152-153	147-149 ^b
58	68,9	-	119-120	115-117 ^c
59	90,1	-	85-89	Inédito
60	70,3	69,7	147-151	Não relatado
61	68,4	70,0	149-150	Não relatado
62	77,4	75,0	129-134	136 ^d

^a GOMPPER, 1962, ^b ELGEMEIE, 2017, ^c RUDORF, 1978, ^d TOMINAGA, 1990.

4.4 Caracterização dos Pirazóis 53-62

4.4.1 Caracterização por Infravermelho (IV)

Os espectros no infravermelho revelaram bandas de absorção comuns aos dez pirazóis obtidos. Assim, foi possível observar um conjunto de bandas relativamente finas, cujas intensidades variaram de média a alta, situado entre 730 cm⁻¹ e 600 cm⁻¹. Tal conjunto de

bandas é compatível com o estiramento S-CH₃ e sugerem a presença de grupos metilsulfanil provenientes de seus respectivos precursores nitrilados (Figura 35).

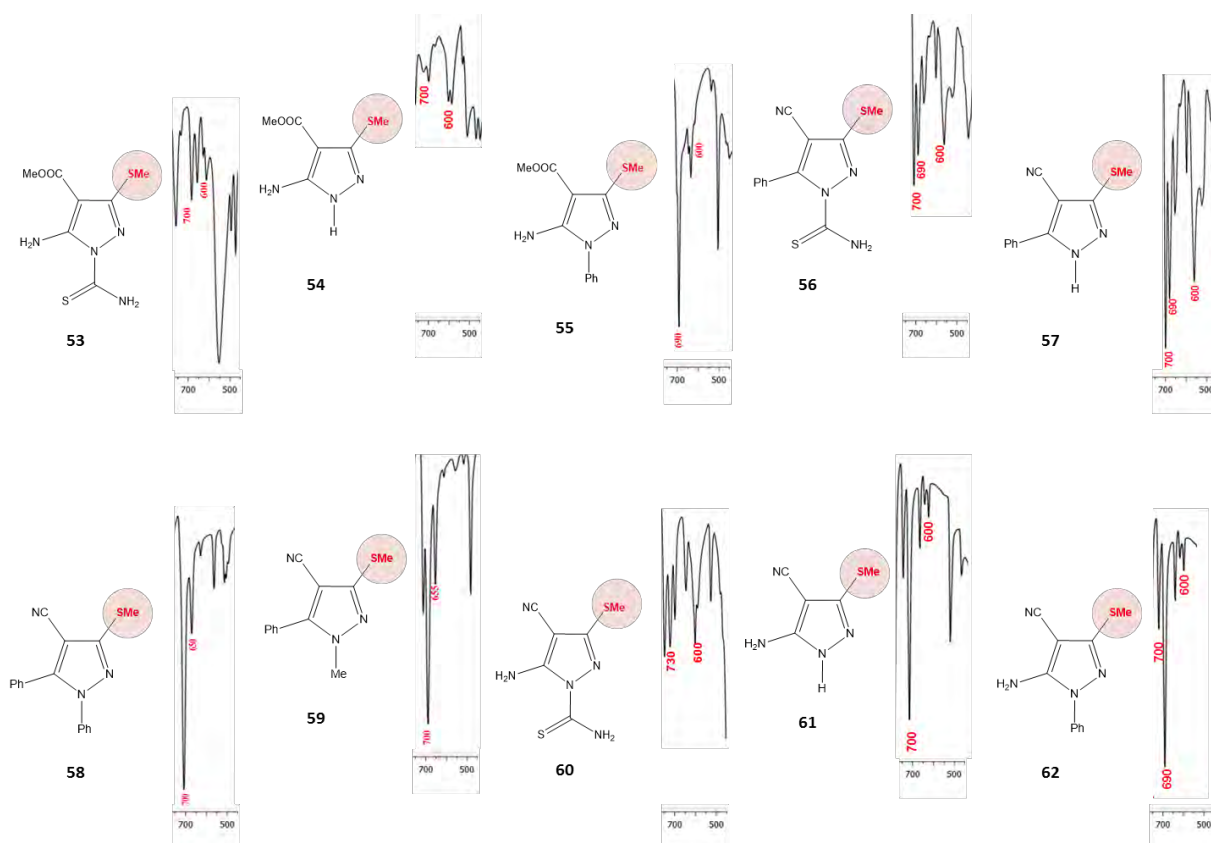


Figura 35: Recorte dos espectros de infravermelho (700-500 cm⁻¹) com destaque para as bandas atribuídas ao substituinte metilsulfanil (SMe) ligado ao anel pirazólico na posição 3 e presentes nos pirazóis **53-62**.

O primeiro grupo de pirazóis, isto é, os compostos **53-55**, obtidos a partir do precursor **46**, apresentou em seus espectros de IV bandas estreitas e de alta intensidade em 1760 cm⁻¹, 1750 cm⁻¹ e 1680 cm⁻¹, respectivamente. Essas bandas foram compatíveis com estiramento de C=O de carbonila de éster (Figura 36, destaque tarja rosa) e confirmadas pela presença de um conjunto de bandas compatíveis com estiramento C-O situado entre 1350 cm⁻¹ e 1000 cm⁻¹ (Figura 36, destaque tracejado vermelho).

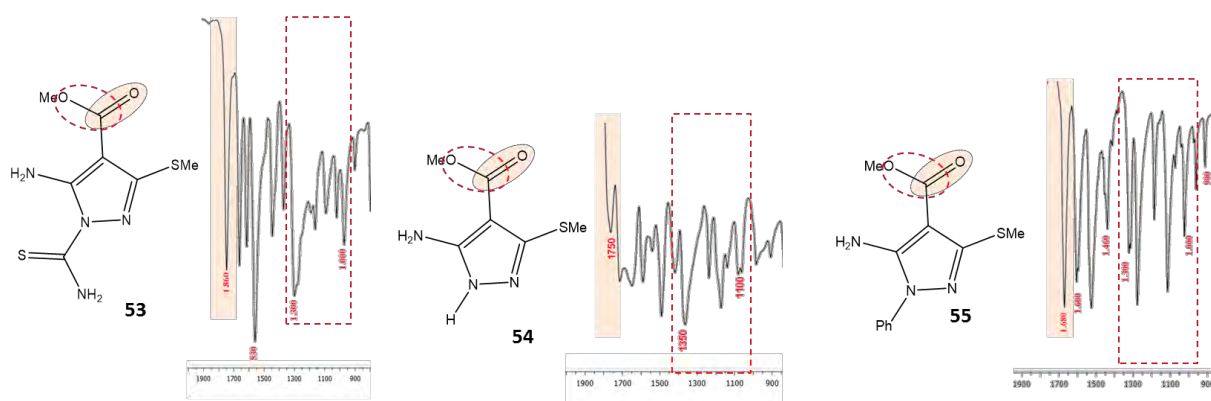


Figura 36: Recorte dos espectros de infravermelho ($1900\text{-}900\text{ cm}^{-1}$) com destaque para as bandas atribuídas a carbonila (destaque rosa) e para as bandas atribuídas ao estiramento C-O de éster (destaque tracejado vermelho), presente no pirazóis **53-55**.

O pirazol **53** revelou em seu espectro de IV dois pares de bandas relativamente finas e com intensidades distintas entre si, situadas entre 3450 cm^{-1} e 3270 cm^{-1} e compatíveis com estiramento N-H de aminas primárias. Atribuiu-se, neste caso, um par para a presença da amina ligada ao anel pirazólico na posição 5 e o outro à amina do grupo tioamida, proveniente da tiossemicarbazida (Figura 37, destaque tarja azul). Já para os pirazóis **54** e **55**, foi observado para cada um apenas um par de bandas, sendo elas em 3450 cm^{-1} e 3330 cm^{-1} e em 3340 cm^{-1} e 3320 cm^{-1} , respectivamente (Figura 37, destaque tarja rosa).

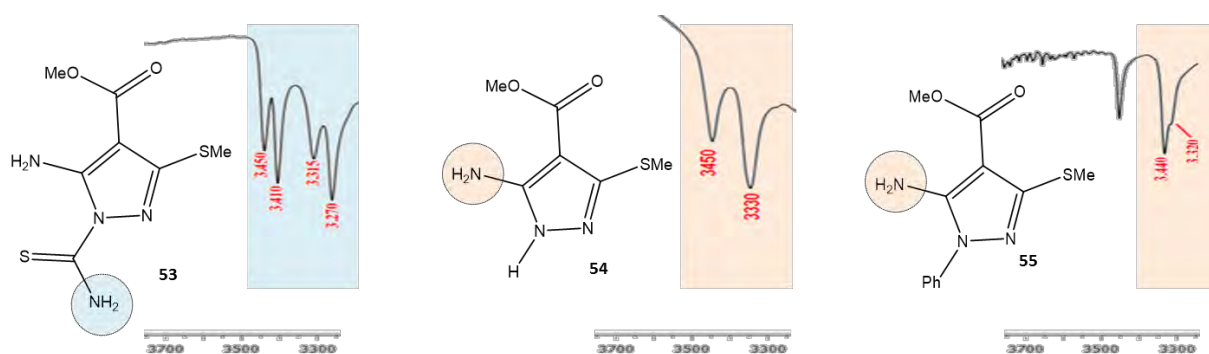


Figura 37: Recorte dos espectros de infravermelho ($3700\text{-}3300\text{ cm}^{-1}$) com destaque para as bandas atribuídas a estiramentos N-H de aminas primárias, presentes no pirazóis **53-55**.

Bandas situadas imediatamente acima da região de 3000 cm^{-1} , observadas no pirazol **55**, foram atribuídas a estiramentos C-H de carbonos sp^2 em anel aromático (Figura 38a,

destaque tarja rosa), cuja presença foi corroborada pelas bandas harmônicas de aromático entre 2000 cm^{-1} e 1700 cm^{-1} (Figura 38a, destaque tarja azul). Além disso, um par de bandas estreitas e intensas em 760 cm^{-1} e em 690 cm^{-1} sugere um padrão de substituição de anel aromático do tipo monossustituído (Figura 38b).

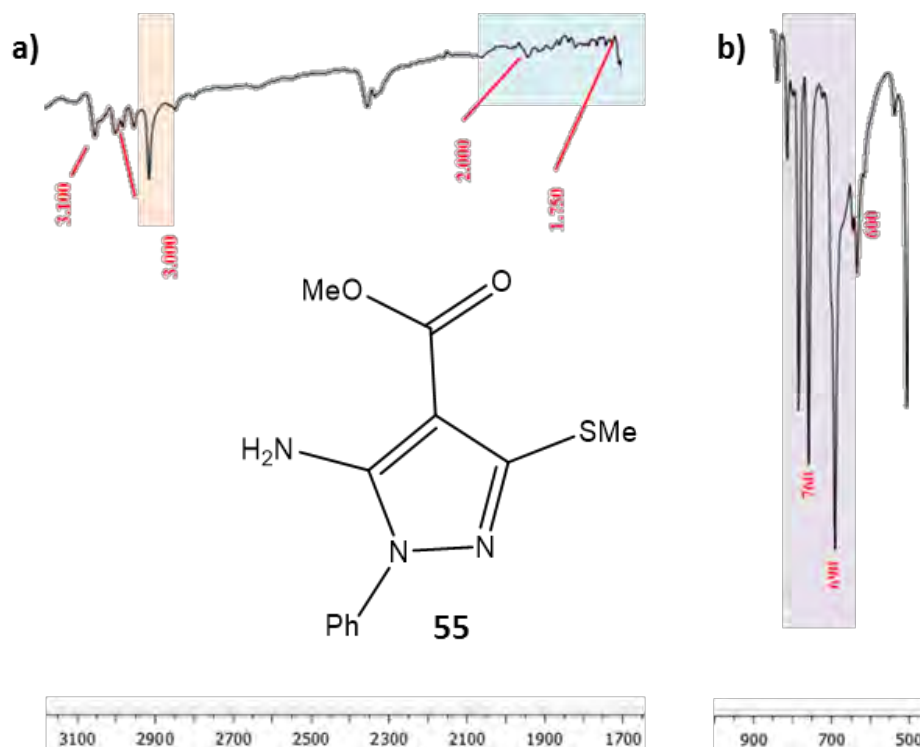


Figura 38: Recorte do espectro de IV para o pirazol **55** entre **a)** $3100\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$ com destaque para bandas atribuídas a estiramento C-H em carbono sp^2 de anel aromático (destaque tarja rosa) e bandas harmônicas de aromático (destaque tarja azul); e entre **b)** $900\text{-}500\text{ cm}^{-1}$ com destaque para bandas de padrão monossustituído de anel aromático (destaque tarja lilás).

O segundo grupo de pirazóis, compostos **56-59**, correspondeu a aqueles cujo precursor nitrilado foi o composto **48**. Seus espectros no IV também mostraram algumas similaridades entre si, como as bandas estreitas de média a alta intensidade situadas em 2300 cm^{-1} , no caso dos compostos **56** e **57**, e em 2225 cm^{-1} , para os compostos **58** e **59**. Tais bandas são compatíveis com estiramento $\text{C}\equiv\text{N}$ e, portanto, foram atribuídas a presença de grupos nitrila (Figura 39).

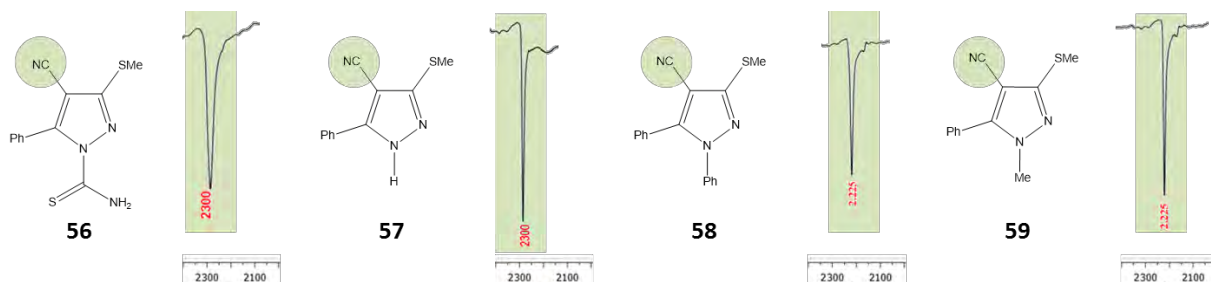


Figura 39: Recorte dos espectros de IV ($2300\text{--}2100\text{ cm}^{-1}$) com destaque para bandas atribuídas ao estiramento $\text{C}\equiv\text{N}$ (tarja verde), presentes nos pirazóis **56-59**.

Ainda sobre os pirazóis **56-59**, foram observadas bandas imediatamente acima da região de 3000 cm^{-1} , sugerindo a presença de estiramento C-H em carbonos do tipo sp^2 de anel aromático (Figura 40).

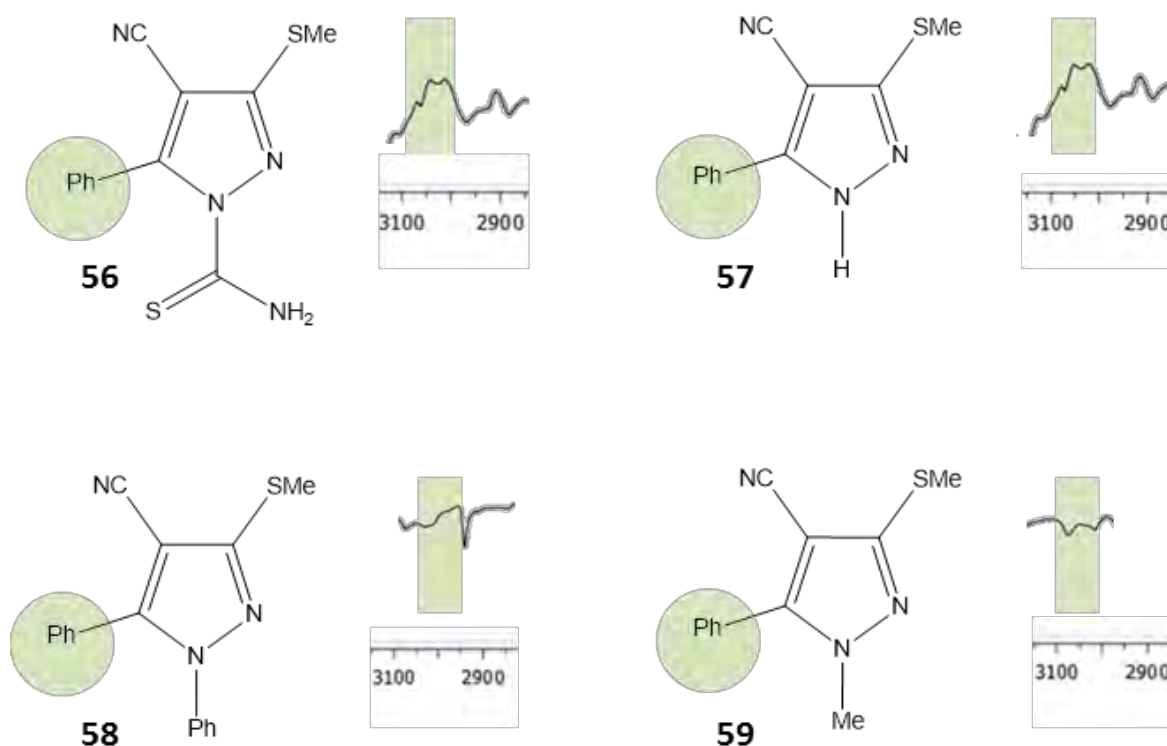


Figura 40: Recorte dos espectros de IV ($3100\text{--}2900\text{ cm}^{-1}$) com destaque para bandas imediatamente acima de 3000 cm^{-1} compatíveis com estiramento C-H em carbono sp^2 de aromáticos.

A presença do anel aromático nos pirazóis **56-59** se reforça pelos de pares de bandas estreitas e intensas observadas em seus respectivos espectros entre 1650 cm^{-1} e 1430 cm^{-1} , uma vez que estas são compatíveis com estiramento C=C de anel aromático. Além disso, pares de bandas, também de aspecto fino e intenso entre 760 cm^{-1} e 690 cm^{-1} , sugerem um anel aromático monossustituído (Figura 41).

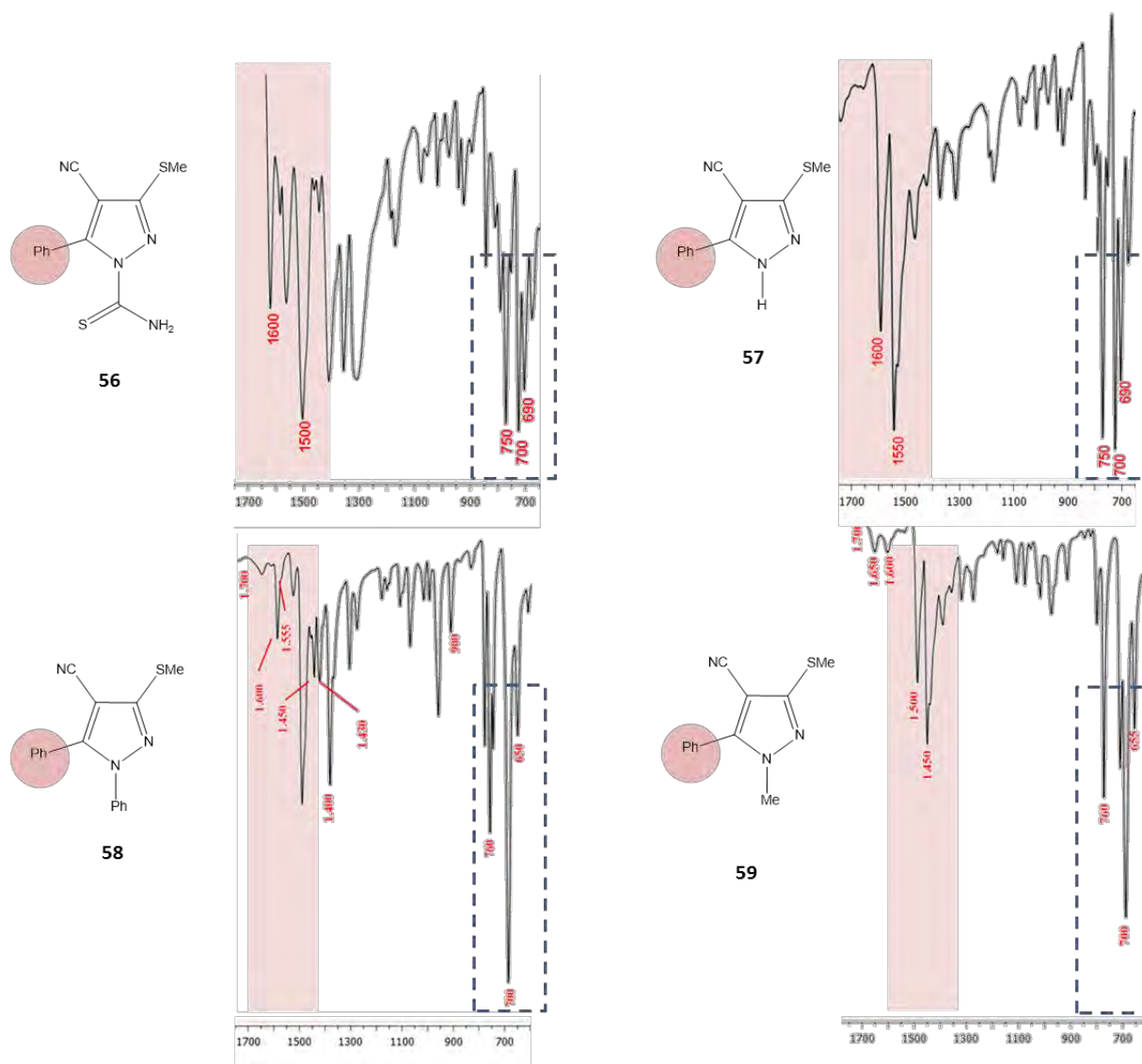


Figura 41: Recortes dos espectros de IV entre $1700\text{-}700\text{ cm}^{-1}$ dos pirazóis **56-59** com destaque para as bandas atribuídas a estiramentos C=C de anel aromático (destaque tarja lilás) bem como pares de bandas compatíveis com anel monossustituído (destaque tracejado azul).

O composto **56** apresentou em seu espectro de IV um par de bandas relativamente estreita e de média intensidade, sendo elas em 3460 cm^{-1} e em 3380 cm^{-1} que foram atribuídas

ao estiramento N-H de aminas primárias, neste caso relacionado ao grupo NH_3 da tioamida proveniente da tiossemicarbazida (Figura 42).

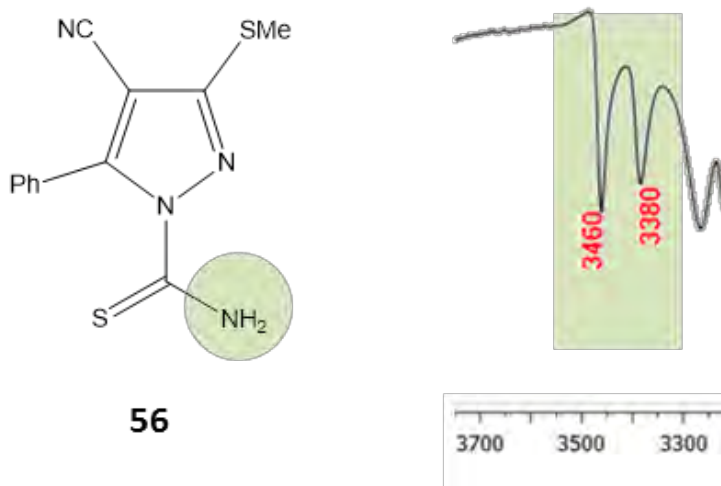


Figura 42: Recorte do espectro de IV entre $3700\text{--}300\text{ cm}^{-1}$ com destaque para um par de bandas (tarja verde) compatível com estiramento N-H em aminas primárias.

Fonte: Próprio autor.

O terceiro e último grupo de pirazóis foi obtido a partir do precursor nitrilado **48** e corresponde aos compostos **60–62**. Em seus espectros de IV, assim como nos espectros dos pirazóis obtidos a partir do precursor nitrilado **47**, foram observadas bandas estreitas e intensas em 2205 cm^{-1} , 2290 cm^{-1} e 2305 cm^{-1} , respectivamente para **60**, **61** e **62**. Tais bandas são compatíveis com estiramento $\text{C}\equiv\text{N}$ e foram atribuídas a grupos nitrila (Figura 43).

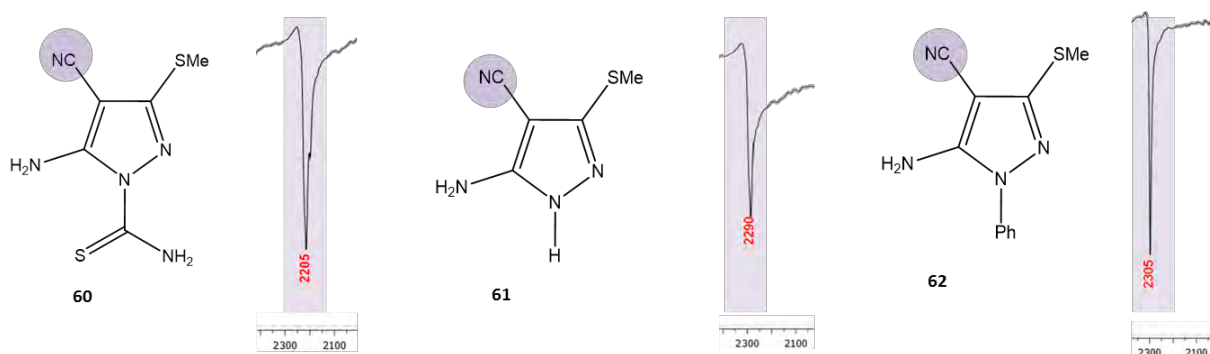


Figura 43: Recorte dos espectros de IV ($2300\text{--}2100\text{ cm}^{-1}$) dos pirazóis **60–62** com destaque para bandas compatíveis com estiramento de $\text{C}\equiv\text{N}$.

O composto **60** apresentou em seu espectro de IV dois pares de bandas entre 3340 cm^{-1} e 3175 cm^{-1} que, embora parcialmente sobrepostas, foram facilmente distintos entre si (Figura 44, destaque rosa). Os valores de absorção e aspectos dessas duas bandas foram compatíveis com estiramento N-H de aminas primárias e foram, portanto, atribuídos ao grupo amina na posição 5 do anel pirazólico e ao grupamento NH_3 da função amida proveniente da tiossemicarbazida. Da mesma forma, os compostos **61** e **62** também apresentaram em seus respectivos espectros de IV bandas que foram atribuídas a estiramento N-H de aminas primárias. Contudo, seus espectros mostraram apenas um único par de bandas, sendo eles em 3295 cm^{-1} e 3125 cm^{-1} para **61** e em 3450 cm^{-1} e 3330 cm^{-1} para **62** (Figura 44, destaque azul).

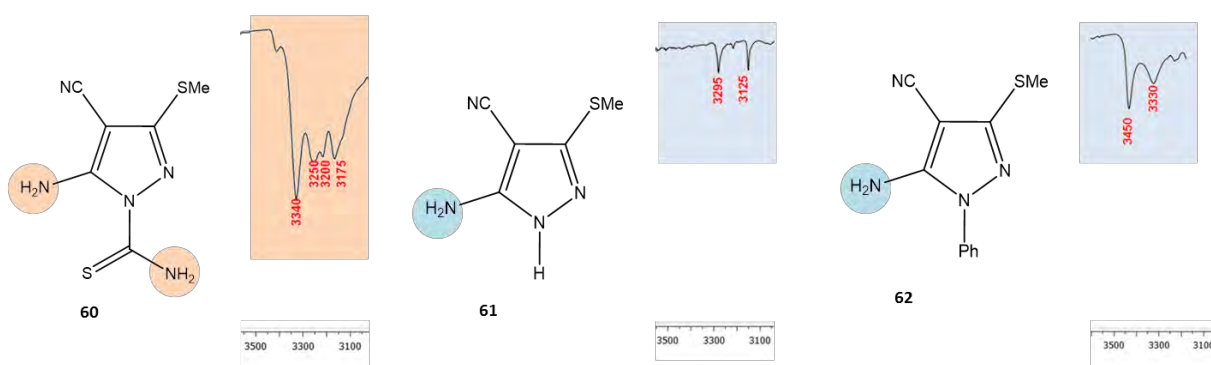


Figura 44: Recorte dos espectros de IV ($3500\text{-}3100\text{ cm}^{-1}$) dos pirazóis **60-62** com destaque para pares de bandas (tarjas rosa e azul) compatíveis com estiramento N-H de aminas primárias.

Um conjunto de bandas imediatamente acima da região de 3000 cm^{-1} sugeriu a presença de um anel aromático no composto **62** proveniente do estiramento C-H em carbonos sp^2 aromáticos (Figura 45, destaque tarja rosa). A presença da estrutura aromática é reforçada pelo par de bandas estreitas e intensas em 1620 cm^{-1} e 1550 cm^{-1} (Figura 45, destaque tarja lilás), compatíveis com estiramento C=C de anel aromático bem como do par de bandas também estreitas e intensas em 750 cm^{-1} e 690 cm^{-1} que sugere um anel monossubstituído (Figura 45, destaque tarja azul).

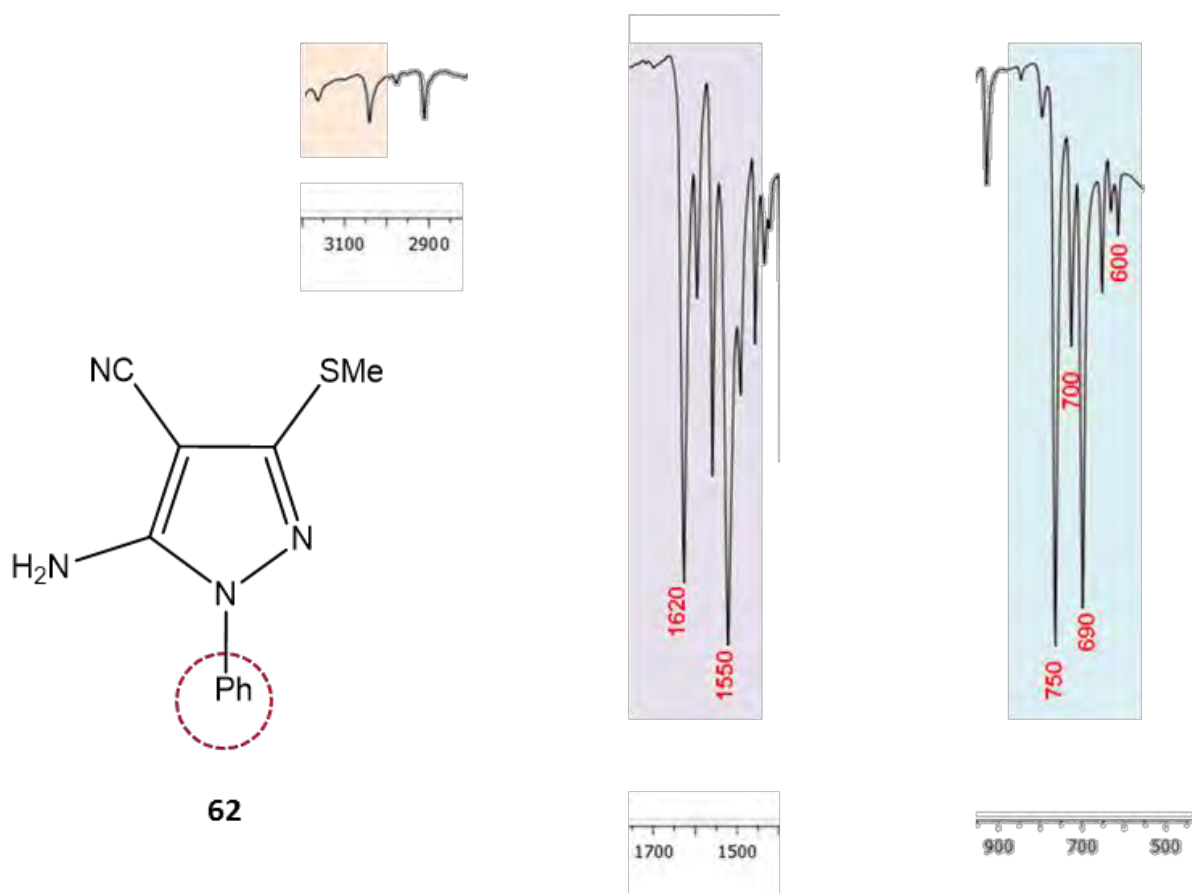


Figura 45: Recortes do espectro de IV para o pirazol **62** nas faixas 3100-2900 cm⁻¹ (tarja rosa), 1700-1500 cm⁻¹ (tarja lilás) e 900-500 cm⁻¹ (tarja azul) com destaque para bandas compatíveis com os estiramentos de C-H de carbono sp² e de C=C aromático e padrão de anel monossustituído, respectivamente.

4.4.2 Caracterização por Ressonância Magnética Nuclear de ¹H (RMN ¹H)

Para todos os pirazóis obtidos, foram observados em seus espectros de RMN ¹H sinais em forma de simpleto e integrados para 3 hidrogenios, cujos deslocamentos químicos variaram de 2,72 ppm a 2,34 ppm. Estes sinais são característicos de núcleos de hidrogênio ligados a carbono em um grupo S-CH₃ e, portanto, foram atribuídos ao grupo metilsulfanil remanescente de seus respectivos precursores nitrilados (Figura 46).

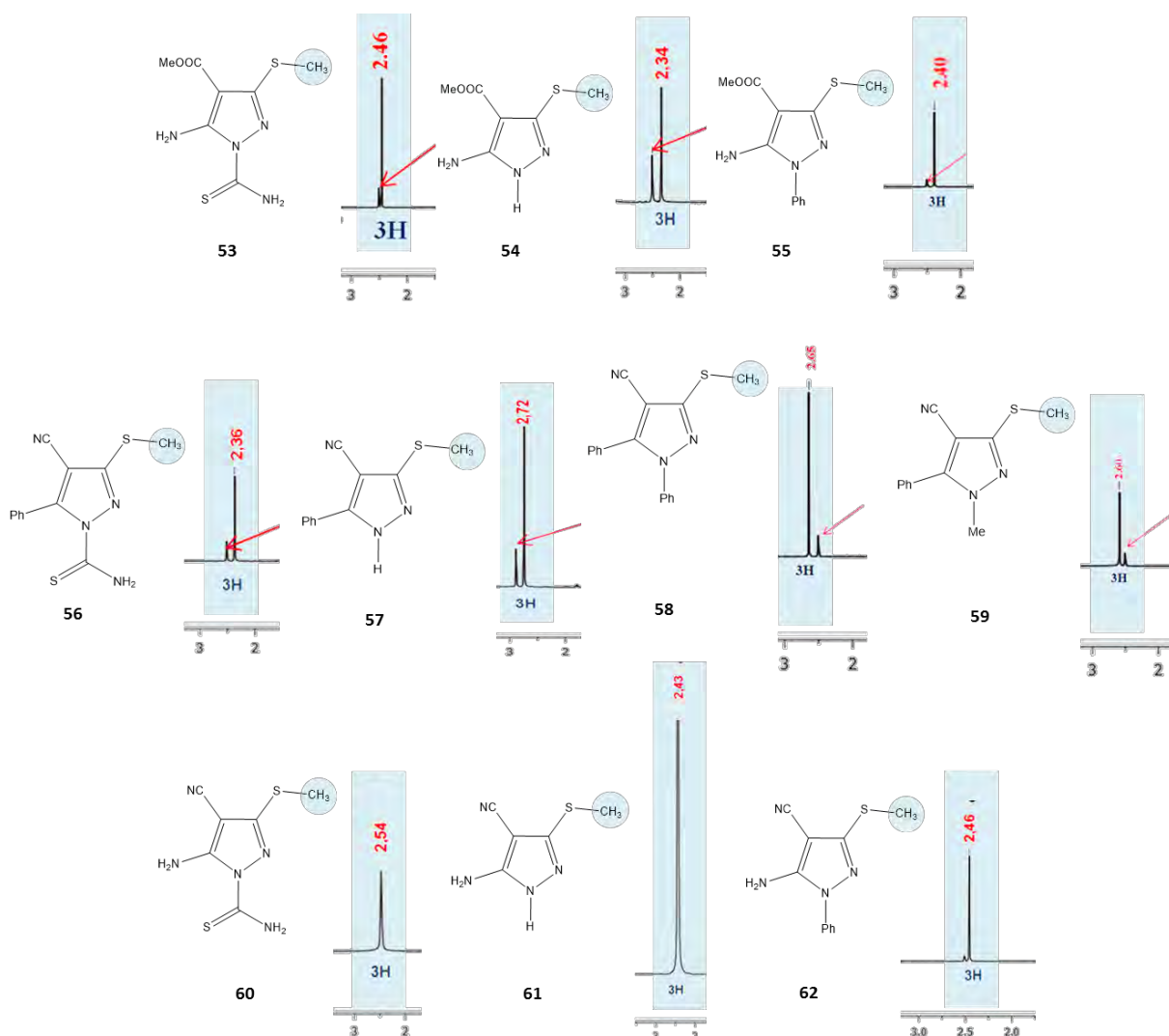


Figura 46: Recortes dos espectros de RMN ^1H (3,00-2,00 ppm) dos pirazóis **53-62** evidenciando singletos integrados para 3 hidrogenios (tarja azul), compatíveis com núcleos do grupo metilsulfanil (substituinte na posição 3 do anel pirazólico). Setas vermelhas indicam sinais do solvente (DMSO- d_6).

Os espectros referentes aos pirazóis **53-55** apresentaram singletos integrados para 3 hidrogenios e deslocamentos químicos cuja variação foi de 3,74 ppm a 3,67 ppm. Estes sinais foram compatíveis a núcleos de hidrogênios diretamente ligados a carbono em um grupo O- CH_3 e foram, portanto, atribuídos aos hidrogenios da porção metoxila no grupo éster na posição 4 do anel pirazólico (Figura 47).

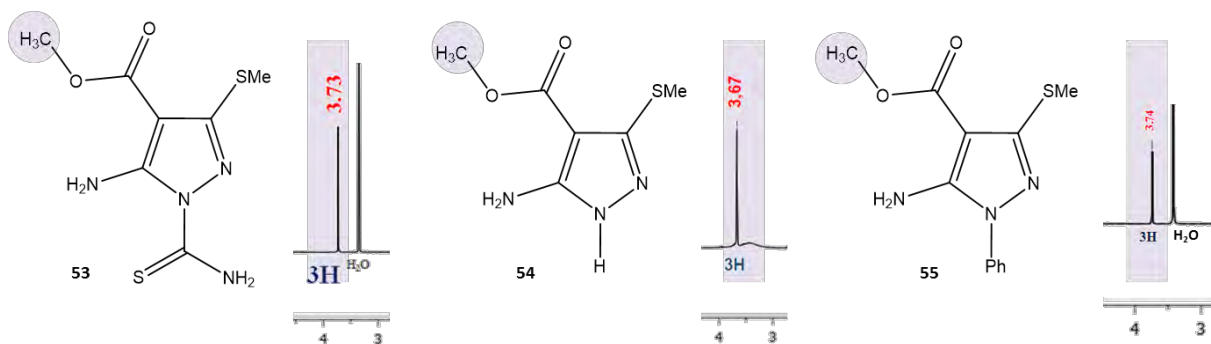


Figura 47: Recortes dos espectros de RMN ^1H (4,00-3,00 ppm) dos pirazóis **53-55** evidenciando singletos integrados para 3 hidrogênios (tarja lilás), compatíveis com núcleos de grupo metoxila no grupo éster (substituinte na posição 4 do anel pirazólico).

Para **53**, foram observados dois simpletos, cada um integrado para 2 hidrogênios, em 9,76 ppm e em 9,14 ppm. Estes sinais foram atribuídos a núcleos de hidrogenios ligados a nitrogênio em um dos grupos amina, sendo eles a amina primária na posição 5 do anel pirazólico e o NH_2 do grupo tioamida oriundo da tiossemicarbazida (Figura 48, tarja rosa). Em **54** e **55**, o sinal atribuído aos núcleos de hidrogênio do grupo amina ligado ao anel pirazólico na posição 5, foi assinalado em 6,27 ppm e 6,41 ppm, respectivamente (Figura 48, destaque tarja azul).

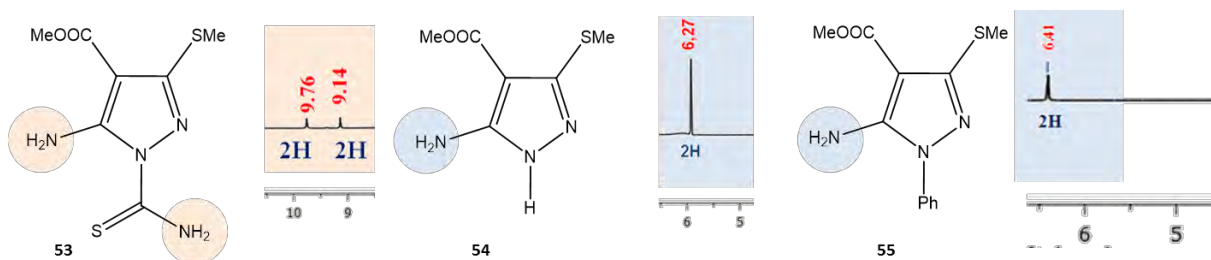


Figura 48: Recortes dos espectros de RMN ^1H para os pirazóis **53** (10,00-9,00 ppm, tarja rosa), **54** e **55** (6,50-5,00 ppm, tarja azul), evidenciando singletos integrados para 2 hidrogênios, compatíveis com núcleos em grupos aminas.

Sinais na forma de multipletos e integrados para 5 hidrogênios foram observados na região de aromático, entre 7,60 ppm e 7,40 ppm, para o pirazol **55**, os quais foram atribuídos aos núcleos de hidrogênio ligados a carbono sp^2 de anel aromático (Figura 49, tarja lilás). O núcleo de hidrogênio diretamente ligado ao anel pirazólico na posição 1, entretanto, não foi observado no espectro referente ao pirazol **54** (Figura 49).

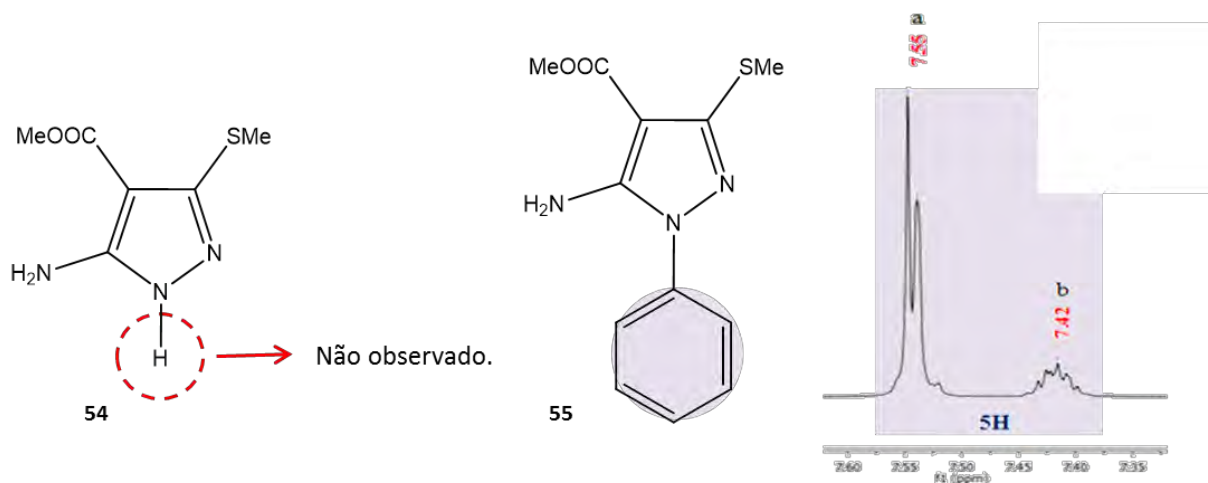


Figura 49: Estrutura do pirazol **54** (à esquerda) e recorte do espectro de RMN ^1H (7,60-7,35 ppm) evidenciando sinais na forma de multipletos integrados para 5 hidrogênios em região de aromático, compatíveis com núcleos de hidrogênio em uma estrutura aromática (tarja lilás).

Os espectros relacionados aos pirazóis **56-59** apresentaram sinais na região atribuída a aromáticos. Na forma de multipletos, estes sinais tiveram deslocamentos químicos que variaram de 7,72 ppm a 7,31 ppm e integração de 5 hidrogênios para **56**, **57** e **59** (Figura 50, destaque em verde), e de 10 hidrogênios para **58**, o que nos permitiu, portanto, sugerir a presença de dois anéis aromáticos neste último (Figura 50, destaque em rosa). Um destes anéis, tal como para os pirazóis **56**, **57** e **59**, foi atribuído ao substituinte na posição 5 do anel pirazólico e o outro, oriundo da fenil-hidrazina, ao substituinte ligado na posição 1.

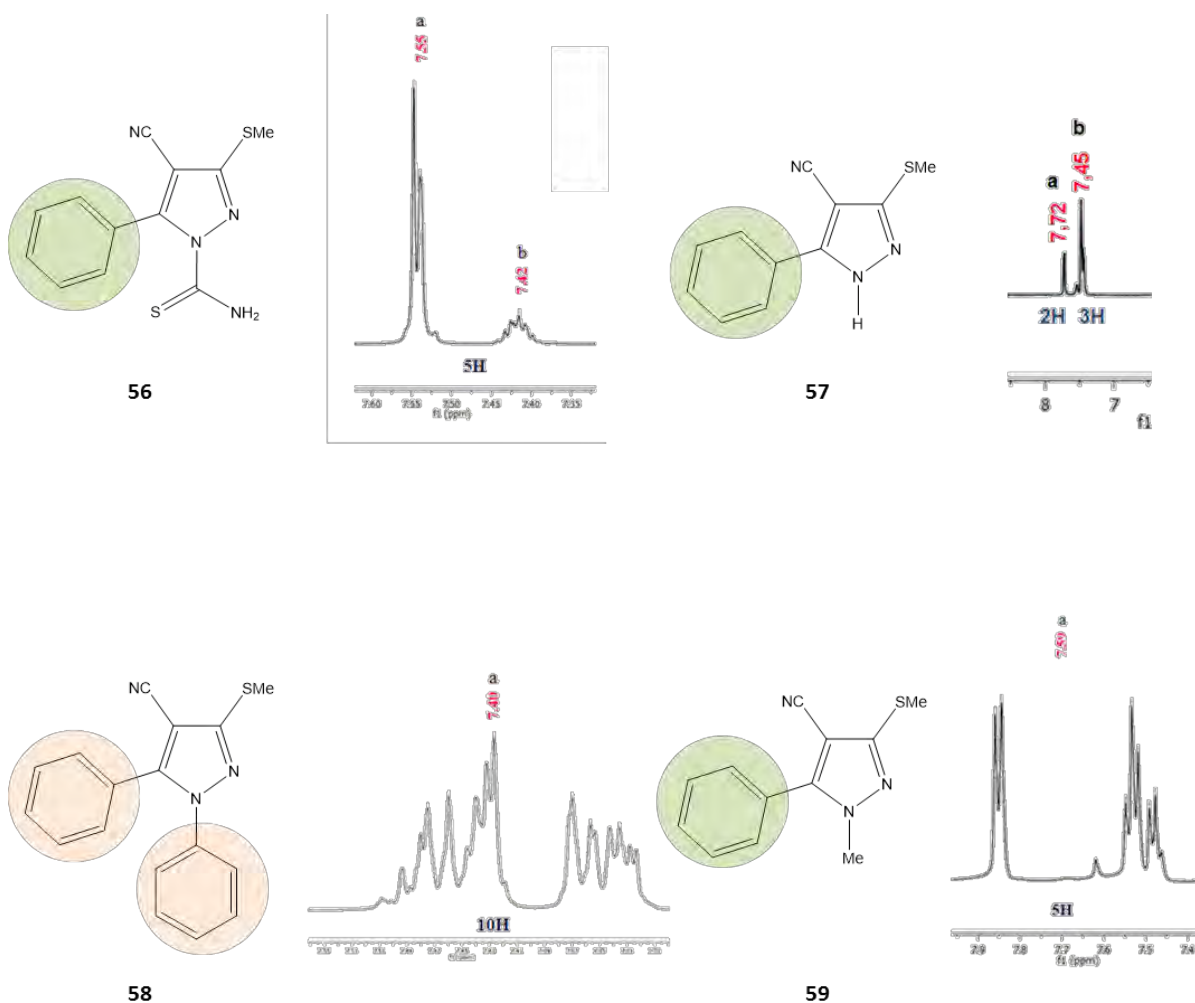


Figura 50: Recortes dos espectros de RMN ^1H na região de aromáticos para os pirazóis **56-59** evidenciando sinais na forma de multipletos integrados para 5 hidrogenios (destaque em verde) e 10 hidrogenios (destaque em rosa), compatíveis com núcleos em um anel aromático.

Um simpleto integrado para 3 hidrogênios em 3,98 ppm foi observado no espectro do pirazol **59** e atribuído aos núcleos de hidrogênio do substituinte metila na posição 1 do anel pirazólico. Estes núcleos apresentam maiores deslocamentos químicos em relação àqueles do grupo metilsulfanil, neste mesmo composto, por estarem mais desblindados em função da proximidade com o átomo de nitrogênio da posição 1 do anel pirazólico que, é mais eletronegativo que o enxofre em S-CH_3 (Figura 51).

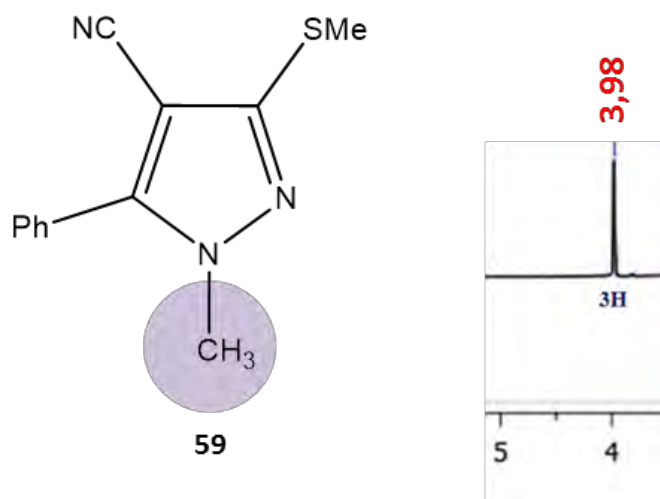


Figura 51: Recorte do espectro de RMN¹H para o pirazol **59** evidenciando o simpleto integrado para 3 hidrogênios em 3,98 ppm, compatível com núcleos em um grupo metila.

Os pirazóis **60-62** apresentaram em seus espectros um simpleto integrado para 2 hidrogênios, respectivamente em 6,95 ppm, 6,41 ppm e 6,70 ppm. Estes sinais foram, portanto, atribuído aos núcleos de hidrogênios ligados a nitrogênio no grupo NH₂, ou seja, ao substituinte amina na posição 5 do anel pirazólico (Figura 52), tais como aqueles anteriormente discutidos para os pirazóis **53-55**.

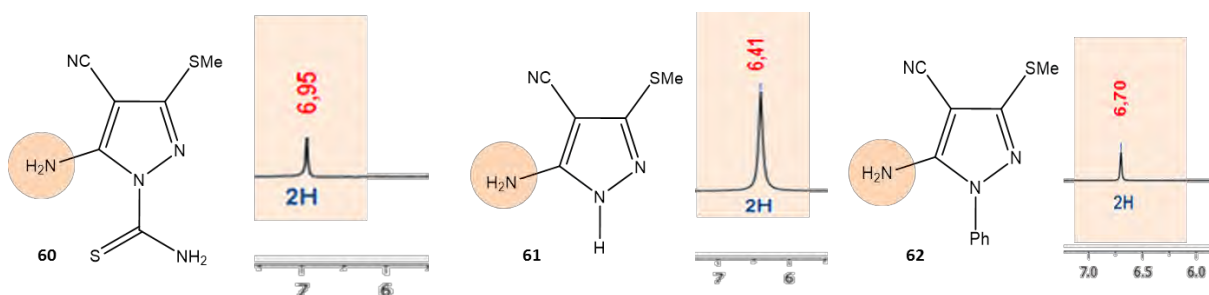


Figura 52: Recorte dos espectros de RMN¹H (7,00-6,00 ppm) dos pirazóis **60-62** evidenciando sinais na forma de simpletos integrados para 2 hidrogênios, compatíveis com núcleos de hidrogênio em grupo amina.

O pirazol **61** mostrou em seu espectro um simpleto bastante desblindado em 12,00 ppm e integrado para 1 hidrogênio, o qual foi atribuído ao núcleo de H diretamente ligado ao

nitrogênio na posição 1 do anel pirazólico (Figura 53, destaque tarja verde). E, por fim, para **62** um multipeto integrado para 5 hidrogenios e centrado em 7,47 ppm, foi observado na região característica de aromáticos. Estes sinais foram, portanto, atribuídos aos núcleos de H ligados a carbono sp^2 de aromáticos, isto é, o substituinte ligado ao anel pirazólico na posição 1 (Figura 53, destaque tarja rosa).

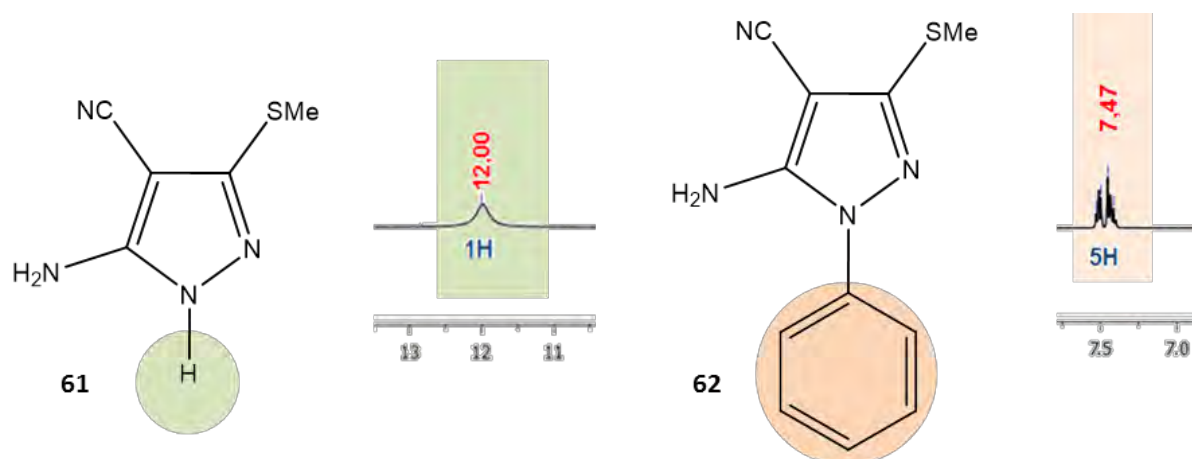


Figura 53: Recortes dos espectros de RMN¹H dos pirazóis **61**, entre 13,0 ppm e 11,0 ppm com destaque (tarja verde) para simpleto integrado para 1 hidrogênio e **62**, entre 7,5 ppm e 6,5 ppm com destaque para multipeto integrado para 5 hidrogênios.

4.2.3 Caracterização por Ressonância Magnética Nuclear de ¹³C (RMN ¹³C)

Sinais de média a alta intensidade em fase negativa no espectro, compatíveis com carbono terciário (CH₃), cujos deslocamentos químicos variaram de 18,6 ppm a 12,8 ppm, foram observados nos dez pirazóis obtidos. Estes sinais foram atribuídos ao núcleo de carbono ligado ao enxofre no grupo S-CH₃, isto é, ao grupo tiometil remanescente de seus respectivos precursores nitrilados, ligados ao anel pirazólico na posição 3 (Figura 54).

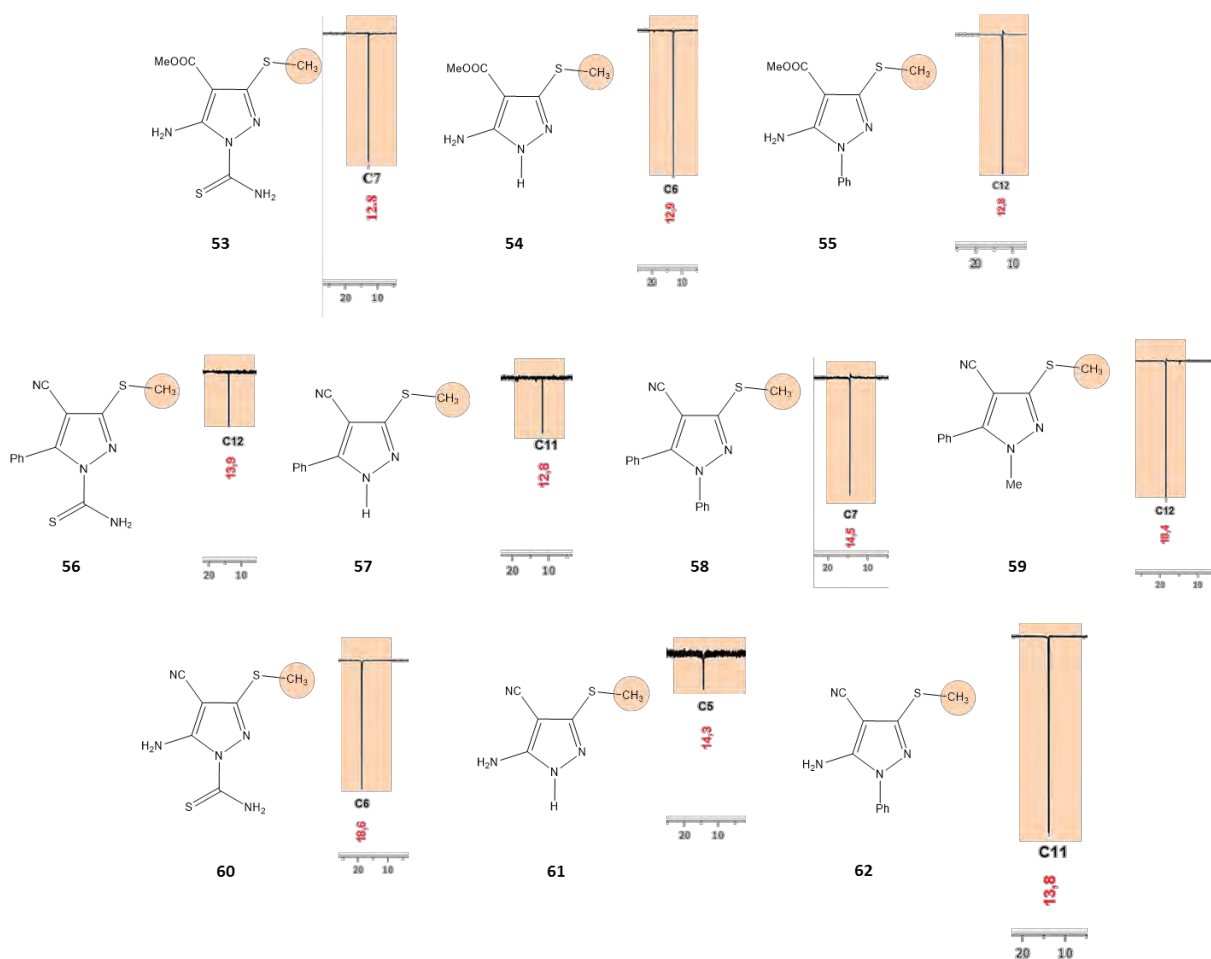


Figura 54: Recortes dos espectros de RMN ^{13}C (20,00-10,00 ppm) dos pirazóis **53-62** com destaque para sinal compatível com S-CH_3 .

Além deste, outros sinais comuns a todos os pirazóis também foram observados, como aqueles relacionados aos núcleos dos carbonos que constituem o anel pirazólico, ou seja, os carbonos das posições 3, 4 e 5 do anel. Assim, os núcleos referentes aos carbonos vinílicos do anel pirazólico foram observados por meio dos sinais em fase positiva e, portanto, quaternários, com deslocamentos químicos variando de 93,8 ppm a 70,9 ppm para o vinílico na posição 4 do anel e de 155,9 ppm a 138,6 ppm para o vinílico na posição 5 do anel (Figura 55, destaques em rosa e azul). Já o núcleo referente ao carbono da posição 3 do anel pirazólico, foi atribuído aos sinais em fase positiva, também quaternários, cujos deslocamentos químicos variaram de 151,9 ppm a 145,9 ppm (Figura 55, destaque em verde).

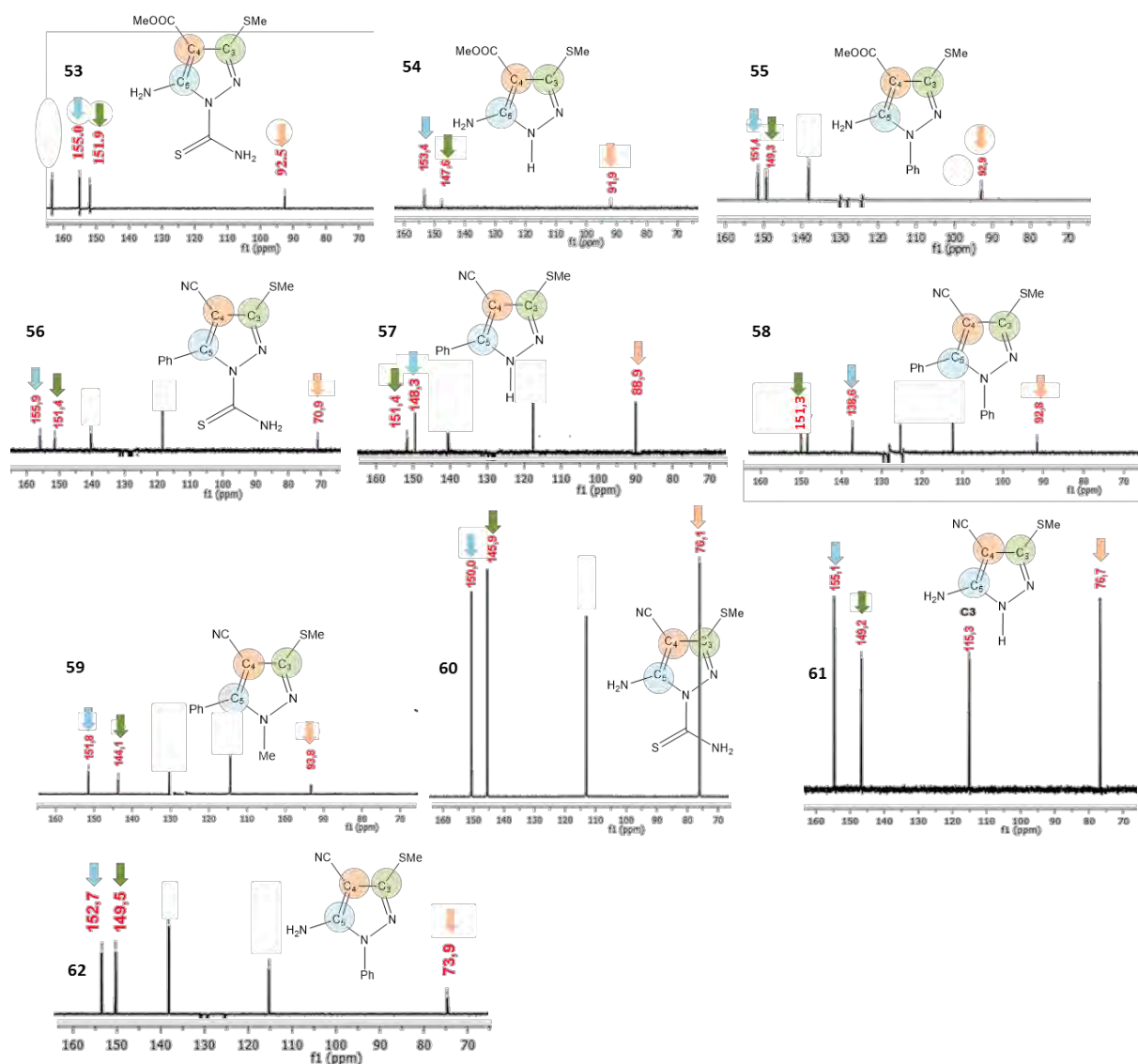


Figura 55: Recortes dos espectros de RMN ^{13}C entre 160,0 ppm e 70,0 ppm dos pirazóis **53-62**, evidenciando sinais compatíveis com o núcleo do carbono C3 e os carbonos vinílicos do anel pirazólico, C4 e C5.

Os espectros dos pirazóis **53-55** mostraram sinais em fase negativa, relacionados a carbonos primários (CH_3) e com deslocamentos químicos variando de 51,3 ppm a 50,7 ppm. A estes sinais foram atribuídos os núcleos de carbono do grupo metoxílico da função éster, isto é, os substituintes ligados ao anel pirazólico na posição 4 nestas três estruturas (Figura 56).

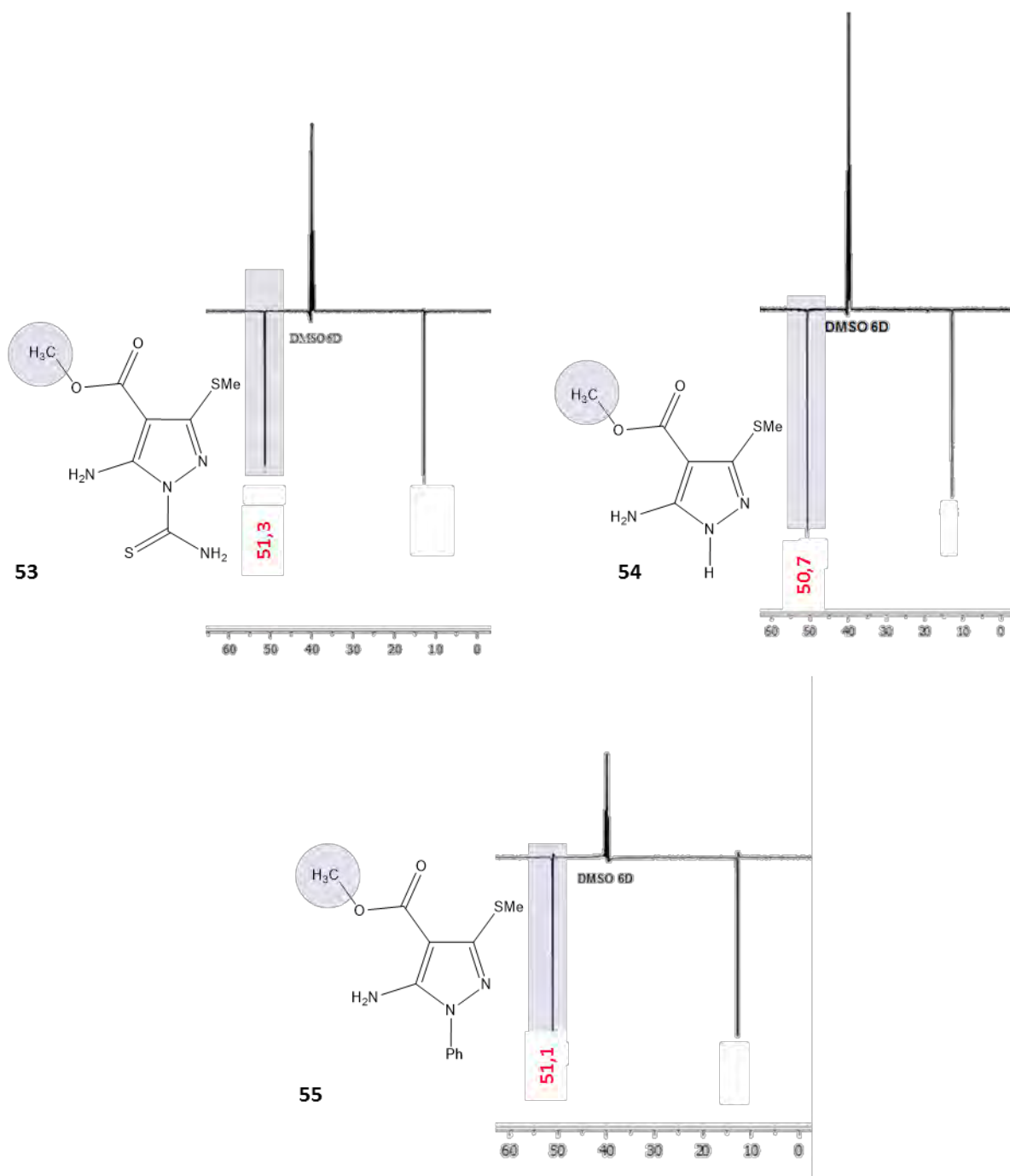


Figura 56: Recortes dos espectros de RMN ^{13}C de 60,0 ppm a 0,00 ppm dos pirazóis **53-55** com destaque para sinais compatíveis com núcleo de carbono em grupo O-CH_3 .

Também foram observados em seus espectros sinais em fase positiva em regiões bastante desblindadas e compatíveis com núcleos de carbono quaternário, cujos deslocamentos químicos variaram de 164,1 ppm a 163,4 ppm. A estes sinais foram atribuídos o núcleo do carbono carbonílico da função éster (Figura 57).

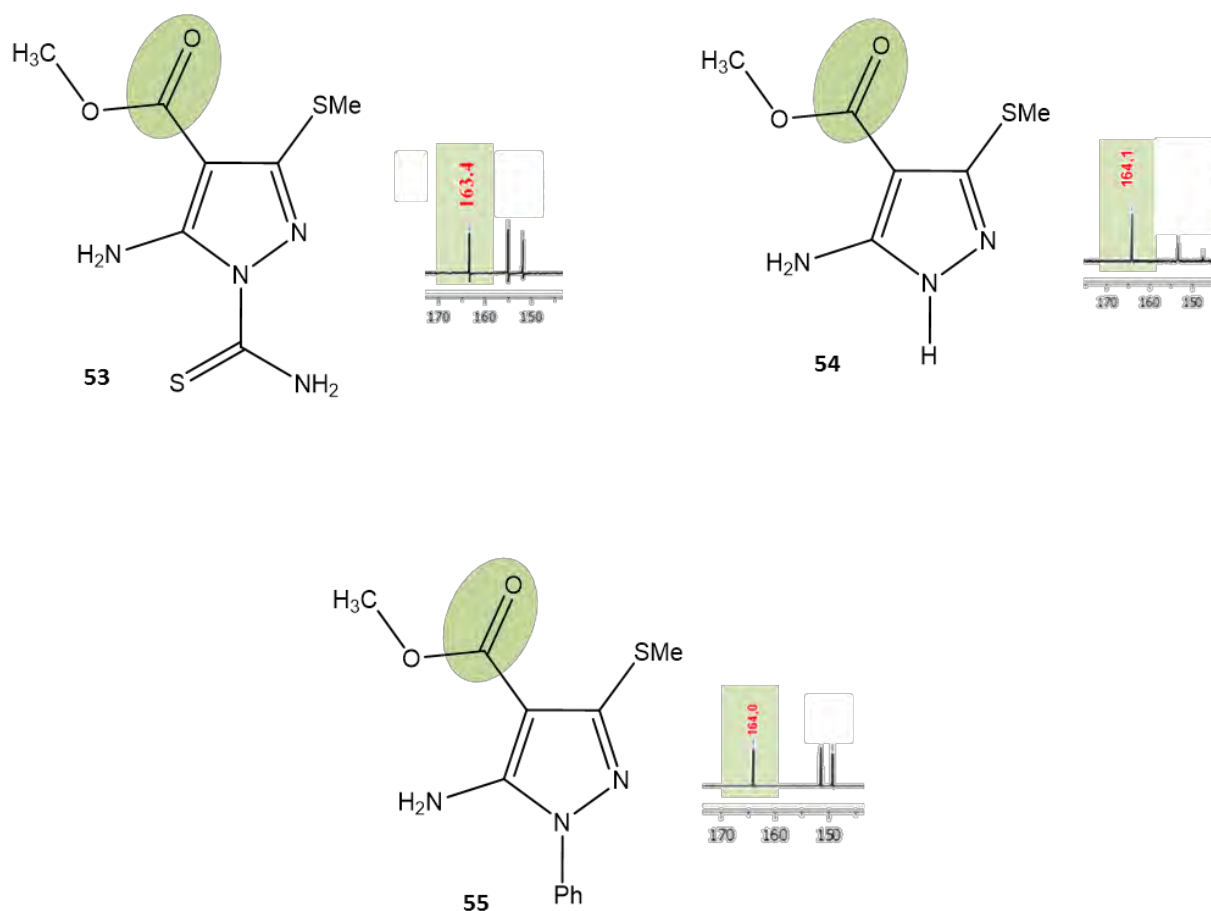


Figura 57: Recortes dos espectros de RMN¹³C entre 170,0 ppm e 150,0 ppm dos pirazóis **53-55** com destaque para sinais compatíveis com núcleo de carbono carboxílico.

Os espectros dos pirazóis **53**, **56** e **60** mostraram um sinal em fase positiva em 176,6 ppm, 176,4 ppm e 181,2 ppm, respectivamente. Estes sinais foram, em cada caso, o de maior deslocamento químico e, portanto, o núcleo mais desblindado nessas estruturas. A eles foram atribuídos os núcleos dos carbonos da tiocarbonila, cujos núcleos diretamente ligados correspondem aos de átomos bastante eletronegativos, sendo eles o enxofre e dois nitrogênios (Figura 58).

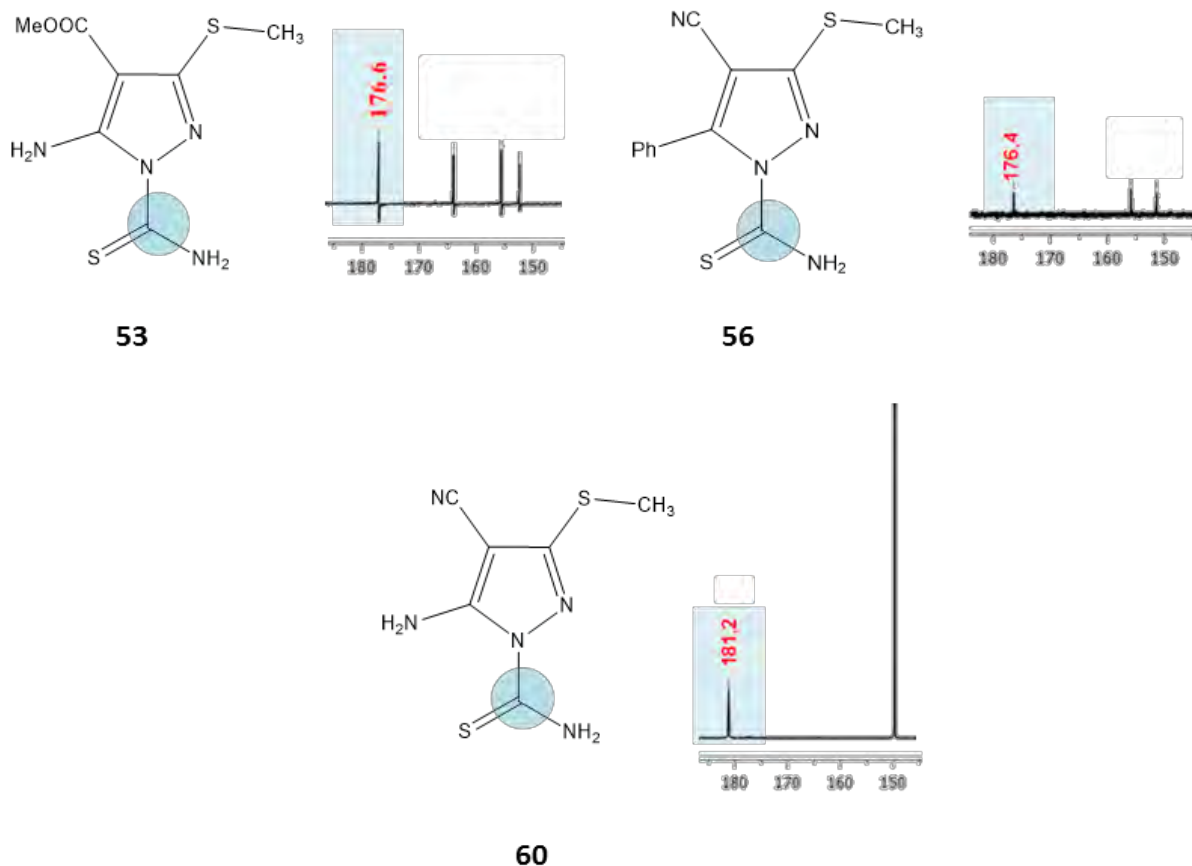


Figura 58: Recortes dos espectros de RMN ^{13}C entre 180,0 ppm e 150,0 ppm dos pirazóis **53**, **56** e **60**, evidenciando sinais compatíveis com o núcleo de carbono em grupo tioamida.

Os pirazóis **56-62** mostraram em seus respectivos espectros sinais em fase positiva que variaram de 118,8 ppm a 113,4 ppm, compatíveis com núcleos de carbono quaternário. A esses sinais foram atribuídos o núcleo de carbono da função nitrila, ligadas ao anel pirazólico na posição 4 (Figura 59, destaque em verde). Sinais em fase negativa na região de aromáticos entre 135,0 ppm e 125,0 ppm foram observados nos espectros dos pirazóis **55-59** e **62** e contribuíram para confirmar a presença do anel aromáticos nessas estruturas (Figura 59, destaque em lilás). Por fim, um sinal em fase negativa compatível com núcleo de carbono primário, cujo deslocamento químico foi de 38,1 ppm, foi observado no espectro do pirazol **59** e atribuído ao núcleo do carbono metílico ligado ao anel pirazólico na posição 1 (Figura 59, destaque em rosa).

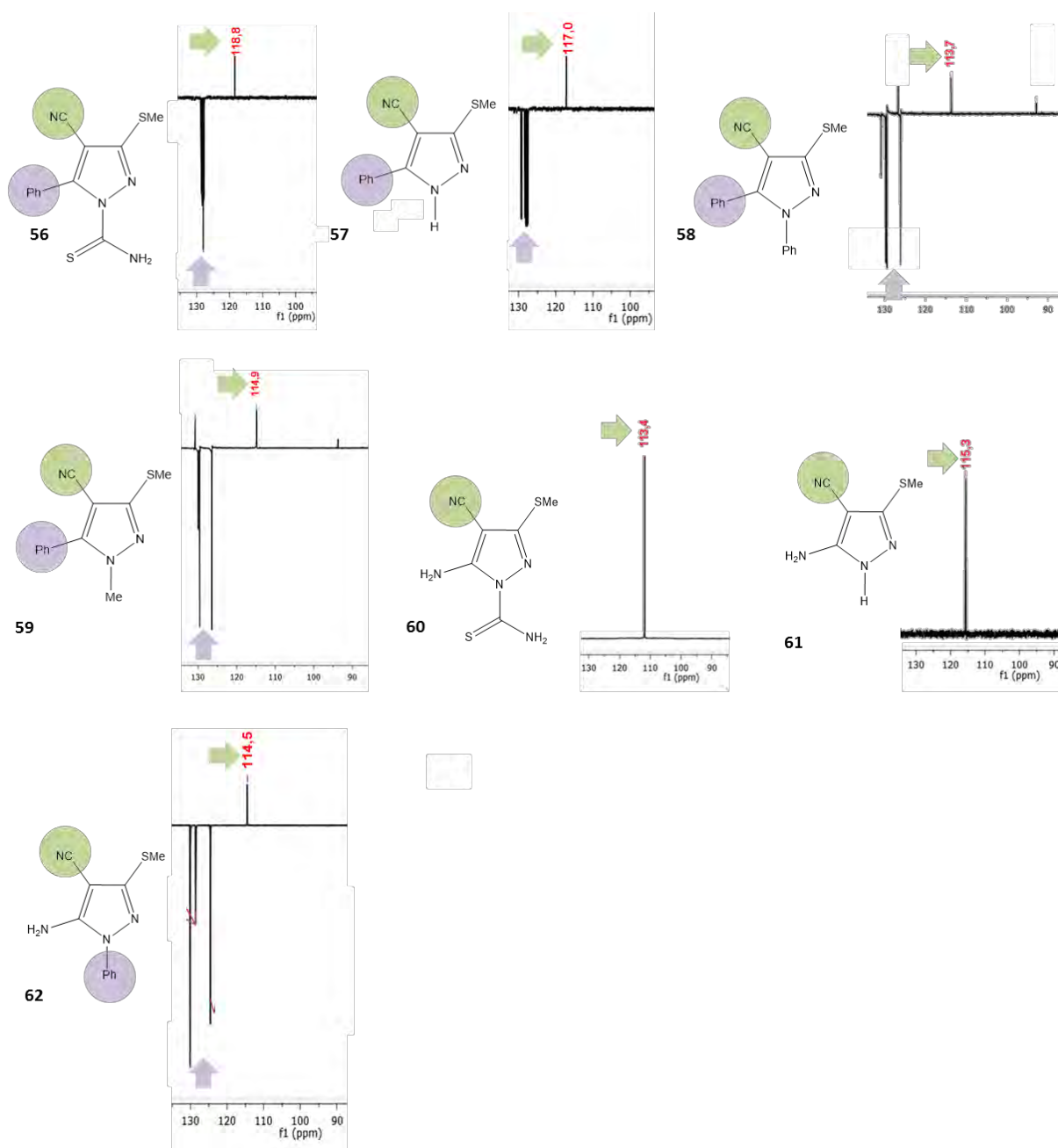


Figura 59: Recortes dos espectros de RMN ^{13}C dos pirazóis **56-62** com destaque para os sinais atribuídos aos núcleos de carbono em grupos nitrila, anel aromático e metila.

4.5 Triagem *in silico* da possível atividade biológica dos pirazóis tetra-substituídos

A análise prévia das estruturas moleculares dos pirazóis **53-62** a partir de uma triagem *in silico* empregando ferramentas *online* gratuitas, tais como CLC-Pred e AdmetSAR, nos forneceu dados importantes a partir dos quais foi possível selecionar os pirazóis com maiores

probabilidades de sucesso para dar sequência com os ensaios biológicos *in vitro*, feitos posteriormente.

O CLC-Pred (Cell Line Cytotoxicity Predictor) é um software capaz de realizar a predição dos efeitos citotóxicos de compostos químicos em linhagens cancerígenas ou não tumorais (LAGUNIN *et al.*, 2018). A partir do grau de similaridade entre as estruturas moleculares analisadas e as estruturas moleculares de outros compostos já com atividade biológica estudada e confirmada, esse software calcula a probabilidade de uma determinada molécula ser ativa, gerando um valor denominado Pa (probabilidade de ser ativo), bem como a sua probabilidade de ser inativa fornecendo, neste caso, um valor denominado Pi (probabilidade de ser inativo).

Inicialmente, a análise realizada a partir do CLC-Pred gerou resultados acerca do número total de linhagens celulares de câncer que poderiam ser alvo para cada pirazol. Como pode ser visto na Figura 60, os pirazóis **53** e **60** apresentaram os maiores alcances em termos do número de linhagens cancerígenas, com 55 e 54, respectivamente.

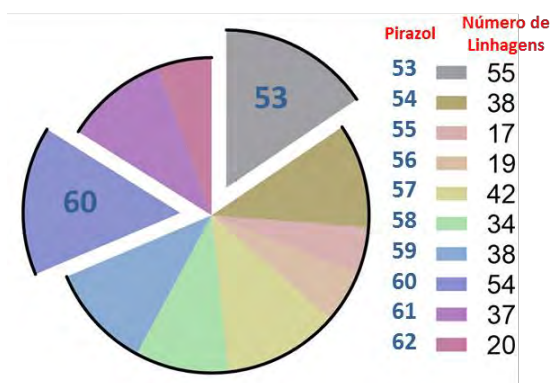


Figura 60: Resultados da predição com o número total de linhagens celulares de câncer a partir da análise empregando CLC-Pred. Valores de $Pa > Pi$.

Posteriormente, foi estabelecido um valor mínimo de Pa , onde apenas aqueles em que $Pa > 0,7$ foram considerados. A Tabela 6, como pode ser observado, mostra os resultados da análise com diferentes linhagens celulares e seus respectivos valores de Pa . Novamente, os pirazóis **53** e **60** mostraram o maior número de linhagens cancerígenas com alvo em potencial, sendo ele de 19 linhagens e 21 linhagens, respectivamente. Neste caso, os valores de Pa ficaram compreendidos entre 0,7000 para linhagem 780-0 (carcinoma renal) e 0,9369 para a

linhagem MCF7 (carcinoma de mama) para o pirazol **60** e, entre 0,7070 e 0,8500 para o pirazol **53**. Os pirazóis **54**, **55**, **57**, **58** e **59** não apresentaram resultados para os valores considerados.

Tabela 6: Análise *in silico* de atividade antitumoral obtida com o CLC-Pred (Way2Drug ©).

Pirazol	<i>Pa</i>	Linhagem cancerígena como alvo potencial	Pirazol	<i>Pa</i>	Linhagem cancerígena como alvo potencial
53	0,8500	MCF7 (carcinoma de mama)	60	0,9360	MCF7 (carcinoma de mama)
	0,8020	HOP-92 (carcinoma pulmonar)		0,9560	SR (linfoma imunoblástico adulto)
	0,8020	HCC 2998 (adenocarcinoma de cólon)		0,9320	A549 (carcinoma pulmonar)
	0,7870	SR (linfoma imunoblástico adulto)		0,8420	HOP-92 (carcinoma pulmonar)
	0,7860	SNB-75 (glioblastoma)		0,8270	HCC 2998 (adenocarcinoma de cólon)
	0,7820	EKVX (carcinoma pulmonar)		0,8260	SNB-75 (glioblastoma)
	0,7810	UACC-257 (melanoma)		0,8030	OVCAR-4 (adenocarcinoma ovário)
	0,7580	A549 (carcinoma pulmonar)		0,8010	UACC-257 (melanoma)
	0,7480	OVCAR-5 (adenocarcinoma ovário)		0,7920	OVCAR-5 (adenocarcinoma ovário)
	0,7470	NCI-H226 (carcinoma pulmonar)		0,7870	EKVX (carcinoma pulmonar)
	0,7440	RXF 393 (carcinoma renal)		0,7790	A498 (carcinoma renal)
	0,7420	TK-10 (carcinoma renal)		0,7730	TK-10 (carcinoma renal)
	0,7400	OVCAR-4 (adenocarcinoma ovário)		0,7640	BT-549 (carcinoma ductal de mama)
	0,7360	CAKI-1 (carcinoma renal)		0,7640	CAKI-1 (carcinoma renal)
	0,7340	A498 (carcinoma renal)		0,7620	RXF 393 (carcinoma renal)
	0,7320	UO-31 (carcinoma renal)		0,7550	UO-31 (carcinoma renal)
	0,7260	BT-549 (carcinoma ductal de mama)		0,7400	NCI-H226 (carcinoma pulmonar)
	0,7190	M14 (melanoma)		0,7120	U-251 (glioma)
	0,7070	KM12 (adenocarcinoma de cólon)		0,7040	KM12 (adenocarcinoma de cólon)
56	0,7270	MCF7 (carcinoma de mama)		0,7040	M14 (melanoma)
61	0,9020	SR (linfoma imunoblástico adulto)		0,7000	786-0 (carcinoma renal)
62	0,8170	SR (linfoma imunoblástico adulto)			
	0,7750	MCF7 (carcinoma de mama)			

Foram considerados valores de $Pa > 0,7$. Os compostos **54**, **55**, **57**, **58** e **59** não mostraram resultados significativos.

Foi realizada também, ainda por meio do programa CLC-Pred, a análise das estruturas moleculares dos pirazóis para avaliar suas citotoxicidades perante células não tumorais. Os compostos **53**, **54**, **55**, **59**, **61** e **62** demonstraram valores de Pa variando de 0,2070 em células de fibroblastos a 0,3710 em células endoteliais da veia umbilical, conforme pode ser observado na Tabela 7. Isso sugere que estes compostos possuem baixa probabilidade de serem ativos contra células não tumorais.

Tabela 7: Predição de baixa citotoxicidade contra células não tumorais

Pirazol	<i>Pa</i>	Resultados de previsão de linhagem celular não-tumoral
53	0,2110	BJ (fibroblasto do prepúcio)
	0,2070	HEL299 (fibroblasto)
54	0,2400	BJ (fibroblasto do prepúcio)
	0,2120	HEL299 (fibroblasto)
55	0,2190	BJ (fibroblasto do prepúcio)
	0,2070	HEL299 (fibroblasto)
59	0,3710	HUVEC (célula endotelial da veia umbilical)
61	0,2070	BJ (fibroblasto do prepúcio)
62	0,2170	PBMC (célula mononuclear do sangue periférico)

O programa AdmetSAR foi a segunda ferramenta utilizada nas análises *in silico* dos pirazóis **53-62**. Este *software*, de modo semelhante ao CLC-Pred, é capaz de buscar similaridade estrutural entre as moléculas estudadas e outras com atividade biológica já conhecida e realizar previsões importantes relacionadas às suas propriedades de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (Figura 61).

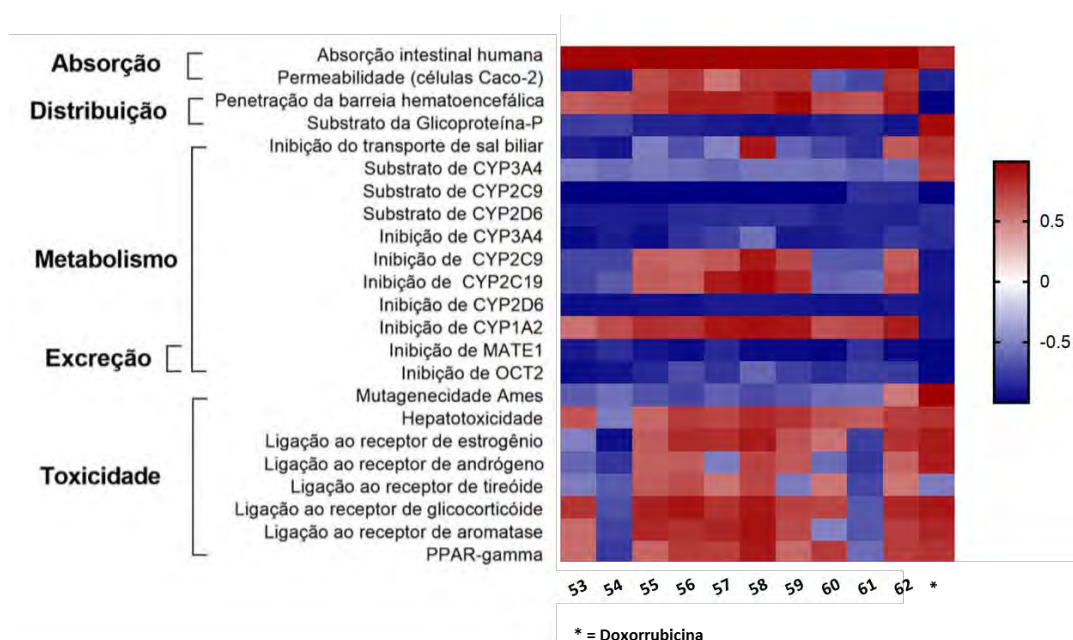


Figura 61: Propriedades ADMET (absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade) previstas pelo software AdmetSAR ©.

Os resultados obtidos a partir do AdmetSAR sugeriram que todos os pirazóis sintetizados neste trabalho apresentam uma boa absorção intestinal bem como são capazes de transpor a barreira hematoencefálica (valores acima de 0,5 em ambas as situações). Por outro lado, nenhum pirazol mostrou probabilidade de atuar como substrato da glicoproteína P (ABCB1) sugerindo, portanto, que as células tumorais não poderiam se utilizar deste mecanismo de resistência no caso destes pirazóis atuarem como agentes quimioterápicos. Apenas os pirazóis **58** e **60** indicaram probabilidade de inibição do transportador de sal biliar, sendo o valor do **58** mais próximo ao da doxorrubicina.

Estudos indicam que o citocromo P450 (CYP) humano é capaz de promover biotransformações em substâncias xenobióticas levando a ativação de compostos altamente reativos. Uma vez ativados, esses compostos poderão interagir com o DNA acarretando mutações capazes de promover o aumento e a multiplicação descontrolada de células que resultariam na formação de tumores (FERREIRA et al., 2007). Deste modo, o AdmetSAR, realizou uma predição da inibição de cinco isoformas do CYP (CYP3A4, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 e CYP1A2) e a probabilidade de algum composto ser substrato. Os resultados sugeriram que todos os pirazóis apresentam probabilidade de inibição da isoforma CYP1A2, no entanto, nenhum deles mostrou probabilidade de inibição para as isoformas CYP3A4 e CYP2D6. As isoformas CYP2C9 e CYP2C19 mostraram probabilidade de serem inibidas por ação dos pirazóis **55-59** e **62**. Em relação a atuação como substrato nenhum pirazol apresentou probabilidade. Embora apenas o pirazol **54** não tenha mostrado probabilidade de hepatotoxicidade, os demais indicaram uma probabilidade equivalente ou inferior ao da doxorrubicina.

4.6 Ensaios Biológicos

Uma vez realizada a triagem *in silico*, essa nos permitiu optar pela escolha dos pirazóis **53** e **60** para seguir com os ensaios biológicos, uma vez que estes apresentaram maior alcance em termos de número de linhagens cancerígenas como alvo em potencial, bem como melhores índices em relação às propriedades de absorção, distribuição, metabolismo e excreção, apresentando baixa toxicidade ou toxicidade equivalente a doxorrubicina.

4.6.1 Análise da toxicidade com *Artemia salina*

Os ensaios para avaliação da toxicidade geral dos pirazóis **53** e **60** foram baseados em sua capacidade tóxica sobre a espécie de *A. salina*, um microcrustáceo, compreendendo um método rápido e de baixo custo (RAJABI *et al.*, 2015). A Figura 62 mostra os resultados com o percentual de sobrevivência dos náuplios para estes compostos bem como para os grupos controle tratados somente com água salina artificial (CTRL) ou DMSO (4% e 0,4%).

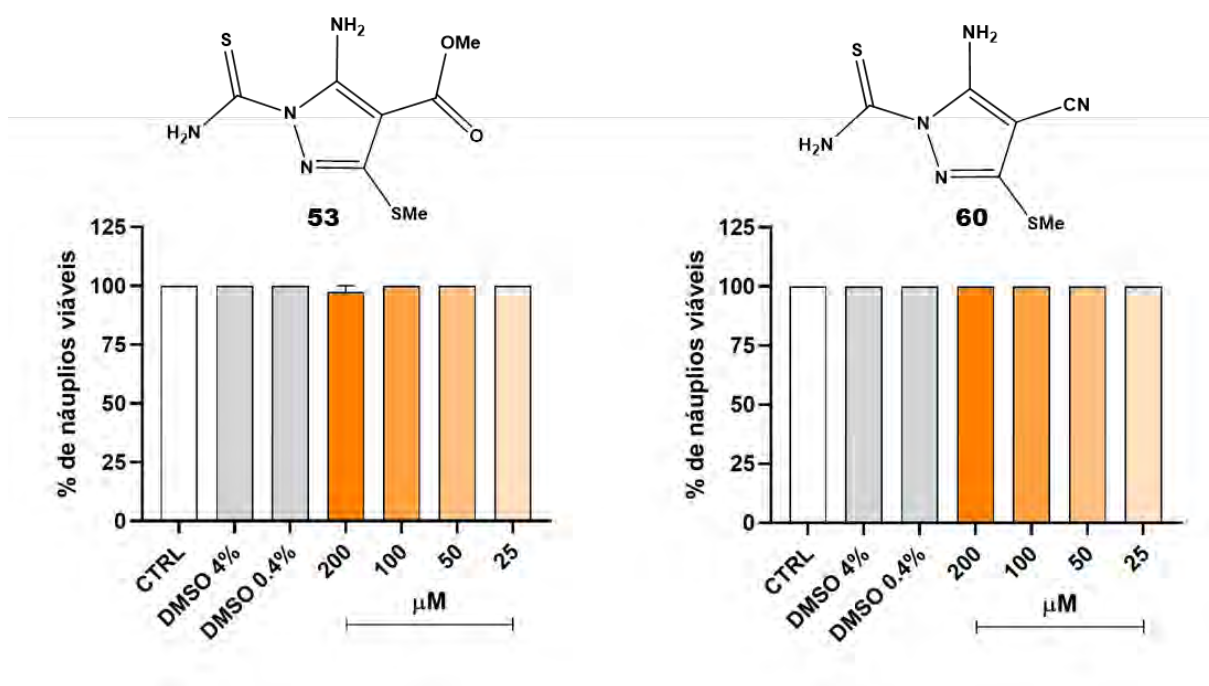


Figura 62: Efeitos dos pirazóis **53** e **60** na viabilidade de *A. salina*. Percentual de náuplios vivos (n=12) após o tratamento por 24h com diferentes concentrações de **53** e **60** (200, 100, 50 e 25 μM). CTRL = náuplios somente em solução salina; DMSO = náuplios tratados com DMSO 4% e 0,4%.

Estes ensaios foram realizados em número de dois experimentos independentes feitos cada um em duplicata. A Figura 62 mostra uma taxa de mortalidade dos náuplios nos grupos controle bastante baixa, com percentual de sobrevivência igual ou muito próximo de 100%. Este comportamento se mantém nos grupos tratados com os pirazóis em todas as concentrações testadas indicando, portanto, que estes compostos não afetaram a viabilidade das artemias e indicaram não serem tóxicos a essa espécie.

4.6.2 Avaliação da viabilidade celular

Um dos objetivos deste trabalho foi justamente avaliar os efeitos anti-leucemia *in vitro* dos pirazóis após a triagem *in silico*. Assim, foi realizado o tratamento de células leucêmicas da linhagem Jurkat com os compostos selecionados em diferentes concentrações sendo elas de 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,12 e 1,56 μM . A Figura 63 ilustra esses resultados.

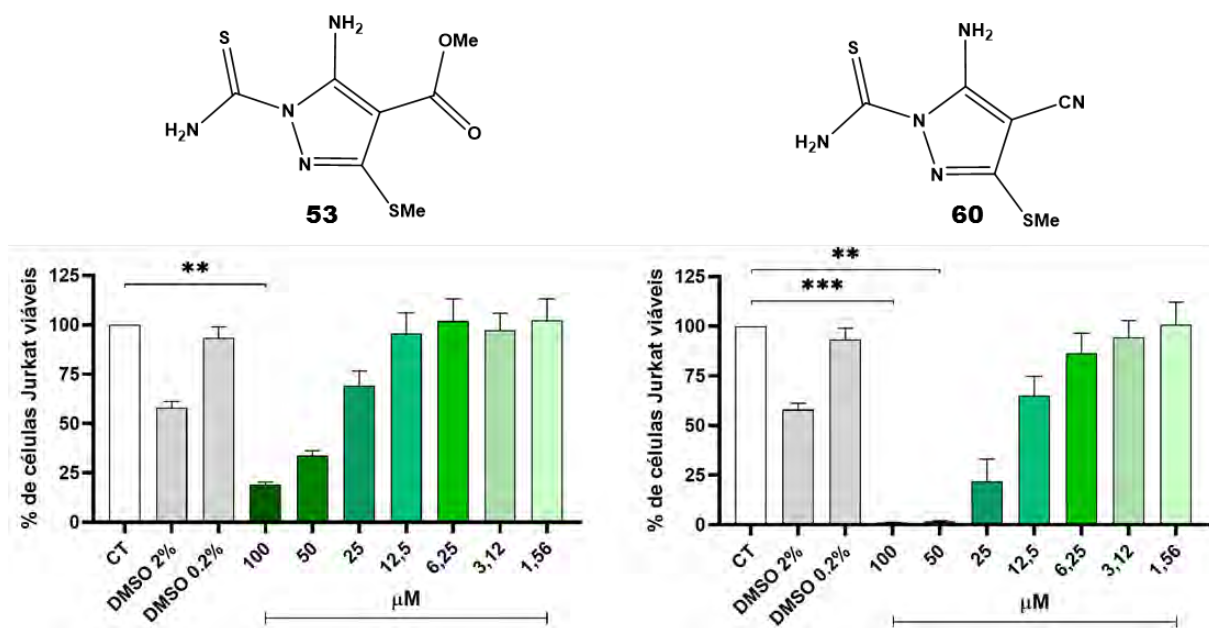


Figura 63: Efeitos dos pirazóis **53** e **60** na viabilidade de células leucêmicas da linhagem Jurkat.

Foi possível observar que ambos os pirazóis indicaram efeitos significativos quanto a viabilidade celular na maior concentração testada (100 μM) mostrando, respectivamente, um percentual de células viáveis pouco abaixo de 25% (**53**) e próximo a zero (**60**).

Observando-se a Figura 63 para o pirazol **53**, pode ser sugerido um valor de IC_{50} entre 25 e 50 μM . Em contrapartida, para o pirazol **60** observa-se que o valor sugerido para IC_{50} se encontra entre 12,5 e 25 μM . Na concentração de 25 μM é possível perceber um aumento significativo do percentual de células viáveis para o pirazol **60**, no entanto, permanecendo ainda abaixo dos 25%, que corresponde ao menor valor do percentual de viabilidade na maior concentração para o pirazol **53**. Em outras palavras, a melhor eficiência do pirazol **53**, que se dá em sua maior concentração, corresponde à eficiência observada no valor de $\frac{1}{4}$ desta

concentração para o pirazol **60**. A partir da concentração de 12,5 μ M, o percentual de viabilidade celular praticamente se mantém para o pirazol **53**, permanecendo próximo de 100%. Entretanto, este comportamento contínuo do percentual de viabilidade celular não é observado para o pirazol **60** nesta mesma faixa de concentração que, como se pode observar, ocorre com um aumento mais gradual.

Estes valores, portanto, sugerem que os efeitos sobre a viabilidade de células Jurkat é mais promissor para o pirazol **60** em relação ao **53**, indicando um maior potencial na inibição das células tumorais. Analisando as suas respectivas estruturas moleculares, verifica-se, uma mudança apenas no substituinte ligado ao anel pirazólico pela posição 4, sendo um grupo éster metílico em **53** e uma nitrila em **60**. Deste modo, é possível sugerir que o grupo nitrila na posição 4 do anel pirazólico resulta em uma significativa potencialidade dos efeitos citotóxicos frente as células Jurkat quando comparados com um grupo éster nesta mesma posição.

Os experimentos relacionados às análises de toxicidade com *Artemia salina* e viabilidade celular, bem como a triagem *in silico*, discutidos acima, foram realizados em parceria com a profa. Dra Juliana Echevarria e sua aluna de doutorado MSc Maria Clara Campos, do Programa de Pós-graduação em Imunologia e Inflamação da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

5. CONCLUSÕES

Os três precursores nitrilados, obtidos na primeira parte deste trabalho, mostraram ser importantes unidades para a construção do anel pirazólico. Juntamente com os nucleófilos empregados (hidrazinas), estes blocos construtores resultaram em uma série de moléculas com diversificado grupo de substituintes ligados ao anel, sugerindo que o emprego de outros nucleófilos pode aumentar a diversidade estrutural desta família de moléculas. Contudo, esta via de obtenção foi dificultada pela restrição de compra de hidrazinas, medida imposta pelo órgão responsável por gerir a compra de substâncias químicas no Brasil.

A metodologia empregada para a síntese do núcleo pirazol tetrassubstituído, a partir de micro-ondas científico, embora tenha sido equivalente em termos de rendimentos quando comparada à metodologia convencional (refluxo em etanol), se mostrou superior a esta por apresentar um tempo de reação significativamente menor, confirmando, portanto, ser uma

técnica que atende a alguns dos princípios da Química Verde, como redução do uso de energia e ausência de solvente.

Os rendimentos obtidos, tanto para os precursores quanto para os pirazóis propriamente ditos, foram considerados satisfatórios.

As técnicas espectroscópicas empregadas na etapa de caracterização dos compostos confirmaram as estruturas propostas.

O uso de softwares *online* e gratuitos como o CLC-Pred e AdmetSAR, representaram uma ferramenta fundamental para a economia de tempo nos testes *in vitro*, uma vez que tornaram possível promover uma triagem prévia dos pirazóis com maiores probabilidades de apresentarem atividade biológica, inclusive prevendo características importantes associadas aos fármacos como a absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade.

O uso da espécie *Artemia salina* para avaliação da toxicidade dos pirazóis selecionados após a análise *in silico*, comprovou ser um método eficiente, simples, rápido e de baixo custo, mostrando que os compostos não apresentaram toxicidade significativa.

Os experimentos de viabilidade celular mostraram que ambos os pirazóis testados apresentaram efeitos significativos sobre a linhagem celular Jurkat, confirmando as análises obtidas a partir dos testes *in silico*.

O composto **60** mostrou maior atividade sobre as células cancerígenas quando comparado ao composto **53**, inclusive inibindo as células em concentrações menores. Dado o maior efeito observado sobre as células Jurkat no composto **60** e considerando o substituinte ligado ao anel pirazólico na posição 4, ser a única diferença estrutural nestes dois compostos, foi possível sugerir que o grupo nitrila nesta posição do anel desempenha papel importante em relação a viabilidade celular. Neste sentido, é necessário que estudos mais detalhados acerca deste papel sejam feitos futuramente, de modo a ajudar a compreender melhor seu mecanismo de ação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDERRAHIM T. RACHID, T.; MOLITERNI, A. HADDA, T. B.; MESSALI, M. BENABBES, R.; BERREDJEM, M.; BOUZINA, A.; ZAQRI, N.; TALEB, M.; ZARROUK, A.; WARAD, I. **Synthesis, structural, biocomputational modeling and antifungal activity of novel armed pyrazoles.** Journal of Molecular Structure, vol. 1264, p. 133–156, 2022.

AGGARWAL, R.; ***p*-Toluenesulfonic acid-catalyzed solvent-free synthesis and biological evaluation of new 1-(4',6'-dimethylpyrimidin-2'-yl)-5-amino-4H-3-arylpyrazole derivatives.** Medicinal Chemistry Research, vol. 23, p. 1454-1464, 2014.

AGGARWAL, V. K.; VICENTE, J. DE; BONNERT, R. V. **A Novel One-Pot Method for the Preparation of Pyrazoles by 1,3-Dipolar Cycloadditions of Diazo Compounds Generated in Situ.** The Journal of Organic Chemistry, vol. 68, p. 5381–5383, 2003.

ALAM, J. **A Review on Pyrazole chemical entity and Biological Activity.** International Journal of Pharma Sciences and Research, vol. 6, n. 12, p. 1433–1442, 2015.

ALEAGAON, S. G.; ALAGAWADI, K. R.; GARG, M.K.; DUSHYANT, K.; VINOD, D. **1,3,4-trisubstituted Pyrazole Analogues as Promising Anti-inflammatory Agents.** Bioorganic Chemistry, vol. 54, p. 51-59, 2014.

ALI, I.; HOZAIFA, M.; ALI, S.; MALIK, A.; LOCATELLI, M. **Advances in ionic liquids as future anticancer drugs.** Ionic liquids Journal. Vol 388, 2023.

ALMEIDA, M. R.; MARTINEZ, S. T.; PINTO, A. C. **Química de Produtos Naturais: Plantas que Testemunham Histórias.** Química Nova, vol. 9, No. 3, p. 1117 – 1153, 2017.

ANJOS, A. DOS; SILVA, M.; BORELLI, P. **Matriz extracelular e Leucemia.** Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia. Vol 22, p. 404-412, 2000.

ANURADA, S. **Antiviral Agents and Treatment of Viral Infections.** Journal International Medicine Science Academy, vol. 27, p. 191, 2014

BARALDI, P.; FRUTAROLO, F.; TABRIZI, M.; AGHAZADEH, P.; ROMAGNOLI, R.; EL-KASHEF, H. MOORMAN, A.; VARANI, K.; GESSI, S.; MERIGHI, S. **Design, Synthesis and Biological Evaluation of C9-and C2 Sbstituted Pyrazole (4,3-e)-1,2,4-triazolo(1,5-c)pyrimidines as New A_{2A} and A₃ Adenosine Receptor Antagonists.** Journal of Medicinal Chemistry, vol. 46, p. 1229 – 1241, 2003.

BORTOLHEIRO, T. C. **Classificações morfológicas das síndromes mielodisblásticas: da classificação Franco-Americana-Britânica (FAB) à classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS).** Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia. Vol. 28, p. 194-197, 2006.

CARBALLO, J.L., HERNÁNDEZ-INDA, Z.L., PÉREZ, P., GARCÍA-GRÁVALOS, M.D. **A comparison between two brine shrimp assays to detect in vitro cytotoxicity in marine natural products.** BMC Biotechnology. 2002.

CHENG, F., LI, W., ZHOU, Y., SHEN, J., WU, Z., LIU, G., LEE, P.W., TANG, Y. **admetSAR: A Comprehensive Source and Free Tool for Assessment of Chemical ADMET Properties.** J. Chem. Inf. Model. 52, 3099–3105, 2012.

DUARTE, C. D.; BARREIRO, E. J.; FRAGA. C. A.; **Privileged Structures: a Useful Concept for the Rational Design of New Lead Drug Candidate.** Mini Review Medicinal Chemistry vol. 15, p. 12-34, 2007.

ELGEMEIE, G.; FATHY, N.; ZAGHARY, W.; FARAG, A. **S-Glycosides in Medicinal Chemistry: Novel Synthesis of Cyanoethylene Thioglycosides and Their Pyrazole Derivatives.** Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids, vol. 36, p. 198 – 212, 2017.

EL-SEHEMI, S. BONDOCK, Y.A. AMMAR. **Transformations of naproxen into pyrazolecarboxamides: search for potent anti-inflammatory, analgesic andulcerogenic agentes.** Medicinal Chemistry Research, vol. 23, p. 827-838, 2014.

FARIA, J. V.; VEGI, P. F.; MIGUITA, A. G. C.; SANTOS, M. S. DOS; BOECHAT, N.; BERNARDINO, A. M. R. **Recently Reported Biological Activities of Pyrazole Compounds**. Bioorganic and Medicinal Chemistry, vol. 25, p. 5891 – 5903, 2017.

FILIMONOV, D.A., LAGUNIN, A.A., GLORIOZOVA, T.A., RUDIK, A.V., DRUZHILOVSKII, D.S., POGODIN, P.V., POROIKOV, V.V. **Prediction of the Biological Activity Spectra of Organic Compounds Using the Pass Online Web Resource**. Chem Heterocycl Comp 50, 444–457, 2014.

FROMTLING, R. A. **Overview of Medically Important Antifungal Azole Derivatives**. Clinical Microbiology Reviews, v. 1, n. 2, p. 187–217, 1988.

GENESCA, E.; RIBERA, J.; RIBERA, J. **Leucemia aguda linfoblástica de precursores T: de la biología a la clínica**. Medicina Clinica.Vol. 144, p. 223-229, 2015.

GLOBAL CANCER OBSERVATORY (GLOBOCAN), 2023. Disponível em <<https://gco.iarc.fr/en>> Acesso em: 20 de jun. de 2023.

GOMPPER, R.; TOEPFL, W. **Carboxylic Acid Derivatives, V. Ketene Derivatives. I. Substituted Dithiocarboxylic Acids and Ketene Mercaptals**. Chemische Berichte, vol. 95, p. 2861-2970, 1962.

INSTITUTO NACIONAL DO CANCER (INCA), 2023. Disponível em: <<https://www.gov.br/inca/pt-br>> Acesso em: 18 de Ago. de 2023.

KADAM, R.; KARPOORMART, B.; OMONDI, H.; CHENIA, D.; RAMJUGERNATH, N. A. **Stereo-selective Synthesis, Structural and Antibacterial Studies of Novel Glycolysated β 2, 3-amino Acid Analogues. 2, 3-amino Acid Analogues**. Medicinal Chemistry Research, vol. 24, p. 3174 – 3193, 2015.

KATRITZKY, A. R.; RACHWAL, S. **Synthesis of Heterocycle Mediated by Benzotriazole. 2 Bicyclic Systems**. American Chemical Society, vol. 111, p. 7063 – 7120, 2011.

KAWAI, H.; YUAN, Z.; TOKUNAGA, E.; SHIBATA, N. **Regioselective Synthesis of Pyrazole Triflones Based on Triflyl Alkyne Cycloadditions.** Organic Letters, vol. 14, No. 20, p. 5330–5333, 2012.

KE, W.; CRIST, R.; CLOGSTON, J.; STERN, S.; DOBROVOLSKAIA, M.; GRODZINSKI, P.; JENSEN, M. **Trends and Patterns in Cancer Nanotechnology Research: A Survey of NCI's caNanoLab and Nanotechnology Characterization Laboratory.** Journal Pre-Proofs. Vol 169, 2022.

KONWAR, M.; SAIKIA, M. HAZARIKA, R.; SARMA, D. **Nickel chloride catalyzed synthesis of pyrazoles and phthalazin-1(2H)-ones from hydrazines at room temperature.** Tetrahedron Letters, vol. 98, p. 135-139, 2022.

KONWAR, M.; HAZARIKA, R. SARMA, D. **Synthetic advances in C(sp²)-H/NeH arylation of pyrazole derivatives through activation/substitution.** Tetrahedron. Vol. 102, p.1234-1254, 2021

KÜÇÜKGÜZEL, Ş. G.; ŞENKARDEŞ, S. **Recent Advances in Bioactive Pyrazoles.** European Journal of Medicinal Chemistry, v. 97, p. 786–815, 2015.

LAGUNIN, A.A., DUBOVSKAJA, V.I., RUDIK, A.V., POGODIN, P.V., DRUZHILOVSKIY, D.S., GLORIOZOVA, T.A., FILIMONOV, D.A., SASTRY, N.G., POROIKOV, V.V. **CLC-Pred: A freely available web-service for in silico prediction of human cell line cytotoxicity for drug-like compounds.** PLoS ONE v. 13, p. 0191838, 2018.

LARENTIS, G. R. **Do Therapeutic Doses of Phenilbutazone Affect Ovulation Processes in Mares?** Journal of Equine Veterinary Science. No. 66, p. 150 – 151, 2018.

LIBRALATO, G., PRATO, E., MIGLIORE, L., CICERO, A.M., MANFRA, L. **A review of toxicity testing protocols and endpoints with Artemia spp.** Ecological Indicators 69, 35–49, 2016.

LIMA, M. C. de; SILVA, D.; FREUND, A. P.; DACOREGIO, J.; COSTA, T.; COSTA, I.; FARACO, D.; SILVA, M. **Acute Myeloid Leukemia: analysis of epidemiological profile and survival rate.** Jornal de Pediatria. Vol. 92, p. 283-289, 2016.

LIU-LIANG, M.; LI-XIA, Q.; LIU, L.; JIE-PING, W. **Nitrogen heterocycle construction in aqueous mediums: A sustainable tool for molecular diversity.** Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry. Vol. 40, 2023.

MALLADI, A. M.; **Synthesis and biological evaluation of newer analogues of 2,5-disubstituted 1,3,4-oxadiazole containing pyrazole moiety as antimicrobial agents.** Arabian Journal Chemistry, vol. 7, p. 1185-1191, 2014.

MEDICINANET, 2023. Disponível em: < <https://www.medicinanet.com.br/> > Acesso em 09 de set. de 2023.

MELO, J. O. F. DONNICI, C. L.; AUGUSTI, R.; FERREIRA, V. F.; SOUZA, M. C.; FERREIRA, M. L. G.; CUNHA, A. C. **Heterocícos 1,2,3-triazólicos: Histórico, Métodos de Preparação, Aplicações e Atividades Farmacológicas.** Química Nova, vol. 29, No. 3, p. 569–579, 2006.

MERDAD, R.; ALYAMI, A.; BASALIM, A.; ALZHRANI, A.; ALDAINIY, A.; AWADH, A.; GHULAM, E.; FARAHAT, F. **Bloodstream gram-negative bacterial infections in adult patients with leukemia: A retrospective review of medical records in a tertiary care hospital in Western Saudi Arabia.** Journal of Infection and Public Health. Vol. 16, p.1525-1530, 2023.

MEYER, B., FERRIGNI, N., PUTNAM, J., JACOBSEN, L., NICHOLS, D., MCLAUGHLIN, J. **Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents.** Planta Med 45, 31–34, 1982.

MONDINO, Mirta Gladis. **Compostos Heterocíclicos: Estudo e Aplicações Sintéticas** – vol. 16. São Paulo, SP: Editora Atheneu, 2014, 205p.

MUHAMMAD, S.; DAS, A.; CHANDRAN, S. C. REVANASIDDAPPA, B.C.; SREERAJ, K. V. **Synthesis, Molecular Docking, and *in-vivo* anti-inflammatory Screening of Novel Substituted Pyrazole Analogues.** Journal of Molecular Structure, v. 1255, p. 415-422, 2022.

NEVES, A. R. das; **Atividade Antileishmania de Compostos Isoxazólicos derivados das Neoligninas Veraguensina, Grandisina e Machilina G.** Dissertação de Mestrado; Mato Grosso do Sul, 2018.

OLIVEIRA, CAROLINE C.; CASTRO, CAROLINA Q.; HÖRNER, R. **Perfil epidemiológico de pacientes com leucemia mielóide aguda: Uma revisão integrativa.** Revista Saúde. Vol. 47, 2021.

OLIVEIRA, A. R. M de; SZCZERBOWSKI, D. **Quinina: 470 anos de História, Controvérsias e Desenvolvimento.** Química Nova, vol. 32, No. 7 p. 1971 – 1974, 2009.

OKAMOTO SHUICHIRO, KEI MIYANO, TOMINARI CHOSHI, NORIHIKO SUGISAWA, TAKASHI NISHIYAMA, RIKI KOTOUGE, MASAHIRO YAMAMURA, MASAKIYO SAKAGUCHI, RIE KINOSHITA. **Inhibition of pancreatic cancer-cell growth and metastasis *in vivo* by a pyrazole compound characterized as a cell-migration inhibitor by an *in vitro* chemotaxis assay.** Journal Biomedicine and Pharmacotherapy. Vol 115, 2022.

RAJABI, S., RAMAZANI, A., HAMIDI, M., NAJI, T. **Artemia salina as a model organism in toxicity assessment of nanoparticles.** DARU J Pharm Sci 23, 20, 2015.

RAHMATZADEH, S. S.; KARAMI, B.; KHODABAKHSHI, S. **A Modified and Practical Synthetic Route to Indazoles and Pyrazoles Using Tungstate Sulfuric Acid.** Journal of the Chinese Chemical Society, v. 62, p. 17–20, 2015.

RAJ, J. P.; GANGAPRASAD, D. KARTHIKEYAN, K.; RENGASAMY, R. KESEVAN, M.; VENKATESWRULU, M.; VAJJIRAVEL, M.; ELANGO VAN, J. **A new route to synthesis of substituted pyrazoles through oxidative [3+2] cycloaddition of electron deficient alkenes and diazocarbonyl compounds.** Tetrahedron Letters, vol. 59, No. 51 p. 4462–4465, 2018.

RUDORF, W.D.; AUGUSTIN, M. **Acylketene-S-S- and Acylketene-S,N-acetals as Building Blocks for Heterocycles: Pyrazoles and Isoxazoles.** Journal fuer Praktische Chemie, vol. 320, p. 585 – 599, 1978.

SAINI, M. S. **A Review: Biological Significances of Heterocyclic Compounds.** International Journal of Pharma Sciences and Research, vol. 4, n. 3, p. 66–77, 2013.

SANGI, D.P. MONTEIRO, L. J.; VANZOLINI, L. K; CASS, B. Q.; PAIXÃO, W. M.; CORRÊA, G.A. **Microwave-Assisted Synthesis of N-Heterocycles and Their Evaluation Using na Acetylcholinesterase Immobilized Capillary Reactor.** Journal Brazilian Chemistry Society, vol. 25, Nol 5, p. 887–889, 2016.

SELVAM, T. P; KUMAR, P.V.; SARAVANAN, G. PRAKASH, C. R. **Microwave-assisted Synthesis, Characterization and Biological Activity of Novel Pyrazole Derivatives.** Journal of Saudi Chemical Society, No. 18, p. 1015–1021, 2014.

SILVA, L. Everson. **Heterociclos Aromáticos Nitrogenados – Síntese e Potencial Quimioterápico.** Dissertação de Mestrado; Santa Catarina, 2006.

SUNG H.; SOERJOMATARAM, I.; AHMEDIN, J.; BRAY, F.; FERLAY, J.; SIEGEL, R.; LAVERSANNE, M. **Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries.** CA Cancer Journal Clin. Vol 71, p.209-249, 2021.

TOMINAGA, Y., HONKAWA, Y., HARA, M., HOSOMI, A. **Syntheses of Pyrazolo(3,4-d)pyrimidine Derivatives Using Ketece dithioacetals.** Journal of Heterocyclic Chemistry, vol. 27, p. 775 – 783, 1990.

VIEGAS JR, C.; BOLZONI, V. S.; BARREIRO, E. J.. **Os produtos naturais e a química medicinal moderna.** Química Nova, vol. 29, No. 2, p. 326-337, 2006.

WAGHULDE, S., KALE, M.K., PATIL, VIJAYR. **Brine Shrimp Lethality Assay of the Aqueous and Ethanolic Extracts of the Selected Species of Medicinal Plants, in: The**

23rd International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry. Presented at the International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry, MDPI, p. 47, 2019.

WEININGER, D. **SMILES, a chemical language and information system. 1. Introduction to methodology and encoding rules.** J. Chem. Inf. Model. 28, 31–36, 1988.

XU, Z.; ZHUANG, Y.; CHEN, Q. **Current scenario of pyrazole hybrids with *in vivo* therapeutic potential against cancers.** European Journal of Medicinal Chemistry. Vol 257, 2023.

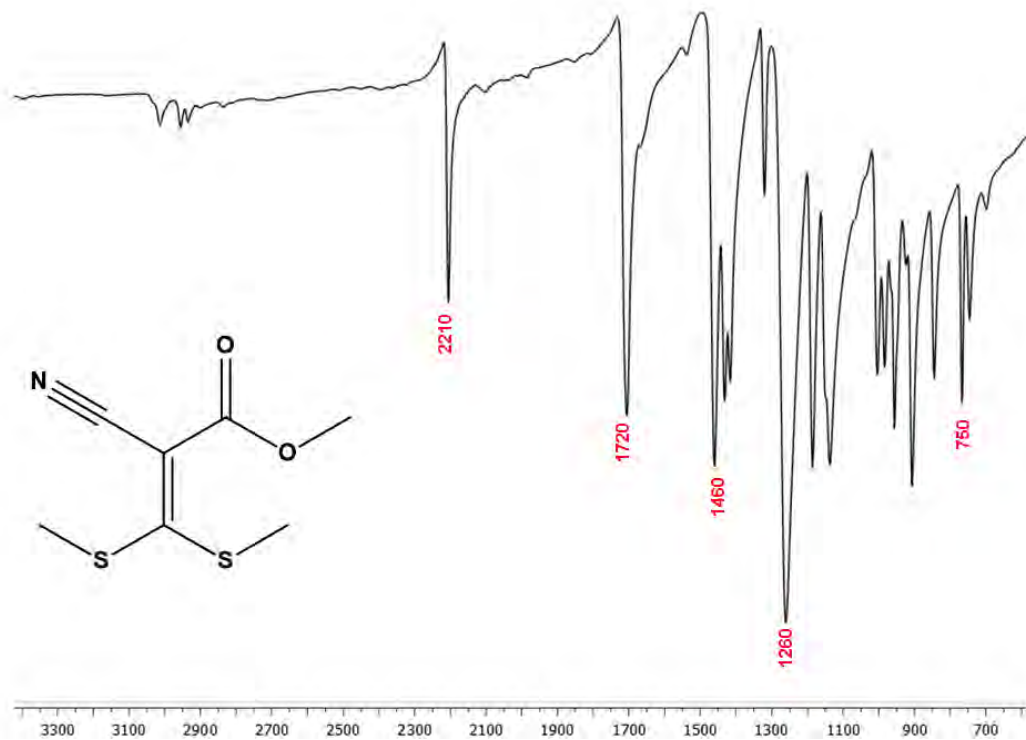
ZHANG, L. **Celecoxib Alleviates Denervation-induced Muscle Atrophy by Suppressing Inflammation and Oxidative Stress and Improving Microcirculation.** Biochemical Pharmacology, vol. 98, p. 1427-1433, 2022.

ANEXOS

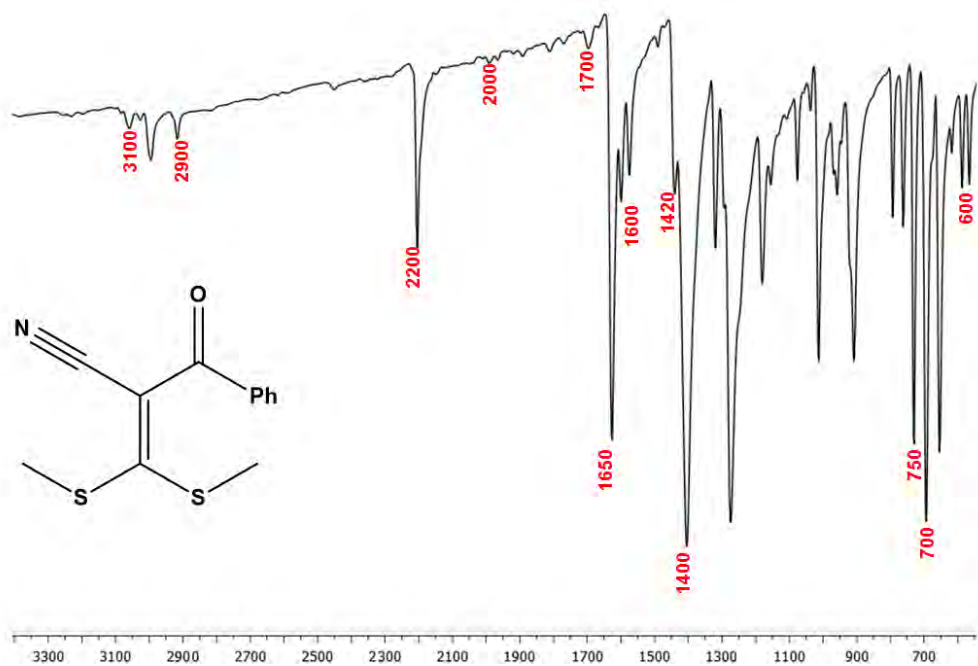
Espectros de FTIR dos precursores nitrilados 46-48	página 107-108
Espectros de FTIR dos pirazóis 53-62	página 108-113
Espectros de RMN de ^1H dos precursores nitrilados 46-48.....	página 114-115
Espectros de RMN de ^1H dos pirazóis 53-62.....	página 115-120
Espectros de RMN de ^{13}C dos precursores nitrilados 46-48.....	página 119-120
Espectros de RMN de ^{13}C dos pirazóis 53-62.....	página 121-127

Anexo A: Espectros de Infravermelho (ATR)

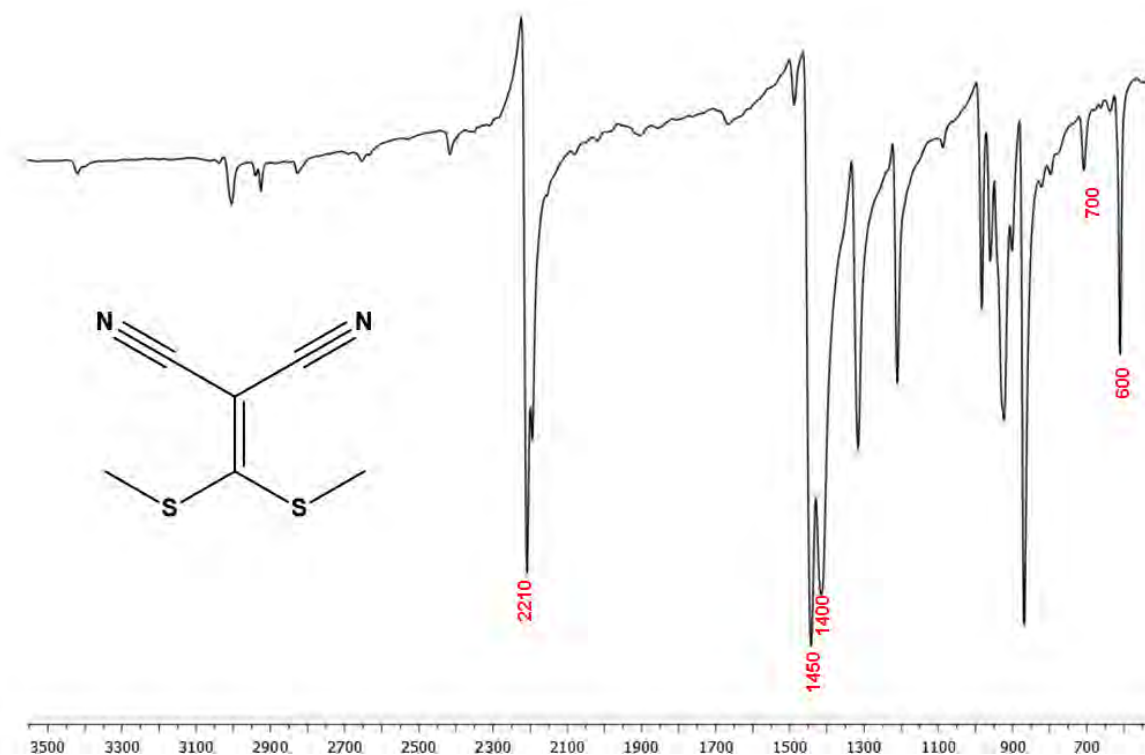
A1) 3,3-bis(metilsulfanil)-2-cianoacrilato de metila (46).



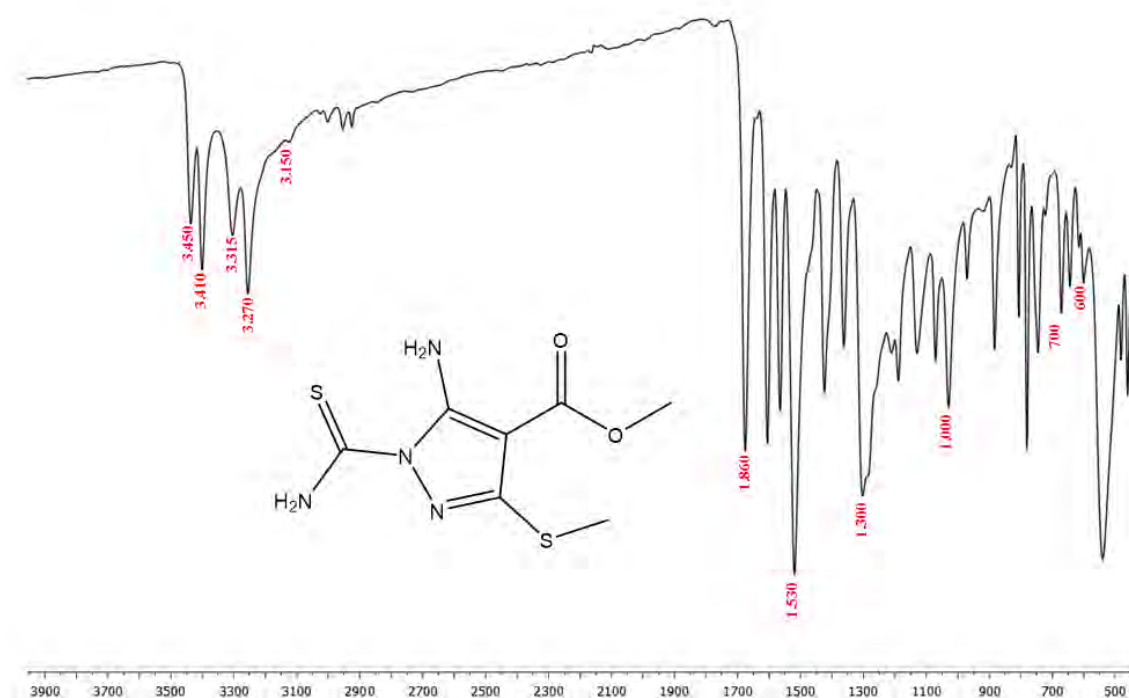
A2) 2-benzoyl-3,3-bis(methylthio)-acrylonitrile (47).



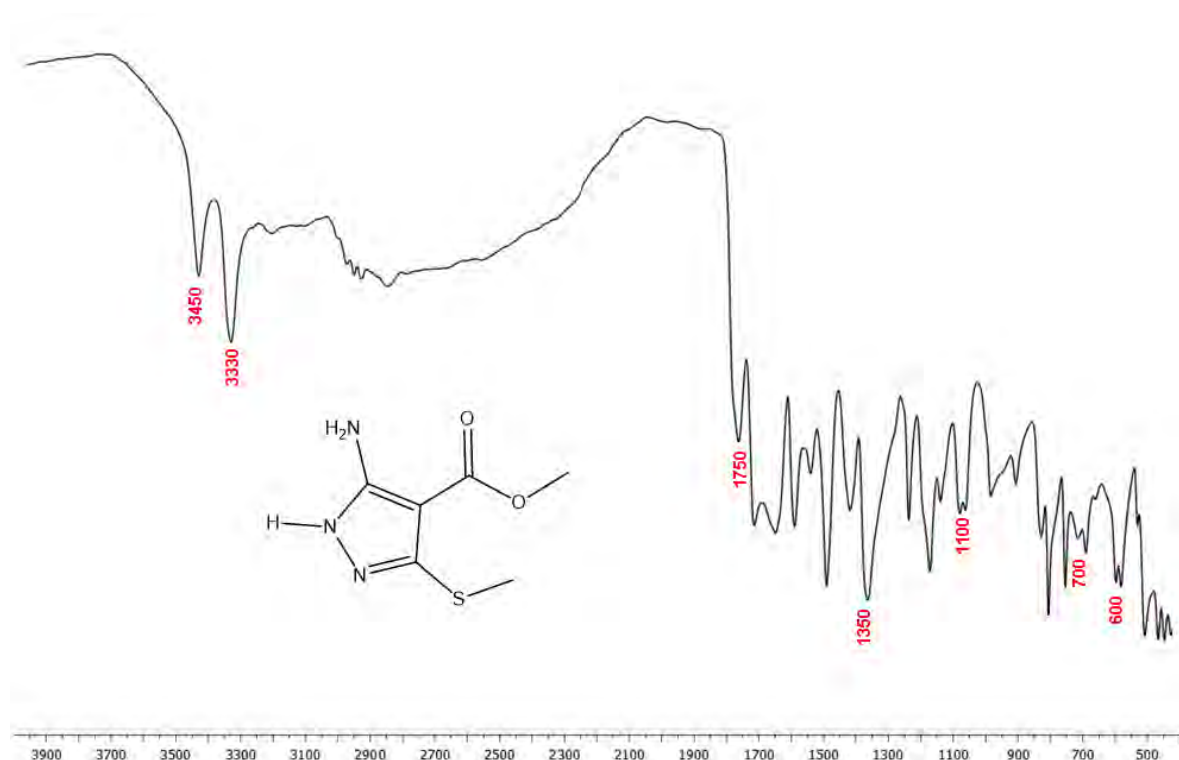
A3) 2-((bis-metilsulfanil)metileno-malononitrila (48):



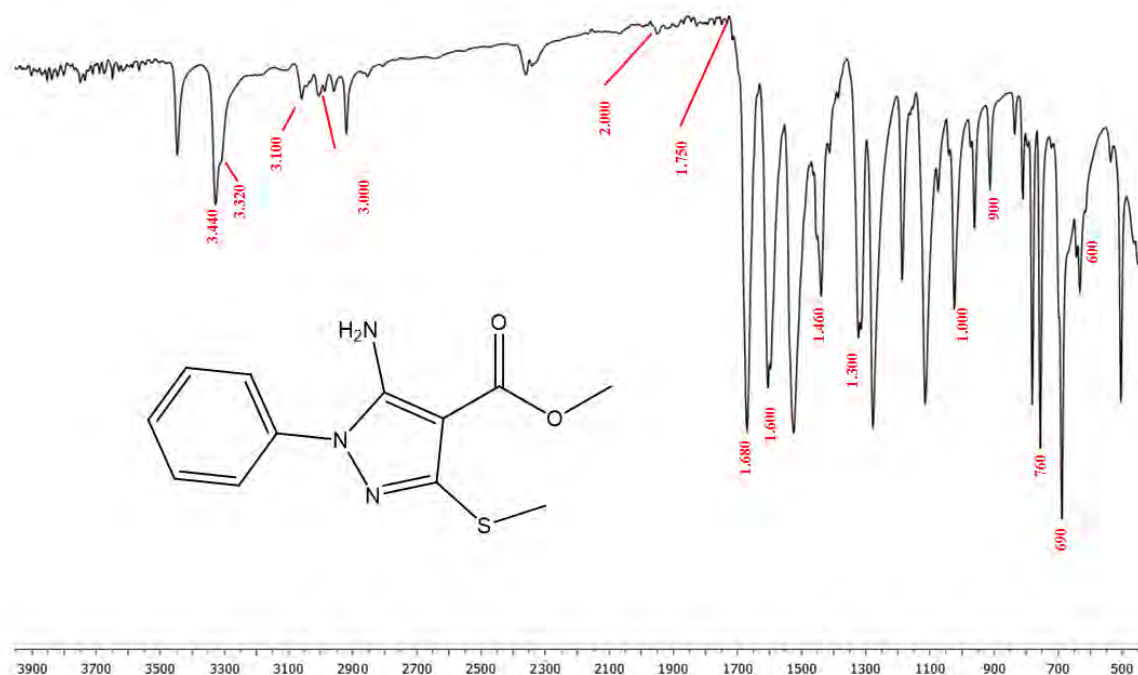
A4) 5- amino-1-carbamotioil-3-metilsulfanil-1H-pirazol-4-carboxilato de metila (53):



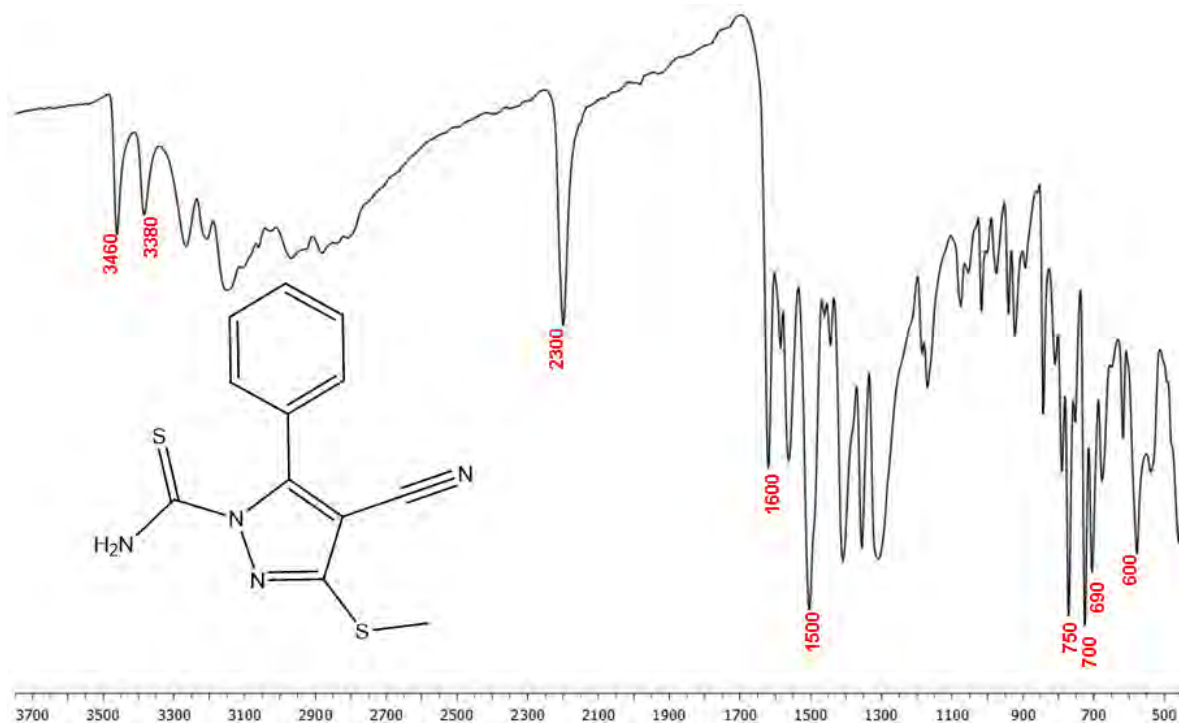
A5) 5-amino-3-metilsulfanil-1H-pirazol-4-carboxilato de metila (54):



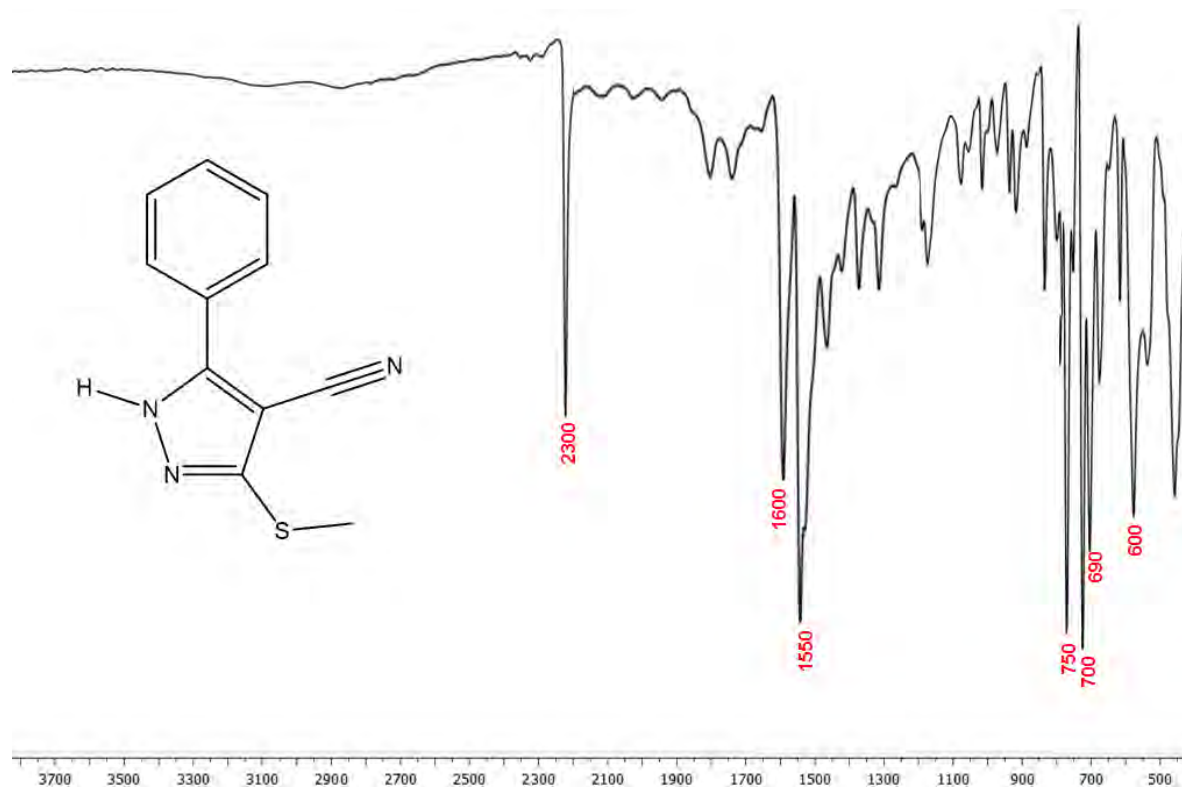
A6) 5-amino-1-fenil-3-metilsulfanil-1H-pirazol-4-carboxilato de metila (55):



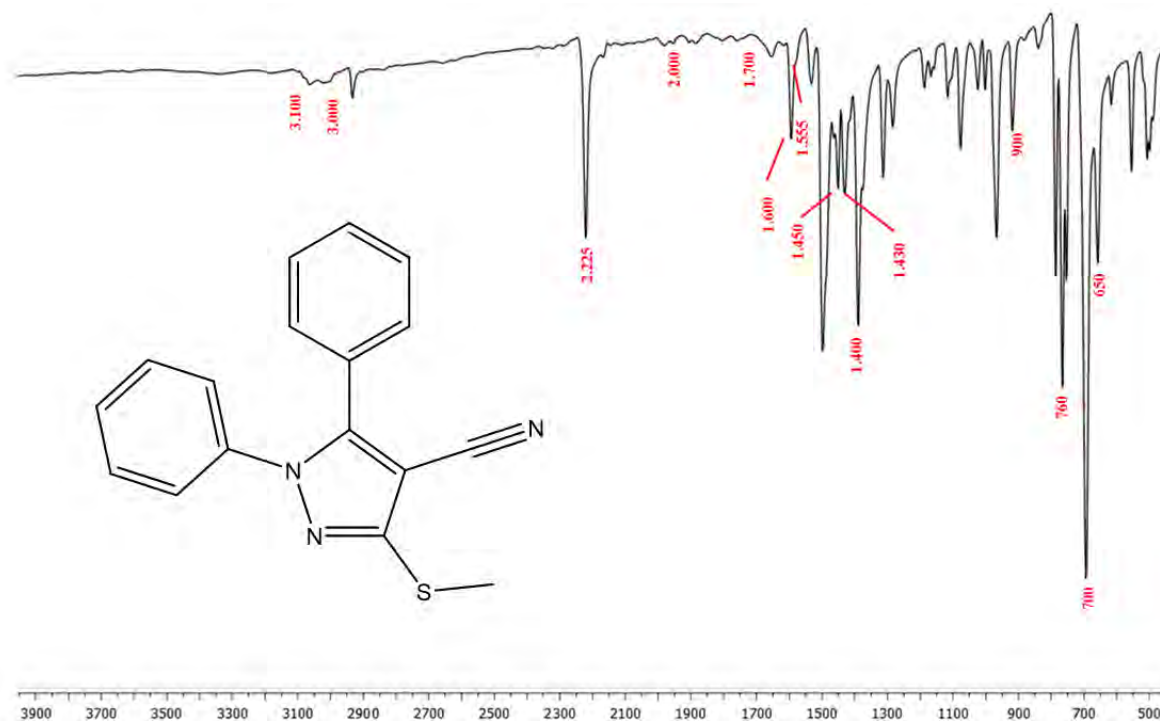
A7) 4-ciano-3-metilsulfanil-5-fenil-1H-pirazol-1-carbotioamida (56):



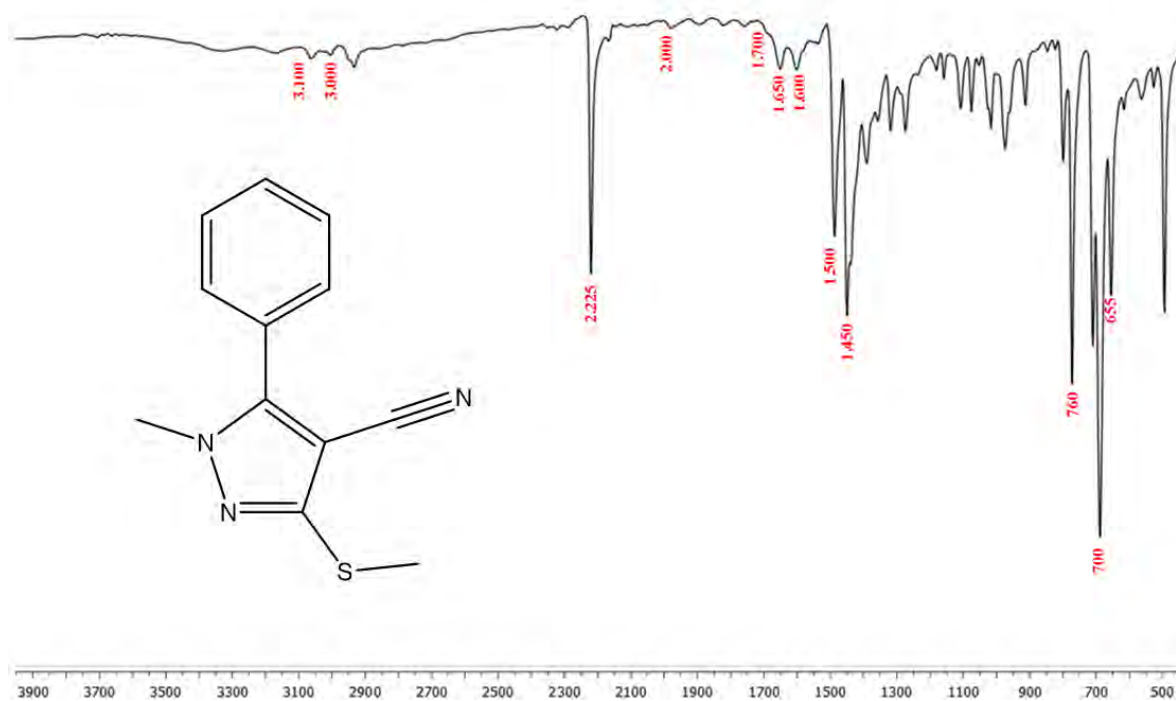
A8) 3-metilsulfanil-5-fenil-1H-pirazol-4-carbononitrila (57):



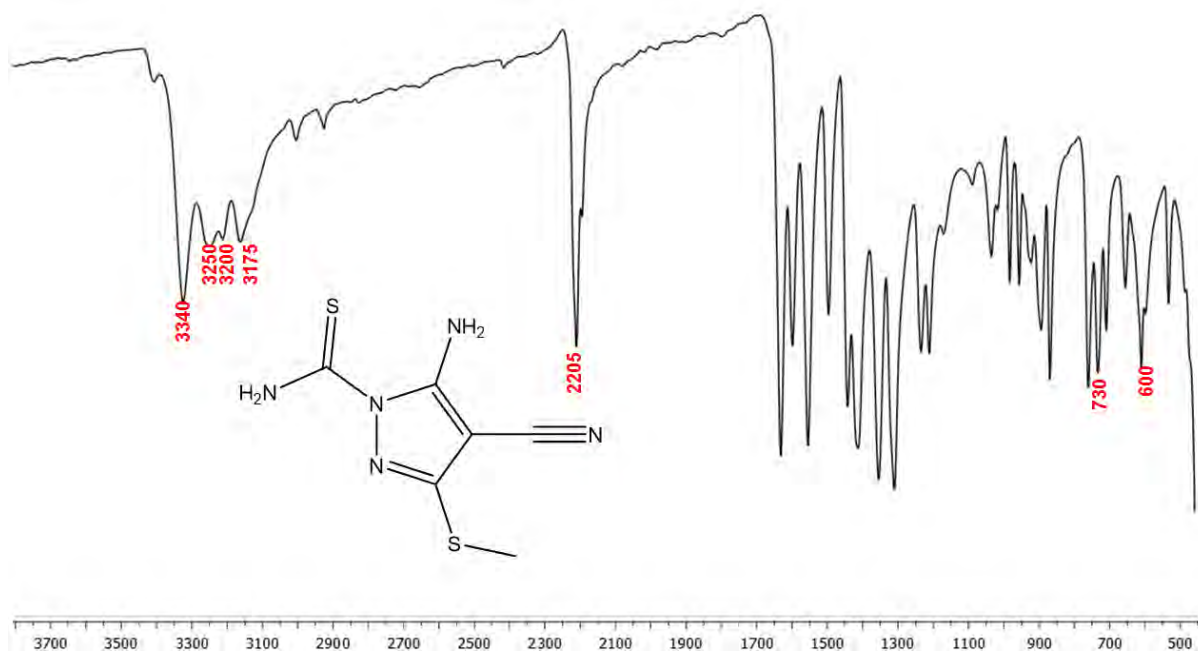
A9) 5-metilsulfanil-1,3-difenil-4-carbonitrila (58):



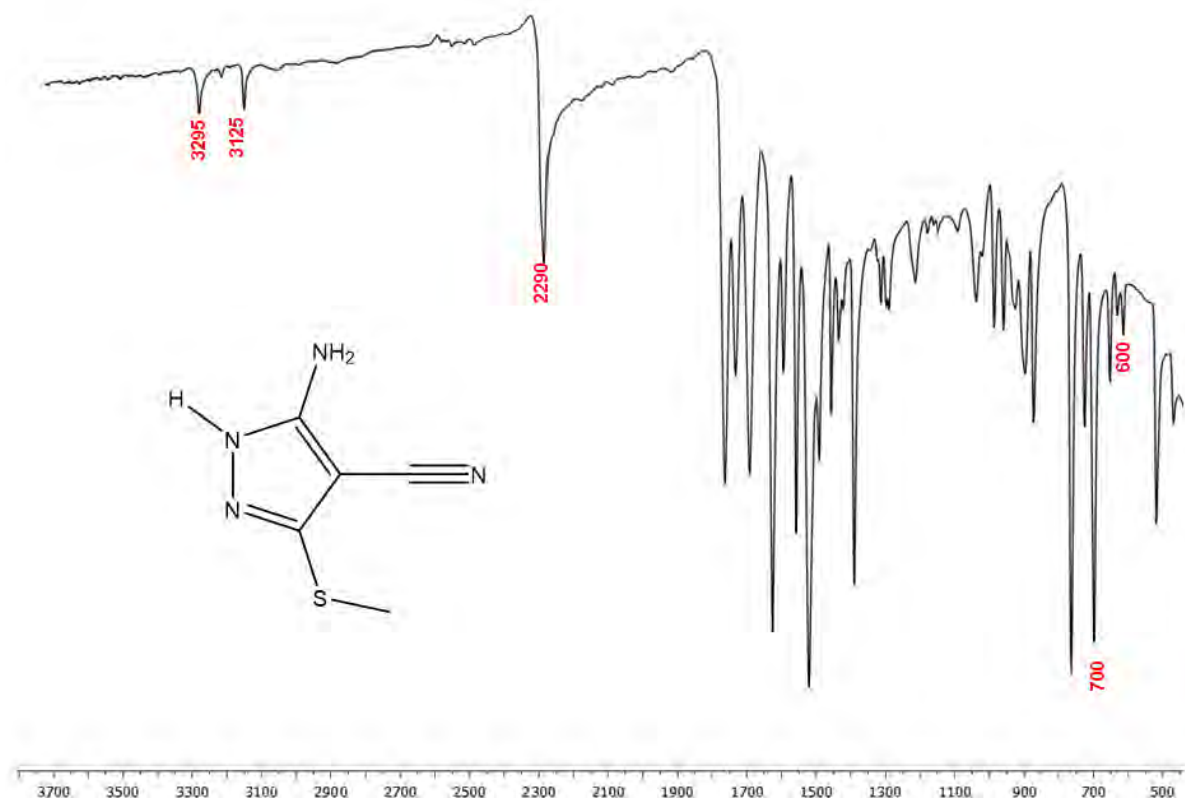
A10) 5-metilsulfanil-1-metil-3-fenil-1H-pirazol-4-carbonitrila (59):



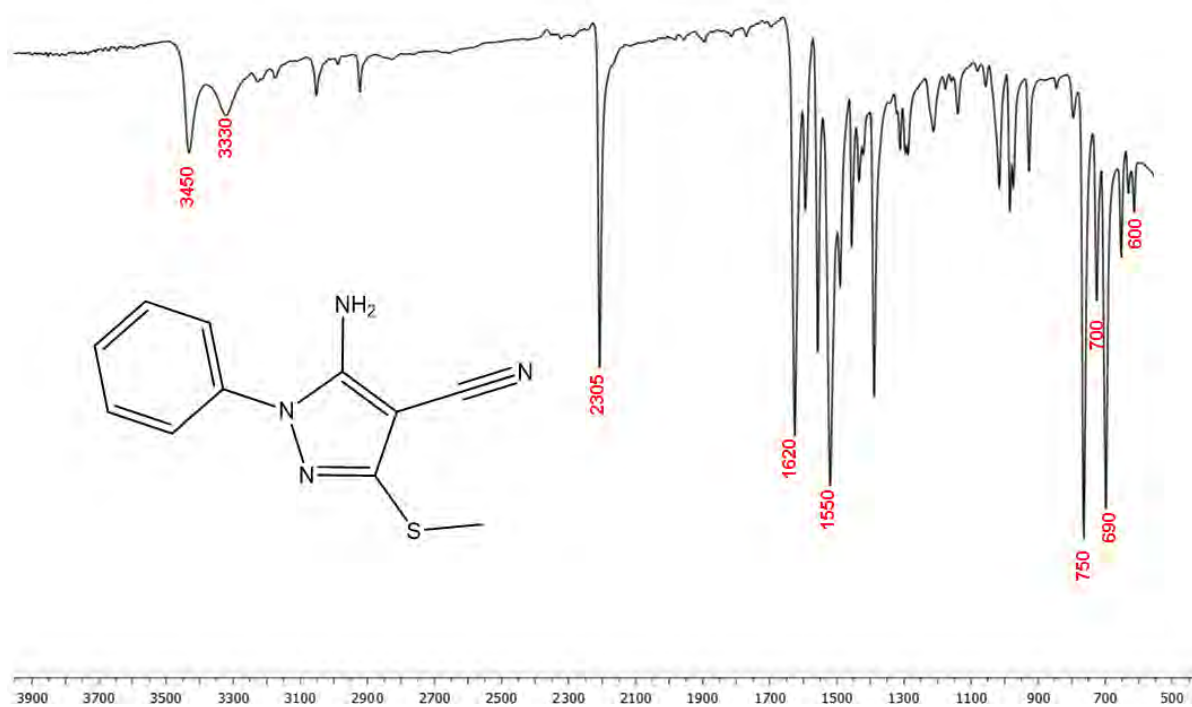
A11) 5-amino-4-ciano-3-metilsulfanil-1H-pirazol-1-carbotioamida (60):



A12) 5-amino-3-metilsulfanil-1H-pirazol-4-carbonitrila (61):

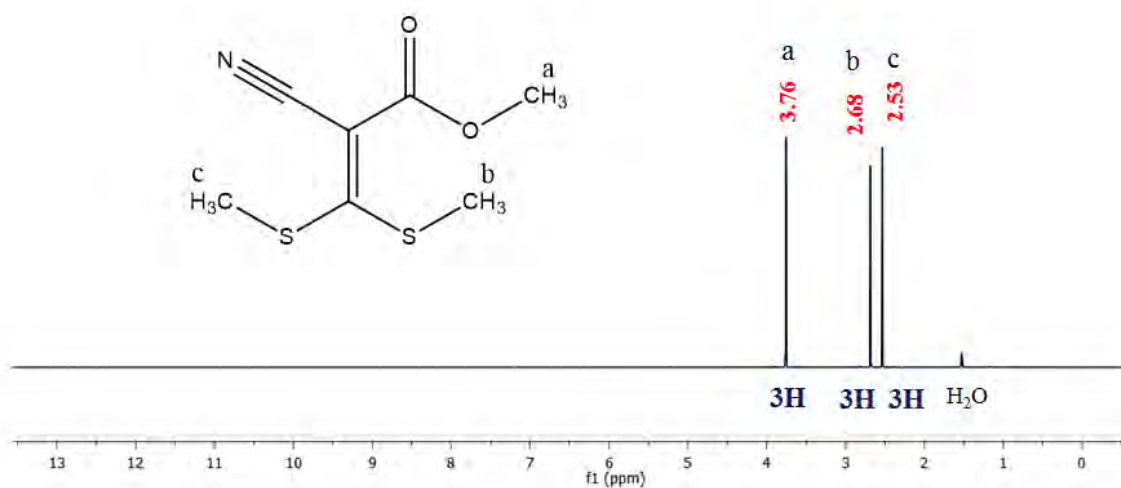


A13) 5-amino-3-metilsulfanil-1-fenil-1H-pirazol-4-carbonitrila (62):

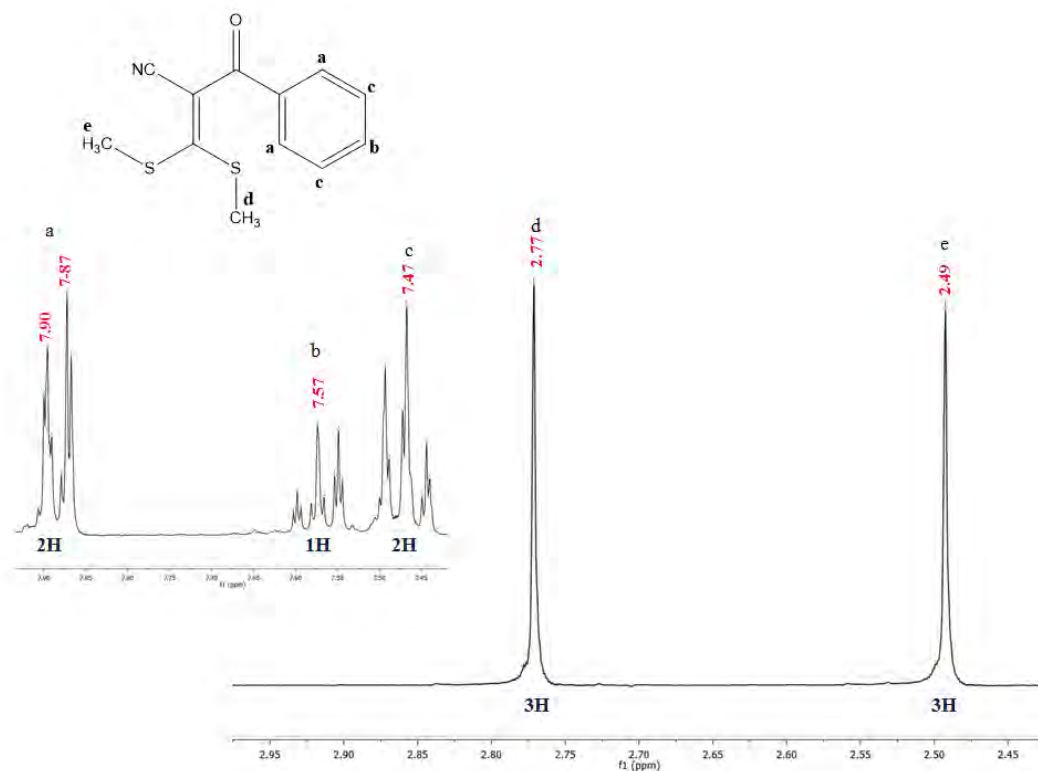


Anexo B: Espectros de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H (500 MHz, CDCl_3)

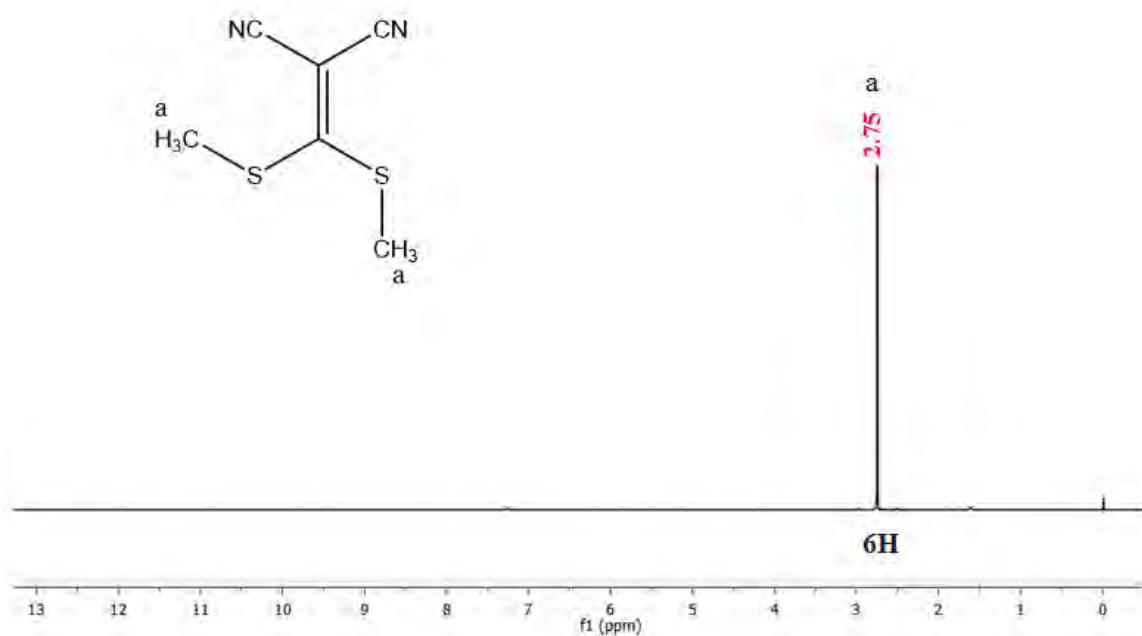
B1) 3,3-bis(metilsulfanil)-2-cianoacrilato de metila (46).



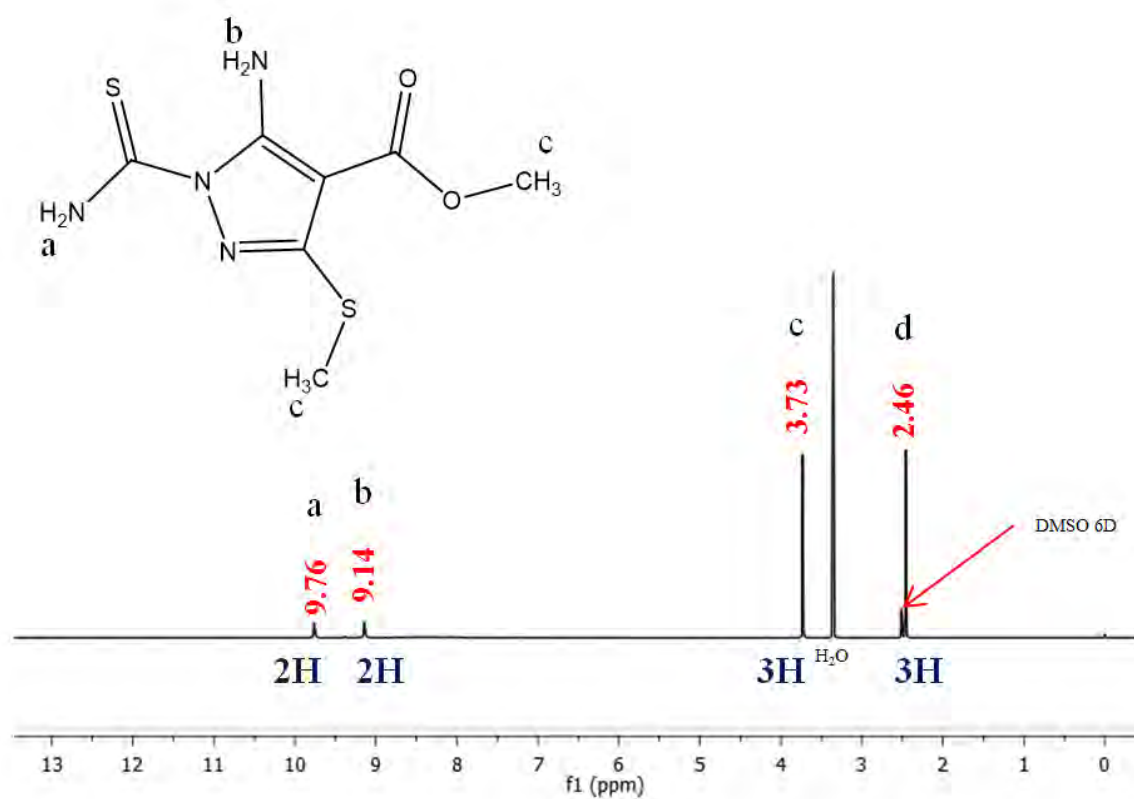
B2) 2-benzoil-3,3-bis(metilsulfanil)-acrilonitrila (47) com expansão em 7.90-7.45 ppm.



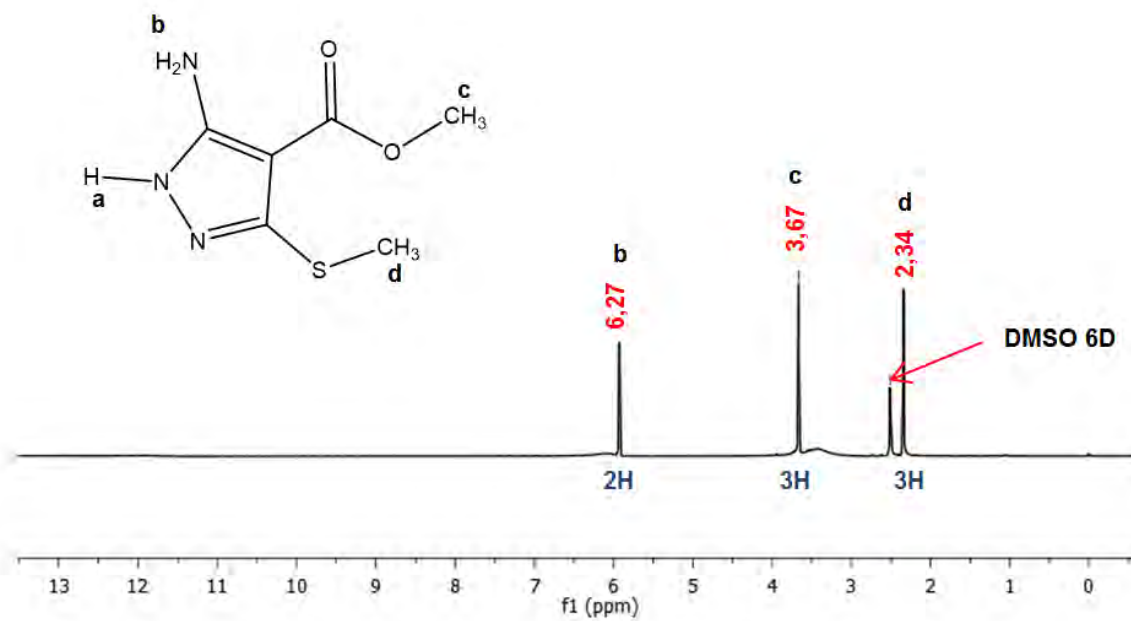
B3) 2-((bis-metilsulfanil)metileno-malononitrila (48):



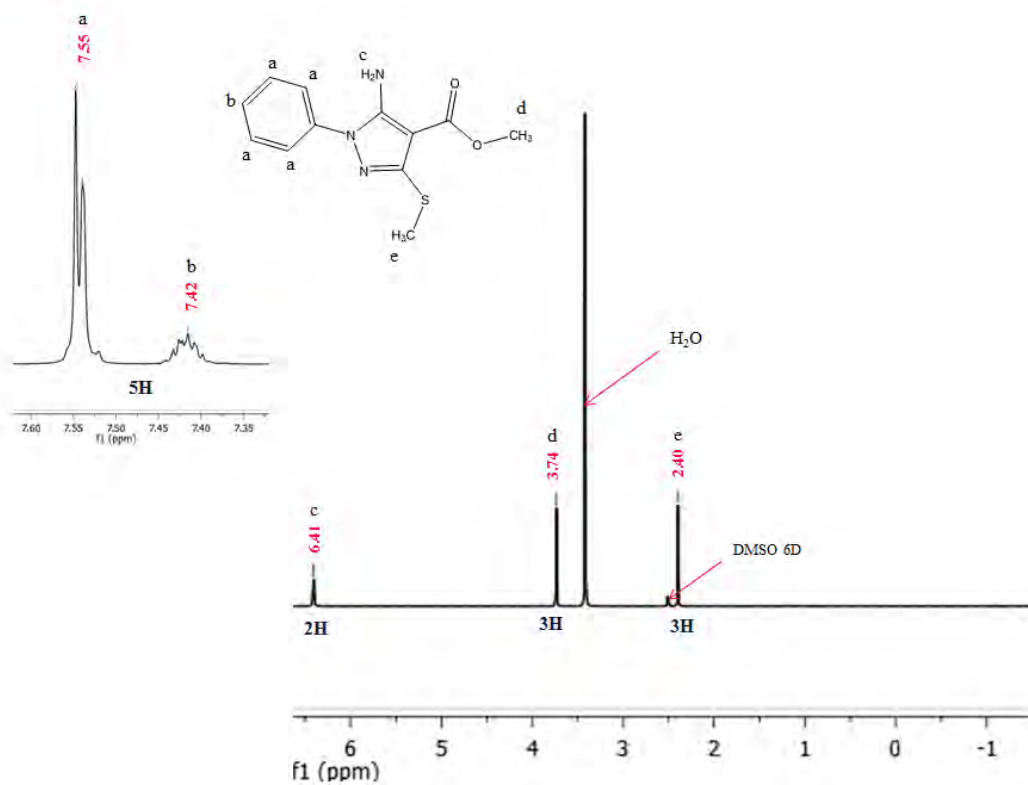
B4) 5- amino-1-carbamotioil-3-metilsulfanil-1H-pirazol-4-carboxilato de metila (53):



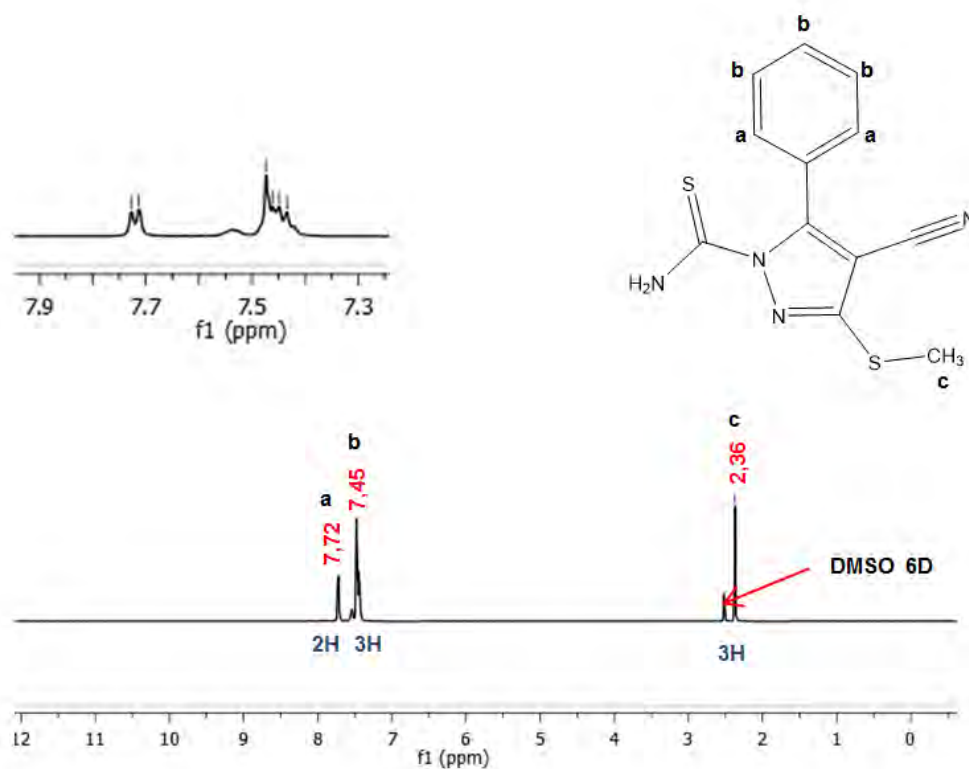
B5) 5-amino-3-metilsulfanil-1H-pirazol-4-carboxilato de metila (54):



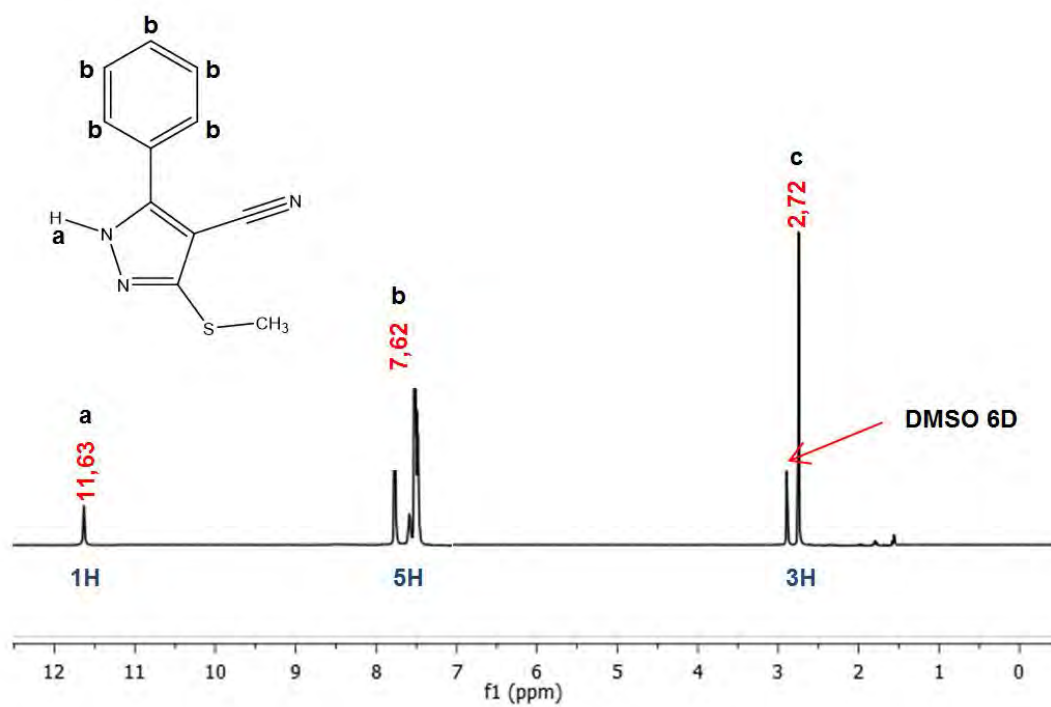
B6) 5-amino-1-phenyl-3-methylthio-1H-pyrazol-4-carboxilato de metila (55):



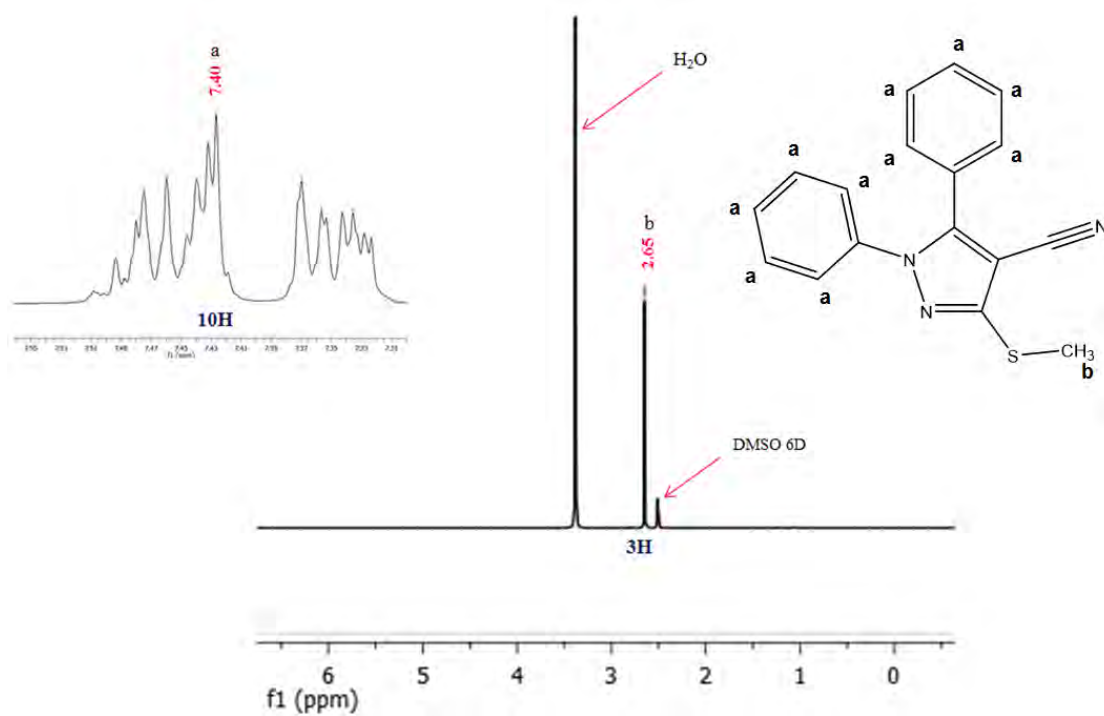
B7) 4-ciano-3-metilsulfanil-5-fenil-1H-pirazol-1-carbotioamida (56):



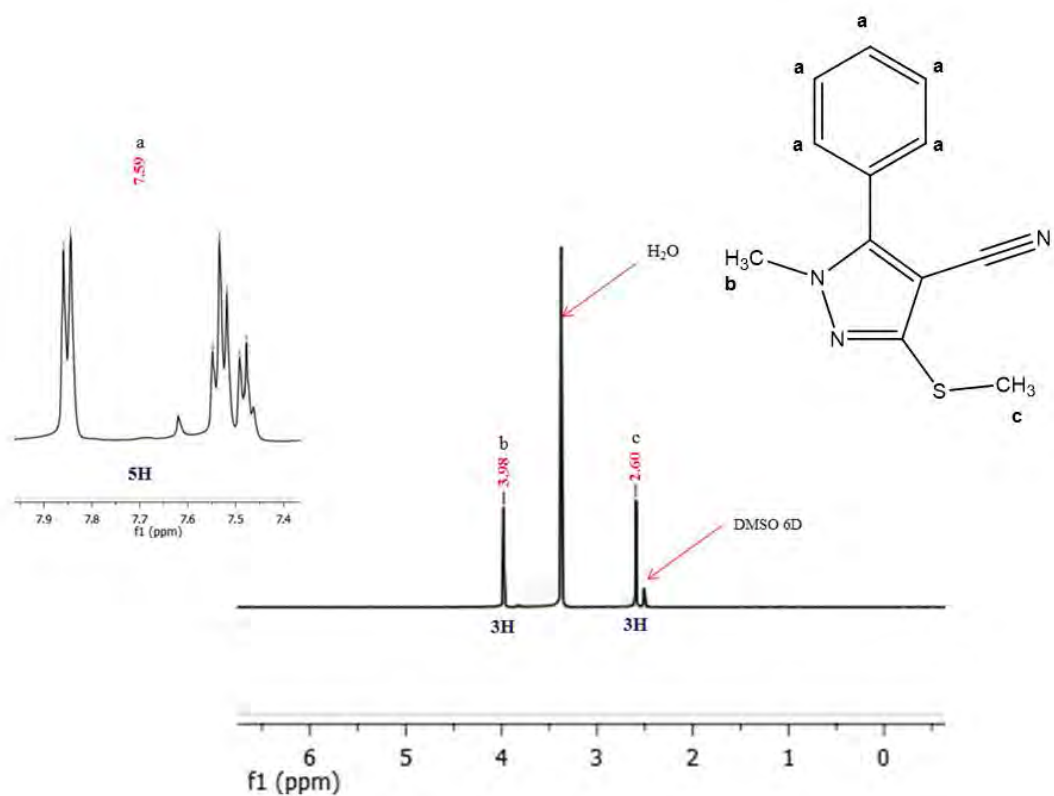
B8) 3-metilsulfanil-5-fenil-1H-pirazol-4-carbononitrila (57):



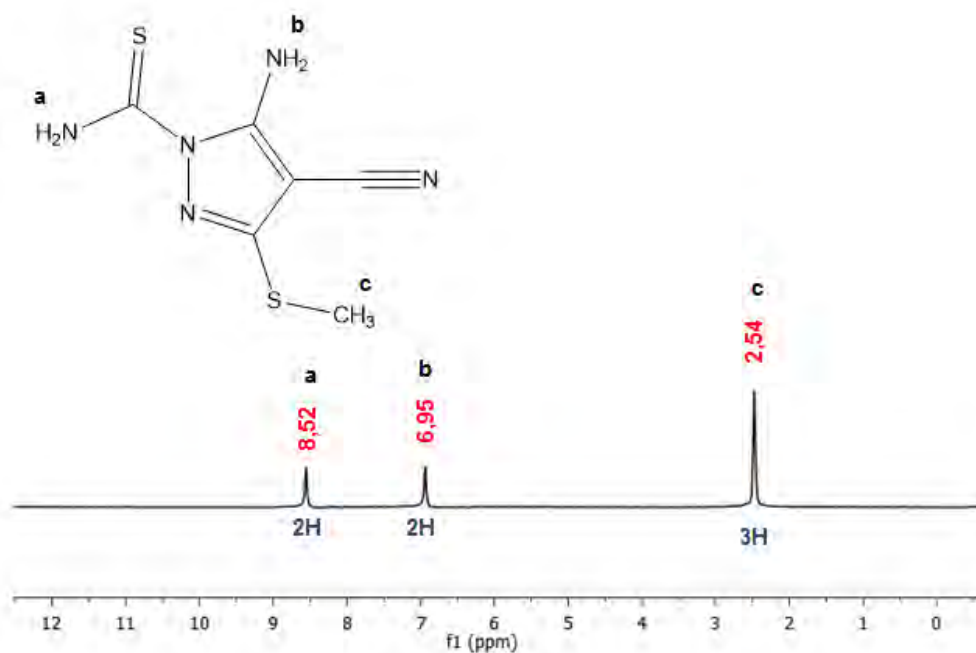
B9) 5-metilsulfanil-1,3-difenil-4-carbonitrila (58):



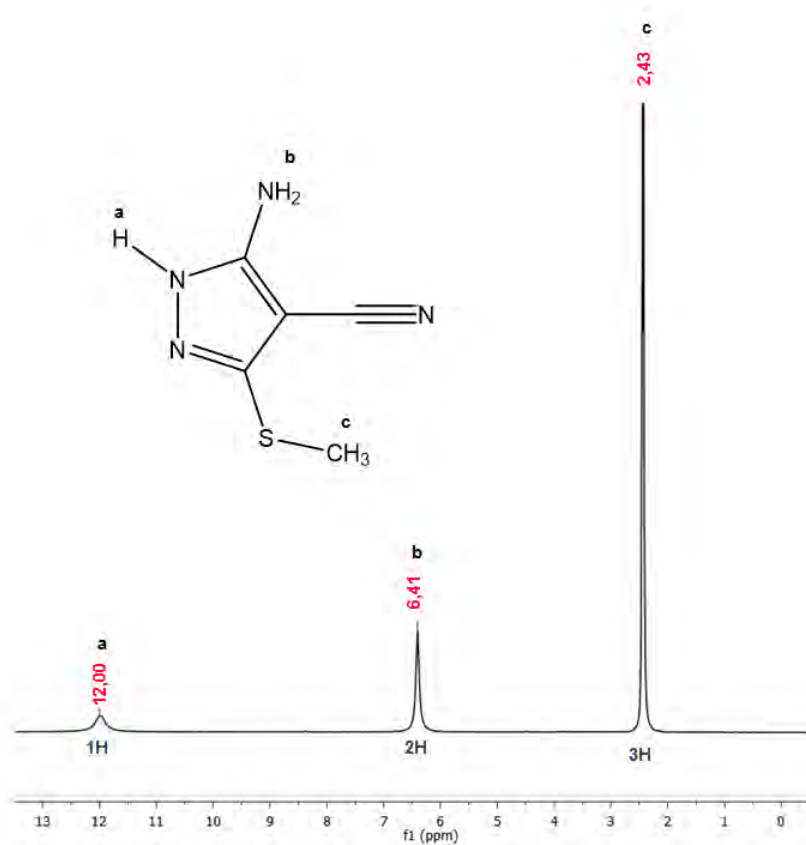
B10) 5-metilsulfanil-1-metil-3-fenil-1H-pirazol-4-carbonitrila (59):



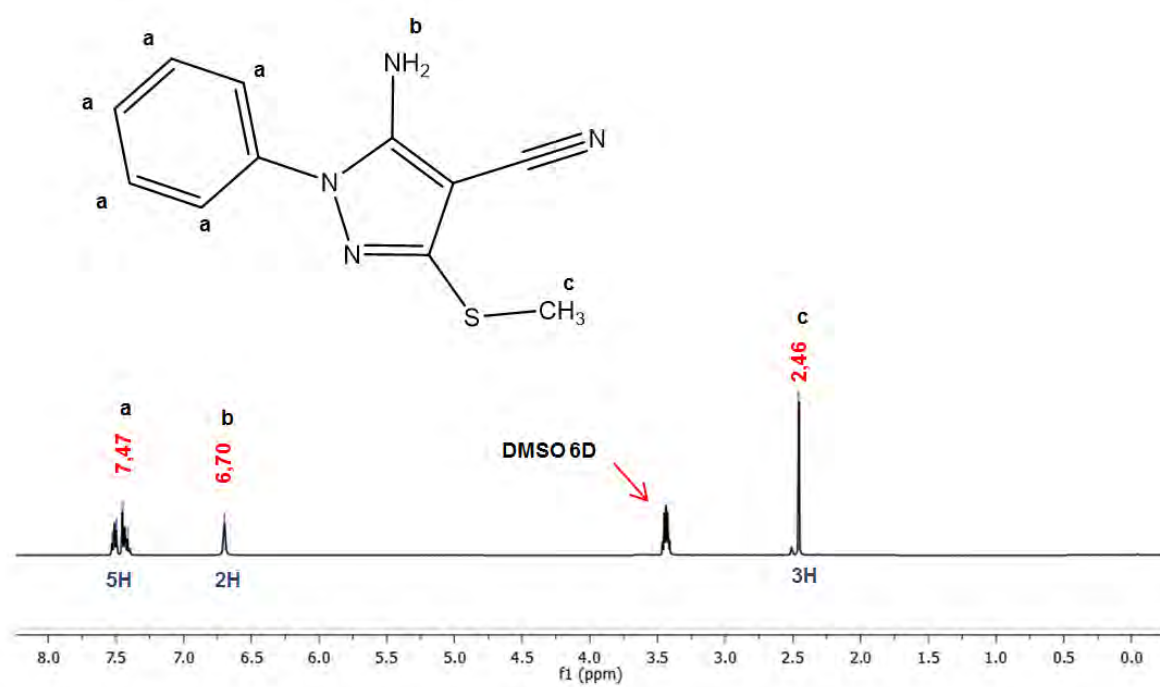
B11) 5-amino-4-ciano-3-metilsulfanil-1H-pirazol-1-carbotioamida (60):



B12) 5-amino-3-metilsulfanil-1H-pirazol-4-carbonitrila (61):

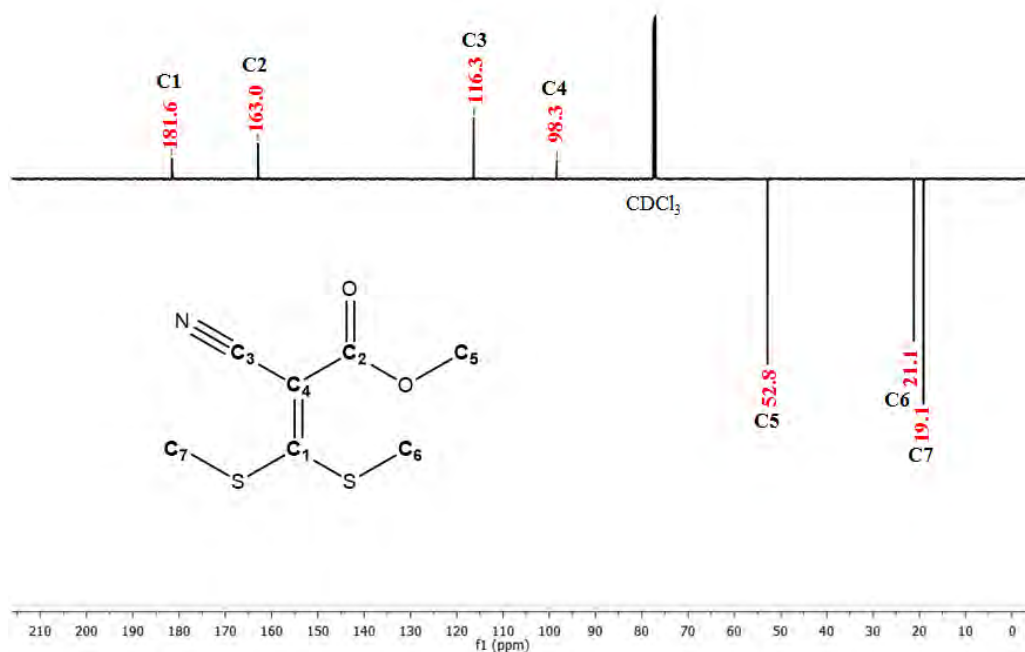


B13) 5-amino-3-metilsulfanil-1-fenil-1H-pirazol-4-carbonitrila (62):

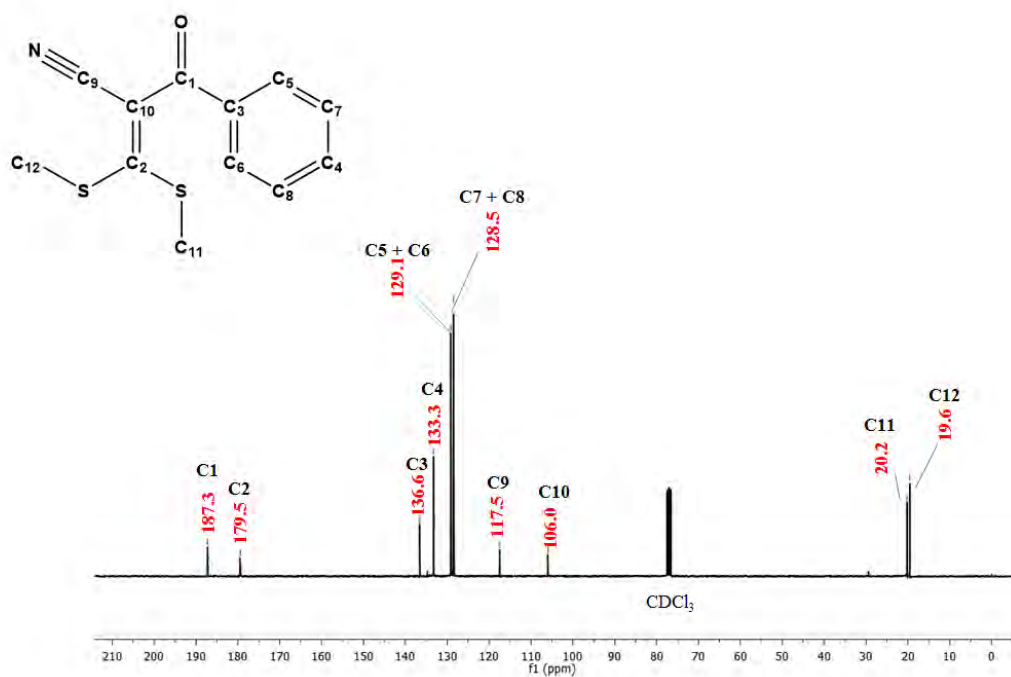


Anexo C: Espectros de Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C (126 MHz, CDCl_3)

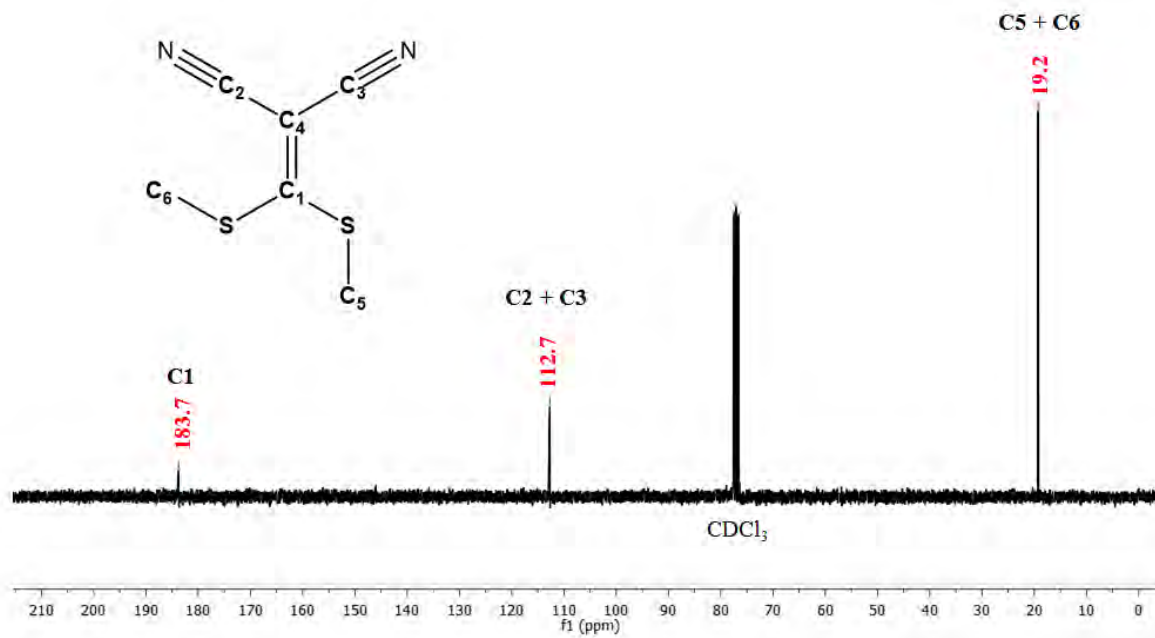
C1) 3,3-bis(metilsulfanil)-2-cianoacrilato de metila (46).



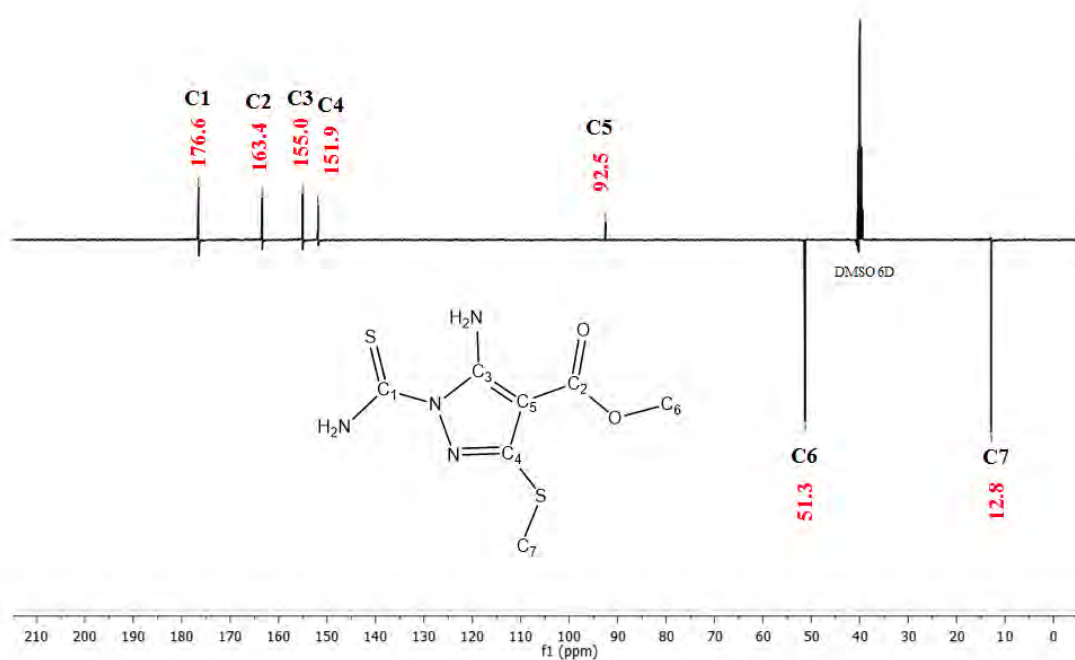
C2) 2-benzoyl-3,3-bis(methylsulfanyl)-acrylonitrile (47).



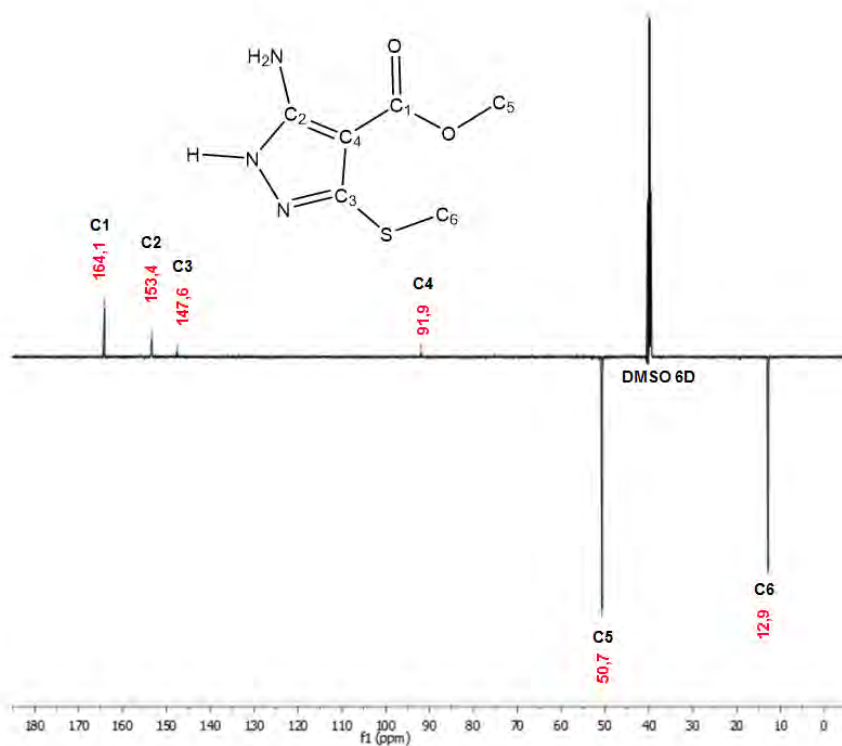
C3) 2-((bis-metilsulfanil)metileno-malononitrila (48):



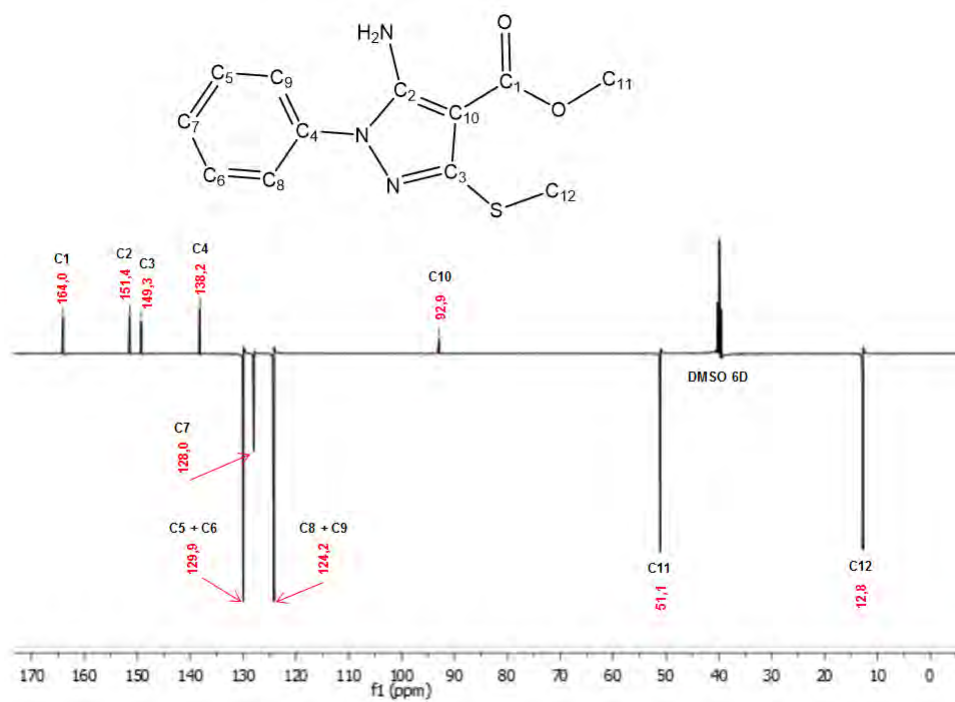
C4) 5- amino-1-carbamotioil-3-metilsulfanil-1H-pirazol-4-carboxilato de metila (53):



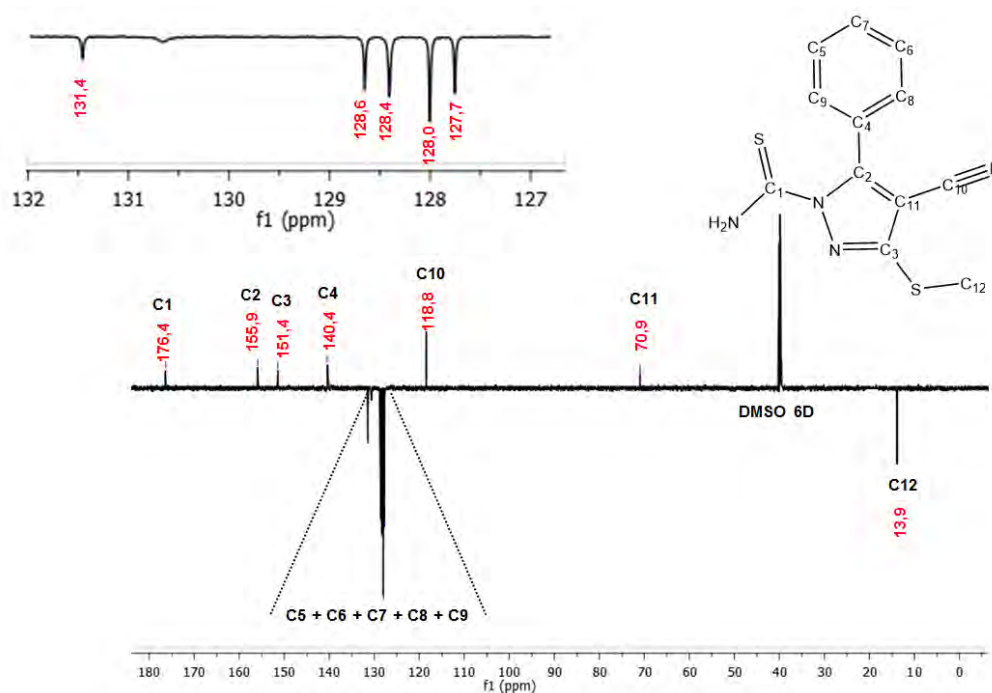
C5) 5-amino-3-metilsulfanil-1H-pirazol-4-carboxilato de metila (54):



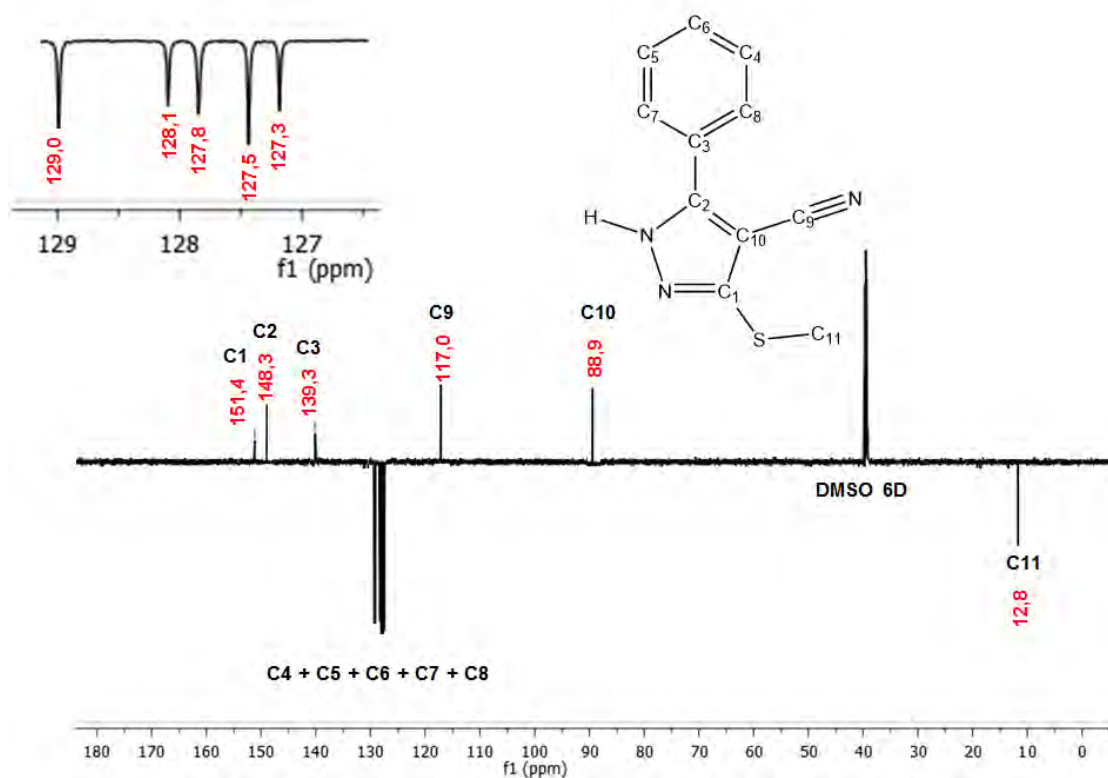
C6) 5-amino-1-phenil-3-metilsulfanil-1H-pirazol-4-carboxilato de metila (55):



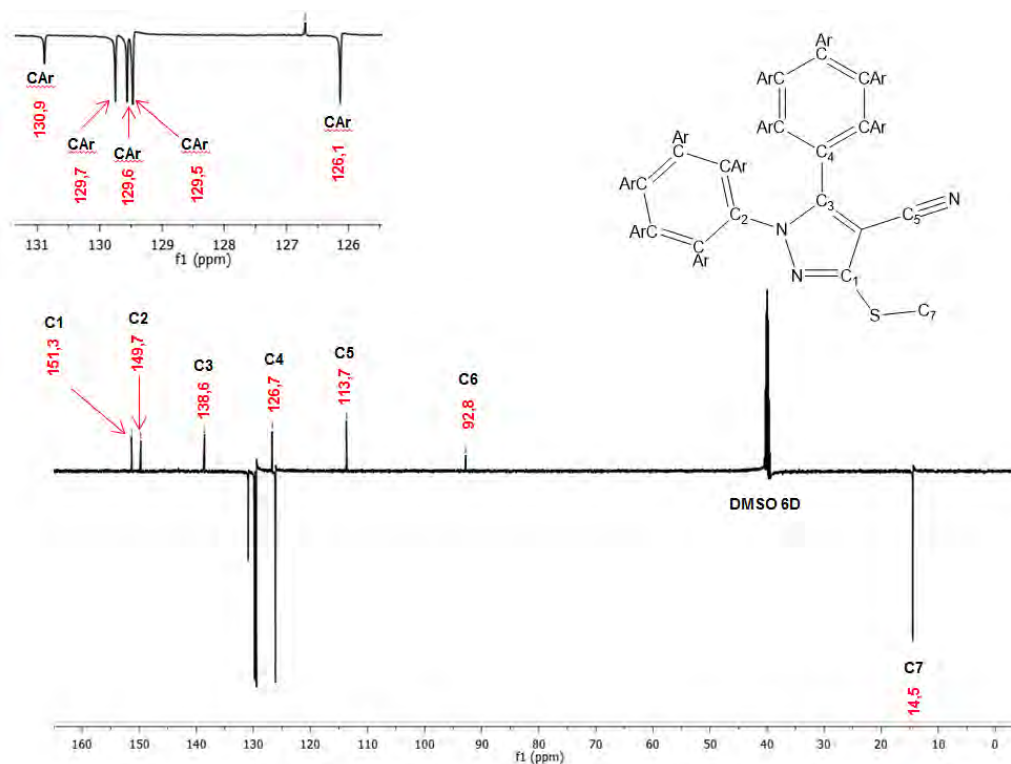
C7) 4-ciano-3-metilsulfanil-5-fenil-1H-pirazol-1-carbotioamida (56):



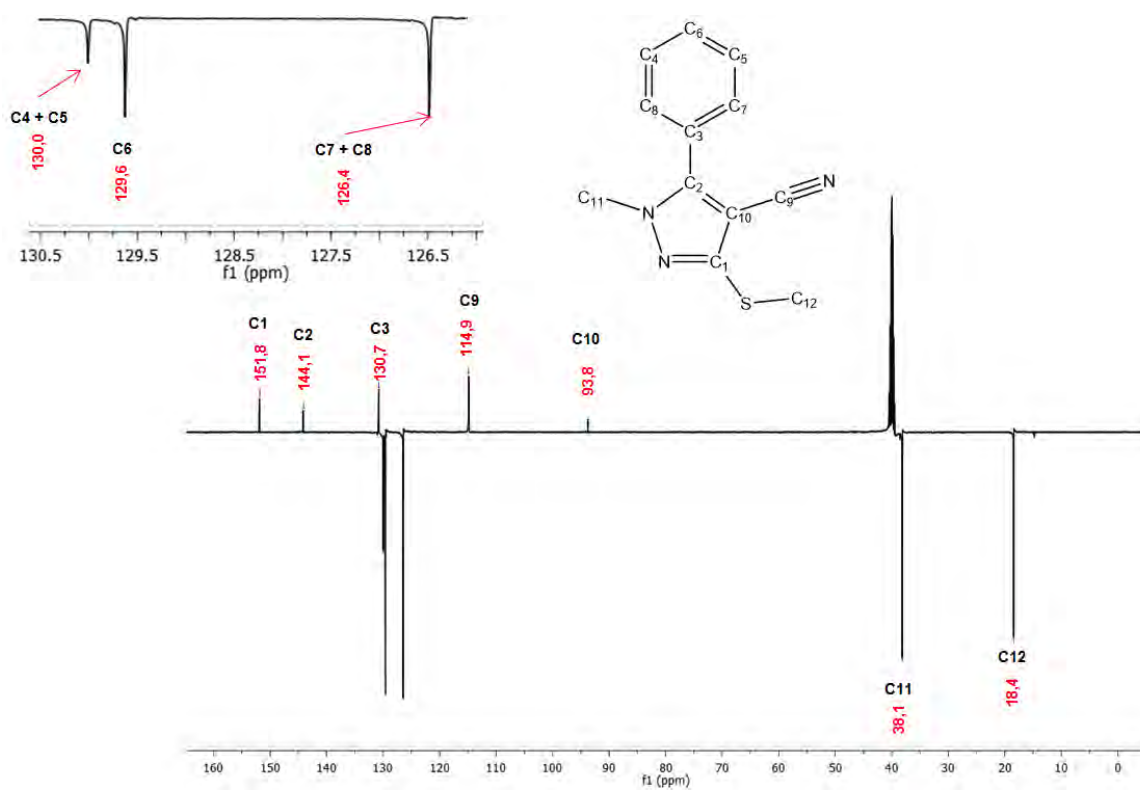
C8) 3-metilsulfanil-5-fenil-1H-pirazol-4-carbononitrila (57):



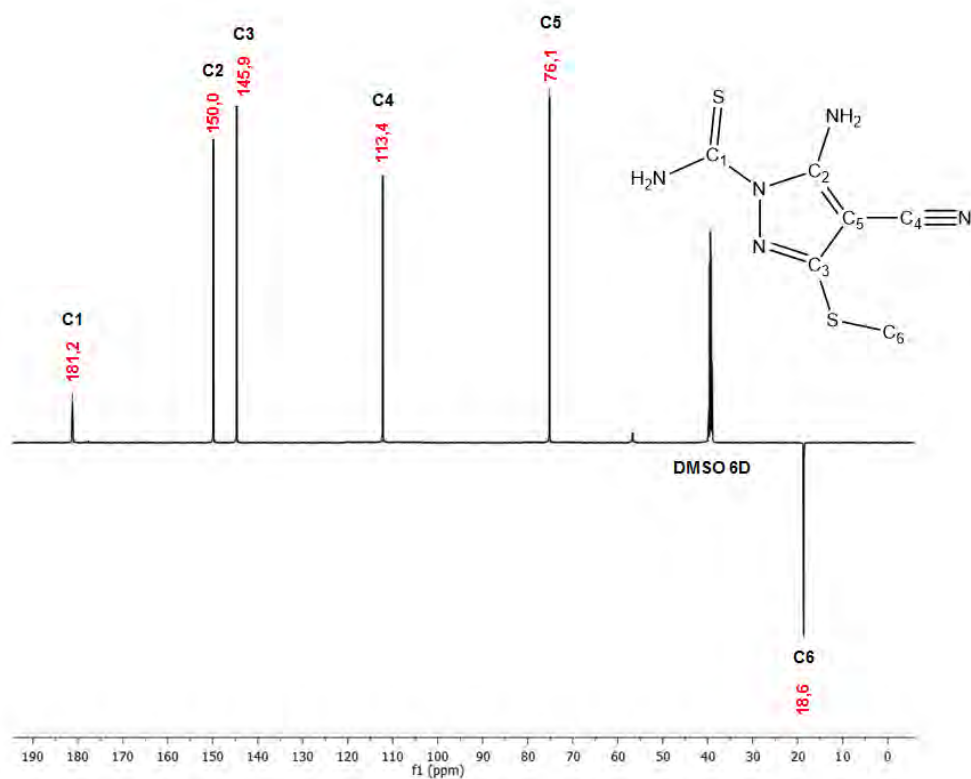
C9) 5-metilsulfanil-1,3-difenil-4-carbonitrila (58):



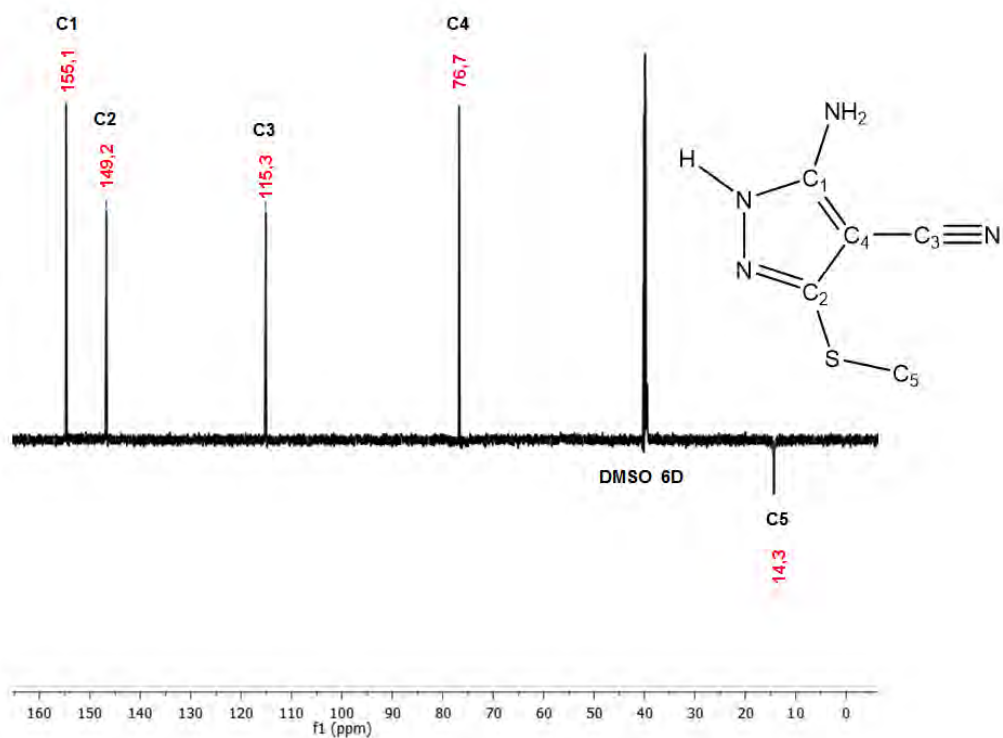
C10) 5-metilsulfanil-1-metil-3-fenil-1H-pirazol-4-carbonitrila (59):



C11) 5-amino-4-ciano-3-metilsulfanil-1H-pirazol-1-carbotioamida (60):



C12) 5-amino-3-metilsulfanil-1H-pirazol-4-carbonitrila (61):



C13) 5-amino-3-metilsulfanil-1-fenil-1H-pirazol-4-carbonitrila (62):

