



Serviço Público Federal
Ministério da educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE NOVOS DERIVADOS DA 4-AMINOANTIPIRINA

Ingridhy Ostaciana Maia Freitas Da Silveira

Prof. Dr. Roberto da Silva Gomes

Campo Grande – 2018



Serviço Público Federal
Ministério da educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE NOVOS DERIVADOS DA 4-AMINOANTIPIRINA

Ingridhy Ostaciana Maia Freitas Da Silveira

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul para obtenção do título de Doutora em Química (área de concentração Química Orgânica).

Prof. Dr. Roberto da Silva Gomes

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: SILVEIRA, Ingridhy Ostaciana Maia Freitas.

Título: Síntese e teste antimicrobiano de derivados do ácido *N*-(4-antipiril) maleâmico

Tese apresentada como um dos requisitos para obtenção do grau de Doutora em Química, junto ao programa de Pós-Graduação em Química do Instituto de Química da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof.Dr.: _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Agradecimentos

Sempre agradecerei primeiramente a Deus pelas oportunidades que me foram dadas, estudo, saúde, felicidade, segurança, força, fé e outras milhares de coisas, que só ele como pai nos abençoa.

No doutorado eu tive a oportunidade de crescer muito profissionalmente, e a isso eu agradeço aos meus professores e a qualquer outro profissional que tenha contribuído para minha pesquisa durante esses quatro anos.

Agradecer a minha família de sangue, a TODOS meus amigos de fora da universidade e a minha família do LP4, pois foi o único lugar que durante algum tempo eu esquecia os meus problemas e me sentia acolhida pelo carinho das pessoas maravilhosas que ali estavam, agradeço a TODOS. Cada um teve um papel importante nessa história.

Grande agradecimento ao meu amigo e orientador Roberto da Silva Gomes e ao co-orientador Adilson Beatriz, por transmitirem seus conhecimentos, experiências e pelas orientações.

Cristiane Winck, eu nunca esquecerei todos os momentos que você esteve ao meu lado irmanita, pelos conselhos, por transmitir sempre o melhor que você tem e por ser parte da minha história. Quando eu crescer, quero ter a sua força e determinação, muito obrigada por tudo.

Amiguinhas mais que especiais na minha vida Tairine Pimental, Suely Copini, Ingrid Duarte, Lyvia Moura, Aline Naujorsk, Rosangela Lopes, Rejane, uma mais diferente que a outra, mas todas tem uma coisa em comum, são inesquecíveis.

Muito obrigada a TODOS!!

RESUMO

A 4-aminoantipirina tem sido utilizada como bloco de construção na síntese orgânica, com modificações principalmente nos substituintes do anel pirazolona. Adicionalmente, compostos heterocíclicos derivados da pirazolona apresentam numerosas aplicações farmacológicas, tais como, analgésicos, antipiréticos, antiartríticos, anti-inflamatórios, e antioxidantes. A união de fragmentos estruturais com atividade biológica comprovada pode melhorar a eficácia desses candidatos a fármacos, bem como aumentar a sua viabilidade celular e diminuir os efeitos tóxicos no organismo. Desde que a Organização Mundial da Saúde tornou público em 2017, a necessidade de produção de novos compostos potencialmente ativos contra bactérias multirresistentes, é considerado relevante o desenvolvimento de derivados da 4-aminoantipirina com a adição do fragmento do grupo 1,4-dioxo-2-butenil, que possam também dar origem a moléculas mais complexas e com possível potencial biológico antimicrobiano. Como resultado deste trabalho, produzimos oito compostos inéditos derivados da 4-aminoantipirina através de reações de substituição nucleofílica, radicalares, e Diels-Alder, com rendimentos entre 21 - 83%, dos quais, cinco foram avaliados contra as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* em teste de microdiluição em caldo, dentre estes, o derivado triclorado da *N*-(4-antipiril) maleimida foi o mais ativo para estes tipos de bactérias.

Palavras chaves: 4-aminoantipirina; compostos heterocíclicos; antimicrobiano.

ABSTRACT

4-aminoantipyrine has been used as a building block in organic synthesis, with modifications mainly in the substituents of the pyrazolone ring. Additionally, pyrazolone-derived heterocyclic compounds have numerous pharmacological applications, such as analgesics, antipyretics, antiarthritics, anti-inflammatories, and antioxidants. The union of structural fragments with proven biological activity can improve the efficacy of such drug candidates as well as increase their cell viability and decrease toxic effects in the body. Since the World Health Organization made public in 2017 the need to produce new compounds potentially active against multiresistant bacteria, the development of 4-aminoantipyrine derivatives with the addition of the 1,4-dioxo-2-butyl, which may also give rise to more complex molecules with a possible biological antimicrobial potential. As a result of this work, we produced eight novel compounds derived from 4-aminoantipyrine through radical nucleophilic substitution reactions, Diels-Alder, with yields between 21-83%, of which five were evaluated against the bacteria *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* in the microdilution test in broth, among them, the trichloro derivative of N-(4-antipyril) maleimide was the most active for these types of bacteria.

Key words: 4-aminoantipyrine; heterocyclic compounds; antimicrobial.

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Relação das prioridades de novos medicamentos em relação às bactérias multirresistentes	19
Tabela 2. Variações das condições reacionais para o <i>procedimento IV</i>	31
Tabela 3. Resultados de CIM no teste de microdiluição em caldo	54
Tabela 4. Rendimento dos produtos 7 e 8 em diferentes proporções estequiométricas dos materiais de partida em temperatura ambiente	63

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química do anel pirazolona e derivados 4-aminoantipirina, edaravona, dipirona e fenilbutazona	13
Figura 2. Estrutura química da <i>N</i> -(4-antipiril) maleimida	15
Figura 3. Estrutura química do ácido tricloroisocianúrico	15
Figura 4. Estrutura do ciclopentadieno, furano e 2-metil-furano.....	16
Figura 5. Estruturas química de análogos da Cantaridina.....	16
Figura 6. Estrutura química básica dos antibióticos carbapenemas e cefalosporinas	19
Figura 7. Estrutura química do ácido <i>N</i> -(4-antipiril) maleâmico.....	20
Figura 8. Estrutura química da <i>N</i> -(4-antipiril) acetamida	21
Figura 9. Estrutura química de compostos derivados da <i>N</i> -(4-antipiril) acetamida com melhores resultados biológicos	21
Figura 10. Estrutura química dos derivados clorados da <i>N</i> -(4-antipiril) maleimida....	22
Figura 11. Estrutura da <i>N</i> -Bromo e <i>N</i> - Clorosuccinimida	24
Figura 12. Estrutura do antraceno.....	25
Figura 13. Placa de Elisa	27
Figura 14. Precursores derivados da 4-aminoantipirina	30
Figura 15. Estrutura química da <i>N</i> -(4-antipiril) acetamida monoclorada (5).....	33
Figura 16. Estrutura química da <i>N</i> -(4-antipiril) acetamida diclorada (6)	34
Figura 17. Estrutura química da <i>N</i> -(4-antipiril) maleimida triclorada (7)	39
Figura 18. Estrutura química da <i>N</i> -(4-antipiril) maleimida tetraclorada (8)	40
Figura 19. Estrutura química do aduto de Diels-Alder (9) derivado da <i>N</i> -(4-antipiril) maleimida triclorada (7).....	44
Figura 20. Espectro de RMN de ¹ H do composto 9 em DMSO-d ₆ a 26°C.....	46
Figura 21. Espectro de RMN de ¹ H do composto 9 em DMSO-d ₆ a 70°C.....	46
Figura 22. Estrutura química do aduto de Diels-Alder (10) da <i>N</i> -(4-antipiril) maleimida (4).....	49
Figura 23. Estrutura química do aduto de Diels-Alder (11) da <i>N</i> -(4-antipiril) maleimida (4).....	51
Figura 24. Estrutura química do aduto de Diels-Alder (12) da <i>N</i> -(4-antipiril) maleimida (4).....	52
Figura 25. Produtos inéditos.....	56

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1. Estrutura química dos derivados do ácido <i>N</i> -aril maleâmico.....	14
Esquema 2. Síntese de estereoisômeros de imidobenzenosulfonilaziridinas	17
Esquema 3. Síntese relatada do composto análogo aos norbornenos dicarboximida	18
Esquema 4. Mecanismo da reação radicalar entre as moléculas de cloro e etano...23	
Esquema 5. Produção dos adutos de Diels-Arder <i>endo</i> e <i>exo</i>	26
Esquema 6. Síntese do produto mono (5) e diclorado (6) derivados da <i>N</i> -(4-antipiril) acetamida (2)	32
Esquema 7. Sistema <i>p</i> -conjugado e formação do radical 2a	35
Esquema 8. Proposta de mecanismo de formação do composto 5 via reação radicalar	37
Esquema 9. Síntese do produto tri (7) e tetraclorado (8) derivados da <i>N</i> -(4-antipiril) maleimida (4).....	38
Esquema 10. Sistema <i>p</i> -conjugado e formação do radical 7a	41
Esquema 11. Reação radicalar entre a hidroquinona e radical cloro	42
Esquema 12. Síntese do aduto <i>endo</i> (9).....	44
Esquema 13. Síntese dos aduto de Diels-Alder 10, 11 e 12	48
Esquema 14. Síntese da <i>N</i> -(4-antipiril) acetamida	59
Esquema 15. Síntese do ácido <i>N</i> -(4-antipiril) maleâmico.....	60
Esquema 16. Síntese da <i>N</i> -(4-antipiril) maleimida	61
Esquema 17. Síntese de produtos bromados da <i>N</i> -(4-antipiril) maleimida	63

ABREVIATURAS

ATCI: ácido tricloroisocianúrico

CCD: cromatografia em camada delgada

CDCl_3 : clorofórmio deuterado

CIM: concentração inibitória mínima

COSY: “Correlation Spectroscopy” ou espectroscopia de correlação

d: duplete

dd: duplo duplete

DEPT: “Distortionless Enhancement by Polarization Transfer” ou intensificação do sinal sem distorção por transferência de polarização

DMSO: dimetilsulfoxido

DMSO- d_6 : dimetilsulfoxido deuterado

H: átomo de hidrogênio

HMBC: “gradiente Heteronuclear Multiple-Bond Coherence” ou correlação heteronuclear de ligação múltipla

HSQC: “gradiente Heteronuclear Single Quantum Coherence” ou correlação heteronuclear quântica simples em gradiente.

NOE: “Nuclear Overhauser Effect” ou efeito nuclear de Overhauser

m: multiplete

NBS: *N*-bromosuccinimida

NCS: *N*-clorosuccinimida

ppm: parte por milhao

RX: reação X, reação entre a hidroquinona e ácido tricloroisocianúrico

RY: reação Y, reação entre a hidroquinona, ácido tricloroisocianúrico e *N*-(4-antipi maleimida

RMN de ^1H : ressonância magnética nuclear de hidrogênio

RMN de ^{13}C : ressonância magnética nuclear de carbono

s: simpleto

TMSCI: clorotrimetilsilano

TTC: tetrafeniltetrazólio

UFC: unidade formadora de colônia

UV: Ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1 Síntese e aplicações biológicas de compostos derivados da 4-aminoantipirina..	20
2.2 Reações radicalares	22
2.3 Reações de Diels-Alder	24
2.4 Avaliação da atividade antimicrobiana pelo método de microdiluição em caldo..	27
3 OBJETIVOS	29
3.1 Objetivo Geral.....	29
3.2 Objetivos específicos.....	29
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
4.1 Produção de derivados clorados da 4-aminoantipirina	30
4.2 Derivados clorados 5 e 6 da <i>N</i> -(4-antipiril) acetamida (2).....	32
4.2.1 Caracterização estrutural da <i>N</i> -(4-antipiril) acetamida monoclorada (5).....	33
4.2.2 Caracterização estrutural da <i>N</i> -(4-antipiril) acetamida diclorada (6).....	34
4.2.3 Cloração via mecanismo radicalar da <i>N</i> -(4-antipiril) acetamida (2)	35
4.3 Produção da <i>N</i> -(4-antipiril) maleimida tri (7) e tetraclorada (8).....	38
4.3.1 Caracterização da <i>N</i> -(4-antipiril) maleimida triclorada (7).....	39
4.3.2 Caracterização da <i>N</i> -(4-antipiril) maleimida tetraclorada (8)	39
4.3.3 Proposta de mecanismo de formação dos compostos 7 e 8	40
4.3.4 Comprovação experimental do mecanismo radicalar para as reações de cloração	41
4.4 Produção de derivados bromados da 4-aminoantipirina.....	43
4.5 Síntese e caracterização do norborneno da <i>N</i> -(4-antipiril) maleimida triclorado (9).....	43
4.6 Produção de adutos de Diels-Alder entre a <i>N</i> -(4-antipiril) maleimida (4) e dienos aromáticos.....	48
4.6.1 Caracterização do aduto de Diels-Alder (10) proveniente do furano e <i>N</i> -(4-antipiril) maleimida	49
4.6.2 Caracterização do aduto de Diels-Alder (11) proveniente do 2-metil-furano e <i>N</i> -(4-antipiril) maleimida	50
4.6.3 Caracterização do aduto de Diels-Alder (12) proveniente do antraceno e <i>N</i> -(4-antipiril) maleimida	52

4.7 Avaliação antimicrobiana pelo método de microdiluição em caldo	53
5 CONCLUSÃO	56
6 PARTE EXPERIMENTAL	58
6.1 Equipamentos e materiais utilizados	58
6.1.1 Experimentos de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e de ^{13}C	58
6.1.2 Medidas de ponto de fusão	58
6.1.3 Espectrômetro de massas de alta resolução	58
6.1.4 Reagentes e solventes utilizados	59
6.2 Descrição das sínteses.....	59
6.2.1 Síntese da <i>N</i> -(4-antipiril) acetamida (2).....	59
6.2.2 Síntese do ácido <i>N</i> -(4-antipiril) maleâmico (3).....	60
6.2.3 Síntese da <i>N</i> -(4-antipiril) maleimida (4)	61
6.2.4 Síntese de derivados clorados da <i>N</i> -(4-antipiril) acetamida (5 e 6) e da <i>N</i> -(4-antipiril) maleimida (7 e 8)	61
6.2.5 Síntese de derivados bromados da <i>N</i> -(4-antipiril) maleimida	63
6.2.6 Síntese do aduto de Diels-Alder (9) entre a <i>N</i> -(4-antipiril) maleimida triclorada (7) e ciclopentadieno	64
6.2.7 Síntese de adutos de Diels-Alder (10), (11) e (12) entre a <i>N</i> -(4-antipiril) maleimida e dienos aromáticos	65
6.3 Teste biológico antimicrobiano	66
7 REFERÊNCIAS	67
8 ANEXOS.....	71

1 INTRODUÇÃO

Na química orgânica são encontrados compostos que possuem em suas estruturas a possibilidade de modificações, com a manutenção de boa parte de sua estrutura original, servindo como blocos de construção para formação de novos derivados. O anel pirazolona (Figura 1), possui vários derivados como a 4-aminoantipirina, edaravona, dipirona e fenilbutazona, que poderiam sofrer modificações em seus substituintes mantendo características da estrutura original.

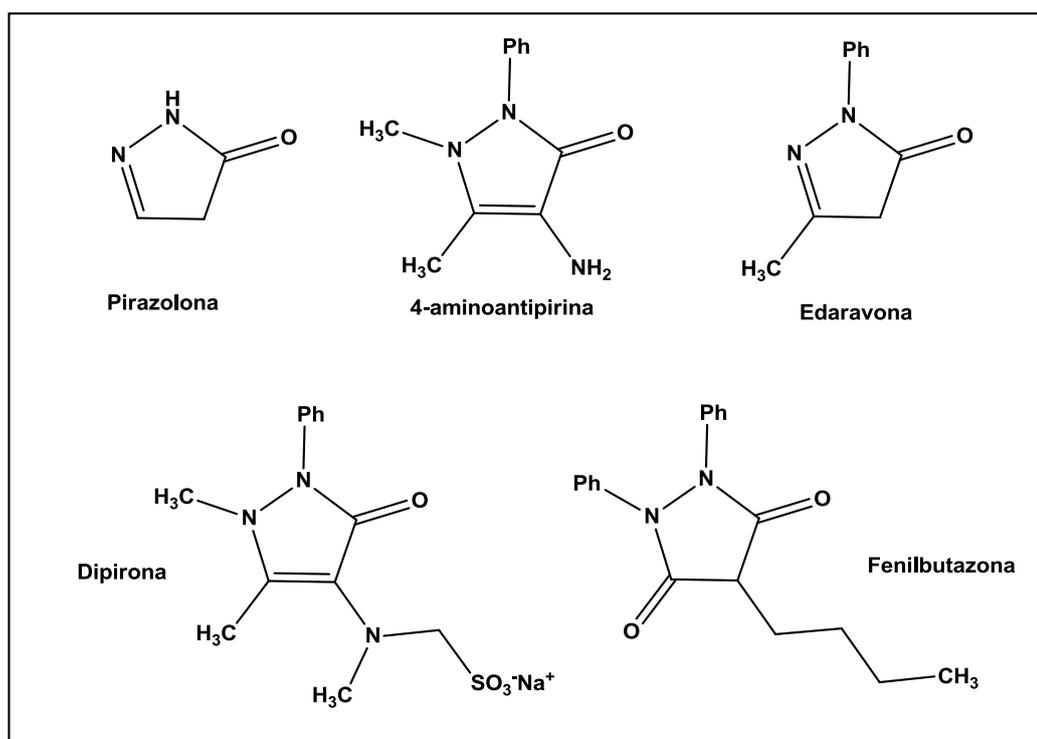


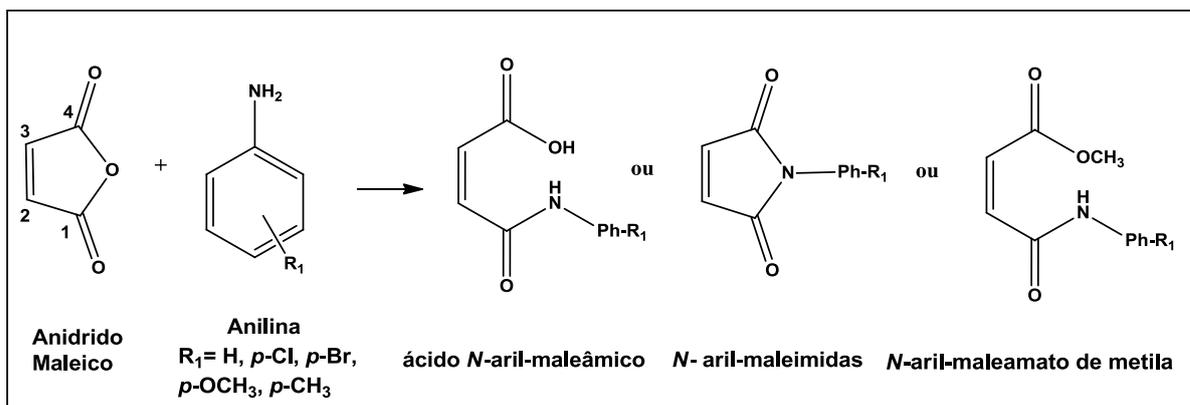
Figura 1. Estrutura química do anel pirazolona e derivados 4-aminoantipirina, edaravona, dipirona e fenilbutazona

Estes compostos (Figura 1) são encontrados em uma grande quantidade de fármacos¹, com numerosas aplicações, tais como analgésicos, antipiréticos, antiartríticos, anti-inflamatórios e antioxidantes, sendo de fácil preparação e tendo

¹ PARK, H.; LEE, K.; PARK, S.; AHN, B.; LEE, J.; CHO, H. PARK, Identification of antitumor activity of pyrazole oxime ethers. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 15, n. 13, p.3307-3312, 2005.

bons resultados de atividade biológica,² o que gera grande interesse no âmbito da pesquisa de novos compostos relacionados.

Acoplar fragmentos de outras estruturas com atividade biológica comprovada pode aumentar a eficácia de produtos químicos como fármacos, quanto à absorção, excreção e diminuição de efeitos tóxicos para os organismos.³



Esquema 1. Estrutura química dos derivados do ácido *N*-aril maleâmico

Desta maneira, acredita-se que acoplar derivados do ácido *N*-maleâmico a estrutura da 4-aminoantipirina poderia potencializar a atividade biológica deste composto, uma vez que esses compostos contendo o grupo 1,4-dioxo-2-butenil (Esquema 1), provenientes do anidrido maleico, como o ácido *N*-aril-maleâmico, as *N*-aril-maleimidias e os *N*-aril-maleamatos de metila, já foram preparados e testados como candidatos a citotoxinas, obtendo-se bons resultados, o que mostra a importância desta classe de compostos como substâncias antitumorais.³

A *N*-(4-antipiril) maleimida (Figura 2) pode ser sintetizada a partir do ácido *N*-(4-antipiril) maleâmico⁴, assim como as *N*-aril maleimidias, os quais poderiam servir como dienófilos em reações de Diels-Alder,⁵ considerando que seu anel maleimídico possui grande reatividade devido à presença das carbonilas vizinhas à ligação dupla.

² MOJTAHEDI, M. M.; JAVADPOUR, M.; ABAEE, M. S. Convenient ultrasound mediated synthesis of substituted pyrazolones under solvent-free conditions. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 15, n. 5, p.828-832, 2008.

³ JHA, A.; MUKHERJEE, C.; PRASAD, A. K.; PARMAR, V. S.; VADAPARTI, M.; DAS, U.; CLERCQ, E.; BALZARINI, J.; STABLES, J. P.; SHRIVASTAV, A.; SHARMA, R. K.; DIMMOCK, J. R. Derivatives of aryl amines containing the cytotoxic 1,4-dioxo-2-butenyl pharmacophore. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, n. 5, p.1510-1515, 2010.

⁴ CUNHA, S.; OLIVEIRA, S. M.; RODRIGUES Jr, M. T.; BASTOS, R. M.; FERRARI, J.; OLIVEIRA, C. M. A.; KATO, L.; NAPOLITANO, H. B.; VENCATO, I.; LARIUCCI, C. Structural studies of 4-aminoantipyrine derivatives. **Journal of Molecular Structure**, v. 752, n. 1-3, p.32-39, 2005.

⁵ ZHANG, PENG, ZHI-WEI; HAO, MING-FENG; GAO, JIAN-GANG. Mechanochemical Diels-Alder Cycloaddition Reactions for Straightforward Synthesis of *endo*-Norbornene Derivatives. **Synlett**, v. 2010, n. 19, p.2895-2898, 2010.

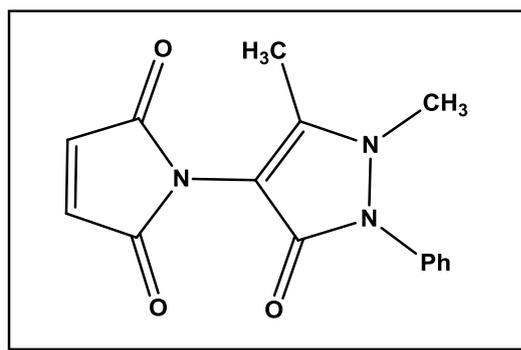


Figura 2. Estrutura química da *N*-(4-antipiril) maleimida

Estruturas halogenadas derivados da *N*-(4-antipiril) maleimida também apresentam atividade biológica, como o análogo diclorado da *N*-(4-antipiril) maleimida⁶.

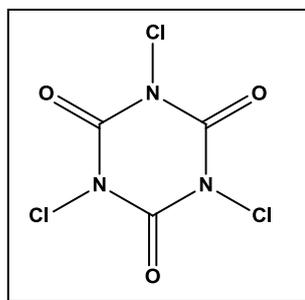


Figura 3. Estrutura química do ácido tricloroisocianúrico

Para a síntese de estruturas halogenadas é possível fazer a utilização de *N*-halo-amidas como o ácido tricloroisocianúrico (Figura 3), em reações de halogenação, visto que a mesma pode ser realizada em condições reacionais mais brandas, além de ser um composto de baixo custo financeiro, de fácil obtenção, com grande quantidade de cloro ativo, pois a cada molécula desse substrato são liberados três átomos de cloro, sendo descrito na literatura como agente de cloração aromática⁷ via substituição eletrofílica e cloração de hidrocarbonetos alifáticos⁸, via reação radicalar. Além das vantagens descritas, existe também a facilidade da remoção do ácido isocianúrico do meio reacional, já que em solventes polares apróticos, como

⁶ CAMPOS, F.; CORRÊA, R.; SOUZA, M. M.; YUNES, R. A.; NUNES, R. J.; CECHINEL-FILHO, V. Studies on New Cyclic Imides Obtained from Aminophenazone with Analgesic Properties. *Arzneimittelforschung*, v. 52, n. 06, p.455-461, 2011.

⁷ VASCONCELLOS, M. L. A. A.; LIMA JR, C. G. Cloração do anisol, tolueno e nitrobenzeno com ácido tricloroisocianúrico (ATCI): aspectos computacionais sobre a reatividade e regioselectividade. *Química Nova*, v. 32, n. 1, p.244-249, 2009.

⁸ COMBE, H. S.; HOSSEINI, A.; PARRA, A.; SCHREINER, P. R. Mild aliphatic and benzylic hydrocarbon c-h bond chlorination using trichloroisocyanuric acid. *The Journal of Organic Chemistry*, v. 82, n. 5, p.2407-2413, 2017.

acetonitrila e acetato de etila, ocorre sua precipitação, podendo ser retirado da mistura reacional através de uma simples filtração.⁹

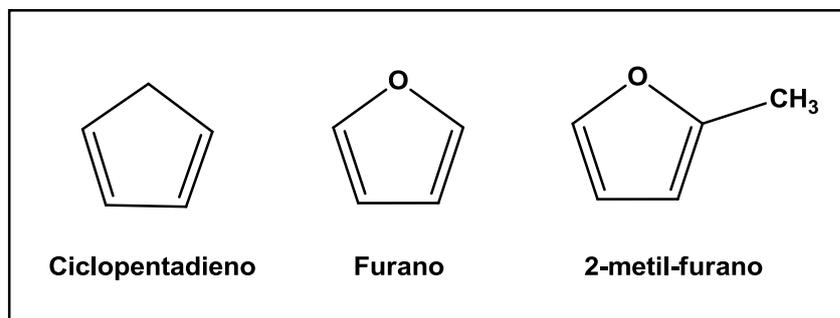


Figura 4. Estrutura do ciclopentadieno, furano e 2-metil-furano

Adicionalmente, se dienos como o ciclopentadieno, furano e 2-metilfurano (Figura 4) fossem utilizados em reações de Diels-Alder com a *N*-(4-antipiril) maleimida, possivelmente originariam compostos com estruturas análogas aos da Figura 5, pois demonstrariam semelhanças no esqueleto estrutural, diferenciando apenas por seus ligantes.

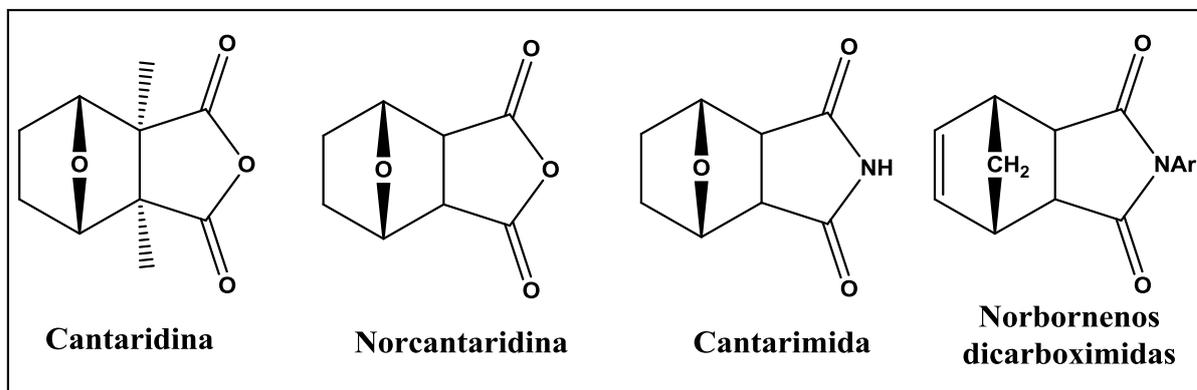


Figura 5. Estruturas química de análogos da Cantaridina

A cantaridina (Figura 5) apresenta um grande potencial farmacológico, como no tratamento de verruga plantar,¹⁰ câncer de fígado,¹¹ câncer de esôfago,¹² induz

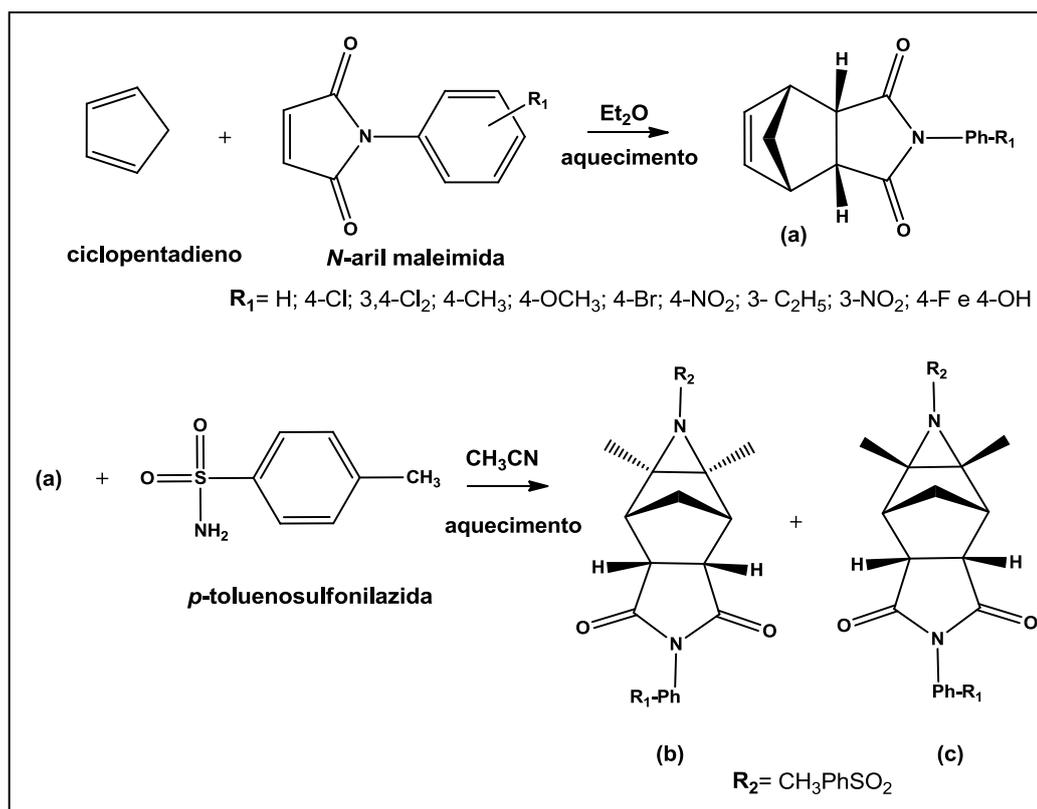
⁹ MENDONÇA, G. F.; MATTOS, M. C. S. Uma metodologia simples e eficiente para a cloração de compostos aromáticos ativados utilizando o ácido tricloro-isocianúrico. **Química Nova**, v. 31, n. 4, p.798-801, 2008.

¹⁰ STAPP, M. D. **Use of cantharidin for verruca.** nov. 2010. Disponível em: <www.podiatryinstitute.com/pdfs/Update_2012/2012_04.pdf>. Acesso em: 20 jun. 2017.

¹¹ WANG, CHING-CHIUNG; WU, CHING-HSIANG; HSIEH, KUO-JENG; YEN, KUN-YING; YANG, LING-LING. Cytotoxic effects of cantharidin on the growth of normal and carcinoma cells. **Toxicology**, v. 147, n. 2, p.77-87, 2000.

apoptose em muitas células tumorais¹², no entanto, possui difícil processo sintético.¹³ Por outro lado, os derivados da cantarimida demonstram igual atividade biológica em relação a cantaridina, com menor toxicidade e maior facilidade sintética.¹³

A norcantaridina (Figura 5) é usada na China como um fármaco antitumoral para tratamento de câncer de mama, carcinoma hepatocelular, leucemia, melanoma e apresentou-se como um novo candidato à fármaco contra câncer de pulmão, através de ensaios *in vivo* que foram realizados.¹⁴



Esquema 2. Síntese de estereoisômeros de imidobenzenosulfonilaziridinas

Norbornenos dicarboximidas (Figura 5) foram sintetizados através de reação de Diels-Alder entre o ciclopentadieno e *N*-*aryl* maleimidas, com diferentes substituições no fragmento *N*-*aryl* (Esquema 2); o produto (a), demonstraram

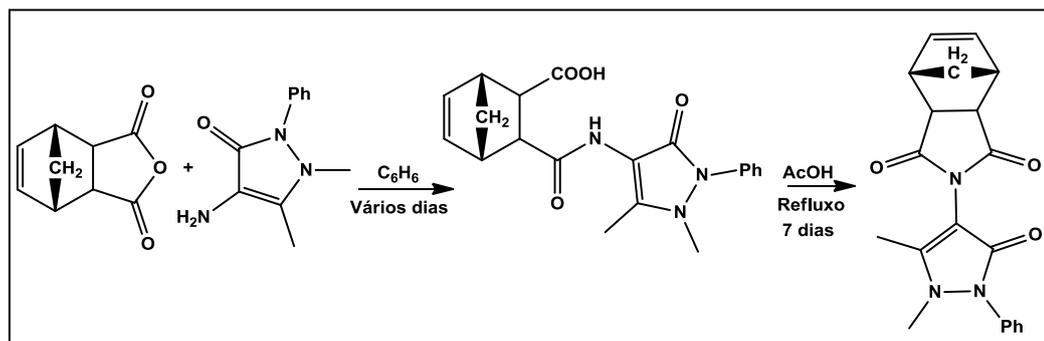
¹² LIU, DONGWU; CHEN, ZHIWEI. **The Effects of Cantharidin and Cantharidin Derivates on Tumour Cells.** *Anti-cancer Agents In Medicinal Chemistry*, v. 9, n. 4, p.392-396, 2009.

¹³ DENG, LI-PING; LIU, FANG-MING; WANG, HOU-YONG. 1,3-Dipolar cycloaddition reaction: Synthesis of novel 5,6-dehydronorcantharidin derivatives of substituted aromatic amines with potential antitumor activities. **Journal of Heterocyclic Chemistry**, v. 42, n. 1, p.13-18, 2005.

¹⁴ XIE, J.; ZHANG, Y.; HU, X.; LV, R.; XIAO, D.; LI, J.; BAO, Q. Norcantharidin inhibits Wnt signal pathway via promoter demethylation of WIF-1 in human non-small cell lung cancer. **Medical Oncology**, v. 32, n. 5, p.2-7, 2015.

comportamento semelhante à de drogas cardiogênicas,¹⁵ e quando foram submetidos à reação 1,3 dipolar com *p*-toluenosulfonilazida, deram origem a uma série de onze estereoisômeros de imidobenzenossulfonilaziridinas (produtos **b** e **c** Esquema 2).¹⁶ Essas estruturas apresentaram notável resultado em um teste de natação forçada em ratos, sem comprometer o desempenho motor dos animais, indicando se tratar de um antidepressivo com o perfil de ação semelhante à imipramina, um fármaco antidepressivo utilizado como padrão para comparação.¹⁶

Quanto aos compostos derivados da 4-aminoantipirina com adutos similares aos norbornenos dicarboximida, há apenas um relato na literatura (Esquema 3), em que o produto é proveniente de reações de substituição nucleofílica acíclica da 4-aminoantipirina com o norborneno com configuração *endo*, e que tem como tempo de reação a duração de vários dias, com rendimento final de 67%.¹⁷



Esquema 3. Síntese relatada do composto análogo aos norbornenos dicarboximida

Sendo assim, o desenvolvimento de derivados da 4-aminoantipirina com a adição do fragmento do grupo 1,4-dioxo-2-butenil, que possam também dar origem a moléculas mais complexas, gerando compostos com possível potencial biológico para uma gama de enfermidades.

Em 2017, a Organização Mundial da Saúde (OMS) tornou público a necessidade de incentivos à pesquisa, por meio do governo e da iniciativa privada

¹⁵ LANIER, M.; SCHADE, D.; WILLEMS, E.; TSUDA, M.; SPIERING, S.; KALISIAK, J.; MERCOLA, M.; CASHMAN, J. R. Wnt Inhibition Correlates with Human Embryonic Stem Cell Cardiomyogenesis: A Structure–Activity Relationship Study Based on Inhibitors for the Wnt Response. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, n. 2, p.697-708, 2012.

¹⁶ DUARTE, F. S.; ANDRADE, E. D.; VIEIRA, E. A.; UIEARA, M.; NUNES, R. J.; LIMA, T. C. M. Synthesis and antidepressant-like action of stereoisomers of imidobenzenesulfonylaziridines in mice evaluated in the forced swimming test. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 15, p.5397-5401, 2006.

¹⁷ KAS'YANA, L. I.; PAL'CHIKOVA, V. A.; TARABARAA, I. N.; KRISHCHIKB, O. V.; KAS'YANC, A. O.; SHISHKINAD, S. V.; SHISHKIND, O. V. Products of endic anhydride reaction with cyclic amines and their heterocyclization. **Russian Journal of Organic Chemistry**, v. 42, n. 11, p.1642-1652, 2006.

para produção de novos compostos potencialmente ativos contra bactérias multirresistentes (Tabela 1),¹⁸ sendo assim a avaliação da atividade antimicrobiana dos compostos derivados da 4-aminoantipirina com a adição do fragmento do grupo 1,4-dioxo-2-butenil são propostas para averiguar sua eficácia contra esses agentes patogênicos.

As prioridades de combate a essas bactérias foram atribuídas de acordo com a taxa de mortalidade, tempo de internação para tratamento, facilidade em apresentar resistência aos antibióticos, facilidade na propagação, possibilidade de imunização e tratamentos disponíveis.¹⁸

Tabela 1. Relação das prioridades de novos medicamentos em relação às bactérias multirresistentes

Prioridade	Bactérias
1 - Crítica	Gram-negativas: <i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> .
2 - Alta	Gram-positivas: <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> . Gram-negativas: <i>Helicobacter pylori</i> , <i>Helicobacter</i> , <i>Campylobacter</i> spp., <i>Salmonella</i> , <i>Neisseria gonorrhoeae</i> .
3 - Média	Gram-positiva: <i>Streptococcus pneumoniae</i> . Gram-negativas: <i>Haemophilus influenzae</i> , <i>Shigella</i> spp.

Esses agentes patogênicos (Tabela 1) tornaram-se resistentes inclusive a antibióticos derivados das carbapenemas e cefalosporinas (Figura 6) utilizados com frequência nos tratamentos de bactérias multirresistentes.¹⁸

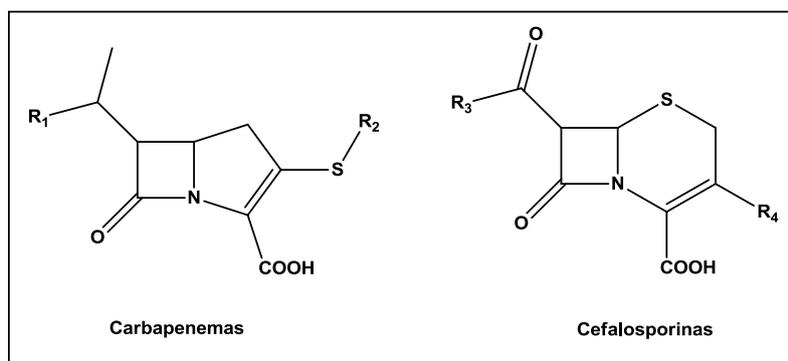


Figura 6. Estrutura química básica dos antibióticos carbapenemas e cefalosporinas

¹⁸ OMS PUBLICA LISTA INÉDITA DE BACTÉRIAS RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS. março 2017. Disponível em: <<https://nacoesunidas.org/oms-publica-lista-inedita-de-bacterias-resistentes-a-antibioticos/>>. Acesso em: 10 jan. 2017.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Síntese e aplicações biológicas de compostos derivados da 4-aminoantipirina

Esta revisão bibliográfica buscou demonstrar a atividade biológica dos compostos derivados da 4-aminoantipirina com a acetamida e o fragmento 1,4-dioxo-2-butenil.

Uma série de compostos obtidos a partir da reação da 4-aminoantipirina com acetilacetona, acetoacetato de etila, isotiocianato de benzoíla, isotiocianato de fenila, anidrido maleico e o ácido metoximetileno de Meldrum foi produzida e testada contra bactérias Gram-positivas como *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus* e Gram-negativas como *Escherichia coli*.⁴

Foram determinadas as concentrações inibitórias mínimas (CIM) para quatro compostos da série proposta, que variaram entre 125 – 1000 µg/mL, sendo os melhores resultados de atividade biológica encontrados para ácido *N*-(4-antipiril) maleâmico (Figura 7), 125 µg/mL sobre a bactéria *M. luteus*, e 250 µg/mL *S. aureus* e *E. coli*.⁴

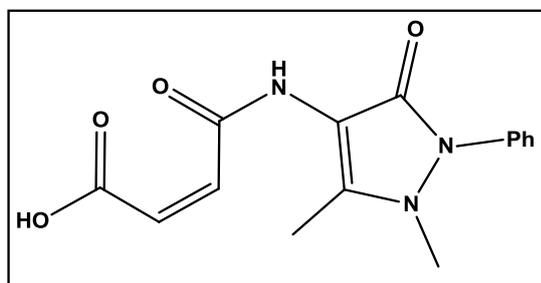


Figura 7. Estrutura química do ácido *N*-(4-antipiril)

Derivados da *N*-(4-antipiril) acetamida (Figura 8) foram testados contra *S. aureus* e *Bacillus subtilis* (bactérias Gram-positivas, CIM entre 9,5 – 78 µg/mL), *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli* (bactérias Gram-negativas, CIM entre 19 – 156 µg/mL), demonstrando atividade biológica, porém inferior quando comparado com os padrões utilizados, penicilina G e estreptomicina.¹⁹

¹⁹ ALY, H. M.; SALEH, N. M.; ELHADY, H. A. Design and synthesis of some new thiophene, thienopyrimidine and thienothiadiazine derivatives of antipyrine as potential antimicrobial agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 9, p.4566-4572, 2011.

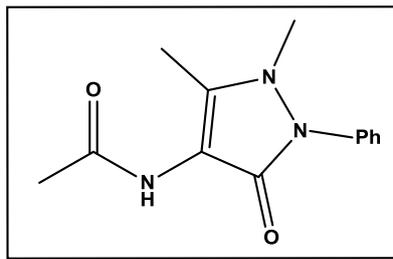


Figura 8. Estrutura química da *N*-(4-antipiril) acetamida

A relação da estrutura e atividade biológica desta classe de compostos mostrou que a presença do anel pirazol e grupos como etoxi e cloro na fração de tiofeno (Figura 9) contribuíram para uma boa atividade antimicrobiana.¹⁹

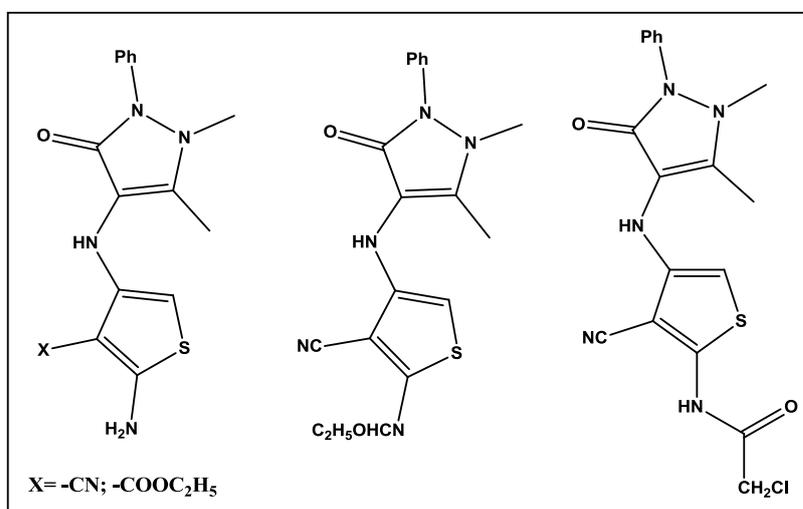


Figura 9. Estrutura química de compostos derivados da *N*-(4-antipiril) acetamida com melhores resultados biológicos

Testes relacionados ao potencial analgésico mostra que derivados da *N*-(4-antipiril) maleimida (Figura 2) causaram potentes efeitos analgésicos quando avaliado no teste de constrição abdominal em ratos. Um desses derivados, o diclorado (Figura 10-(a)), causou um efeito analgésico pronunciado, reduzindo em 99% o número de constrições abdominais induzidas pelo ácido acético. Nenhum sinal de toxicidade foi observado em qualquer um dos ensaios farmacológicos na dose de 30 mg/kg para o composto (a) da Figura 10.⁶

Anos mais tarde, o composto **a** (Figura 10) foi utilizado como material de partida em reações de substituição por aminas aromáticas, uma vez que o cloro é um bom grupo de saída frente à nucleófilos fortes, permitindo a preparação de 25 novos derivados com bons rendimentos, sendo todos candidatos promissores para futuros

medicamentos analgésicos.²⁰ Além disso, três derivados exibiram atividade contra fungos patogênicos, com CIM entre 40 e 80 µg/mL.²⁰

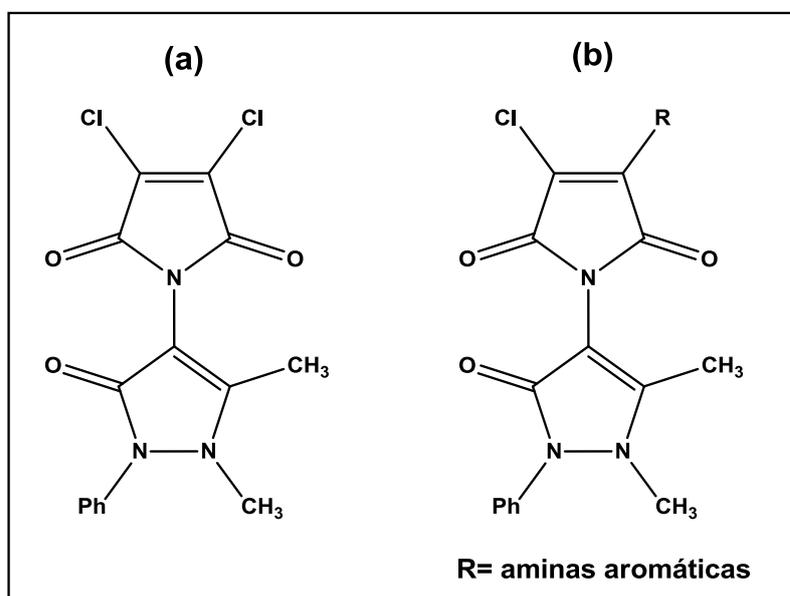


Figura 10. Estrutura química dos derivados clorados da *N*-(4-antipiril)

Os trabalhos relatados na literatura demonstram que tais derivados do ácido *N*-(4-antipiril) maleâmico e da *N*-(4-antipiril) acetamida podem ainda sofrer modificações em sua estrutura e servir como bloco de construção novas moléculas, proporcionando melhora nos resultados dos testes antimicrobianos.

2.2 Reações radiculares

O mecanismo de reação radicalar ocorre resumidamente em três etapas; a primeira é a iniciação (formação do radical por cisão homolítica); a segunda é a propagação (abstração de um elétron por um radical e formação de um novo radical livre); por fim, a terceira é a finalização (etapa de junção de todos radicais formados), como demonstradas no Esquema 4, para a reação radicalar entre as moléculas de cloro e etano.²¹

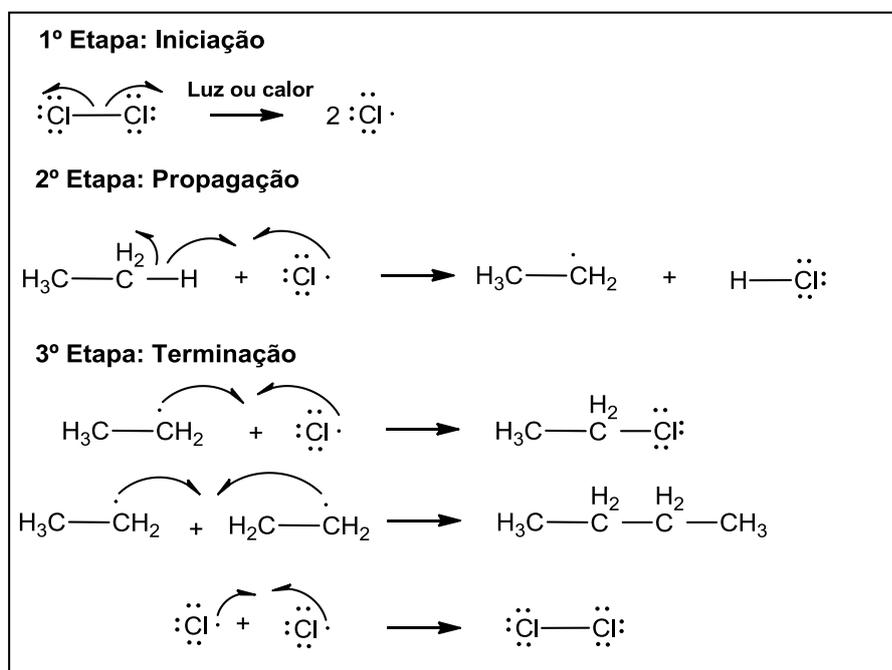
A primeira etapa acontece por meio de formação de radicais livres, produzidos de cisão homolítica de uma espécie cuja ligação é relativamente fraca

²⁰ MAHLE, F.; GUIMARÃES, T. R.; MEIRA, A. V.; CORRÊA, R.; CRUZ, R. C.; CRUZ, A. B.; NUNES, R. J.; CECHINEL-Filho, V.; CAMPOS, F. Synthesis and biological evaluation of *N*-antipyrine-4-substituted amino-3-chloromaleimide derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 11, p.4761-4768, 2010.

energeticamente. Essa clivagem é também favorecida pelo fornecimento de energia luminosa ou térmica.²¹

Na etapa seguinte, a propagação ocorre pois os radicais livres formados na primeira etapa são altamente reativos por possuírem um elétron desemparelhado, sendo capazes de abstrair um átomo radical proveniente de uma molécula com spin-emparelhado, produzindo um novo radical livre e uma nova molécula de spin-emparelhado.²¹

Por fim, a etapa de finalização ocorre pela junção de todos os radicais formados, podendo haver formação de vários produtos, além dos de interesse principal.



Esquema 4. Mecanismo da reação radicalar entre as moléculas de cloro e etano

As halogenações via mecanismo radicalar podem ser realizadas através da formação de radicais livres de substâncias simples como Br₂ e Cl₂ (ambos nocivos à saúde), ou por fontes mais brandas como as *N*-halo-amidas, tendo como exemplo o ácido tricloroisocianúrico (Figura 3), *N*-clorosuccinimida (NCS) e *N*-bromosuccinimida (NBS) (Figura 11).⁹

²¹ SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B. **Química Orgânica**, v.1, 7ed. LTC, 2009 cap. 10 p. 365-391.

Os radicais livres formados pelos átomos de cloro são mais reativos e menos seletivos que os radicais formados pelo átomo de bromo, podendo reagir facilmente com carbonos primários, secundários e terciários, produzindo até mesmo compostos policlorados. Os radicais de bromo são seletivos a carbonos terciários.²²

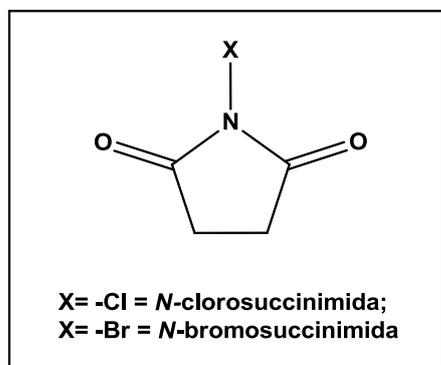


Figura 11. Estrutura da *N*-Bromo e *N*-Clorosuccinimida

Os radicais livres do átomo de carbono possuem hibridização do tipo sp^2 , com o elétron não emparelhado no orbital p , sendo um orbital molecular ocupado por um único elétron (SOMO), possuindo estabilidade semelhante à dos carbocátions, logo radicais terciários são mais estáveis e menos reativos que os primários.²² O efeito de hiperconjugação é responsável pela estabilidade do radical terciário, pois ocorre interação orbitalar dos grupos alquilas com o orbital p , tendo um efeito doador de elétrons.²²

As ligações entre carbono e hidrogênio vizinhas aos grupos conjugados, como alila ou benzila, ou grupos retiradores de elétrons, como carbonilas e nitrilas são particularmente fracas, de modo que os radicais formados são estabilizados por conjugação. Tais radicais tendem a ser mais estáveis que os terciários, muitas vezes podendo até ser isolados.²²

2.3 Reações de Diels-Alder

A reação de Diels-Alder é bastante utilizada como método sintético, pois permite a formação de novas ligações entre átomos de carbono sem intermediários

²² CLAYDEN, J. GREEVS, N.; WARREN, S.; WHOTERS, P. **Organic Chemistry**, Paperback, 2 ed., 2012, ISBN: 978-0199270293, Oxford University Press, p. 1020-1050.

de reação, possibilitando economia atômica, uma vez que todos os átomos constituintes dos materiais de partida estão na estrutura final do produto.²³

A reação também pode ser chamada de cicloadição [4+2], ou seja, uma reação eletrocíclica que envolve os 4 elétrons π do dieno e 2 elétrons π do dienófilo, sendo a força motriz da reação a formação de duas novas ligações σ (com os orbitais p) que são energeticamente mais estáveis que as ligações π .²³

Esta reação é eficiente em gerar anéis de seis membros, insaturados. Quando realizada com dieno ou dienófilo contendo um heteroátomo, como nitrogênio ou oxigênio, constitui uma poderosa ferramenta sintética na produção de anéis heterocíclicos de seis membros.²³

Geralmente as reações ocorrem facilmente pela mistura dos componentes à temperatura ambiente ou por um leve aquecimento em um solvente apropriado. Dependendo da reatividade dos dienos e dienófilos, condições mais rigorosas se fazem necessárias, a exemplo de altas temperaturas e/ou altas pressões, catalisadores, dentre outros.²⁴

Uma opção de dienófilos reativos em reações de Diel-Alder são os derivados da *N*-maleimida,⁵ pois, assim como o anidrido maleico, também possui em sua estrutura o grupamento 1,4-dioxo-2-butenil, em que as carbonilas comportam-se como grupos retiradores de elétrons, característica importante para a reatividade dos dienófilos.

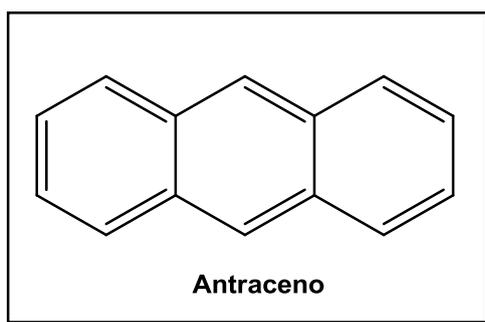


Figura 12. Estrutura do antraceno

Dienos aromáticos como o furano, 2-metil-furano (Figura 4) e antraceno (Figura 12) possuem duas ligações duplas conjugadas em conformação *S-cis*, outra condição

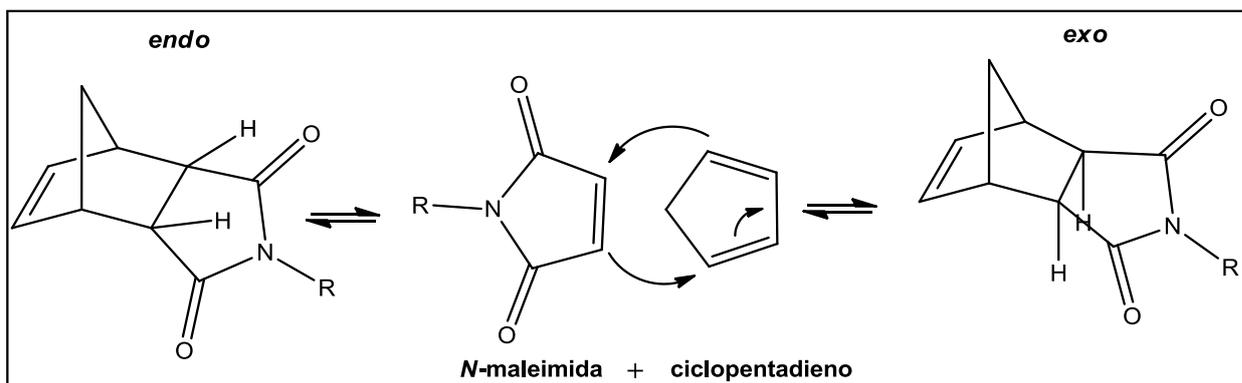
²³ **Diels-Alder Reaction.** Disponível em: <<http://www.organic-chemistry.org/namedreactions/diels-alder-reaction.shtm>>. Acesso em: 20 jan. 2018.

²⁴ CARRUTHERS, W. **Some Modern Methods of Organic Synthesis.** Cambridge texts in Chemistry and Biochemistry, 3 ed., 1986, New York, 159-202.

básica para efetuar essas reações, porém a grande estabilidade desses compostos devido à aromaticidade faz com que eles sejam menos reativos se comparados com o ciclopentadieno (não aromático – Figura 4).²⁵ Nesses casos, então, é necessário fornecer maior energia para o meio reacional, de modo que a barreira energética para os estados de transição seja vencida e se formem os adutos de Diels-Alder esperados.²⁵

Para cada reação de Diels-Alder há a possibilidade de formação de dois produtos de reação, um cinético (configuração *endo*) e o outro termodinâmico (configuração *exo*), tendo entre eles uma relação estrutural de diastereoisomerismo e sendo interconversíveis, uma vez que a reação de Diels-Alder é reversível.²⁵

Tomando como exemplo a reação genérica entre o ciclopentadieno e uma *N*-maleimida substituída (Esquema 5), existem duas possibilidades de aproximação entre o orbital molecular de maior energia ocupado (HOMO) e o orbital molecular de menor energia não ocupado (LUMO) de mesma fase, do dieno e dienófilo.²⁵



Esquema 5. Produção dos adutos de Diels-Alder *endo* e *exo*

O produto *exo* é o mais estável, apresentando em sua estrutura menor repulsão eletrônica entre os grupos volumosos da molécula, porém, é o produto que necessita de maior energia para ser formado. Em contrapartida, o produto *endo* é primeiramente formado, mesmo sendo o menos estável. Sua produção é favorecida pela menor energia de ativação por existência de interação entre as carbonilas do dienófilo e a nova ligação π gerada no substrato do dieno, no momento da cicloadição.²⁵

²⁵ CLAYDEN, J. GREEVS, N.; WARREN, S.; WHOTERS, P. **Organic Chemistry**, Paperback, 2 ed., 2012, ISBN: 978-0199270293, Oxford University Press, 905-919.

2.4 Avaliação da atividade antimicrobiana pelo método de microdiluição em caldo

O método de diluição em caldo é um teste biológico *in vitro* que considera a relação entre o crescimento do microrganismo no meio líquido e a concentração do composto testado.²⁶

A microdiluição em caldo é correspondente à técnica de diluição, porém é realizada em menor escala de reagentes, utilizando placas de Elisa (Figura 13) estéreis, com 96 poços, com o fundo em formato de “U”, que permite a visualização do crescimento bacteriano.²⁷

As placas de microdiluição podem conter o antimicrobiano liofilizado ou congelado e os microrganismos são inoculados com o auxílio de micropipeta, para obter uma concentração bacteriana final de aproximadamente 5×10^4 a 10^5 UFC/mL em cada poço da placa de microdiluição. O meio de cultura utilizado para a maioria das espécies bacterianas é o caldo Müller-Hinton.²⁷

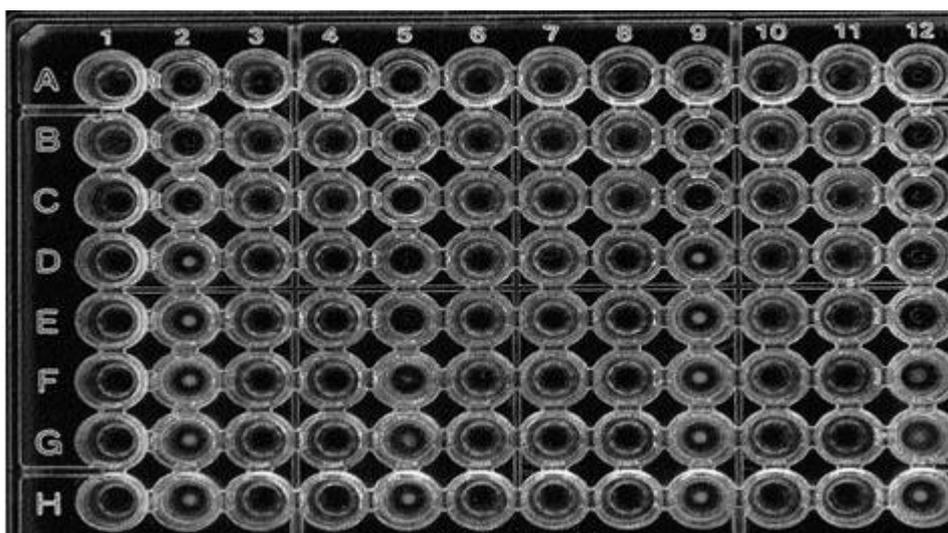


Figura 13. Placa de Elisa

Os painéis de microdiluição, após a inoculação, são incubados a 35°C por 16 a 20 horas ou de acordo com o microrganismo em teste.²⁷

²⁶ PINTO, T. J. A.; KANEKO, T. M.; OHARA, M. T. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos**. 2 ed., São Paulo: Atheneu, p. 325, 2003.

²⁷ **Microdiluição em caldo**. 2008. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede_rm/cursos/atm_racional/modulo2/metodos2.1.htm>. Acesso em: 18 março 2018.

São utilizados no teste controles que auxiliam na redução dos erros de interpretação do experimento. São eles o branco (meio de cultura, DMSO e inóculo) e o controle positivo (meio de cultura, inóculo, DMSO e antibiótico comercial) controle negativo (meio de cultura e microrganismo).²⁸

Após a incubação, a leitura da placa com a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) é realizada visualmente por avaliação dos poços de controle com os poços dos compostos testados, por meio de turbidez ou reatividade com cloreto de trifeniltetrazolio (mudança de coloração), quando há o crescimento bacteriano.²⁸

As vantagens deste método são que em uma placa pode-se testar até 12 drogas antimicrobianas em várias concentrações para um tipo de bactéria e que o método gera resultados reprodutíveis, quantitativos, e ainda há economia de reagentes e espaço.²⁸

²⁸ OSTROSKY, E. A. MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; KANEKO, T. M.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B. R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p.301-307, 2008.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O principal objetivo deste trabalho foi sintetizar novos derivados da 4-aminoantipina e verificar a atividade antimicrobiana *in vitro* dos mesmos.

3.2 Objetivos específicos

Sintetizar novos compostos clorados derivados da *N*-(4-antipiril) acetamida.

Sintetizar novos compostos derivados do ácido *N*-(4-antipiril) maleâmico, incluindo a formação de *N*-(4-antipiril) maleimidas, adutos de Diels-Alder, compostos clorados e bromados.

Analisar os resultados dos compostos sintetizados quanto a atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*) e Gram-negativas (*Escherichia coli*) através do método de microdiluição de caldo.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Produção de derivados clorados da 4-aminoantipirina

Inicialmente a produção de derivados clorados da 4-aminoantipirina **(1)** via substituição eletrofílica aromática, seria para posterior utilização desses derivados como *N*-(4-antipiril) maleimida halogenada (dienófilos) em reação de Diels-Alder.

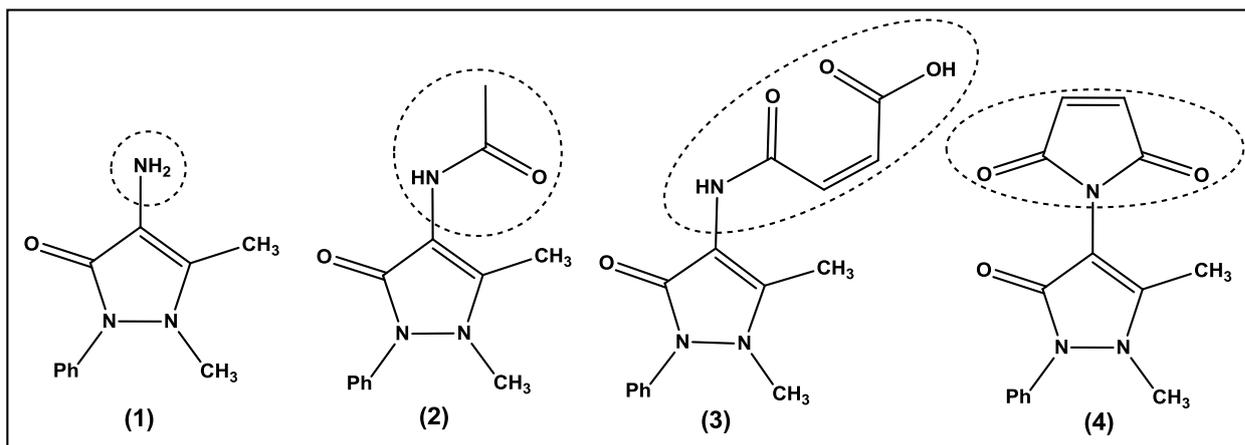


Figura 14. Precursores derivados da 4-aminoantipirina

Como a 4-aminoantipirina **(1)** (Figura 14) é bastante funcionalizada, as reações tiveram que ser planejadas analisando a quimiosseletividade dos reagentes e as condições térmicas devido à possibilidade de sua degradação. Sendo assim, os compostos **2**, **3** e **4** (Figura 14) foram selecionados como candidatos a materiais de partida para a obtenção dos derivados halogenados. A escolha do composto **2** está relacionada a presença do grupo de proteção, pois a mesma quando desprotegida pode ser um nucleofílico em potencial, atraindo para si os eletrófilos, prejudicando a eficácia da reação de halogenação via substituição eletrofílica aromática, podendo gerar subprodutos e diminuindo os rendimentos. Em relação a escolha dos compostos **3** e **4**, ambos são precursores dos produtos alvo, podendo diminuir o número de etapas reacionais.

Para o composto **2** seria necessária a desproteção do grupo amina, posteriormente a etapa de halogenação, para produção dos derivados de *N*-maleimidas. Já nas estruturas **3** e **4** não haveria necessidade de tal ação.

Os compostos *N*-(4-antipiril) acetamida **(2)**, ácido *N*-(4-antipiril) maleâmico **(3)** e *N*-(4-antipiril) maleimida **(4)** foram respectivamente sintetizados e purificados de

acordo com os *procedimentos I* (Seção 6.2.1)¹⁹, *II* (Seção 6.2.2)²⁹ e *III* (Seção 6.2.3)²⁹, relatados na literatura.

Metodologias tradicionais de cloração de anéis aromáticos envolvem a utilização do gás cloro, tóxico e corrosivo, que gera HCl como subproduto⁹, podendo ocasionar reações paralelas na estrutura do anel pirazolona, mesmo este já estando com um grupo de proteção, como no caso do composto **2**.

Nesse contexto, o *procedimento IV* (Seção 6.2.4)⁹ foi selecionado por ser uma metodologia com condições mais brandas, utilizando o ácido tricloroisocianúrico (ATCI) (Figura 3). Variações do procedimento foram testadas com os compostos **1**, **2**, **3** e **4**, como descritos na Tabela 2, e acompanhadas por cromatografia em camada delgada (CCD), indicando que com os compostos **1** e **3** produziram um número muito grande de substâncias, impossibilitando a separação dos mesmos para a caracterização dos produtos.

Apenas nas reações com os compostos **2** e **4** foi possível que houvesse a separação e caracterização de alguns produtos. Os estão descritos na Seção 4.2 para os produtos clorados derivados da estrutura **2** e na Seção 4.3 para os produtos clorados derivados de **4**.

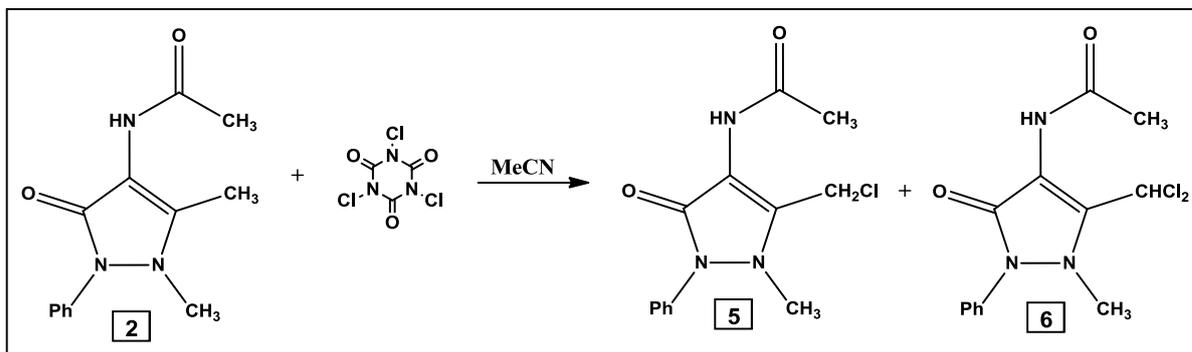
Tabela 2. Variações das condições reacionais para o *procedimento IV*

Proporção (Composto + ATCI)	Temperaturas			
	Temperatura Ambiente Acetonitrila*	80°C Acetonitrila*	Temperatura Ambiente Acetonitrila seca	80°C Acetonitrila seca
Composto 1 (1:1)	X	x	x	—
Composto 2 (1:1)	x	Produtos identificados 5 e 6	—	—
Composto 2 (3:1)	—	—	Produtos identificados 5 e 6	Produtos identificados 5 e 6
Composto 3 (3:1)	x	x	—	—
Composto 4 (3:1)	x	—	Produto 7	Produtos identificados 7 e 8
Composto 4 (1:1)	—	—	Produtos identificados 7 e 8	0

*Solvente não tratado; x: Padrão de degradação da reação; — Reação não realizada.

²⁹ MATUSZAK, N.; MUCCIOLI, G. G.; LABAR, G.; LAMBER, D. M. Synthesis and in Vitro Evaluation of N-Substituted Maleimide Derivatives as Selective Monoglyceride Lipase Inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**. 52, 23, p.7410-7420, 2009.

4.2 Derivados clorados 5 e 6 da *N*-(4-antipiril) acetamida (2)



Esquema 6. Síntese do produto mono (5) e diclorado (6) derivados da *N*-(4-antipiril) acetamida (2)

Quando o *procedimento IV* (Seção 6.2.4)⁹ foi realizado, sem tratamento prévio da acetonitrila, à temperatura ambiente (aproximadamente 25°C), foi verificada através de CCD inúmeras manchas, demonstrando um padrão de degradação, possuindo fatores de retenção muito próximos, sendo inviável a separação.

Depois, a mesma metodologia foi testada e acompanhada por CCD em temperaturas de 60 e 80°C, indicando a formação 7 e 5 manchas, respectivamente).

Para purificação desses compostos em coluna cromatográfica, foi utilizado como eluente o acetato de etila, tendo sido ele um dos únicos solventes capazes de fazer a eluição desses em sílica.

Através da purificação, foram separados os cinco produtos da reação realizada a 80°C, que foram submetidos a análises de RMN de ¹H e ¹³C. Das cinco amostras, uma foi identificada como material de partida (2), dois compostos clorados 5, 6 (Esquema 6) e dois compostos que não tinham massa suficiente para realização dos experimentos de análise espectroscópica.

Os compostos 5 e 6, inéditos, foram produzidos com rendimentos de 27 e 21%, respectivamente, e tratam-se de produtos de halogenação alílica.

A estabilidade desses compostos formados é baixa, degradando com facilidade na presença de luz, oxigênio e temperatura ambiente, desestimulando a utilização dos mesmos em outras etapas reacionais. Os experimentos de DEPT 135 e massas de alta resolução não puderam ser realizados, pois os produtos degradaram.

Essa mesma metodologia de reação também foi testada, separadamente, com adição de cloreto de ferro III (FeCl_3) e de ácido sulfúrico (H_2SO_4), a fim de estimular a formação do eletrólito de cloro para que ocorresse a halogenação eletrofílica do anel aromático, entretanto não foi obtido sucesso.

4.2.1 Caracterização estrutural da *N*-(4-antipiril) acetamida monoclorada (**5**)

No espectro de RMN de ^1H (Anexo 5.1) foram encontrados dois simpletos com integração de três hidrogênios/cada, referente aos hidrogênios das metilas (H12 e H9) com deslocamentos em 2,01 e 3,15 ppm, respectivamente. Foi notada a ausência do sinal dos hidrogênios da metila (C8) em relação ao material partida (**2**) (Anexo 2.1) encontrados em 2,08 ppm, e ao mesmo tempo o aparecimento de um simpleto com integração de dois hidrogênios com deslocamento químico em 4,61 ppm (H8) (Figura 15).

Não houve a halogenação do anel aromático, confirmado pela integração dos sinais de multipletos com deslocamentos entre 7,32 – 7,48 ppm proporcional a cinco hidrogênios ainda presentes após a reação.

O sinal do hidrogênio amídico (H10) encontra-se como um simpleto com deslocamento em 9,29 ppm, possuindo integração proporcional a um hidrogênio.

No espectro de RMN de ^{13}C (Anexo 5.2) do composto **5**, foi comprovado o desaparecimento do sinal da metila vicinal ao carbono insaturado (C7) do anel pirazolona no composto **2**, em 12,1 ppm e houve o aparecimento do sinal em 36,3 ppm referente ao metileno clorado (C8).

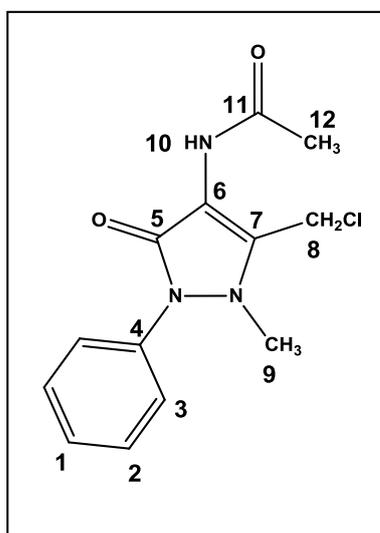


Figura 15. Estrutura química da *N*-(4-antipiril) acetamida monoclorada (**5**)

As modificações encontradas nos espectros de RMN do composto **5**, em comparação do material de partida (**2**), demonstraram ter ocorrido uma cloração no carbono C8, pois houve variações pontuais nos sinais quanto à integração e deslocamentos químicos que condizem com a presença de um carbono monoclorado.³⁰

4.2.2 Caracterização estrutural da *N*-(4-antipiril) acetamida diclorada (**6**)

No espectro de RMN de ¹H (Anexo 6.1) também foi notado o desaparecimento do sinal dos hidrogênios da metila (C8) do composto **2** (Anexo 2.1), com aparecimento de um simpleto em 7,31 ppm (H8) (Figura 16) com integração proporcional a um hidrogênio, demonstrando que houve substituição de dois átomos de hidrogênios.

Os demais sinais de hidrogênios não sofreram alterações no que diz respeito à multiplicidade e integração, em relação ao composto **5**, apenas pequenas variações em seus deslocamentos.

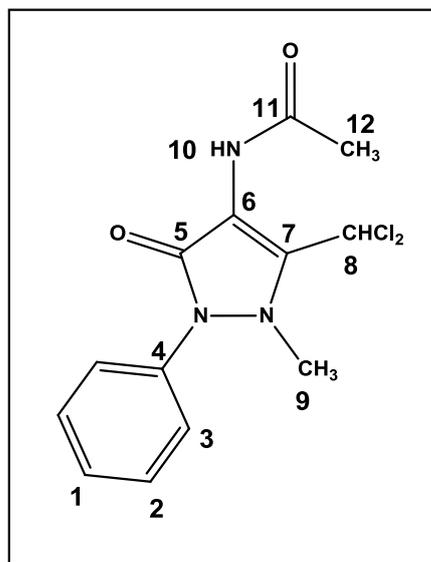


Figura 16. Estrutura química da *N*-(4-antipiril) acetamida diclorada (**6**)

No espectro de RMN de ¹³C (Anexo 6.2) foi confirmado o desaparecimento do sinal da metila C8 em 12,1 ppm, referente ao composto **2** e o aparecimento de um

³⁰ PAVIA, D. L.; LAMPAN, G. M.; KRIZ, S. G.; VYVYAN, J. R. **Introdução à Espectroscopia**. 4 ed. São Paulo, Cengage Learning, 2010. p.639.

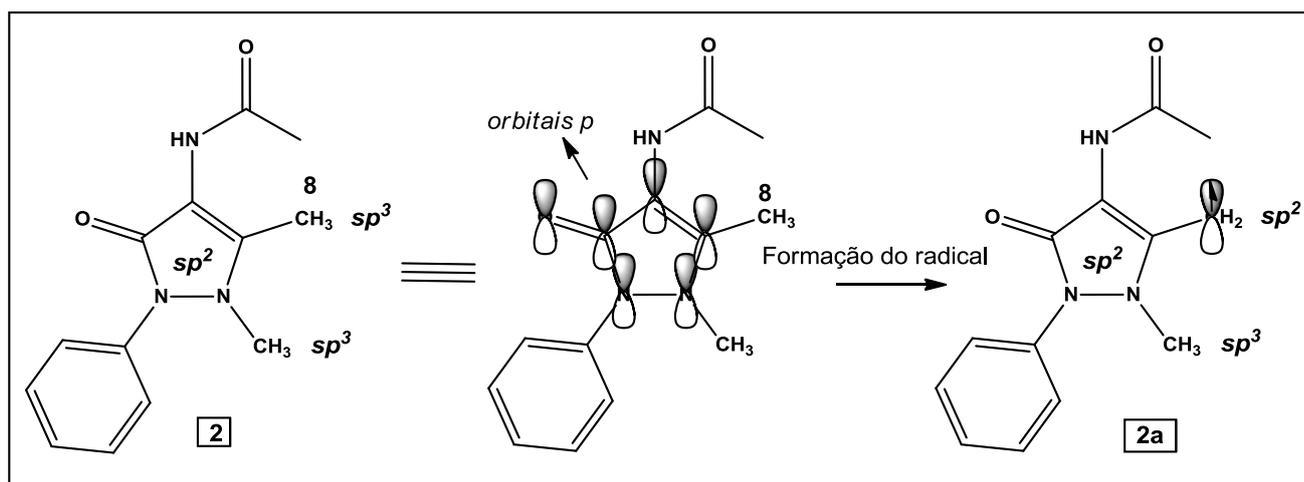
sinal de metino em 61,1 ppm (C8) (Figura 16). Estes deslocamentos químicos e integração condizem com um carbono diclorado (C8).³⁰

4.2.3 Cloração via mecanismo radicalar da *N*-(4-antipirilil) acetamida (2)

Uma vez que não foi possível separar produtos de halogenação do anel aromático, a proposta de mecanismo mais aceitável para explicar a formação dos produtos clorados **5** e **6** é por via radicalar, uma vez que já foram relatadas na literatura reações na porção alílica da estrutura.³¹

Analisando os resultados em relação ao *procedimento IV* (temperatura ambiente, 60 e 80°C), pode-se propor que pelo fato do solvente acetonitrila não ter passado por nenhuma etapa de tratamento, deveria conter água e outros componentes. Logo quando foram iniciadas as reações radicalares em cadeia, poderia haver a formação de inúmeros compostos radicalares até a etapa de finalização.

Havia probabilidade de policloração e formação de vários produtos cinéticos que não dependem de muita energia para realizar a cisão homolítica e abstração de radicais, formando orbital SOMO (orbital molecular ocupado por um elétron) de baixa energia, com facilidade para receber elétrons, reagindo de maneira desordenada, isso explicaria a grande quantidade de compostos verificados por CCD.



Esquema 7. Sistema p -conjugado e formação do radical **2a**

³¹ NEWKOME, G. R.; KIEFER, G. E.; XIA, Y. J.; GUPTA, V. K. α -Methyl Functionalization of Electron-Poor Heterocycles1: Free Radical Chlorination. **Synthesis**, v. 1984, n. 08, p.676-679, 1984.

Para entender a formação dos produtos **5** e **6** precisamos analisar a estrutura do material de partida (**2**) e o radical alílico formado por ele. Todos os elementos constituintes do anel pirazolona em **2** possuem hibridização do tipo sp^2 (Esquema 7), inclusive os átomos de nitrogênios, onde par de elétrons não ligantes distribuído no orbital p . Sendo assim, há cinco orbitais p paralelos e elétrons p -conjugados a eles.

Sendo o anel pirazolona altamente conjugado, a metila C8 (Esquema 7), ligada diretamente a esse fragmento da estrutura, tem seus hidrogênios com caráter ácido devido ao efeito indutivo retirador de elétrons do sistema conjugado.

Por essa razão, o radical **2a** (Esquema 7) é favorecido, por conseguir deslocalizar o elétron desemparelhado pelo sistema p -conjugado³², explicando assim a formação dos produtos clorados **5** e **6**.

O mecanismo por via reação radicalar foi então proposto em três etapas, de forma resumida no Esquema 8 para explicar a formação dos produtos clorados **5** e **6** a 80°C.

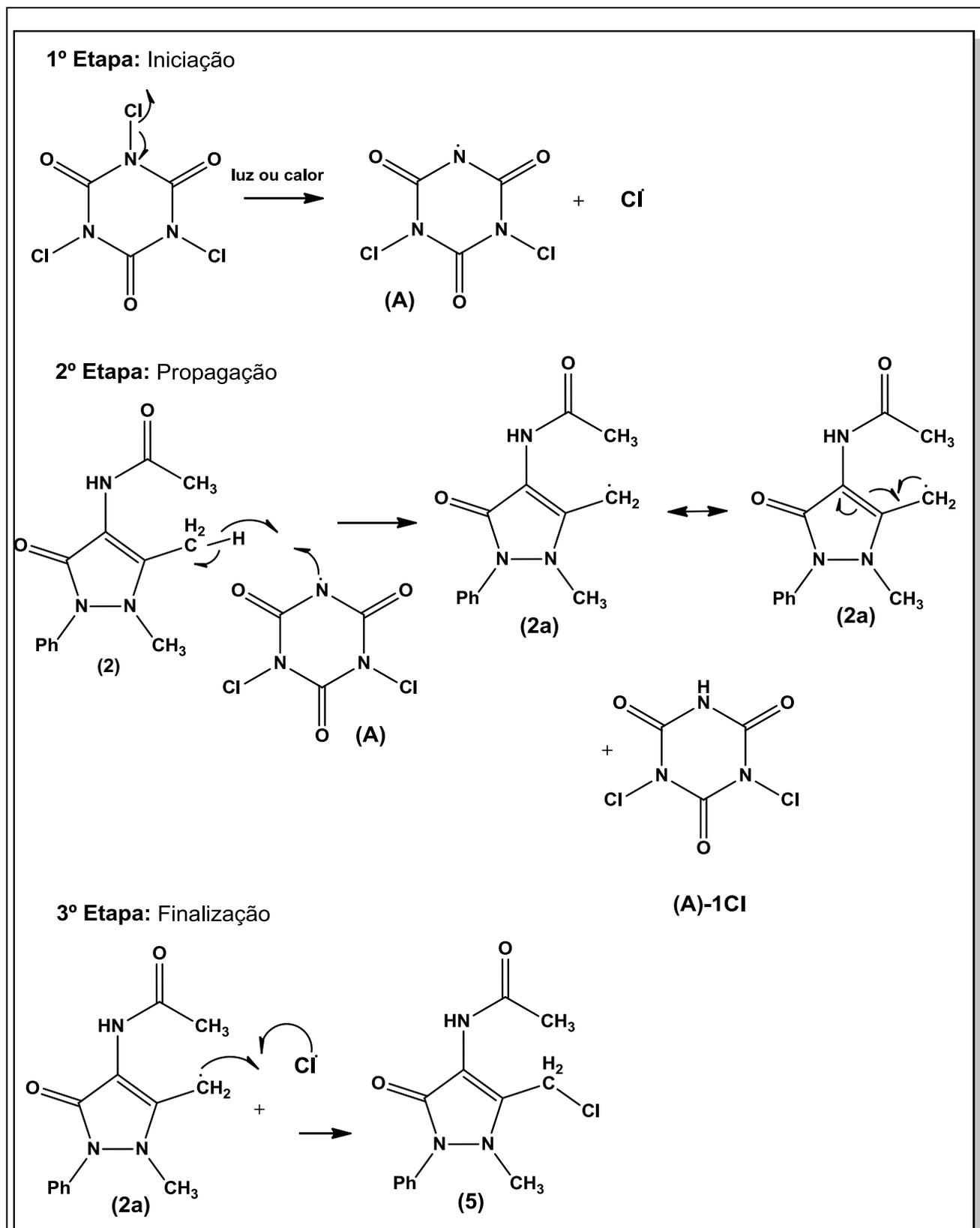
Na *primeira etapa* ocorre a iniciação, formação dos primeiros radicais cloro e **A**, provenientes da cisão homolítica do ácido tricloroisocianúrico.

Na *segunda etapa* ocorre a propagação, o radical **A** é responsável por formar o radical **2a**, proveniente da acetamida (**2**). Ocorre preferencialmente a formação do radical **2a**, pois esse radical estabiliza o elétron desemparelhado através de ressonância pelos orbitais p do anel pirazolona. Essa estabilização é permitida, porque há a mudança de hibridização do carbono C8 de sp^3 para sp^2 (Esquema 7).

A *terceira etapa* é de finalização, onde os radicais **2a** e cloro se unem para formar o composto **5**.

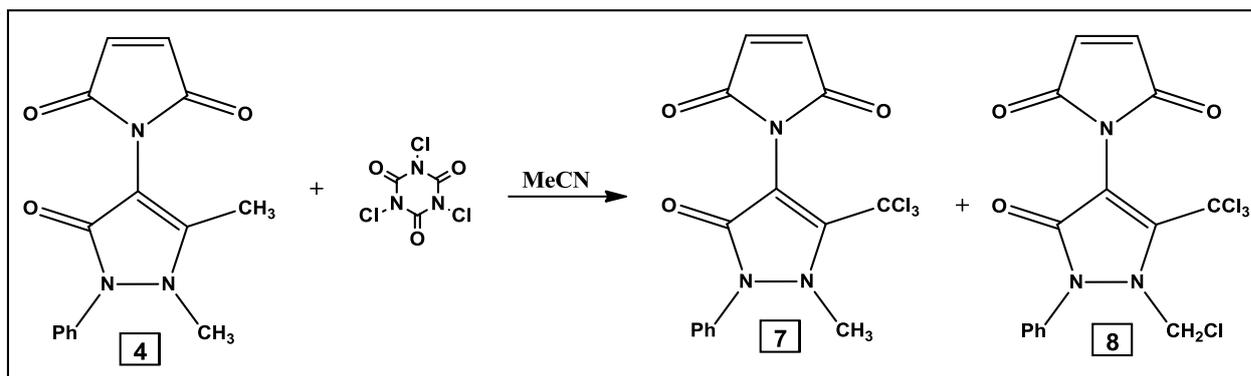
O mesmo raciocínio deve ser seguido para a formação do composto clorado **6**, porém ocorre formação do radical proveniente da molécula **5**, pela perda do segundo átomo radical de hidrogênio.

³² CLAYDEN, J.; GREEVS, N.; WARREN, S.; WHORTERS, P. **Organic Chemistry**, Paperback, 2 ed., 2012, ISBN: 978-0199270293, Oxford University Press, p.151-166.



Esquema 8. Proposta de mecanismo de formação do composto **5** via reação radicalar

4.3 Produção da *N*-(4-antipiril) maleimida tri (7) e tetraclorada (8)



Esquema 9. Síntese do produto tri (7) e tetraclorado (8) derivados da *N*-(4-antipiril) maleimida (4)

Reações de cloração foram também realizadas diretamente com a *N*-(4-antipiril) maleimida (4) (Esquema 9), já que esse composto pode ser usado diretamente em reações de Diels-Alder, sem passar por etapas de desacetilação como nos compostos 5 e 6, o que diminui o rendimento final de produção.

Para essa reação de cloração, houve a purificação da acetonitrila comercial, na tentativa de diminuir a quantidade de possíveis interferentes no meio reacional.

Utilizando a proporção molar de 1:3 do composto 4 em relação ao ácido tricloroisocianúrico (Figura 3), em temperatura ambiente por trinta minutos, pode-se verificar através de CCD a formação de apenas um produto de reação (composto 7). No entanto, com o aquecimento de 80°C, com o mesmo tempo de reação, além da formação do composto 7, houve também a formação do composto 8 (Esquema 9).

Quando foi utilizada quantidade equimolar do composto 4 e do ácido tricloroisocianúrico, mesmo em temperatura ambiente, por trinta minutos, foram obtidos os produtos 7 e 8, com rendimentos de 35 e 30%, respectivamente.

Ao realizar a elaboração dessa reação com água e acetato de etila, apenas os produtos de reação foram para a fase orgânica, pois a maleimida 4 é insolúvel em acetato de etila, sendo assim uma mistura reacional de fácil purificação.

No caso das reações que geraram a mistura dos compostos 7 e 8, a separação foi realizada por meio de coluna cromatográfica de sílica gel utilizando apenas acetato de etila como eluente.

4.3.1 Caracterização da *N*-(4-antipiril) maleimida triclorada (7)

Analisando os espectros de RMN de ^1H (Anexo 7.1) e de ^{13}C (Anexo 7.3) do composto **7** em relação ao material de partida **4** (Anexo 4.1), verifica-se o desaparecimento da metila C8, tanto pela ausência do simpleto referente aos hidrogênios H8 em 2,08 ppm, como também o sinal do carbono C8 em 12,1 ppm.

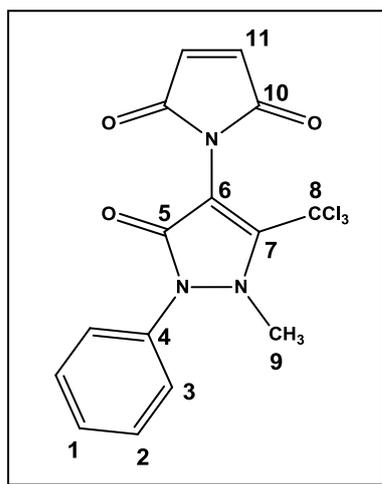


Figura 17. Estrutura química da *N*-(4-antipiril) maleimida triclorada (**7**)

O aparecimento de um sinal em 86,0 ppm no espectro de carbono ^{13}C , sem substituição por átomos de hidrogênios é confirmado pelo experimento de DEPT 135 (Anexo 7.2), indica que houve a tricloração da metila C8 do composto **4**.

A ausência de hidrogênios ligado a carbono C8 e o deslocamento químico em 86,0 ppm é condizente com um átomo de carbono ligado a três átomos de cloro²⁹ (Figura 17).

4.3.2 Caracterização da *N*-(4-antipiril) maleimida tetraclorada (8)

Para este composto foram verificados no espectro de RMN de ^1H (Anexo 8.1) e de ^{13}C (Anexo 8.3), a ausência dos sinais da metila C8 e também ausência dos sinais relativos a metila C9 com deslocamento em 35,3 ppm, em comparação com o material de partida **4** (Anexo 4.1). O aparecimento de um simpleto em 5,57 ppm com integração de dois hidrogênios foi relacionado aos hidrogênios H9 (Figura 18) no espectro de RMN de ^1H .

A confirmação da monocloração da metila C9, no composto **7**, é indicada pela ausência do sinal da metila C9, do material de partida, e aparecimento do sinal de

metileno em 58,3 ppm, comprovado pelo experimento de DEPT 135 (Anexo 8.2). Os deslocamentos químicos e a integração de H9 condizem com um átomo de carbono monoclorado³⁰ (C9) (Figura 18).

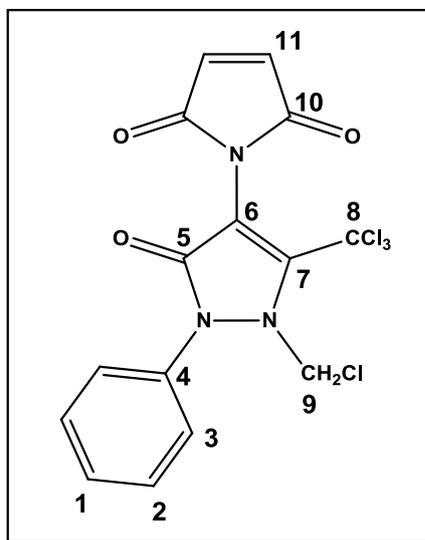


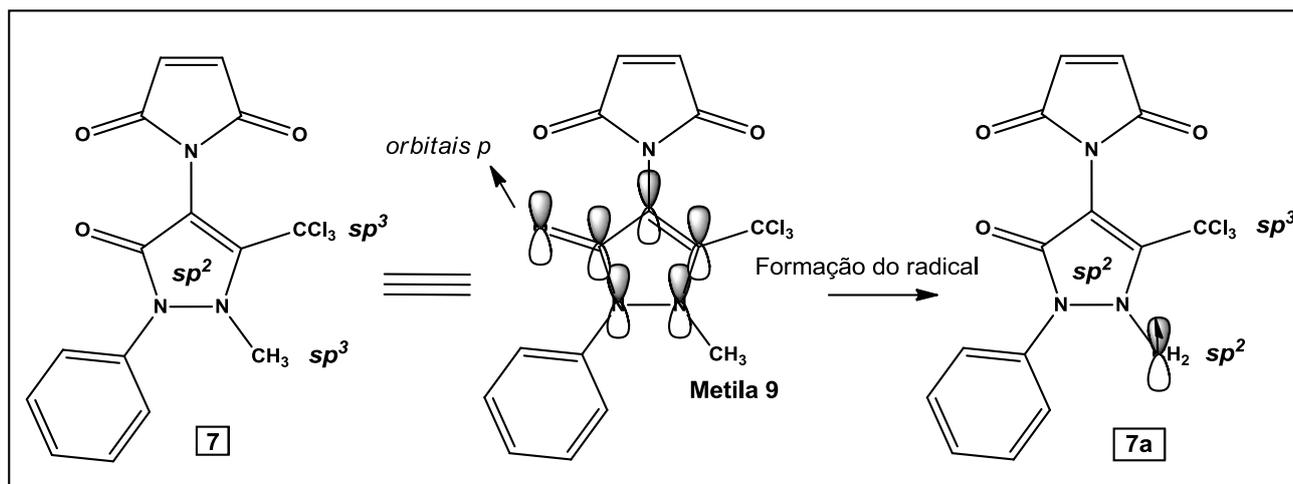
Figura 18. Estrutura química da *N*-(4-antipiril) maleimida tetraclorada (**8**)

Os demais sinais referentes ao substrato da 4-aminoantipirina (**1**) não sofreram alterações consideráveis em seus deslocamentos químicos e nem em suas integrações em relação aos compostos **7** e **8**.

4.3.3 Proposta de mecanismo de formação dos compostos **7** e **8**

Assim como, na reação de formação dos compostos **5** e **6** (Figura 15 e 16), sugere-se o mecanismo via radicais livres para cloração de C8, por três vezes, para produção do composto **7**.

Sendo assim, para a produção do composto **8**, houve a formação do radical **7a** em C9 (Esquema 10), que pode ser explicada por certa estabilidade fornecida ao radical, devido ao efeito elétron-doador do par de elétrons não-ligantes do átomo de nitrogênio, estabilizando o elétron desemparelhado presente no orbital *p*, por conjugação.



Esquema 10. Sistema p -conjugado e formação do radical **7a**

Podemos relacionar a menor variedade de produtos formados com a utilização do solvente tratado, pois houve diminuição de impurezas e água no solvente.

O anel N -maleimídico constituinte do composto **4** não apresentou reatividade frente às condições reacionais testadas, mesmo quando houve fornecimento de energia térmica extra na reação em 80°C , o que demonstra grande estabilidade devido à deslocalização dos elétrons em um sistema também conjugado, assim como encontrado no anel pirazolona. Nota-se esse comportamento, pois os dois fragmentos não formaram radicais vinílicos.

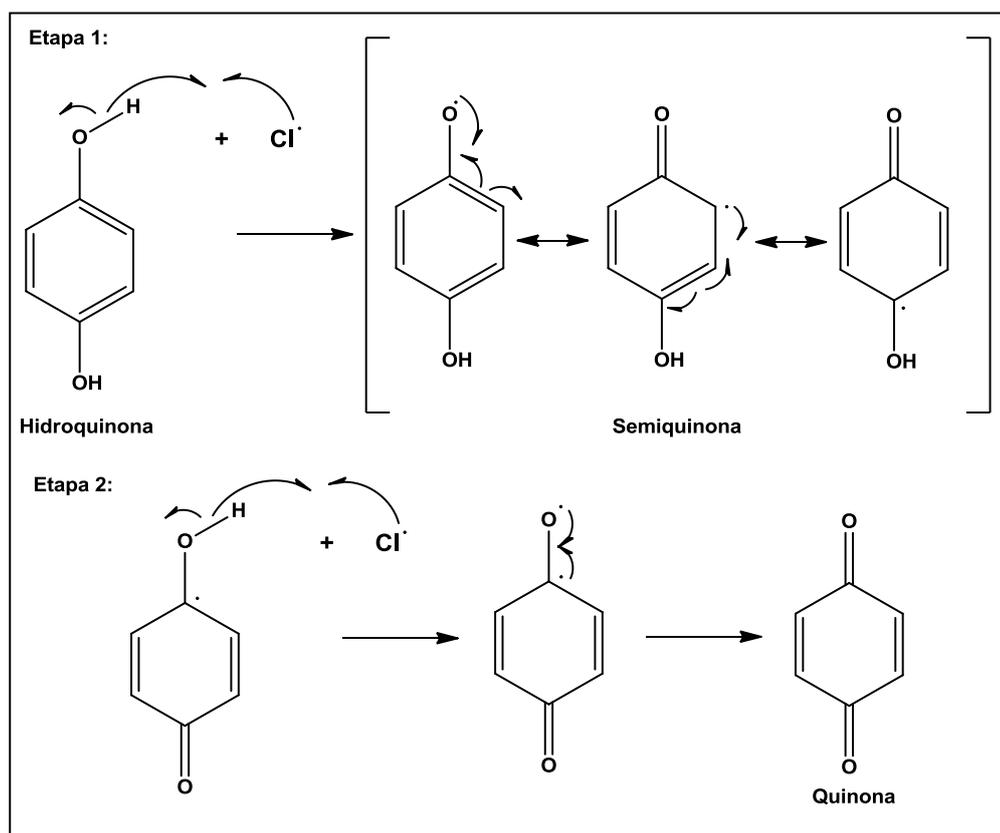
Os compostos **7** e **8** são inéditos, portanto há necessidade de comprovação das massas moleculares, porém não havia massa do composto **8** disponível para a realização do experimento de espectrometria massas de alta resolução, sendo assim foi realizado apenas para o produto **7**, encontrando a razão massa/carga (m/z) $[\text{M}+1]^+ = 385,9875$ (Anexo A), sendo a massa teórica calculada de $[\text{M}+1]^+ = 385,9860$.

4.3.4 Comprovação experimental do mecanismo radicalar para as reações de cloração

Uma maneira de comprovar o mecanismo radicalar ocorrido na formação do composto **7**, e conseqüentemente a formação dos outros produtos clorados, é por meio de reações utilizando compostos sequestradores de radicais livre. Esses compostos reagem com os radicais livres da reação, diminuindo a concentração deles no meio reacional, impossibilitando que a reação radicalar principal ocorra.

A hidroquinona é uma das opções de sequestradores de radicais livres, comportando-se como agente redutor, antioxidante e inibidor de polimerização.³³ Sendo também capaz de reagir com o radical livre de cloro (Esquema 11 – Etapa 1), por exemplo, produzindo um radical livre semiquinona estabilizado pela deslocalização do elétron desemparelhado e podendo ainda perder mais um radical de hidrogênio formando a quinona (Esquema 11 – Etapa 2).

Foram então realizadas duas reações (**RX** e **RY**) na tentativa de comprovação do mecanismo radicalar na síntese do composto **7**. A primeira reação (**RX**) continha apenas a mistura da hidroquinona com o ácido tricloroisocianúrico em acetonitrila, enquanto a segunda (**RY**) seguiu o *procedimento IV* de cloração, colocando-se inicialmente a hidroquinona e o composto **4**, em proporção molar 3:1 em acetonitrila, com posterior adição de ácido tricloroisocianúrico.



Esquema 11. Reação radicalar entre a hidroquinona e radical cloro

³³ DECAPRIO, A. P. The Toxicology of Hydroquinone — Relevance to Occupational and Environmental Exposure. *Critical Reviews In Toxicology*, v. 29, n. 3, p.283-330, 1999.

As reações **RX** e **RY** apresentaram a mesma coloração, acastanhada, diferente do *procedimento IV* sem a hidroquinona, que resultava em uma mistura reacional amarela.

RX e **RY** reagiram por trinta minutos, para então serem analisadas por CCD utilizando luz ultra-violeta (UV) e iodo (Figura 19) como revelador. O padrão de manchas em **RX** e **RY** foram os mesmos, diferenciando apenas um do outro pela presença do material de partida **4** encontrado próximo a base da placa, em **RY**.

Analisando então todos os dados experimentais das reações com hidroquinona foi possível confirmar o mecanismo radicalar da síntese do produto **7**, devido à permanência do material de partida em **RY** e aos padrões de manchas serem iguais em **RX** e **RY**.

4.4 Produção de derivados bromados da 4-aminoantipirina

Foram testadas três metodologias de bromação (Seção 6.2.5) utilizando a *N*-(4-antipiril) acetamida (**2**) e *N*-(4-antipiril) maleimida (**4**), em solvente purificado e variando a temperatura, agentes de halogenação e tempo reacional. Contudo, em nenhuma delas foi confirmada a produção de derivados bromados da 4-aminoantipirina.

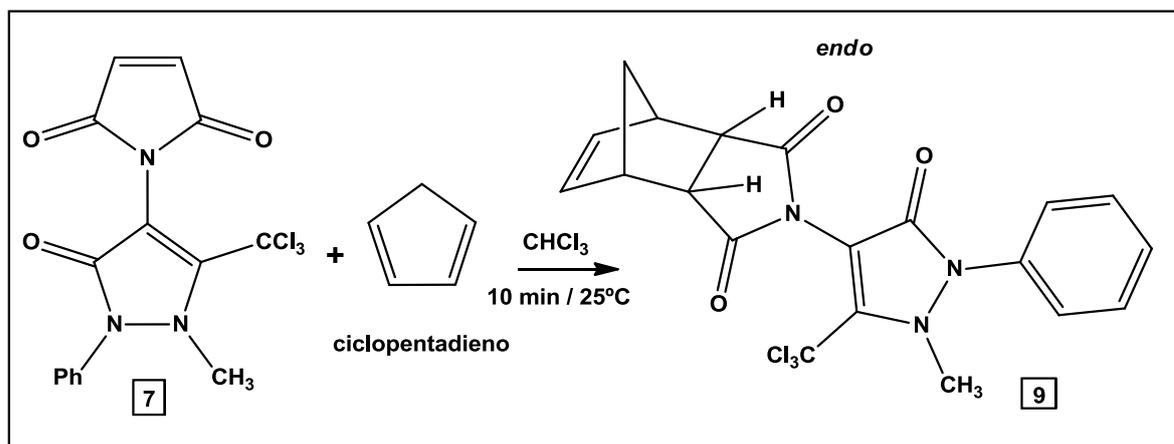
Em algumas tentativas houve o aparecimento de inúmeras manchas, verificadas por CCD, indicando a formação de vários produtos e inviabilizando a separação dos mesmos.

Em relação as reações radicalares, o átomo bromo forma um radical livre mais seletivo do que o radical do átomo de cloro, sendo necessária uma maior energia na abstração de radicais de hidrogênios ligados a carbonos primários do que em relação a carbonos terciários.²⁰ Isso explica a facilidade na formação dos compostos **5**, **6**, **7** e **8** a partir de um radical de carbono primário (alílico) e a dificuldade de obtenção de produtos bromados por reação radicalar.

4.5 Síntese e caracterização do norborneno da *N*-(4-antipiril) maleimida triclorado (**9**)

A reação de Diels-Alder entre o ciclopentadieno e a *N*-(4-antipiril) maleimida triclorada (**7**) (Esquema 12) foi realizada em temperatura ambiente por intermédio do *procedimento VIII* (Seção 6.2.6), sendo observado o aquecimento espontâneo da

reação no momento em que se adicionou o ciclopentadieno. Esse fenômeno indica uma reação espontânea e exotérmica, possivelmente formando o produto cinético, com configuração *endo*, já esta que necessita de menor energia de ativação para ser formado do que em relação ao produto com configuração *exo*.



Esquema 12. Síntese do aduto *endo* (9)

No espectro de RMN de ^1H (Anexo 9.1) realizado em CDCl_3 , o acoplamento entre os H11 e os hidrogênios de cabeça de ponte (H12), produziram sinais de multipletos com deslocamentos em 3,28 – 3,37 ppm, com integração proporcionais a quatro hidrogênios, sugerindo a configuração do tipo *endo* para o aduto **9** formado. Esses deslocamentos foram atribuídos à configuração *endo* da estrutura semelhante relatada na literatura¹⁶ (Esquema 3), na qual o material de partida (norborneno) já possui configuração *endo* específica.

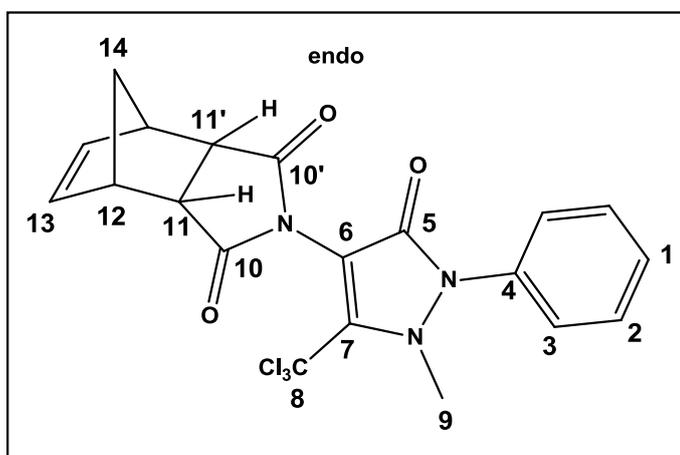


Figura 19. Estrutura química do aduto de Diels-Alder (**9**) derivado da N-(4-antipiril) maleimida triclorada (**7**)

Ainda sobre o espectro de RMN de ^1H , os hidrogênios olefínicos (H13) aparecem com dois dupletos em 6,18 – 6,21 ppm e os hidrogênios de ponte (H14) como dois dupletos entre 1,46 – 1,69 ppm. Já na molécula análoga descrita na literatura (Esquema 3)¹⁶ os hidrogênios H13 apresentam um sinal de simpleto referente aos dois hidrogênios olefínicos. Essa diferenciação se dá pela presença do carbono triclorado (C8), causando um efeito anisotrópico gerado pelos átomos de cloro.

No espectro de ^{13}C (Anexo 9.2) realizado em CDCl_3 , foram encontrados 16 tipos de carbono, dois a mais que o esperado, se a molécula **9** também possuísse plano de simetria como seu composto análogo¹⁶ relatado na literatura. Esses sinais duplicados do composto **9** apareceram em deslocamentos relacionados aos C10 e C11, dessa forma podemos relacionar que na molécula triclorada **9** pode haver o fenômeno de atropisomerismo devido ao carbono triclorado volumoso (C8), impedindo a rotação livre da ligação simples (σ) entre o nitrogênio do grupo dicarboximida e o C6 do anel pirazolona triclorado.

O fenômeno de atropisomerismo é atribuído a um tipo específico de estereoisomerismo que possui a rotação livre em torno de uma ligação simples impedida, necessitando o fornecimento de uma energia suficientemente elevada para transpor a barreira energética que permitiria sua rotação, de modo a permitir o isolamento ou simplesmente a detecção dos diferentes confômeros.³⁴

O atropisomerismo poderia ser analisado no espectro de RMN de ^1H em temperaturas de detecção do experimento superiores a 25°C , sendo que o fornecimento de energia na forma de calor poderia transpor a barreira energética e gerar a rotação da ligação entre o nitrogênio proveniente do grupo *N*-maleimida e o C6. Caso isso acontecesse, a multiplicidade do sinal dos hidrogênios olefínicos (H13) desapareceria, tornando-se um simpleto.

Uma amostra do composto **9** foi então enviada para a Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) onde os professores Dr. Alvaro Cunha e Dr. Valdemar Lacerda Junior ficaram responsáveis pelos experimentos de RMN de ^1H com aquecimento.

³⁴ SANTOS, A. R.; PINHEIRO, A. C.; SODERO, A. C. R.; CUNHA, A. S.; PADILHA, M. C.; SOUSA, P. M.; FONTES, S. P.; VELOSO, M. P.; MANSSOUR FRAGA, C. A. M. Atropisomerismo: o efeito da quiralidade axial em substâncias bioativas. *Química Nova*, v. 30, n. 1, p.125-135, fev. 2007.

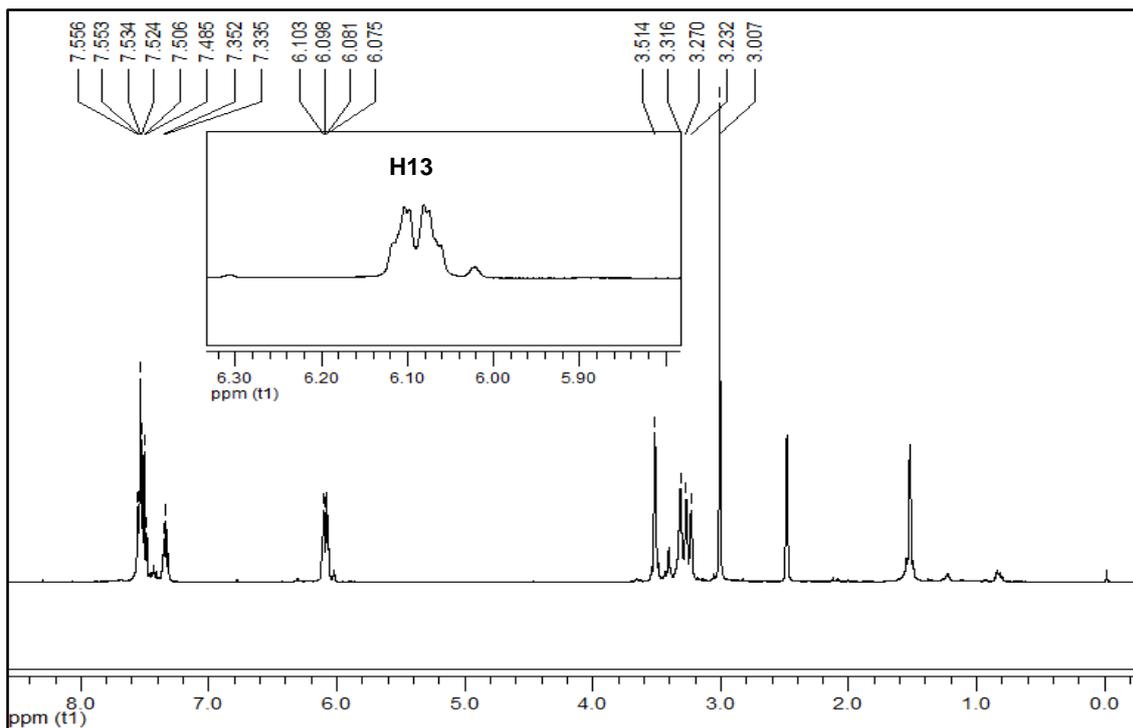


Figura 20. Espectro de RMN de ^1H do composto **9** em DMSO-d_6 a 26°C

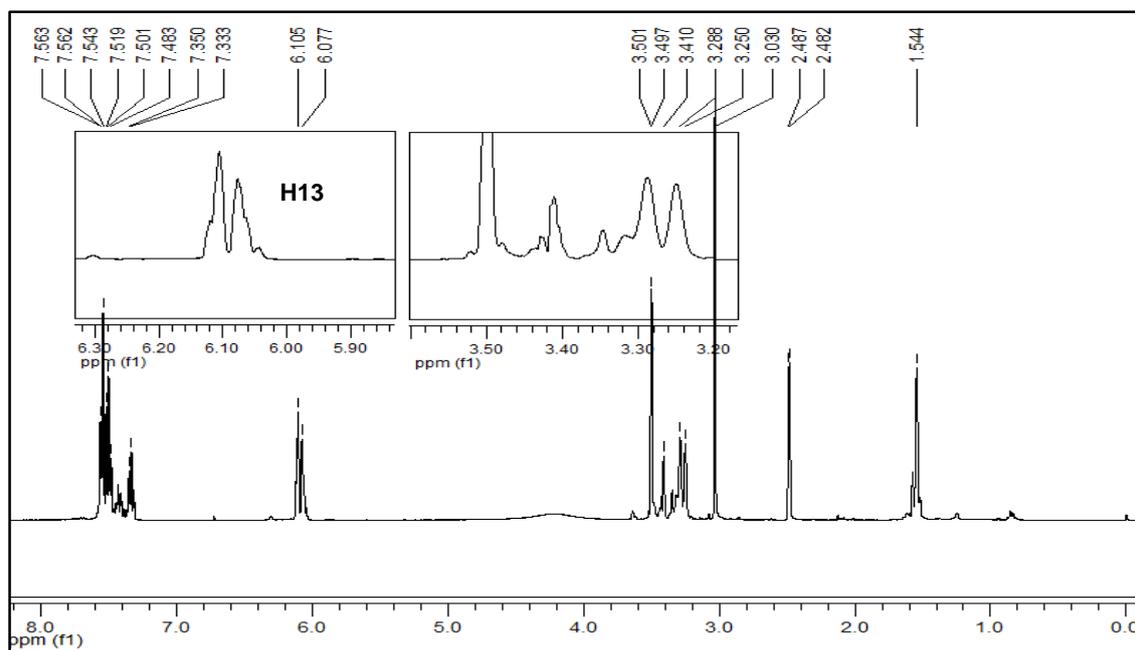


Figura 21. Espectro de RMN de ^1H do composto **9** em DMSO-d_6 a 70°C

A amostra **9** foi solubilizada em DMSO-d_6 e submetida a aquecimentos de 26°C (Figura 20), 30°C , 40°C , 50°C , 60°C e 70°C (Figura 21) em um espectrômetro de 400 MHz para se avaliar variações no sinal dos hidrogênios olefínicos (H13) da amostra no experimento de RMN de ^1H . No entanto, não foi possível atribuir diferenças na

conformação com o aumento da temperatura, porque esse aumento fez apenas o espectro perder resolução, sendo necessário maior temperatura de aquecimento da amostra **9** para transpor a barreira energética que impede a livre movimentação do anel pirazolona.

Todos os experimentos de 2D foram realizados com o produto **9** solubilizado em CDCl_3 .

No espectro de 2D de HMBC (acoplamento $^{2,3}J_{\text{C-H}}$) (Anexo 9.3) foram encontradas as correlações de acoplamento 3J entre os hidrogênios de ponte (H14) com os carbonos C11 e C13, o acoplamento 2J entre os hidrogênios H12 com os carbonos C11 e C11'.

O espectro 2D de NOESY (Anexo 9.6) não apresentou bom padrão de leitura, impossibilitando verificar as correlações de proximidade espacial entre hidrogênios.

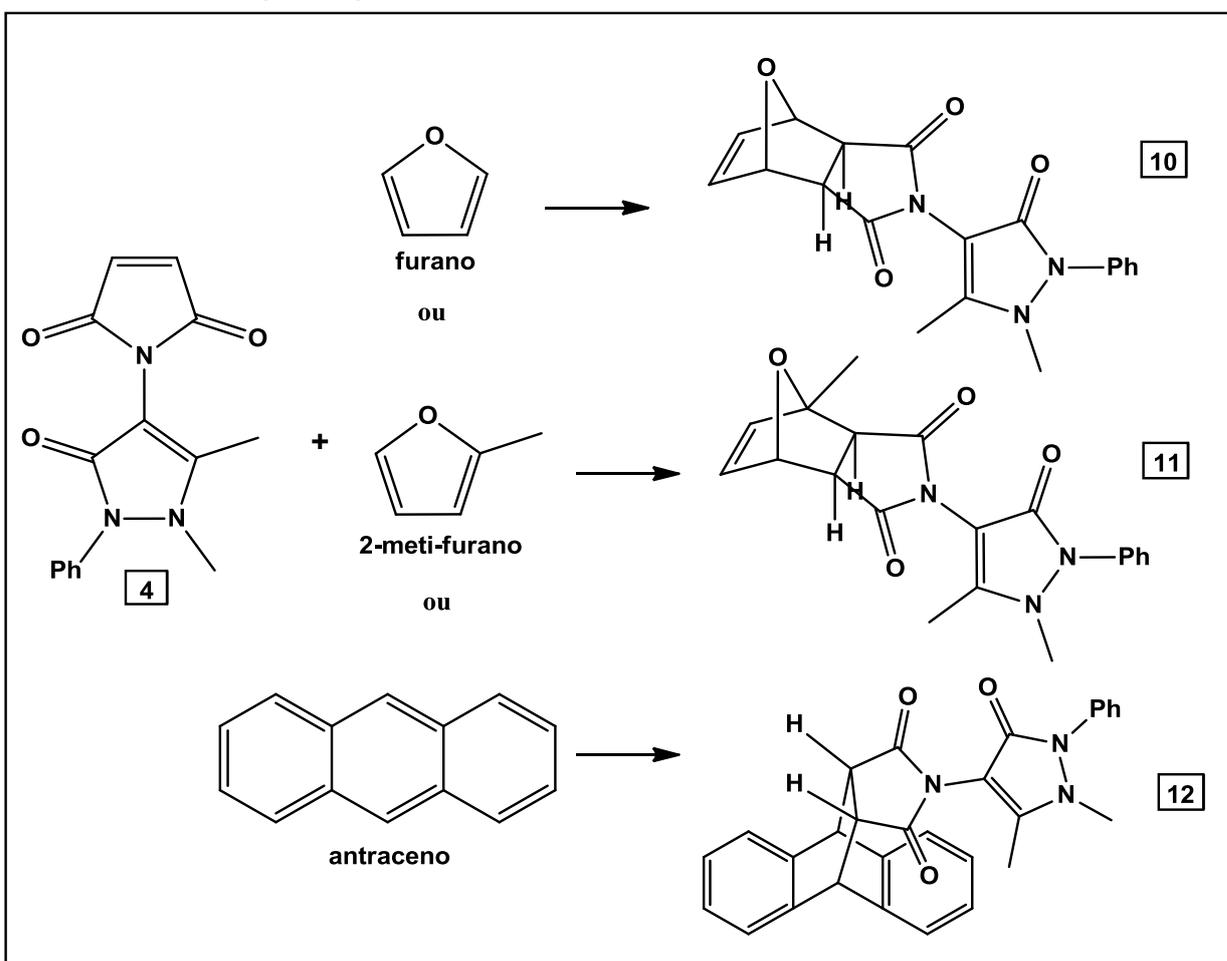
Por outro lado, no espectro 2D de HSQC (acoplamento $^1J_{\text{C-H}}$) (Anexo 9.4) foram relacionados com precisão os hidrogênios ligados diretamente aos carbonos da metila (C9-H9) dos átomos envolvidos na cabeça de ponte (C14-H14), no do aduto (C11-H11, C12-H12 e C13-H13), esses últimos com um pouco mais de dificuldade devido ao padrão de segunda ordem encontrado para os sinais dos hidrogênios H11 e H12. As correlações dos carbonos C1, C2 e C3, com os respectivos hidrogênios do anel aromático, existentes no substrato da 4-aminoantipirina, foram comprovados porque no composto **9** os deslocamentos químicos dos sinais apresentaram separação de cada tipo específico de hidrogênio.

Já em relação ao espectro de RMN 2D do tipo COSY (Anexo 9.5) pôde ser verificado que a porção mais desprotegida do multipletto dos hidrogênios H11 e H12, diz respeito aos hidrogênios H12, pois esse fragmento apresentou um acoplamento $^3J_{\text{H-H}}$ com os hidrogênios H13.

Por tratar-se de uma molécula inédita, houve a necessidade de comprovação de sua massa molecular. Para isso foi realizado o experimento de espectrometria de massas de alta resolução, encontrando a razão massa/carga (m/z) $[\text{M}+1]^+ = 452,0297$ (Anexo B), sendo a massa teórica calculada de $[\text{M}+1]^+ = 452,0330$.

4.6 Produção de adutos de Diels-Alder entre a *N*-(4-antipiril) maleimida (**4**) e dienos aromáticos

Os adutos **10** e **12** (Esquema 13) possuem plano de simetria na porção do aduto Diels-Alder formado, pois são originados do furano e antraceno, dienos que possuem apenas hidrogênios como substituintes. O composto **11** (Esquema 13), por ter sido originado do 2-metil-furano, não possui o mesmo plano de simetria e, por conseguinte o aduto produzido de forma racêmica, visto que não houve a utilização de catalisadores quirais para induzir excesso enantiomérico.



Esquema 13. Síntese dos aduto de Diels-Alder **10**, **11** e **12**

As reações não ocorreram em temperatura ambiente para esses dienos aromáticos, mesmo as reações sendo submetidas à agitação por períodos de 48 horas. Desse modo, as reações foram testadas em refluxo utilizando clorofórmio. Em temperaturas superiores a 100°C ocorre a degradação dos materiais de partida.

Houve monitoramento das reações através de CCD, onde verificou-se que após aproximadamente 20 horas de refluxo não havia mais modificação no padrão reacional, sendo então as reações elaboradas.

As atribuições das configurações *exo* das moléculas **10** e **11** foram feitas por comparação dos espectros de RMN de moléculas análogas descritas na literatura.

Para o composto **12**, formado a partir do antraceno, não há uma configuração específica, uma vez que em ambos os tipos de configuração, *endo* ou *exo*, sempre haverá um anel aromático na posição equatorial ao anel de seis membros formado.

Os rendimentos calculados após a purificação dos adutos de Diels-Alder formados **10**, **11** e **12** foram de 49, 83 e 70%, respectivamente.

4.6.1 Caracterização do aduto de Diels-Alder (**10**) proveniente do furano e *N*-(4-antipiril) maleimida

Por tratar-se de uma substância inédita, houve a necessidade de comprovação de sua massa molecular. Para tal, realizou-se o experimento de espectrometria de massas de alta resolução, encontrando a razão massa/carga (m/z) $[M+1]^+ = 352,1294$ (Anexo C), sendo a massa teórica calculada de $[M+1]^+ = 352,1291$.

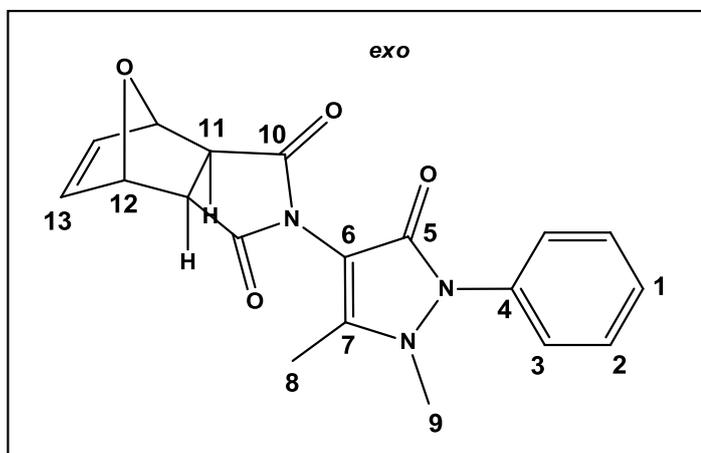


Figura 22. Estrutura química do aduto de Diels-Alder (**10**) da *N*-(4-antipiril) maleimida (**4**)

No espectro de RMN de ^1H (Anexo 10.1) os sinais de simpletos em 2,99 (H11) e 5,28 ppm (H12), sugerem que não houve acoplamento (sinais sem multiplicidade) entre os hidrogênios da cabeça de ponte (H12) e H11, presentes no anel de seis membros formado pela cicloadição de Diels-Alder, produzindo o composto **10** (Figura 22).

A porção olefínica aparece mais protegida, com sinal em 6,48 ppm (H13), por conta do seu afastamento das carbonilas (C10) em relação a *N*-(4-antipiril) maleimida (**4**), seu material de partida.

As integrações de todos os sinais no espectro de RMN de ^1H comprovam a quantidade de hidrogênios existentes na estrutura molecular proposta para o composto **10**.

A configuração do tipo *exo* é confirmada quando compara-se o espectro de RMN de ^1H do composto **10** (Figura 22), com dados espectrais de um estudo relatado na literatura³⁵ a respeito do aduto de Diels-Alder formado pelo furano e o anidrido maleico. Onde indica um sinal relativo a um simpleto em 3,20 ppm, proporcional a dois hidrogênios, atribuídos carbono a ligação C11 – H11 encontrada no produto **10**.

Segundo o estudo, a taxa de formação do produto *endo* (cinético) é muito mais rápida do que do produto *exo* (termodinâmico), devido a necessidade de menor energia de ativação. Porém, a reação é reversível e após 48 horas, ocorrendo a conversão total do produto *endo* em produto *exo*, independentemente da proporção inicial dos materiais de partida. Essa conversão está relacionada a energia livre de Gibbs do aduto *exo* ser 1,9 kcal/mol mais estável que o aduto *endo*.³⁵

O espectro de RMN de ^{13}C (Anexo 10.3) mostra 12 dos 13 tipos de carbonos existentes no composto **10** proposto. No entanto, não foi observado C6, provavelmente por não ter sido detectado pelo experimento devido ao tempo de aquisição do espectro, ou por estar sobreposto a outros sinais.

4.6.2 Caracterização do aduto de Diels-Alder (**11**) proveniente do 2-metil-furano e *N*-(4-antipiril) maleimida

O composto **11** também é inédito, portanto, a comprovação de sua massa molecular foi realizada por meio do experimento de espectrometria massas de alta resolução, encontrando a razão massa/carga (m/z) $[\text{M}+1]^+ = 366,1449$ (Anexo D), sendo a massa teórica calculada de $[\text{M}+1]^+ = 366,1448$.

Por não possuir um plano de simetria na porção do aduto formado pela reação de Diels-Alder, o composto **11** teve duplicada a quantidade de sinais nos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C , para os elementos referentes ao aduto.

³⁵ LEE, M. W.; HERNDON, W. C. Stereochemistry of the furan-maleic anhydride cycloaddition. *The Journal of Organic Chemistry*, v. 43, n. 3, p.518-518, 1978.

No espectro de RMN de ^1H (Anexo 11.1) foram encontrados quatro dupletos com constantes de acoplamento que indicaram correlações vicinais entre os hidrogênios H11 e H11' ($J= 6,5\text{Hz}$), H13 e H13' ($J= 5,6\text{Hz}$) e do tipo axial-equatorial entre H11' e H12 ($J= 1,2\text{Hz}$) (Figura 23).

As integrações de todos os sinais no espectro de RMN de ^1H comprovam a quantidade de hidrogênios existentes na molécula **11** proposta, Figura 23.

A determinação da configuração do aduto **11** também foi realizada por comparação dos dados espectrais de RMN de ^1H , com os descritos na literatura³⁶ para um aduto de Diels-Alder *exo* formado pelo 2-metil-furano e anidrido maleico, proveniente de uma pesquisa de estudo mecanístico desse par de reagentes.³⁶ As comparações levam à dedução que a estrutura **11** também apresenta configuração do tipo *exo*, assim como, a estrutura descrita.

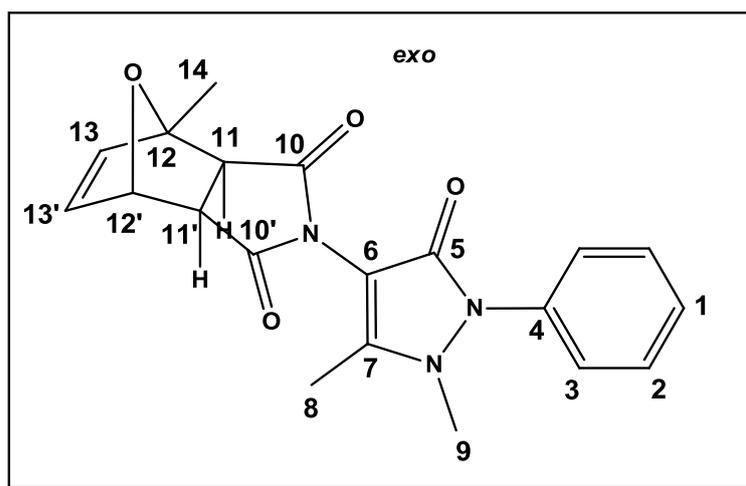


Figura 23. Estrutura química do aduto de Diels-Alder (**11**) da *N*-(4-antipiril) maleimida (**4**)

O espectro de DEPT 135 (Anexo 11.2) verificou-se todos os átomos de carbonos substituídos por hidrogênios, inclusive os carbonos do aduto de Diels-Alder formados por C14 (16,1 ppm), C11 e C11' (49,9 e 51,1 ppm) e C12' (81,4), C13 e C13' (137,1 e 140,7 ppm).

O espectro de RMN de ^{13}C (Anexo 11.3) verificou-se os 18 tipos de carbonos existentes na estrutura proposta para o composto **11**.

³⁶ SELTZER, S. The Mechanism of the Diels-Alder Reaction of 2-Methylfuran with Maleic Anhydride 1,2. *Journal of The American Chemical Society*, v. 87, n. 7, p.1534-1540, 1965.

Os demais sinais referentes ao substrato da 4-aminoantipirina (**1**) não sofreram alterações consideráveis em seus deslocamentos químicos e nem em suas integrações.

4.6.3 Caracterização do aduto de Diels-Alder (**12**) proveniente do antraceno e *N*-(4-antipiril) maleimida

Para o composto **12**, também inédito, realizou-se comprovação de sua massa molecular através do experimento de espectrometria massas de alta resolução, encontrando a razão massa/carga (m/z) $[M+1]^+ = 462,1761$ (Anexo E), sendo a massa teórica calculada de $[M+1]^+ = 462,1812$.

O aduto de Diels-Alder **12** (Figura 24) é formado entre dois anéis aromáticos igualmente substituídos por hidrogênios, logo sua estrutura não tem como ser considerada *endo* ou *exo*, pois qualquer tipo de interação dos orbitais no momento da reação de cicloadição formaria o mesmo composto.

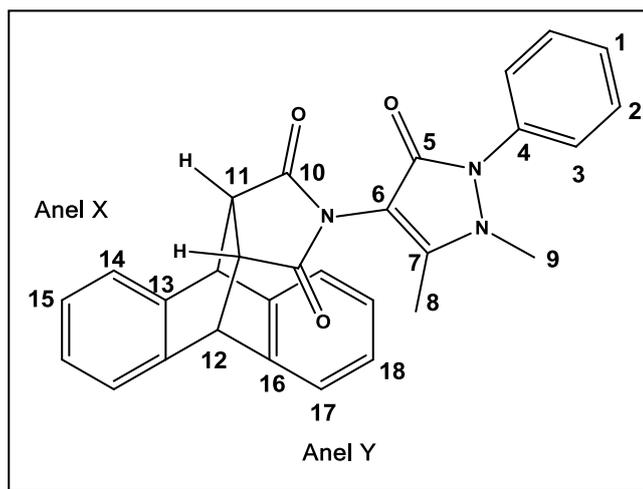


Figura 24. Estrutura química do aduto de Diels-Alder (**12**) da *N*-(4-antipiril) maleimida (**4**)

O espectro de RMN de ^1H (Anexo 12.1) comprovou, através das integrações dos sinais, a quantidade total de hidrogênios existentes na molécula. A estrutura do aduto Diels-Alder formado entre a maleimida **4** e o antraceno foi comprovado pelo aparecimento dos simpletos em 3,41 ppm (H11) e 4,85 ppm (H12).

Os hidrogênios dos anéis aromáticos tiveram seus sinais com deslocamentos químicos muito próximos, causando um padrão de segunda ordem, não sendo possível calcular as constantes de acoplamento, nem diferenciá-los entre si.

No espectro de DEPT 135 (Anexo 12.2) foram encontrados, além dos carbonos do aduto C11 (47,3 ppm) e C12 (45,8 ppm), sete tipos de carbonos aromáticos substituídos por hidrogênio, demonstrando que houve diferenciação entre os deslocamentos químicos dos carbonos dos anéis aromáticos da porção do antraceno (C14, C15 ≠ C17, C18).

Essa diferenciação também foi encontrada no espectro de RMN de ^{13}C (Anexo 12.3), quando foram contados 18 tipos de carbonos, indicando que o deslocamento químico de C13 é diferente de C16.

Analisando a estrutura da Figura 25, foi proposto que os hidrogênios H11 estariam voltados para o anel aromático X (C13, C14 e C15), pois foi observado o acoplamento 3J entre C13 e H11 encontrado no espectro de 2D de HMBC (acoplamento $^{2,3}J_{\text{C-H}}$) (Anexo 12.4) serve para propor que os deslocamentos químicos do anel X são menores que os do anel Y.

Desse modo, é proposto que o efeito anisotrópico exercido pelas carbonilas (C10), provenientes do anel maleimídico influencia na desproteção dos sinais em decorrência do alinhamento dos campos magnéticos gerados pela movimentação dos elétrons π das carbonilas e do anel aromático Y.

No espectro 2D de HSQC (acoplamento $^1J_{\text{C-H}}$) (Anexo 12.5) foram atribuídas as correlações entre os hidrogênios ligados diretamente aos carbonos das metilas (C8-H8 e C9-H9) e dos átomos envolvidos no aduto (C11-H11 e C12-H12). Para os carbonos C1, C2 e C3, referentes ao anel aromático existente no substrato da 4-aminoantipirina, não havia a necessidade de avaliar correlações, uma vez que esses deslocamentos se repetem, embora com pouca variação, em todos os compostos estudados até aqui. Os padrões de segunda ordem encontrados nos sinais dos hidrogênios aromáticos interferiram nas suas atribuições.

As atribuições dos carbonos foram realizadas com ajuda de tabelas de deslocamentos e simulação em programas de RMN.

4.7 Avaliação antimicrobiana pelo método de microdiluição em caldo

Os testes foram realizados pela doutoranda Tatiana Matayoshi, aluna do programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal de Mato Grosso

do Sul (UFMS), no Laboratório de Biotransformação localizado no Instituto de Química da UFMS, sob coordenação da Prof^a Dra. Ana Camila Micheletti.

O teste foi realizado com os compostos **7**, **9**, **10**, **11** e **12** utilizando a técnica de microdiluição em caldo para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM), por intermédio do procedimento³⁷ descrito na Seção 6.3, dos com concentrações iniciais das soluções de 3,0 mg/mL em dimetilsulfoxido (DMSO), sobre as bactéria *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923 – Gram-positiva) e *Escherichia coli* (ATCC 25922 – Gram-negativa). Os testes foram realizados em triplicata para cada um dos compostos, havendo também *controle negativo* (meio de cultura e microrganismo), *controle positivo* (meio de cultura, microrganismo, DMSO e solução aquosa de Gentamicina (120 µg/mL)) e o *branco* (meio de cultura, microrganismo e DMSO).

Realizou-se a interpretação dos resultados pela visualização da turvação, referente ao crescimento do microrganismo comparado aos controles positivos e negativos, sendo a concentração inibitória mínima do produto a qual capaz de impedir o crescimento.

Após a primeira interpretação dos dados, quanto ao crescimento bacteriano, foi adicionado 10 µL de uma solução aquosa (0.5%) de cloreto de trifeniltetrazolio (TTC) em cada poço e incubadas novamente a 36°C por 1 hora. O crescimento bacteriano foi evidenciado nos poços onde houve mudança de coloração, indo de incolor para vermelho, definindo a CIM de cada substância onde não ocorre mudança de coloração da solução.³⁷

Os resultados foram colocados na Tabela 3, referente a cada poço onde o crescimento do microrganismo foi impedido.

Tabela 3. Resultados de CIM no teste de microdiluição em caldo

Bactéria	Branco (µg/mL)	C. P (µg/mL)	Amostra 7 (µg/mL)
<i>Escherichia coli</i>	375,00	1,87	187,50
<i>Staphylococcus aureus</i>	375,00	0,93	93,75

C.P.=Controle positivo.

³⁷ AYRES, M. C. C. BRANDÃO, M. S.; VIEIRA JR, G. M.; MENOR, J. C. A. S.; HILDESSANDRA B. SILVA, H. B.; SOARES, M. J. S.; CHAVES, M. H. Atividade antibacteriana de plantas úteis e constituintes químicos da raiz de Copernicia prunifera. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 1, p.90-97, 2008.

Verificou-se que apenas o composto **7** apresentou inibição, tanto para a bactéria *Staphylococcus aureus* com CIM de 93,75 µg/mL, como também para *Escherichia coli* com CIM de 187,50 µg/mL. Os compostos **9**, **10**, **11** e **12** não foram ativos nas concentrações testadas.

O composto **7**, contudo apresenta baixa atividade antimicrobiana em relação ao fármaco do *controle positivo*, Gentamicina, que apresentou CIM de 0,93 µg/mL para *Staphylococcus aureus* e 1,87 µg/mL para *Escherichia coli*.

5 CONCLUSÃO

Foram sintetizados e caracterizados oito compostos inéditos **5**, **6**, **7**, **8**, **9**, **10**, **11** e **12** (Figura 25) derivados da 4-aminoantipirina, que ainda podem servir de bloco de construção para outras modificações, gerando outros compostos.

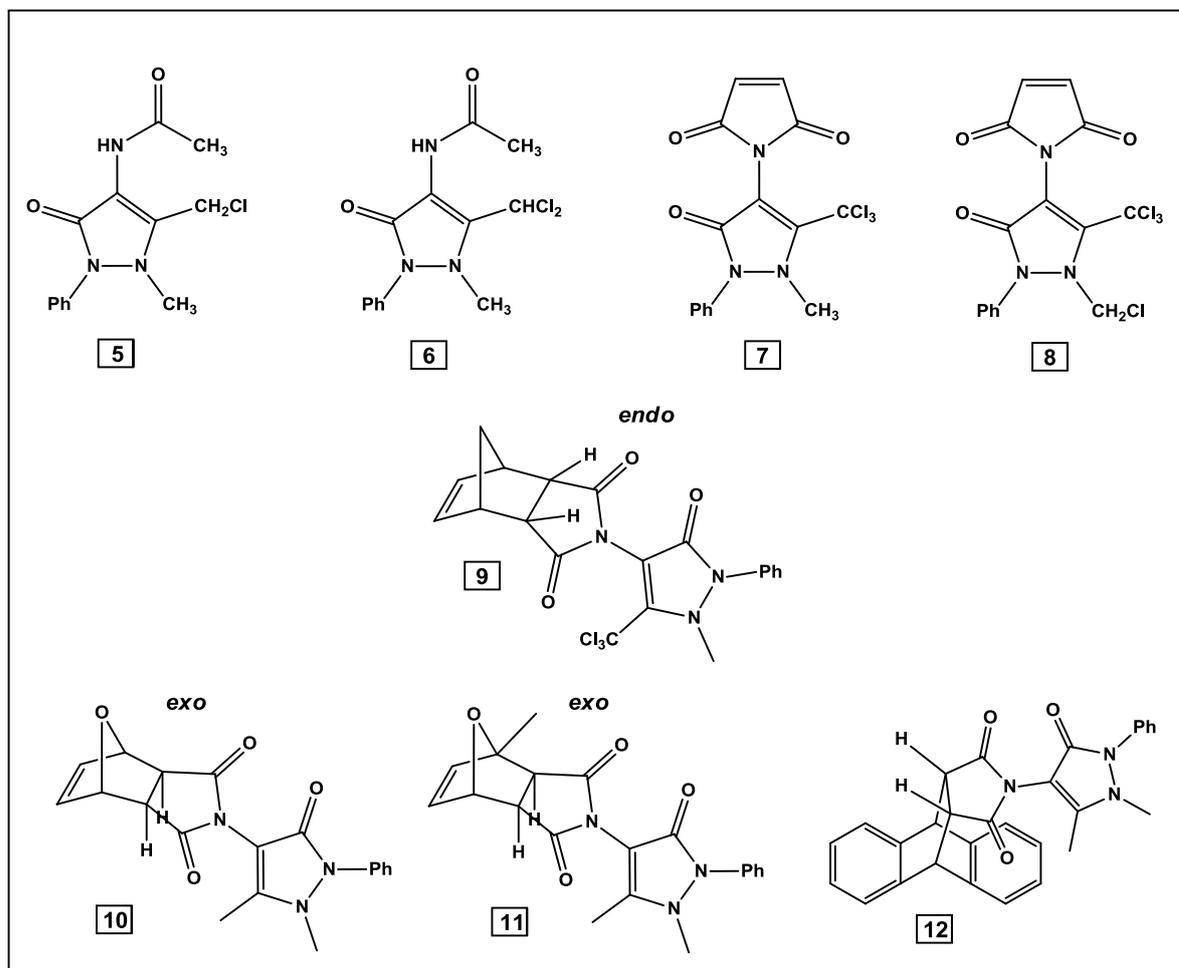


Figura 25. Produtos inéditos

Os derivados clorados **5**, **6**, **7** e **8** foram produzidos via reações radiculares, utilizando o ácido tricloroisocianúrico como fonte de radicais livres do átomo de cloro, tendo seu mecanismo reacional comprovado através de experimento com antioxidante hidroquinona.

Foram testadas metodologias de bromação utilizando Br_2 e NBS, variando as condições reacionais, com fornecimento de calor e/ou energia luminosa, mas não foi comprovada a formação de produtos halogenados por via radiacalar ou substituição eletrofílica aromática.

As reações de Diels-Alder foram realizadas com êxito utilizando pares de dienos e dienófilos ainda não citados na literatura, produzindo os adutos **9**, **10**, **11** e **12** com bons rendimentos (45 – 83%) e sendo de fácil purificação. As configurações *endo* e *exo* foram atribuídas às moléculas **9**, **10** e **11** utilizando comparação de dados espectrais de RMN de ^1H de moléculas análogas às produzidas, já relatadas na literatura.

Testes biológicos foram realizados para os compostos **7**, **9**, **10**, **11** e **12**, quanto a sua ação antibiótica contra as bactérias *Staphylococcus aureus* (Gram-positiva) e *Escherichia coli* (Gram-negativa) utilizando a metodologia de microdiluição de caldo.

Verificou-se que apenas o composto **7** possui ação antibiótica, tanto para a bactéria *Staphylococcus aureus* com CIM de 93,75 $\mu\text{g/mL}$, como também para *Escherichia coli* com CIM de 187,50 $\mu\text{g/mL}$.

Outras avaliações de ação biológica ainda são relevantes, principalmente a atividade citotóxica, analgésica e anti-inflamatória dos compostos **9**, **10**, **11** e **12**, pois são derivados da 4-aminoantipirina e apresentam adutos de Diels-Alder análogos aos dos norbornenos dicarboximidas, cantaridinas e cantaramidas¹⁰⁻¹⁵ (Figura 5).

6 PARTE EXPERIMENTAL

6.1 Equipamentos e materiais utilizados

6.1.1 Experimentos de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e de ^{13}C

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e de ^{13}C foram registrados no espectrômetro Bruker DPX-300, localizado no Instituto de Química da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C foram determinados em dimetilsulfóxido deuterado ($\text{DMSO-}d_6$) para o ácido *N*-(4-antipiril) maleâmico e em clorofórmio deuterado (CDCl_3) para os demais compostos e tetrametilsilano (TMS), como referência interna, usando-se radiofrequência de 300 e 75 MHz respectivamente, num campo magnético de 7,05 Tesla.

Os espectros de RMN de ^1H com aquecimento foram registrados no espectrômetro Varian-Agilent 400 MHz, instalado no Laboratório de RMN de Alto Campo da UFES, localizado no Núcleo de Competências em Química do Petróleo (NCQP), com radiofrequência de 399,73 MHz para prótons e 100,52 MHz para ^{13}C , o que corresponde a um campo magnético de 9,4 T.

Os valores de deslocamentos químicos foram atribuídos em parte por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz). As áreas dos sinais dos espectros de RMN de ^1H foram obtidas por integração eletrônica e suas multiplicidades descritas do seguinte modo: s: simpleto; d: duplete; t: tripleto; q: quadruplete; dd: duplo duplete e m: multipleto.

6.1.2 Medidas de ponto de fusão

Foram realizadas no aparelho de ponto de fusão a seco, Quims modelo 180 9001.

6.1.3 Espectrômetro de massas de alta resolução

Realizou-se a infusão direta, das amostras através do Cromatógrafo UFLC Shimadzu LC-20AD, acoplado ao detector IES-Q-QTOF-microTOF III do Espectrômetro de Massas (Bruker Daltonics), operado em modo de ionização positivo (m/z 120 – 1200) e ionização por eletro-spray (ESI). Preparou-se a amostra em uma

concentração de 0,1g/mL com metanol/água (7:3) e injetando-se um volume de 1 μ L, utilizando gradiente de eluição água (fase A) e acetonitrila (fase B), ambos com 0,1% de ácido fórmico, em modo isocrático 50%, corrida de 3 min.

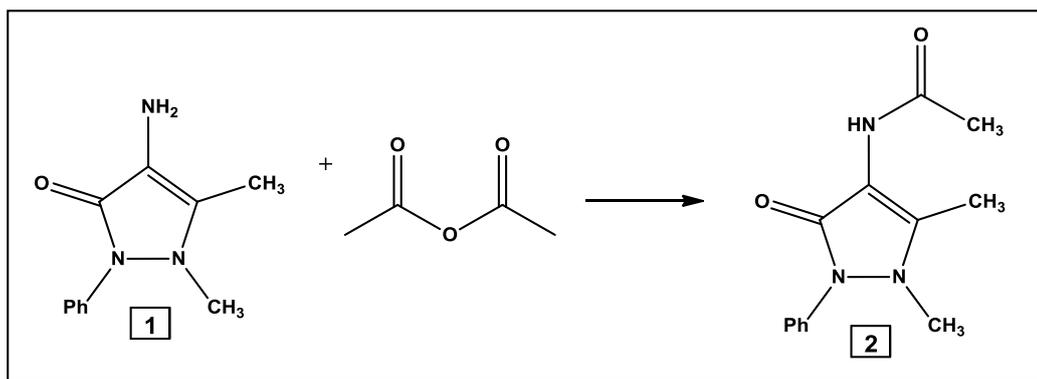
6.1.4 Reagentes e solventes utilizados

Todos os solventes anidros utilizados foram obtidos empregando-se os procedimentos convencionais descritos na literatura³⁸.

Os reagentes foram obtidos comercialmente e foram utilizados sem etapas de purificação prévia.

6.2 Descrição das sínteses

6.2.1 Síntese da *N*-(4-antipiril) acetamida (2)



Esquema 14. Síntese da *N*-(4-antipiril) acetamida

Procedimento experimental I:

Em um balão de 25 mL de fundo redondo adicionou-se a 4-aminoantipirina (1) (2,5 mmol) e 5 mL de anidrido acético, e mantidos em temperatura ambiente sob agitação magnética por meia hora. O produto foi purificado através de recristalização utilizando acetato de etila e hexano.¹⁹

Rendimento, dados espectroscópicos e características do composto:

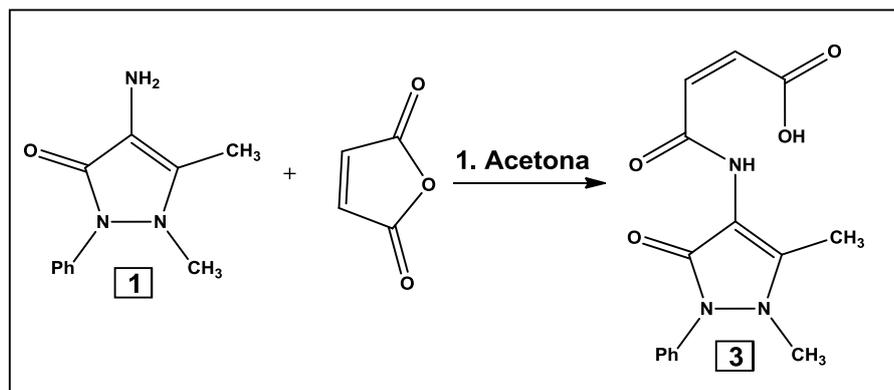
N-(1,5-dimetil-3-oxo-2-fenil-2,3-di-hidro-1*H*-pirazol-4-il) acetamida (2):

Rendimento= 75%. **RMN-¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm):** 2,08 (s, 3H); 2,23 (s, 3H); 3,12 (s, 3H); 7,34 (m, 3H); 7,47 (m, 2H); 9,44 (s, 1H, NH). **RMN-¹³C (CDCl₃, 75 MHz)**

³⁸ PERRIN, D.D.; ARMAREGO W. L. F.; **Purification of laboratory Chemicals** – 3 ed. Oxford: Pergamon Press, 1998.

δ (ppm): 12,1 (CH₃); 22,9 (CH₃); 35,7 (CH₃); 108,4 (C); 124,8 (CH); 127,3 (CH); 129,3 (CH); 134,3 (C); 150,4 (C); 162,3 (C=O); 170,4 (C=O). Sólido amarelo claro. Ponto de fusão: 166°C.

6.2.2 Síntese do ácido *N*-(4-antipiril) maleâmico (**3**)



Esquema 15. Síntese do ácido *N*-(4-antipiril) maleâmico

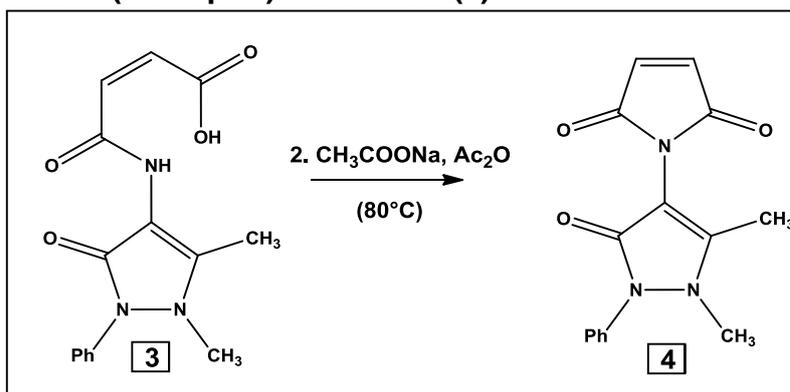
Procedimento experimental II:

Uma solução de 5 mL de 4-aminoantipirina (**1**) (10,20 mmol) em acetona foi adicionada gota a gota em um balão de 50 mL de fundo redondo contendo 5 mL de solução de anidrido maleico (10,20 mmol) preparada com o mesmo solvente sob agitação à temperatura ambiente por 1 hora. O precipitado formado foi purificado através de filtração simples e lavagem com acetona.²⁹

Rendimentos, dados espectroscópicos e características dos compostos:

Ácido (*Z*)-4-((1,5-dimetil-3-oxo-2-fenil-2,3-di-hidro-1*H*-pirazol-4-il)amino)-4-oxobut-2-enóico (**3**): Rendimento= 98%. **RMN-¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm):** 2,14 (s, 3H); 3,02 (s, 3H); 6,26 (d, 1H, J_{cis} =12,0 Hz); 6,48 (d, 1H, J_{cis} =12,0 Hz); 7,30 (m, 3H); 7,46 (m, 2H); 9,78 (s, 1H, OH). **RMN-¹³C (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm):** 11,7 (CH₃); 36,3 (CH₃); 106,6 (C); 124,2 (CH); 127,0 (CH); 129,6 (CH); 131,6 (CH); 131,6 (CH); 135,3 (C); 152,6 (C); 161,7 (C=O); 164,6 (C=O); 167,0 (C=O). Sólido amarelo claro. Ponto de fusão: 202,5°C.

6.2.3 Síntese da *N*-(4-antipiril) maleimida (**4**)



Esquema 16. Síntese da *N*-(4-antipiril) maleimida

Procedimento experimental III:

O ácido *N*-(4-antipiril) maleâmico (**3**) (10,00 mmol) foi adicionado em um balão de 50 mL de fundo redondo contendo acetato de sódio (4 mmol) e anidrido acético (36,11 mmol), acoplado a um condensador, e aquecido a 80°C. Após quinze minutos, a reação foi extraída com clorofórmio (10 mL), lavada com solução de NaHCO₃ saturado (3 X 5 mL), seca utilizando MgSO₄ e o solvente foi retirado através de pressão reduzida. A purificação do produto (**4**) foi realizada por recristalização utilizando acetato de etila.²⁹

Rendimentos, dados espectroscópicos e características dos compostos:

1-(1,5-dimetil-3-oxo-2-fenil-2,3-di-hidro-1*H*-pirazol-4-il)-1*H*-pirrole-2,5-diona (**4**):

Rendimento: 95%. **RMN-¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm):** 2,02 (s, 3H); 3,03 (s, 3H); 6,73 (s, 2H); 7,26 (m, 5H). **RMN-¹³C (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm):** 10,8 (CH₃); 35,3 (CH₃); 100,8 (C); 124,8 (CH); 127,3 (CH); 129,2 (CH); 134,2 (C); 134,8 (CH); 153,0 (C); 160,9 (C=O); 169,3 (C=O). Sólido amarelo. Ponto de fusão: 159°C.

6.2.4 Síntese de derivados clorados da *N*-(4-antipiril) acetamida (**5** e **6**) e da *N*-(4-antipiril) maleimida (**7** e **8**)

Procedimento experimental IV:

Em um balão de 25 mL de fundo redondo adicionou-se o ácido tricloroisocuanúrico (2,0 ou 0,67 mmol) ao derivado correspondente (**2** ou **4**) (2,0 mmol) em 10 mL de acetonitrila. A solução foi mantida em aquecimento a uma temperatura de 80°C ou temperatura ambiente, sob agitação magnética. Após meia

hora, a mistura reacional foi filtrada, depois extraída com acetato de etila (10 mL), lavada com solução de NaHCO₃ 15% (3 X 5 mL), seca utilizando MgSO₄ e o solvente retirado através de pressão reduzida. Os produtos foram purificados por meio de cromatografia em coluna utilizando sílica gel e acetato de etila como eluente.⁹

Rendimentos, dados espectroscópicos e características dos compostos:

N-(5-(clorometil)-1-metil-3-oxo-2-fenil-2,3-di-hidro-1*H*-pirazol-4-il) acetamida (**5**):
Rendimento= 27% **RMN-¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm):** 2,01 (s, 3H); 3,15 (s, 3H); 4,60 (s, 2H); 7,34 (m, 3H); 7,45 (m, 2H); 9,29 (s, 1H, NH). **RMN-¹³C (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm):** 22,9 (CH₃); 34,9 (CH₃); 36,3 (CH₂); 110,0 (C); 125,0 (CH); 127,9 (CH); 129,5 (CH); 133,5 (C); 145,0 (C); 160,8 (C=O); 170,1 (C=O). Sólido amarelo. Ponto de fusão: 198°C.

N-(5-(diclorometil)-1-metil-3-oxo-2-fenil-2,3-di-hidro-1*H*-pirazol-4-il) acetamida (**6**): Rendimento: 21%. **RMN-¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm):** 2,05 (s, 3H); 3,44 (s, 3H); 7,31 (s, 1H); 7,43 (m, 3H); 7,54 (m, 2H); 9,54 (s, 1H, NH). **RMN-¹³C (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm):** 22,9 (CH₃); 37,8 (CH₃); 61,1 (CH); 108,4 (C); 125,7 (CH); 128,6 (CH); 129,7 (CH); 132,8 (C); 141,6 (C); 159,6 (C=O); 170,2 (C=O). Sólido amarelo. Ponto de fusão: 188°C.

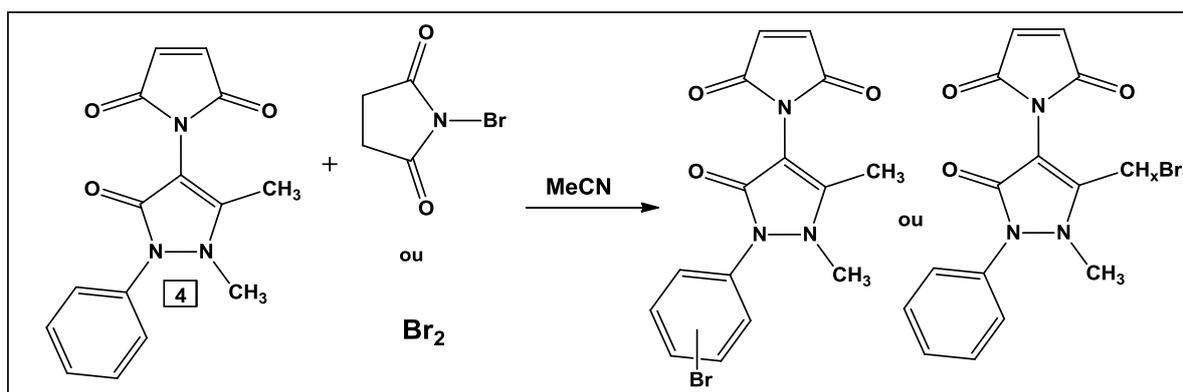
1-(1-meil-3-oxo-2-fenil-5-(triclorometil)-2,3-di-hidro-1*H*-pirazol-4-il)-1*H*-pirrole-2,5-diona (**7**): **RMN-¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm):** 3,48 (s, 3H); 6,87 (s, 2H); 7,47 (m, 5H). **RMN-¹³C (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm):** 39,7 (CH₃); 86,0 (C); 104,2 (C); 125,1 (CH); 128,4 (CH); 129,6 (CH); 132,7 (C); 135,4 (CH); 150,9 (C); 158,8 (C=O); 168,3 (C=O). Sólido amarelo.

1-(1-(clorometil)-3-oxo-2-fenil-5-(triclorometil)-2,3-di-hidro-1*H*-pirazol-4-il)-1*H*-pirrole-2,5-diona (**8**): **RMN-¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm):** 5,57 (s, 2H); 6,91 (s, 2H); 7,42 (m, 1H); 7,51 (m, 4H). **RMN-¹³C (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm):** 58,3 (CH₂); 85,6 (C); 102,8 (C); 125,3 (CH); 129,0 (CH); 129,8 (CH); 131,5 (C); 135,6 (CH); 148,6 (C); 158,4 (C=O); 167,3 (C=O). Sólido amarelo.

Tabela 4. Rendimento dos produtos 7 e 8 em diferentes proporções estequiométricas dos materiais de partida em temperatura ambiente

Proporção em números de mol composto (4) : ATCl	Produto 7	Produto 8
3 : 1	32%	Não é formado
1 : 1	35%	30%

6.2.5 Síntese de derivados bromados da *N*-(4-antipiril) maleimida



Esquema 17. Síntese de produtos bromados da *N*-(4-antipiril) maleimida

Procedimento experimental V:

Em um balão de fundo redondo de 25 mL uma mistura da *N*-(4-antipiril) maleimida (**4**) (1,0 mmol) e NBS (1,05 mmol) foi agitada com 5 mL de acetonitrila sob atmosfera de nitrogênio gasoso, na presença de luz (250 W, $\lambda = 200 - 600$ nm), em temperatura ambiente. A NBS foi adicionado em intervalos de três minutos. A mistura reacional foi extraída com CHCl₃, lavada com solução aquosa de NaCl e seca com Na₂SO₄ anidro. A mistura reacional foi separada por meio de cromatografia em coluna utilizando sílica gel e acetato de etila como eluente.³⁹ Não foi verificada a formação do produto de interesse.

Procedimento experimental VI:

Em um balão de fundo redondo de 25 mL a mistura da *N*-(4-antipiril) maleimida (**4**) (1,0 mmol), NBS (1,05 mmol), clorotrimetilsilano (0,1 mmol) em 5 mL de acetonitrila foi mantida em agitação mecânica por uma hora à temperatura ambiente.

³⁹ CHHATTISE, P. K.; RAMASWAMY, A. V.; WAGHMODE, S. B. Regioselective, photochemical bromination of aromatic compounds using N-bromosuccinimide. *Tetrahedron Letters*, v. 49, n. 1, p.189-194, 2008.

A reação foi extraída com CHCl_3 , lavada com solução de NaCl e seca com Na_2SO_4 anidro. A mistura reacional foi separada por meio de cromatografia em coluna utilizando sílica gel e acetato de etila como eluente.⁴⁰ Não foi verificada a formação do produto de interesse.

Procedimento experimental VII:

Em um balão de fundo redondo de 25 mL uma mistura da *N*-(4-antipiril) maleimida (**4**) (1,0 mmol) e Br_2 (1,05 mmol) foi agitada com 5 mL de acetonitrila, na presença de luz ambiente, em temperatura ambiente (ou refluxo). A reação foi extraída com clorofórmio, lavada com solução aquosa de NaCl e seca com Na_2SO_4 anidro. A mistura reacional foi separada por meio de cromatografia em coluna utilizando sílica gel e acetato de etila como eluente. Não foi verificada a formação do produto de interesse.

6.2.6 Síntese do aduto de Diels-Alder (9**) entre a *N*-(4-antipiril) maleimida triclorada (**7**) e ciclopentadieno**

Procedimento experimental VIII:

O ciclopentadieno (30,0 mmol) foi gotejado em um balão de 20 mL contendo a *N*-(4-antipiril) maleimida triclorada (**7**) (14,8 mmol) em 5 mL de CHCl_3 , e a reação foi deixada sob agitação magnética por dez minutos. A purificação do produto foi feita por recristalização em hexano.

Rendimento, dados espectroscópicos e características do composto:

2-(1-metil-3-oxo-2-fenil-5-(triclorometil)-2,3-di-hidro-1*H*-pirazol-4-il)-3a,4,7,7a-tetra-hidro-1*H*-4,7-metanoisoindol-1,3(2*H*)-diona (**9**):

Rendimento= 45%. **RMN-¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm):** 1,47 (d, 1H, $J_{\text{gem.}} = 9,0$ Hz); 1,67 (d, 1H, $J_{\text{gem.}} = 9,0$ Hz); 3,05 (s, 3H); 3,31 (m, 4H); 6,19 (dd, 2H, $J_{\text{cis}} = 9$ Hz, $J_{\text{eq-eq.}} = 3$ Hz); 7,24 (m, 1H); 7,41 (m, 2H); 7,62 (d, 2H, $J_{\text{orto}} = 6,0$ Hz). **RMN-¹³C (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm):** 42,3 (CH₃); 45,2 (CH); 45,6 (CH); 46,6 (CH); 51,2 (CH₂); 112,2 (C); 121,6

⁴⁰ MAIBUNKAEW, T.; THONGSORNKLEEB, C.; TUMMATORN, J.; RUCHIRAWATA, A. B. S. Practical and Metal-Free Electrophilic Aromatic Halogenation by Interhalogen Compounds Generated In Situ from *N*-Halosuccinimide and Catalytic TMSCl. *Synlett*, v. 25, n. 12, p.1769-1775, 2014.

(CH); 126,9 (CH); 129,3 (CH); 134,2 (CH); 134,8 (C); 135,5 (CCl₃); 141,4 (C); 159,8 (C=O); 175,2 (C=O); 175,4 (C=O). Sólido amarelo claro. Ponto de fusão: 178°C.

6.2.7 Síntese de adutos de Diels-Alder (10), (11) e (12) entre a *N*-(4-antipiril) maleimida e dienos aromáticos

Procedimento experimental IX:

Em uma balão de 25 mL adicionou-se a *N*-(4-antipiril) maleimida (**4**) (14,8 mmol), 10 mL de clorofórmio e o dieno correspondente (furano, 2-metilfurano, antraceno), sendo este o reagente em excesso (30,0 mmol). Mantando-se em refluxo com agitação magnética por 24 horas. Após a retirada do solvente, a purificação do produto foi feita por coluna cromatográfica utilizando sílica gel e acetato de etila e acetona 3:1 (v/v) como eluente.

Rendimentos, dados espectroscópicos e características dos compostos:

2-(1,5-dimetil-3-oxo-2-fenil-2,3-di-hidro-1*H*-pirazol-4-il) 3a,4,7, 7a-tetra-hidro-1*H*-4,7-epoxi-isoindol-1,3(2*H*)-diona (**10**): Rendimento = 49%. **RMN-¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm):** 2,04 (s, 3H); 2,99 (s, 2H); 3,12 (s, 3H); 5,28 (s, 2H); 6,48 (s, 2H); 7,34 (m, 5H). **RMN-¹³C (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm):** 10,8 (CH₃); 35,3 (CH₃); 47,7 (CH); 81,4 (CH); --- (C); 125,0 (CH); 127,5 (CH); 129,3 (CH); 134,2 (C); 136,4 (CH); 152,2 (C); 160,6 (C=O); 173,8 (C=O); 175,2 (C=O). Sólido amarelo claro. Ponto de fusão: 180-181°C.

2-(1,5-dimetil-3-oxo-2-fenil-2,3-di-hidro-1*H*-pirazol-4-il)-4-metil-3a,4,7,7a-tetra-hidro-1*H*-4,7-epoxi-isoindol-1,3(2*H*)-diona (**11**): Rendimento= 83%. **RMN-¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm):** 1,71 (s, 3H); 2,05 (s, 3H); 2,84 (d, 1H, $J_{\text{vicinal}}= 6,5\text{Hz}$); 3,11 (m, 4H); 5,20 (d, 1H, $J_{\text{ax-eq}}= 1,2\text{Hz}$); 6,29 (d, 1H, $J_{\text{vicinal}}= 5,5\text{Hz}$); 6,49 (d, 1H, $J_{\text{vicinal}}= 5,4\text{Hz}$); 7,34 (m, 5H). **RMN-¹³C (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm):** 10,7 (CH₃); 15,8 (CH₃); 35,3 (CH₃); 49,6 (CH); 50,9 (CH); 81,1 (CH); 88,4 (C); 102,2 (C); 125,0 (CH); 127,4 (CH); 129,3 (CH); 134,2 (C); 136,8 (CH); 140,4 (CH); 152,2 (C); 160,6 (C=O); 173,8 (C=O); 175,2 (C=O). Sólido amarelo. Ponto de fusão: 104,3°C.

13-(1,5-dimetil-3-oxo-2-fenil-2,3-di-hidro-1*H*-pirazol-4-il)-10,11-di-hidro-9*H*-9,10-[3,4]epipirroloantraceno-12,14(13*H*,15*H*)-diona (**12**): Rendimento= 70%. **RMN-¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm):** 1,19 (s, 3H); 3,02 (s, 3H); 3,41 (s, 2H); 4,85 (s, 2H); 7,33

(m, 13H). **RMN-¹³C (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm):** 9,7 (CH₃); 35,0 (CH₃); 45,5 (CH); 47,0 (CH); 101,6 (C); 124,3 (CH); 125,0 (CH); 125,3 (CH); 126,8 (CH); 127,0 (CH); 127,4 (CH); 129,3 (CH); 134,1 (C); 141,5 (C); 152,0 (C); 160,3 (C=O); 175,7 (C=O). Sólido branco. Ponto de fusão: >300°C.

6.3 Teste biológico antimicrobiano

Placas de 96 poços foram preparadas colocando-se 100 µL de caldo Müeller-Hinton em cada poço. O volume de 100 µL de uma solução preparada com dimetilsulfoxido (DMSO) inicialmente na concentração de 3,0 mg/mL de cada amostra foi adicionado ao primeiro poço. Em seguida, 100 µL do primeiro poço foram transferidos para o segundo e sucessivas diluições de 1:2, com volume final de 100 µL em cada poço. O inóculo bacteriano se constituiu de uma cultura de 24 horas de cada espécie bacteriana em ágar Müelle- Hinton diluída em solução salina estéril (0,45%) a uma concentração de 10⁸ UFC/mL, diluído 1/10 em solução salina estéril, sendo adicionados 5 µL (5x10⁴ UFC/mL) em cada poço.

Todos os testes foram realizados em triplicata e as placas incubadas a 36°C por 18 horas. Após este período, 10 µL de uma solução aquosa (0,5%) de cloreto de trifeniltetrazolio (TTC) foram adicionados a cada poço e as placas foram incubadas novamente a 36°C por 1 hora. Nos poços onde o crescimento bacteriano ocorreu, houve uma mudança de coloração, indo de incolor para vermelho. A CIM é definida como a menor concentração de cada substância onde não ocorre mudança de coloração da solução.³⁷

7 REFERÊNCIAS

1. PARK, H.; LEE, K.; PARK, S.; AHN, B.; LEE, J.; CHO, H. PARK, Identification of antitumor activity of pyrazole oxime ethers. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 15, n. 13, p. 3307-3312, 2005. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2005.03.082>.
2. MOJTAHEDI, M. M.; JAVADPOUR, M.; ABAEE, M. S. Convenient ultrasound mediated synthesis of substituted pyrazolones under solvent-free conditions. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 15, n. 5, p. 828-832, 2008. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2008.02.010>.
3. JHA, A.; MUKHERJEE, C.; PRASAD, A. K.; PARMAR, V. S.; VADAPARTI, M.; DAS, U.; CLERCQ, E.; BALZARINI, J.; STABLES, J. P.; SHRIVASTAV, A.; SHARMA, R. K.; DIMMOCK, J. R. Derivatives of aryl amines containing the cytotoxic 1,4-dioxo-2-butenyl pharmacophore. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, n. 5, p. 1510-1515, 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2010.01.098>.
4. CUNHA, S.; OLIVEIRA, S. M.; RODRIGUES Jr, M. T.; BASTOS, R. M.; FERRARI, J.; OLIVEIRA, C. M. A.; KATO, L.; NAPOLITANO, H. B.; VENCATO, I.; LARIUCCI, C. Structural studies of 4-aminoantipyrine derivatives. **Journal Of Molecular Structure**, v. 752, n. 1-3, p. 32-39, 2005. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molstruc.2005.05.016>.
5. ZHANG, PENG, ZHI-WEI; HAO, MING-FENG; GAO, JIAN-GANG. Mechanochemical Diels-Alder Cycloaddition Reactions for Straightforward Synthesis of endo-Norbornene Derivatives. **Synlett**, v. 2010, n. 19, p. 2895-2898, 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.1055/s-0030-1259030>.
6. MAHLE, F.; GUIMARÃES, T. R.; MEIRA, A. V.; CORRÊA, R.; CRUZ, R. C.; CRUZ, A. B.; NUNES, R. J.; CECHINEL-FILHO, V.; CAMPOS, F. Synthesis and biological evaluation of *N*-antipyrine-4-substituted amino-3-chloromaleimide derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 11, p. 4761-4768, 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2010.07.040>.
7. VASCONCELLOS, M. L. A. A.; LIMA JR, C. G. Cloração do anisol, tolueno e nitrobenzeno com ácido tricloroisocianúrico (ATCI): aspectos computacionais sobre a reatividade e regioselectividade. **Química Nova**, v. 32, n. 1, p. 244-249, 2009. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422009000100041>.
8. COMBE, H. S.; HOSSEINI, A.; PARRA, A.; SCHREINER, P. R. Mild aliphatic and benzylic hydrocarbon C-H bond chlorination using trichloroisocyanuric acid. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 82, n. 5, p. 2407-2413, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/acs.joc.6b02829>.
9. MENDONÇA, G. F.; MATTOS, M. C. S. Uma metodologia simples e eficiente para a cloração de compostos aromáticos ativados utilizando o ácido

tricloroisocianúrico. **Química Nova**, v. 31, n. 4, p. 798-801, 2008. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422008000400017>.

10. STAPP, M. D. **Use of cantharidin for verruca**. nov. 2010. Disponível em: www.podiatryinstitute.com/pdfs/Update_2012/2012_04.pdf. Acesso em: 20 jun. 2017.

11. WANG, CHING-CHIUNG; WU, CHING-HSIANG; HSIEH, KUO-JENG; YEN, KUN-YING; YANG, LING-LING. Cytotoxic effects of cantharidin on the growth of normal and carcinoma cells. **Toxicology**, v. 147, n. 2, p. 77-87, 2000.

12. LIU, Dongwu; CHEN, Zhiwei. The Effects of Cantharidin and Cantharidin Derivates on Tumour Cells. **Anti-cancer Agents In Medicinal Chemistry**, v. 9, n. 4, p. 392-396, 2009. Bentham Science Publishers Ltd. DOI: <http://dx.doi.org/10.2174/1871520610909040392>.

13. DENG, Li-ping; LIU, Fang-ming; WANG, Hou-yong. 1,3-Dipolar cycloaddition reaction: Synthesis of novel 5,6-dehydronorcantharidin derivatives of substituted aromatic amines with potential antitumor activities. **Journal of Heterocyclic Chemistry**, v. 42, n. 1, p. 13-18, 2005. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/jhet.5570420103>.

14. XIE, J.; ZHANG, Y.; HU, X.; LV, R.; XIAO, D.; LI, J.; BAO, Q. Norcantharidin inhibits Wnt signal pathway via promoter demethylation of WIF-1 in human non-small cell lung cancer. **Medical Oncology**, v. 32, n. 5, p. 2-7, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s12032-015-0592-0>.

15. LANIER, M.; SCHADE, D.; WILLEMS, E.; TSUDA, M.; SPIERING, S.; KALISIAK, J.; MERCOLA, M.; CASHMAN, J. R. Wnt Inhibition Correlates with Human Embryonic Stem Cell Cardiomyogenesis: A Structure–Activity Relationship Study Based on Inhibitors for the Wnt Response. **Journal Of Medicinal Chemistry**, v. 55, n. 2, p. 697-708, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/jm2010223>.

16. DUARTE, F. S.; ANDRADE, E. D.; VIEIRA, E. A.; UIEARA, M.; NUNES, R. J.; LIMA, T. C. M. Synthesis and antidepressant-like action of stereoisomers of imidobenzenesulfonylaziridines in mice evaluated in the forced swimming test. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 15, p. 5397-5401, 2006. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2006.03.036>.

17. KAS'YANA, L. I.; PAL'CHIKOVA, V. A.; TARABARAA, I. N.; KRISHCHIKB, O. V.; KAS'YANC, A. O.; SHISHKINAD, S. V.; SHISHKIND, O. V. Products of endic anhydride reaction with cyclic amines and their heterocyclization. **Russian Journal of Organic Chemistry**, v. 42, n. 11, p. 1642-1652, 2006. DOI: <http://dx.doi.org/10.1134/s107042800611008x>.

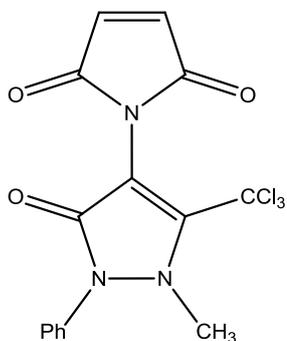
18. **OMS publica lista inédita de bactérias resistentes a antibióticos**. março 2017. Disponível em: <https://nacoesunidas.org/oms-publica-lista-inedita-de-bacterias-resistentes-a-antibioticos/>. Acesso em: 10 jan. 2018.

19. ALY, H. M.; SALEH, N. M.; ELHADY, H. A. Design and synthesis of some new thiophene, thienopyrimidine and thienothiadiazine derivatives of antipyrine as potential antimicrobial agents. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 9, p. 4566-4572, 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2011.07.035>.
20. CAMPOS, F.; CORRÊA, R.; SOUZA, M. M.; YUNES, R. A.; NUNES, R. J.; CECHINEL-FILHO, V. Studies on New Cyclic Imides Obtained from Aminophenazone with Analgesic Properties. **Arzneimittelforschung**, v. 52, n. 06, p. 455-461, 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.1055/s-0031-1299914>
21. SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B. **Química Orgânica**, v.1, 7 ed. LTC, 2009, cap. 10, p. 365-391.
22. CLAYDEN, J. GREEVS, N.; WARREN, S.; WHOTERS, P. **Organic Chemistry**, Paperback, 2 ed., 2012, ISBN: 978-0199270293, Oxford University Press, p. 1020-1050.
23. **Diels-Alder Reaction**. Disponível em: <<http://www.organic-chemistry.org/namedreactions/diels-alder-reaction.shtm>>. Acesso em: 20 jan. 2018.
24. CARRUTHERS, W. **Some Modern Methods of Organic Synthesis**. Cambridge texts in Chemistry and Biochemistry, 3 ed., 1986, New York, p. 159-202.
25. CLAYDEN, J. GREEVS, N.; WARREN, S.; WHOTERS, P. **Organic Chemistry**, Paperback, 2 ed., 2012, ISBN: 978-0199270293, Oxford University Press, p. 905-919.
26. PINTO, T. J. A.; KANEKO, T. M.; OHARA, M. T. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos**. 2 ed. São Paulo: Atheneu, 2003. p. 325.
27. **Microdiluição em caldo**. 2008. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede_rm/cursos/atm_racional/modulo2/metodos2.1.htm>. Acesso em: 18 março 2018.
28. OSTROSKY, E. A. MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; KANEKO, T. M.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B. R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 301-307, 2008. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/s0102-695x2008000200026>
29. MATUSZAK, N.; MUCCIOLI, G. G.; LABAR, G.; LAMBER, D. M. Synthesis and *in Vitro* Evaluation of *N*-Substituted Maleimide Derivatives as Selective Monoglyceride Lipase Inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, p. 7410-7420, 2009. DOI: 10.1021/jm900461w.
30. PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, S. G.; VYVYAN, J. R. **Introdução à Espectroscopia**. 4 ed. São Paulo, Cengage Learning, p. 639, 2010.

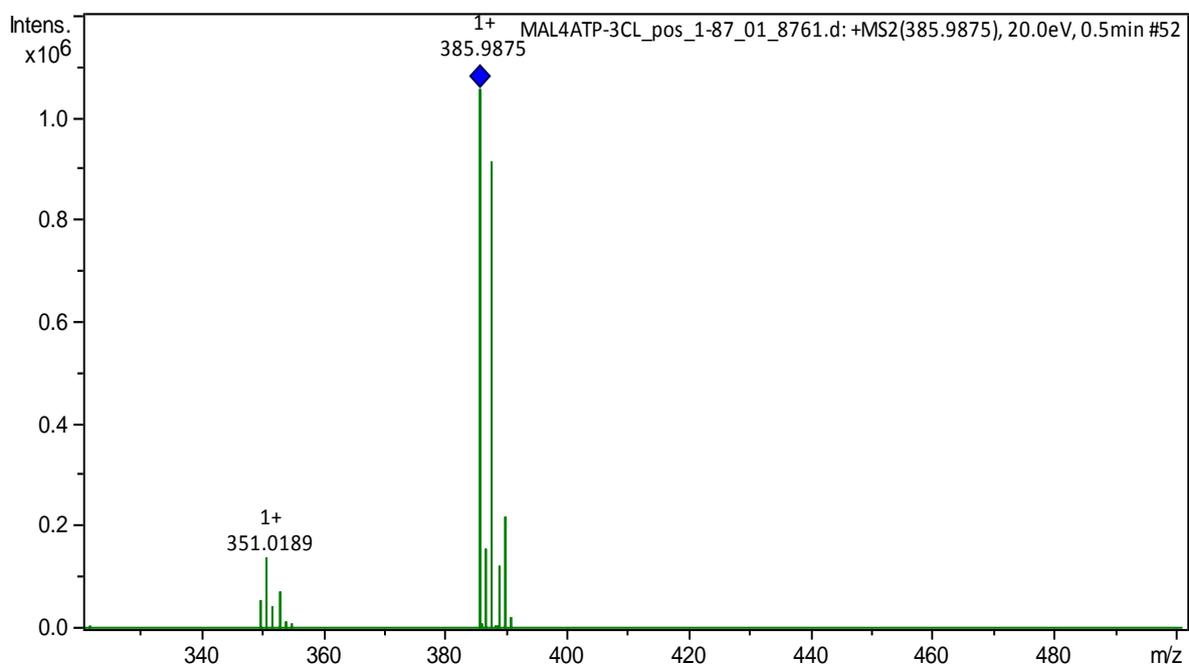
31. NEWKOME, G. R.; KIEFER, G. E.; XIA, Y. J.; GUPTA, V. K. α -Methyl Functionalization of Electron-Poor Heterocycles: Free Radical Chlorination. **Synthesis**, v. 1984, n. 08, p.676-679, 1984. DOI: <http://dx.doi.org/10.1055/s-1984-30930>.
32. CLAYDEN, J.; GREEVS, N.; WARREN, S.; WHORTERS, P. **Organic Chemistry**, Paperback, 2 ed., 2012, ISBN: 978-0199270293, Oxford University Press, p. 151-166.
33. DECAPRIO, A. P. The Toxicology of Hydroquinone — Relevance to Occupational and Environmental Exposure. **Critical Reviews In Toxicology**, v. 29, n. 3, p. 283-330, 1999. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/10408449991349221>
34. SANTOS, A. R.; PINHEIRO, A. C.; SODERO, A. C. R.; CUNHA, A. S.; PADILHA, M. C.; SOUSA, P. M.; FONTES, S. P.; VELOSO, M. P.; MANSSOUR FRAGA, C. A. M. Atropoisomerismo: o efeito da quiralidade axial em substâncias bioativas. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 125-135, 2007. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422007000100024>
35. LEE, M. W.; HERNDON, W. C. Stereochemistry of the furan-maleic anhydride cycloaddition. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 43, n. 3, p. 518-518, 1978. DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/jo00397a031>
36. SELTZER, S. The Mechanism of the Diels-Alder Reaction of 2-Methylfuran with Maleic Anhydride^{1,2}. **Journal Of The American Chemical Society**, v. 87, n. 7, p. 1534-1540, 1965. DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/ja01085a023>.
37. AYRES, M. C. C. BRANDÃO, M. S.; VIEIRA JR, G. M.; MENOR, J. C. A. S.; HILDESSANDRA B. SILVA, H. B.; SOARES, M. J. S.; CHAVES, M. H. Atividade antibacteriana de plantas úteis e constituintes químicos da raiz de Copernicia prunifera. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 1, p. 90-97, 2008. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/s0102-695x2008000100017>.
38. PERRIN, D.D.; ARMAREGO W.L.F.; **Purification of laboratory Chemicals** – 3 ed. Oxford: Pergamon Press, 1998.
39. CHHATTISE, P. K.; RAMASWAMY, A. V.; WAGHMODE, S. B. Regioselective, photochemical bromination of aromatic compounds using N-bromosuccinimide. **Tetrahedron Letters**, v. 49, n. 1, p. 189-194, 2008. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tetlet.2007.10.126>.
40. MAIBUNKAEW, T.; THONGSORNKLEEB, C.; TUMMATORN, J.; RUCHIRAWATA, A. B. S. Practical and Metal-Free Electrophilic Aromatic Halogenation by Interhalogen Compounds Generated In Situ from N-Halosuccinimide and Catalytic TMSCl. **Synlett**, v. 25, n. 12, p. 1769-1775, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1055/s-0034-1378225>.

8 ANEXOS

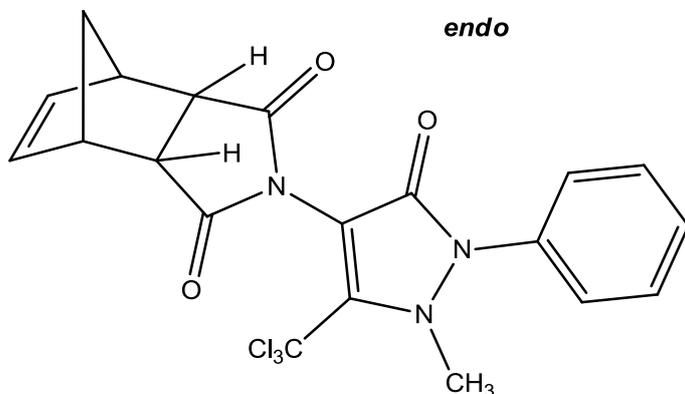
Anexo A. Espectro de massas de alta resolução em modo positivo para o composto 1-(1-meil-3-oxo-2-fenil-5-(triclorometil)-2,3-di-hidro-1*H*-pirazol-4-il)-1*H*-pirrole-2,5-diona (**7**):



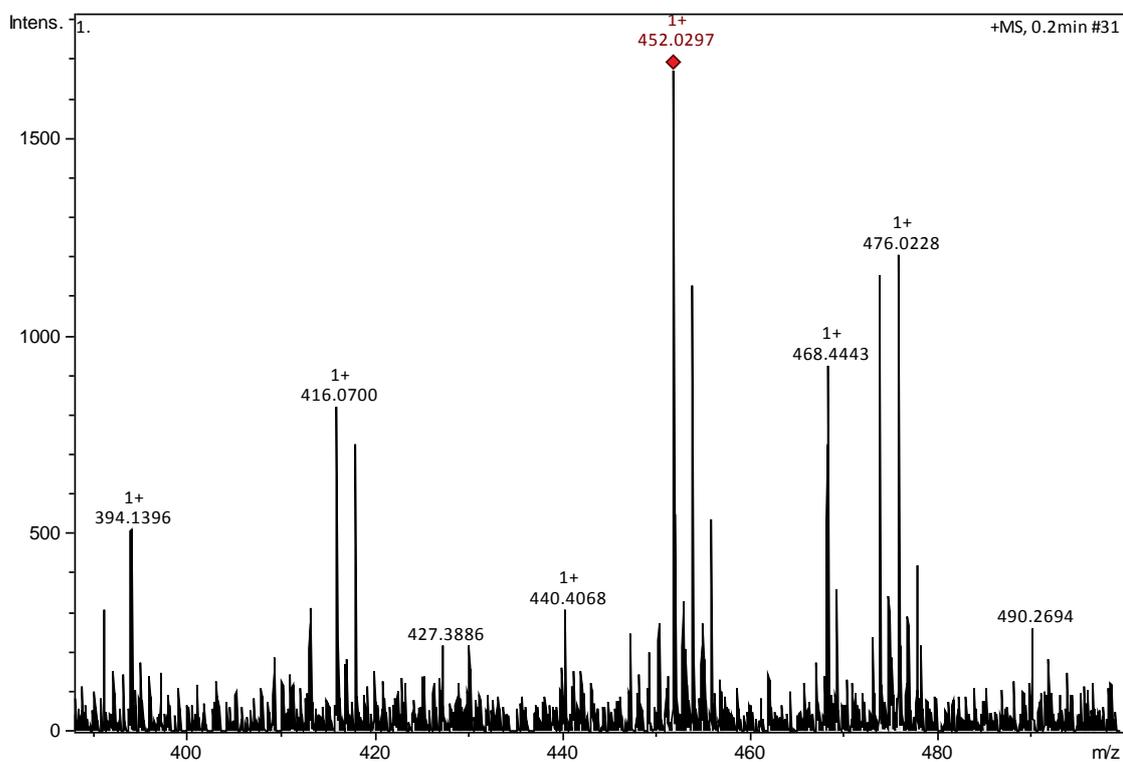
Fórmula: C₁₅H₁₀Cl₃N₃O₃
[M+H]⁺ calculado = 385,9860



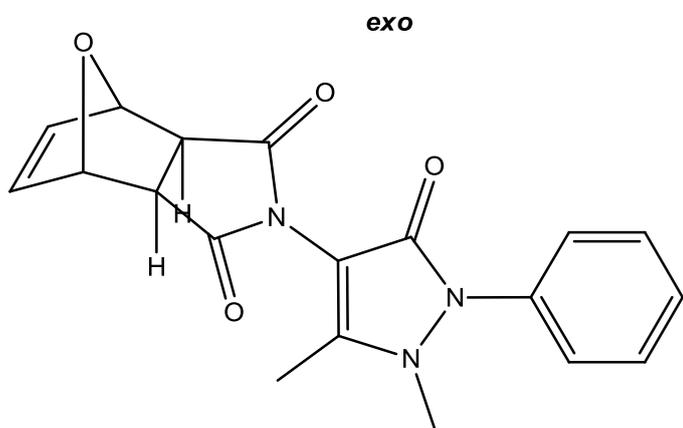
Anexo B. Espectro de massas de alta resolução em modo positivo para o composto 2-(1-metil-3-oxo-2-fenil-5-(triclorometil)-2,3-di-hidro-1H-pirazol-4-il)-3a,4,7,7a-tetra-hidro-1H-4,7-metano isoindol-1,3(2H)-diona (**9**)



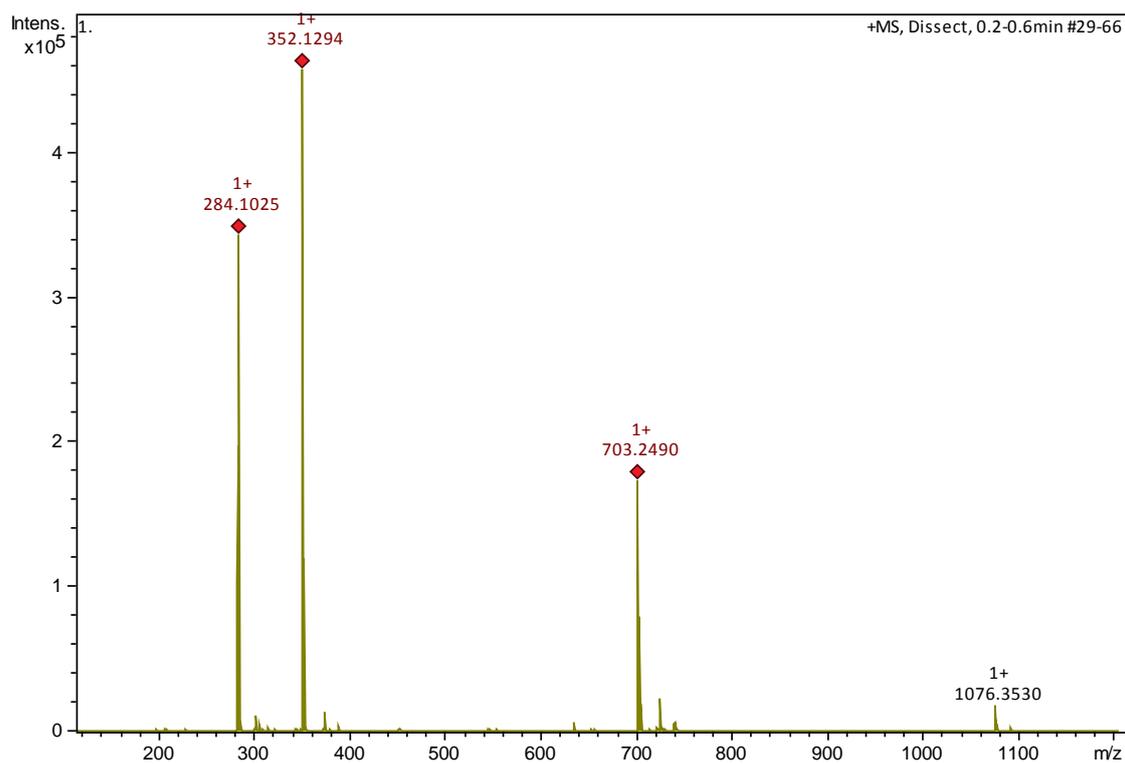
Fórmula: $C_{20}H_{16}Cl_3N_3O_3$
[M+H]⁺ calculado = 452,0330



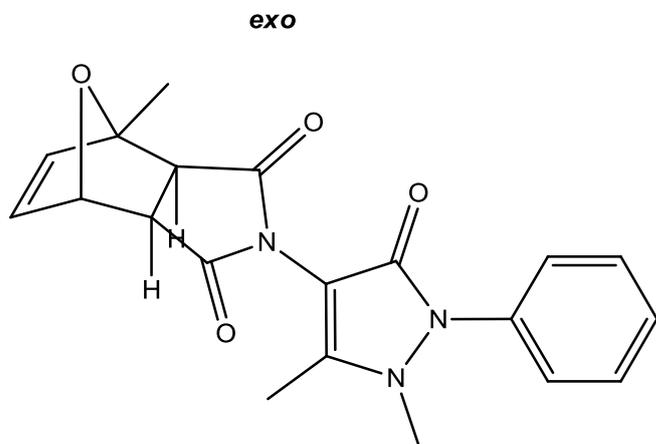
Anexo C. Espectro de massas de alta resolução em modo positivo para o composto 2-(1,5-dimetil-3-oxo-2-fenil-2,3-di-hidro-1*H*-pirazol-4-il)-3a,4,7,7a-tetra-hidro-1*H*-4,7epoxi-isoindol-1,3(2*H*)-diona (**10**).



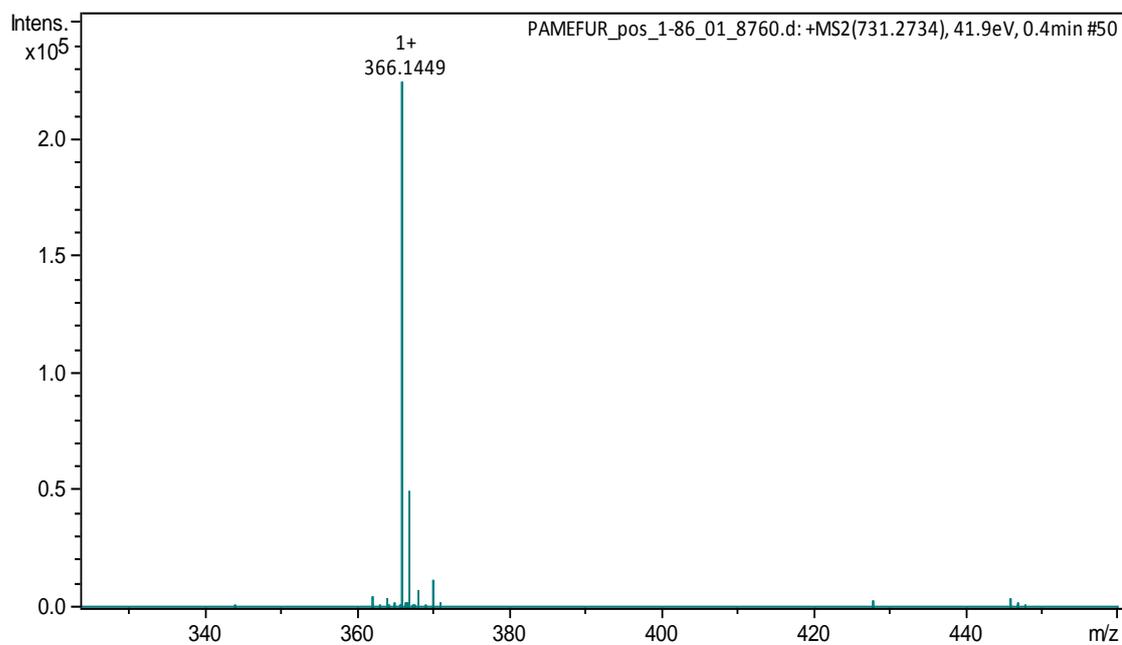
Fórmula: $C_{19}H_{17}N_3O_4$
[M+H]⁺ calculado = 352,1291



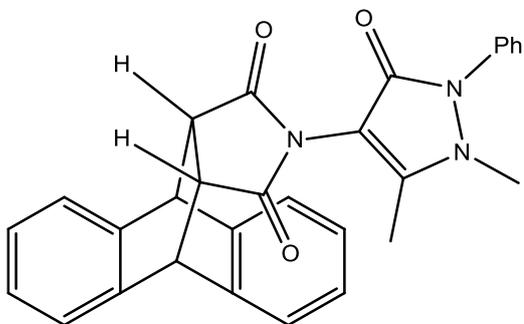
Anexo D. Espectro de massas de alta resolução em modo positivo para o composto 2-(1,5-dimetil-3-oxo-2-fenil-2,3-di-hidro-1*H*-pirazol-4-il)-4-metil-3a,4,7,7a-tetra-hidro-1*H*-4,7-epoxi-isoindol-1,3(2*H*)-diona (**11**):



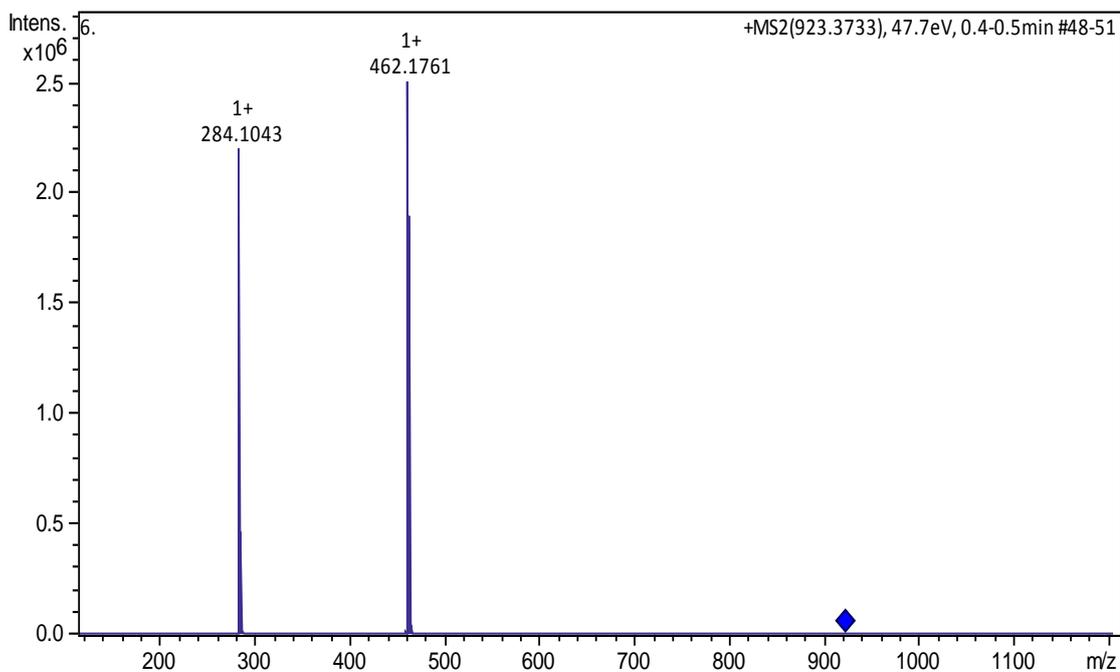
Fórmula: $C_{20}H_{19}N_3O_4$
[M+H]⁺ calculado = 366,1448

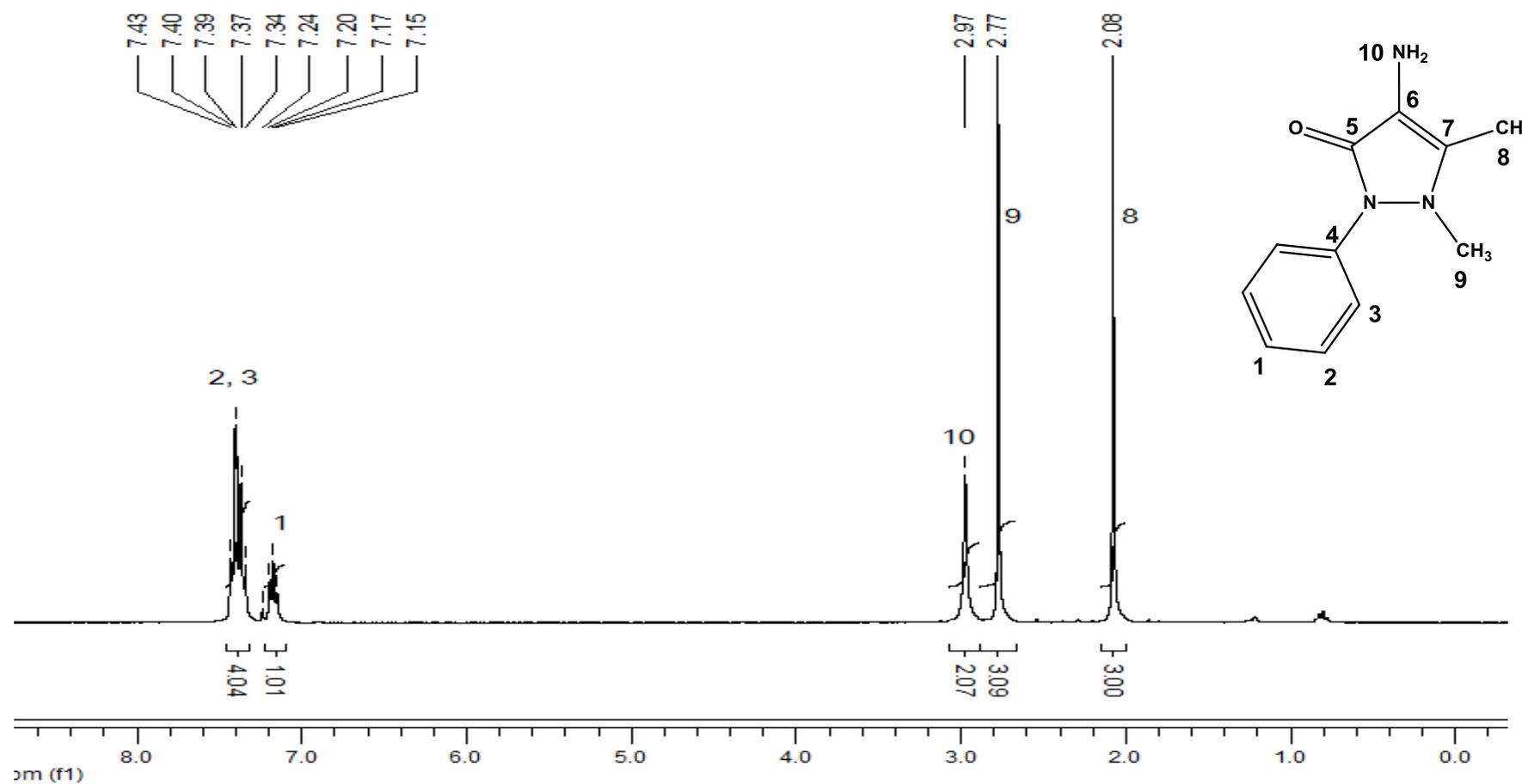


Anexo E. Espectro de massas de alta resolução para o composto 13-(1,5-dimetil-3-oxo-2-fenil-2,3-di-hidro-1*H*-pirazol-4-il)-10,11-di-hidro-9*H*-9,10 [3,4]epipirroloantraceno-12,14(13*H*,15*H*)-diona (**12**).

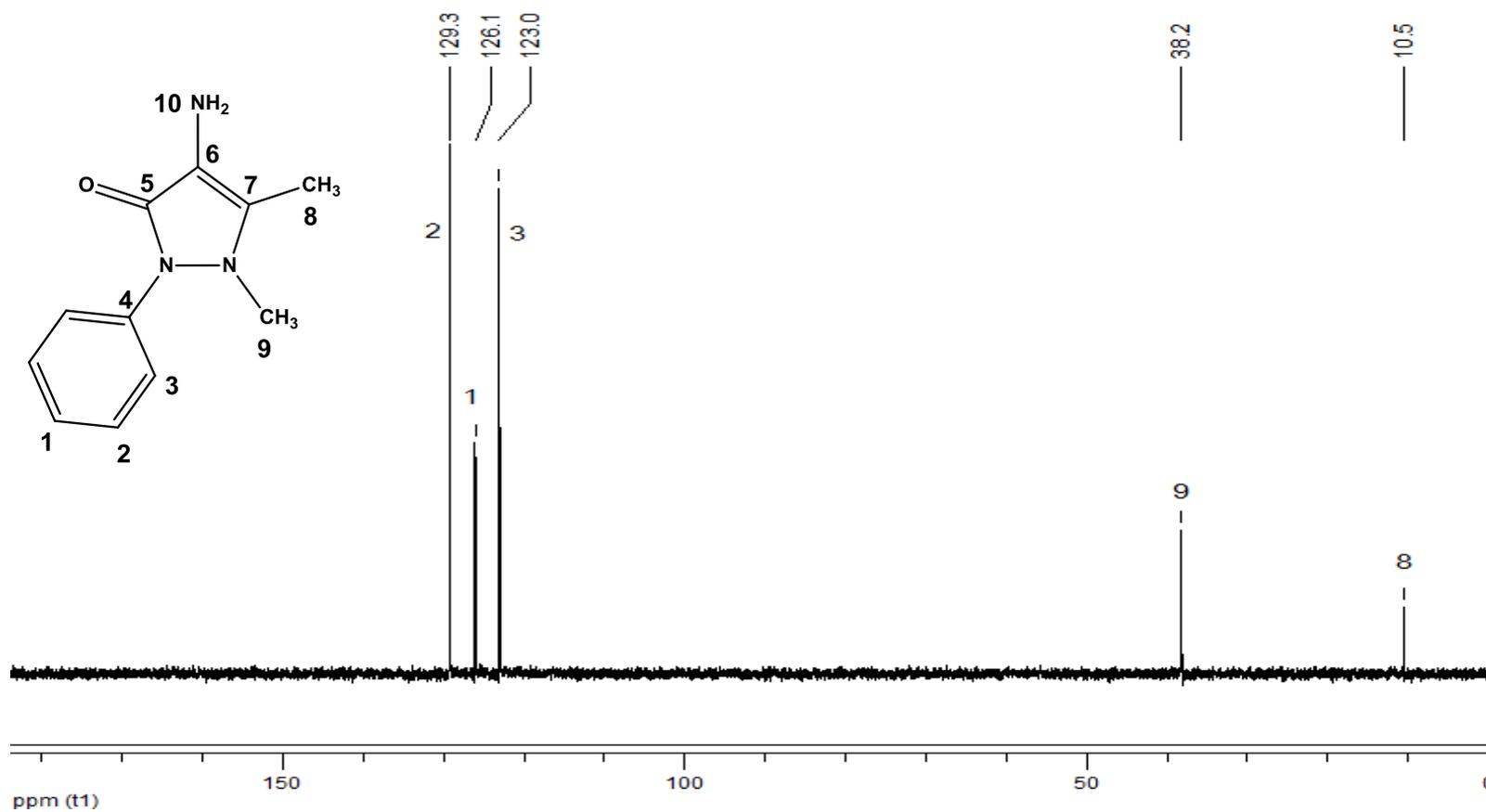


Fórmula: $C_{29}H_{23}N_3O_3$
[M+H]⁺ calculado = 462,1812

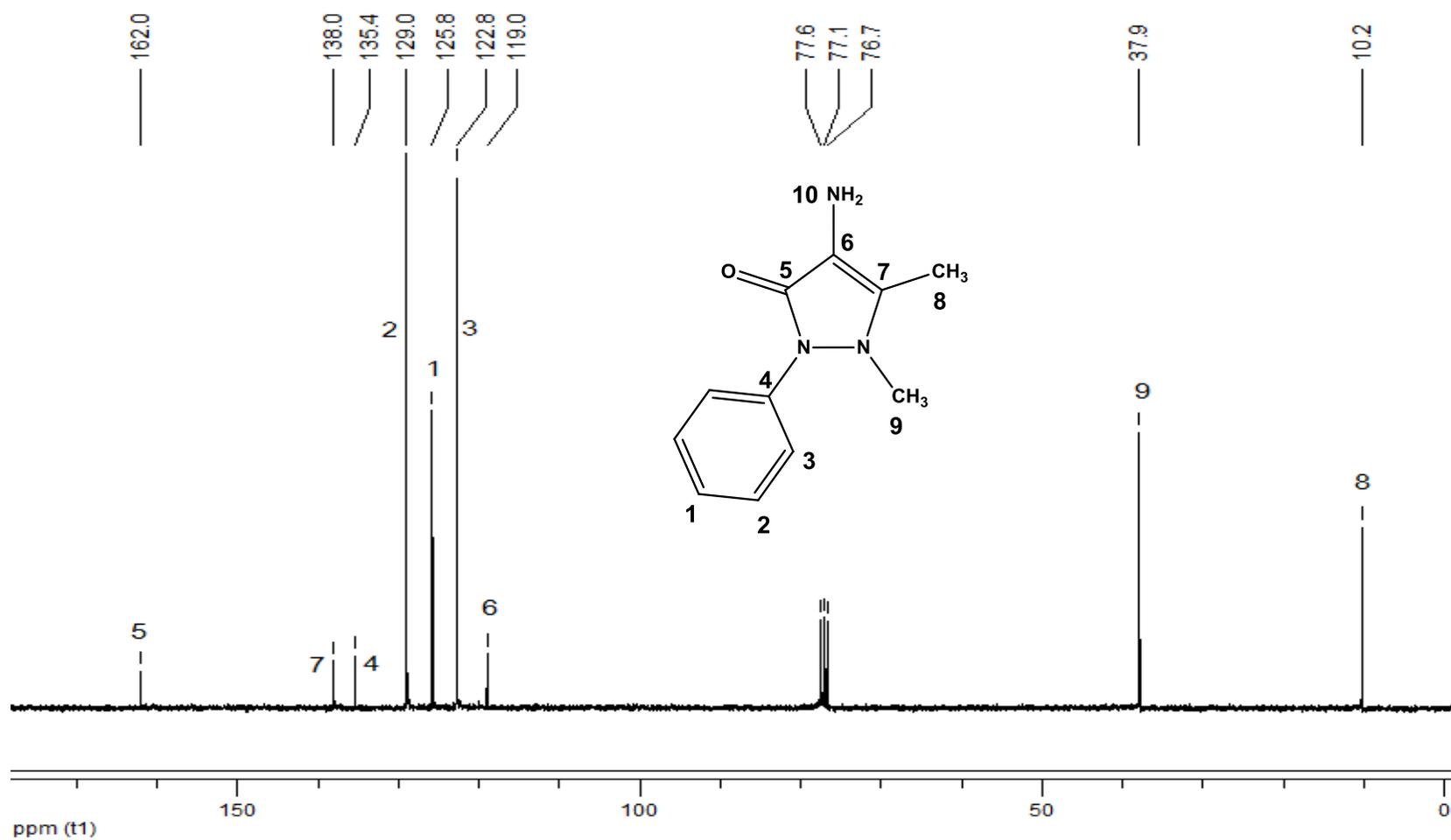




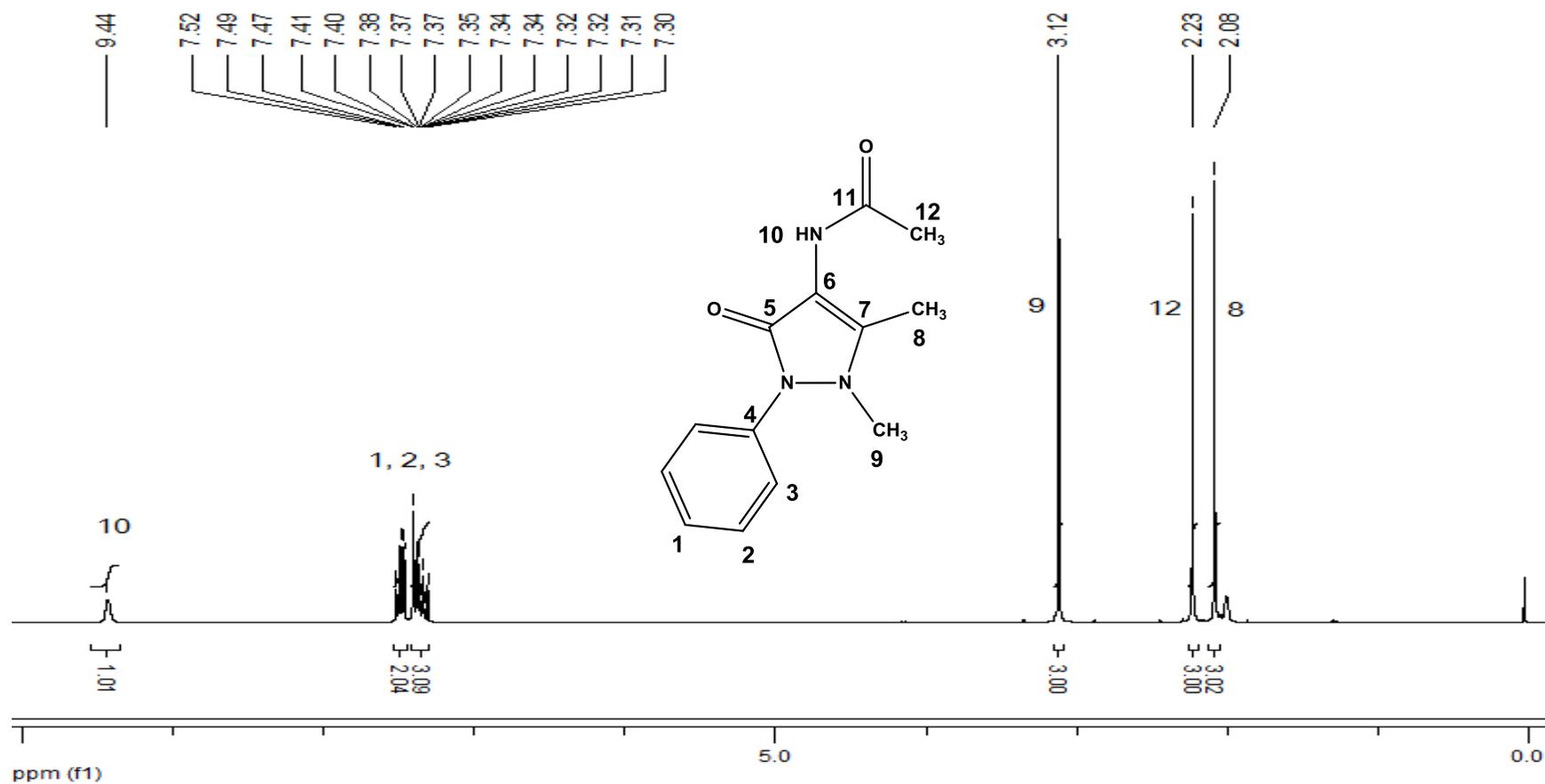
Anexo 1.1 – Espectro de RMN de ¹H da 4-amino-1,5-dimetil-2-fenil-1H-pirazol-3(2H)-one (**1**) em CDCl₃ a 300 MHz.



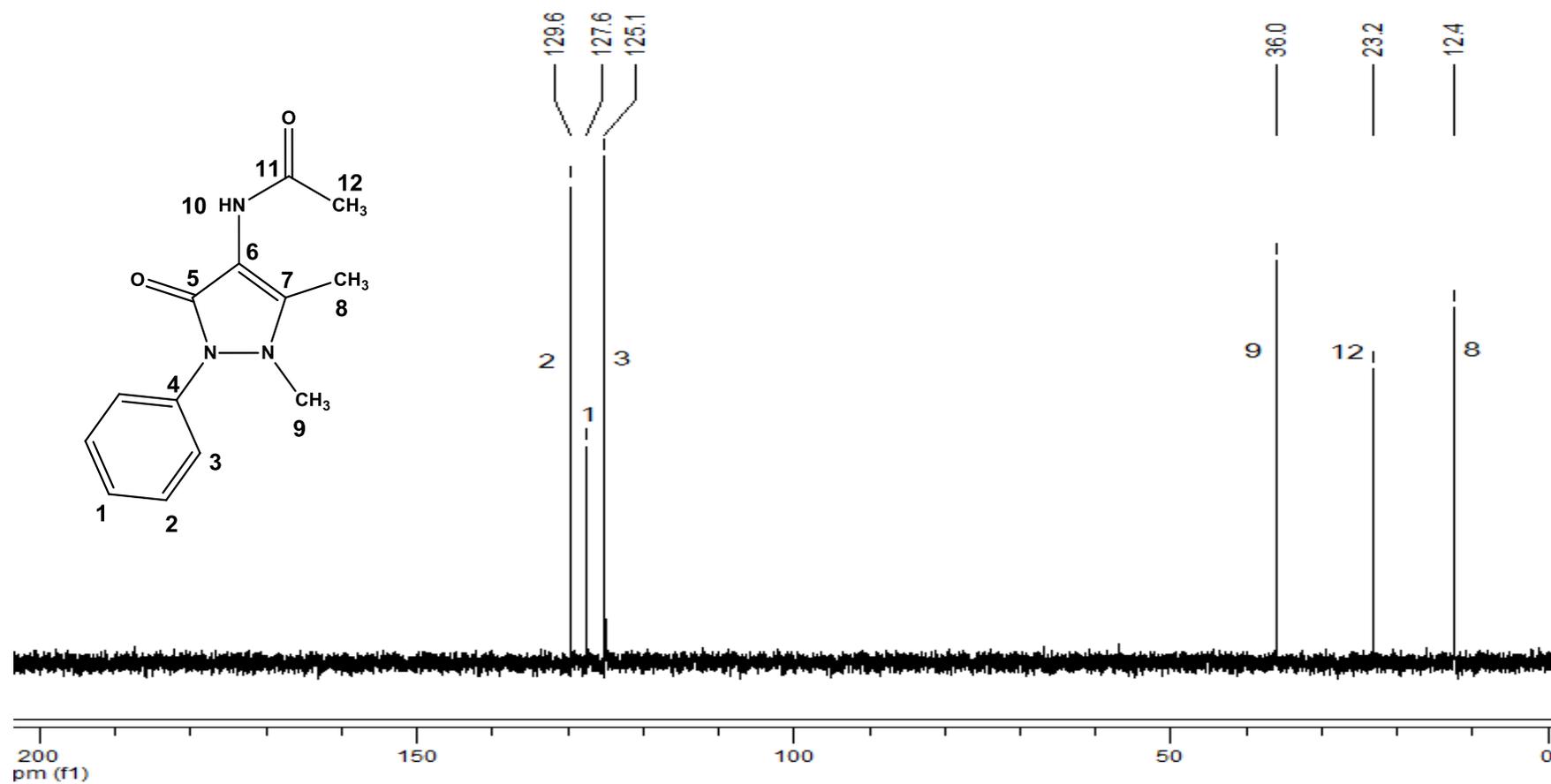
Anexo 1.2 – Espectro de RMN DEPT-135 da 4-amino-1,5-dimetil-2-fenil-1H-pirazol-3(2H)-one (1) em CDCl₃ a 75 MHz.



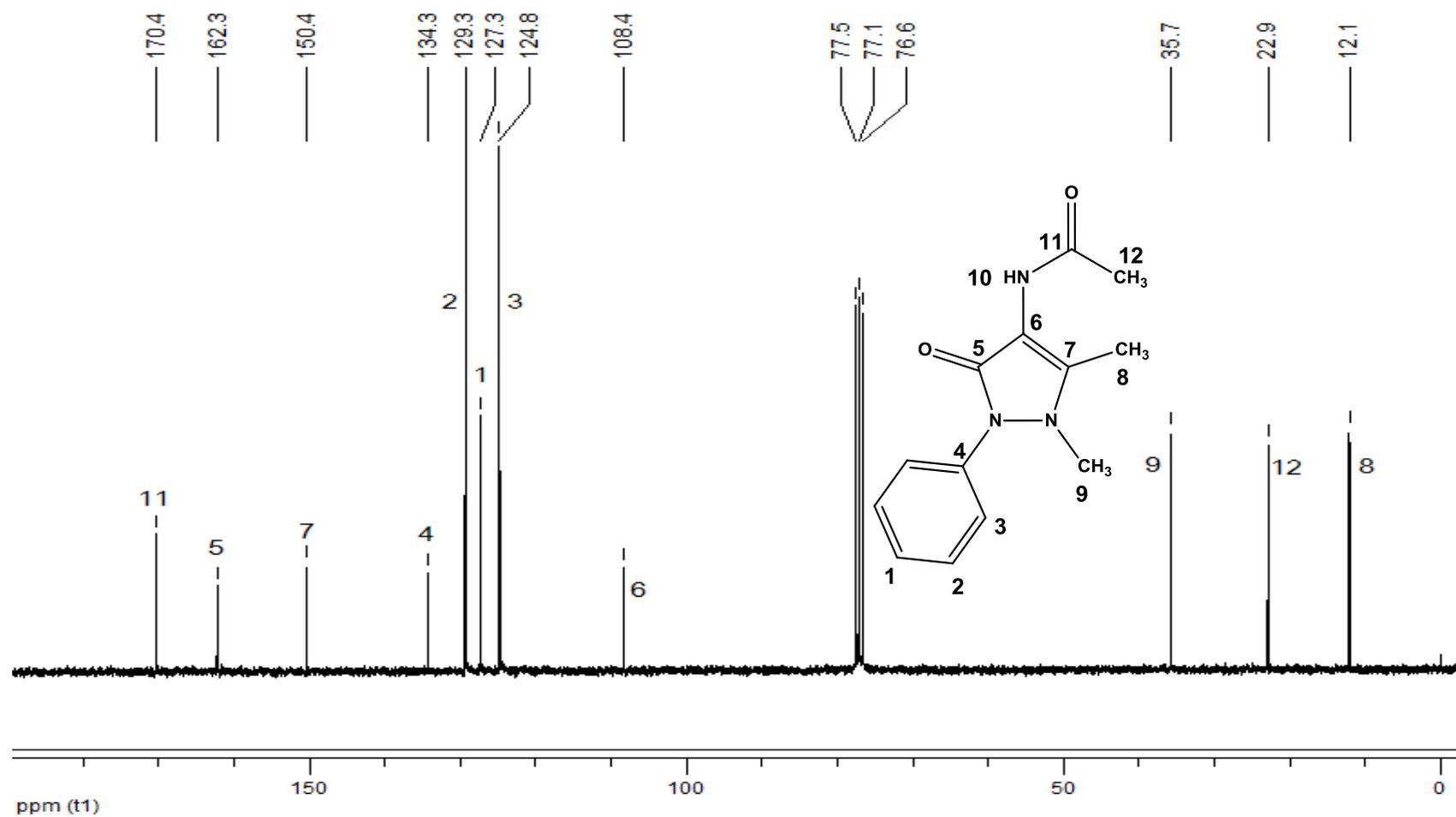
Anexo 1.3 – Espectro de RMN de ^{13}C da 4-amino-1,5-dimetil-2-fenil-1H-pirazol-3(2H)-one (**1**) em CDCl_3 a 75 MHz.



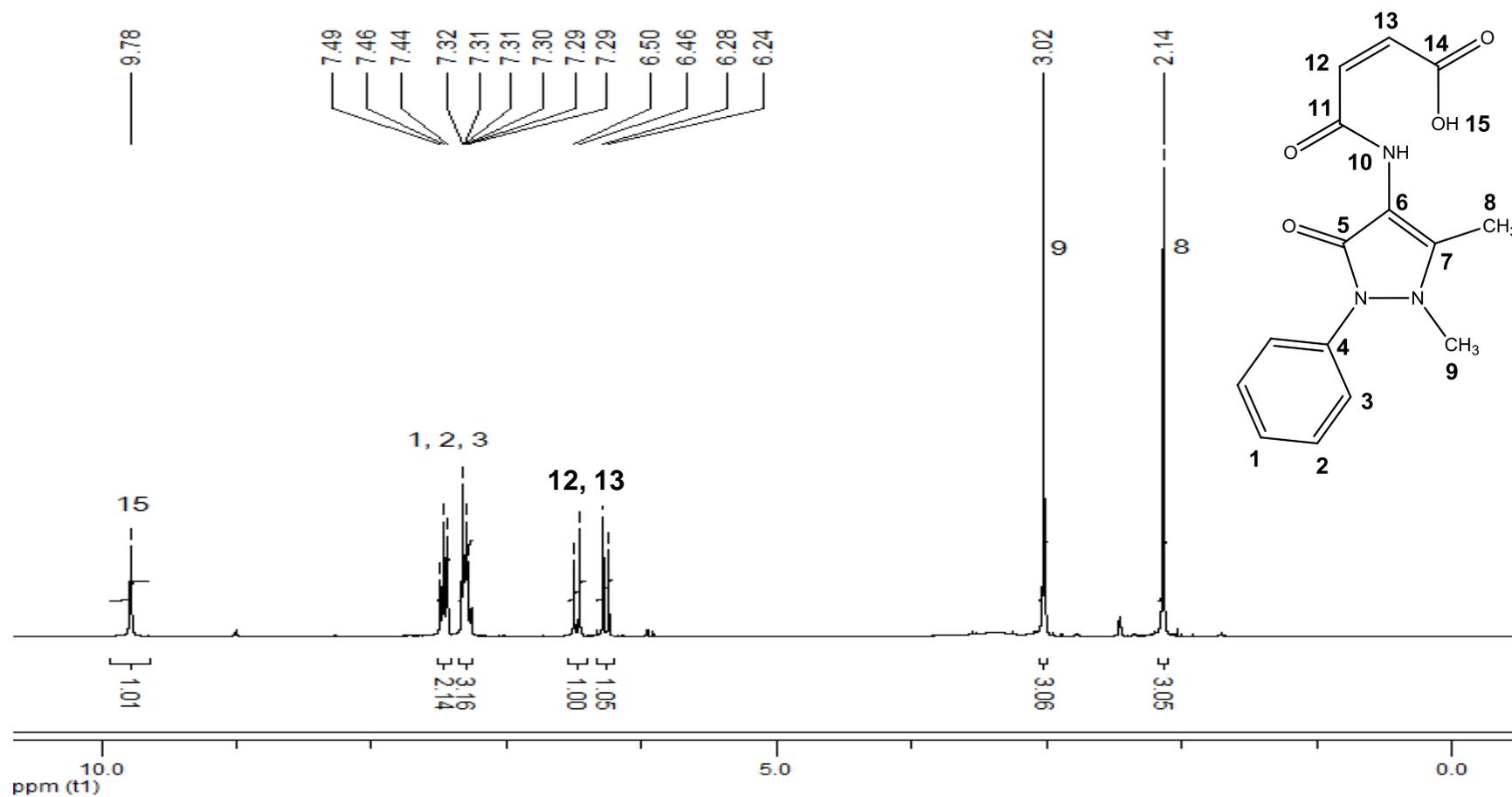
Anexo 2.1 – Espectro de RMN de ¹H da *N*-(1,5-dimetil-3-oxo-2-fenil-2,3-di-hidro-1*H*-pirazol-4-il)acetamida (**2**) em CDCl₃ a 300 MHz.



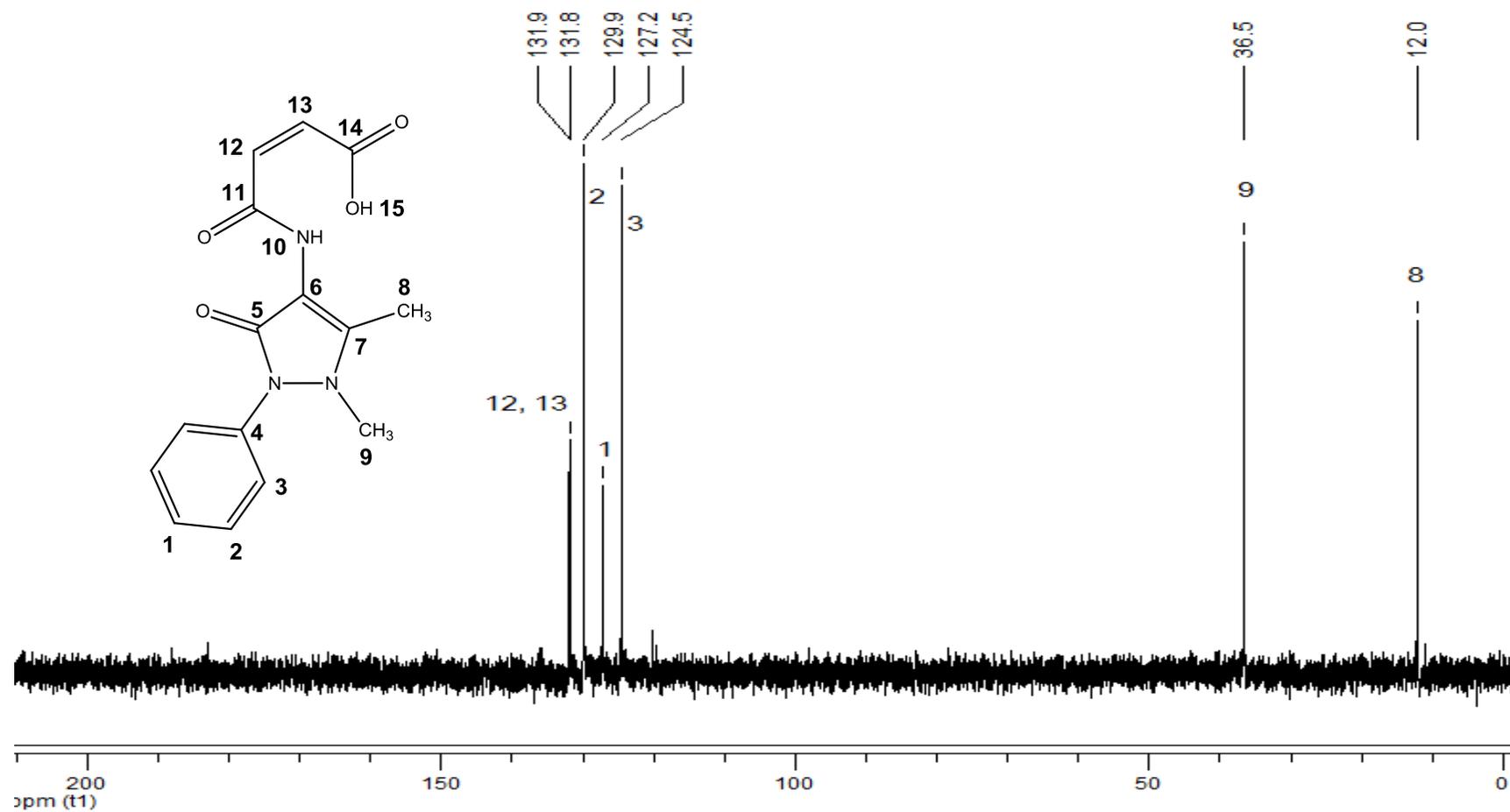
Anexo 2.2 – Espectro de RMN DEPT-135 da *N*-(1,5-dimetil-3-oxo-2-fenil-2,3-di-hidro-1*H*-pirazol-4-il)acetamida (**2**) em CDCl_3 a 75 MHz.



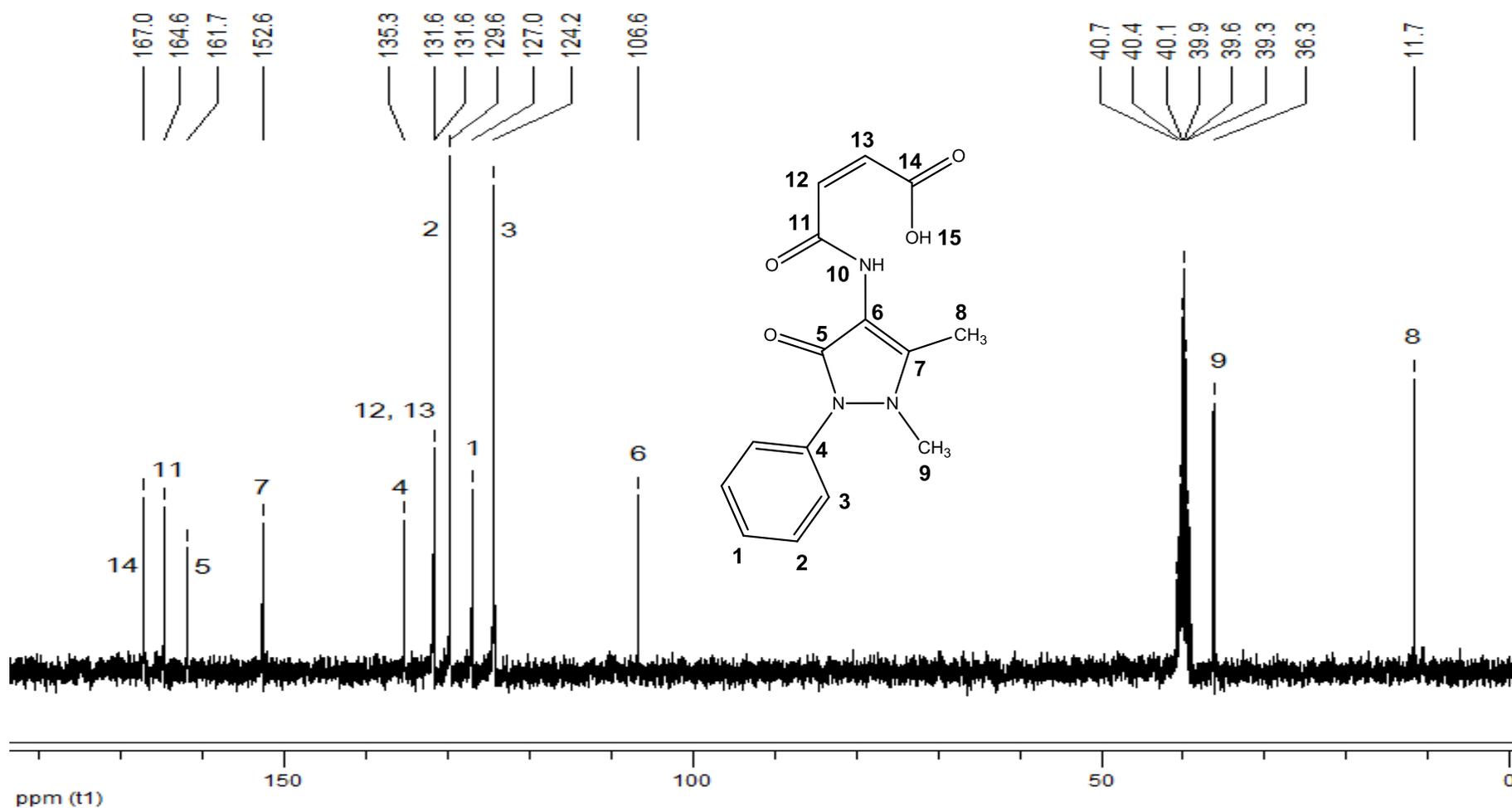
Anexo 2.3 – Espectro de RMN de ^{13}C da *N*-(1,5-dimetil-3-oxo-2-fenil-2,3-di-hidro-1*H*-pirazol-4-il)acetamida (2) em CDCl_3 a 75 MHz.



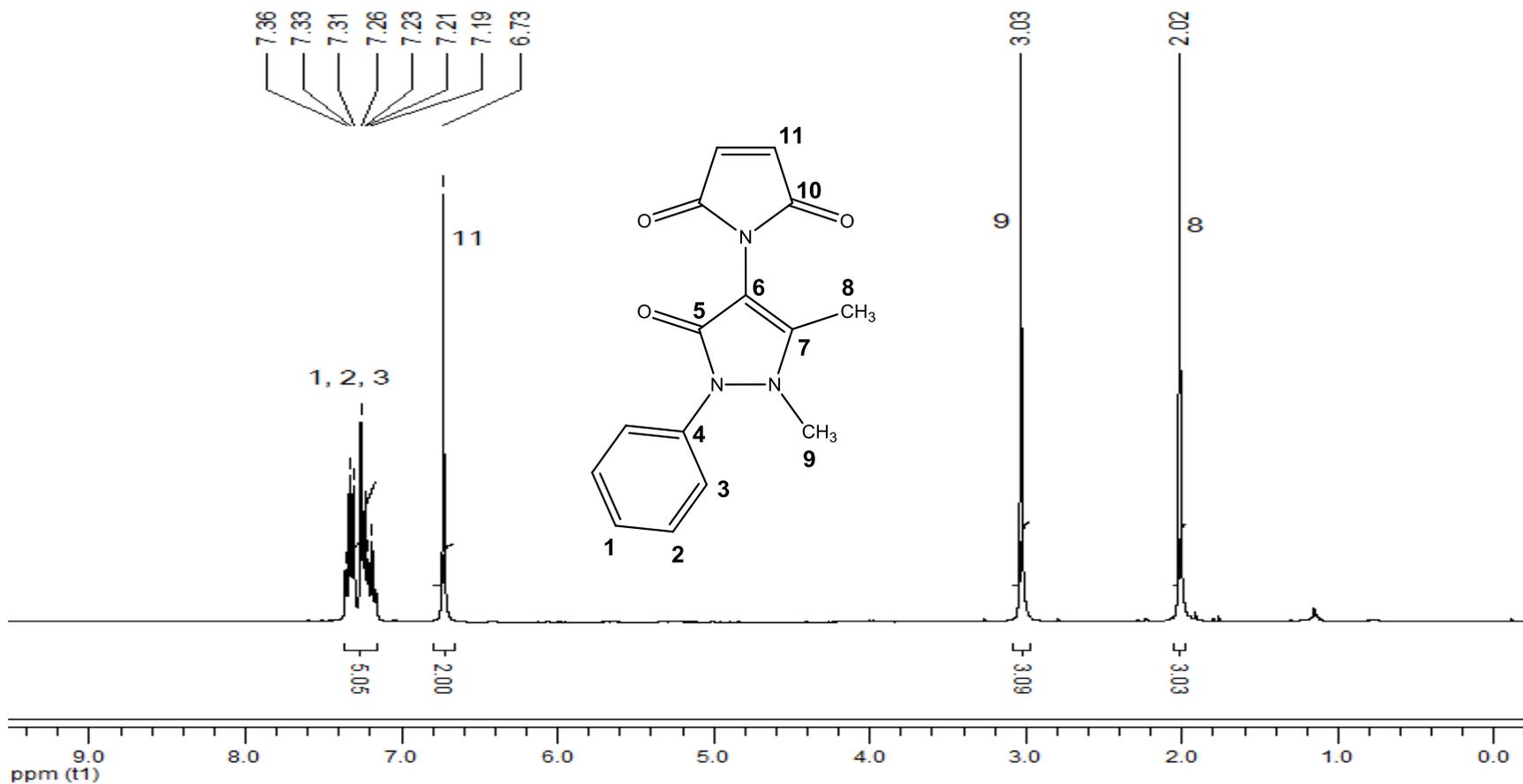
Anexo 3.1 – Espectro de RMN de ¹H do ácido (Z)-4-((1,5-dimetil-3-oxo-2-fenil-2,3-di-hidro-1H-pirazol-4-il)amino)-4-oxobut-2-enóico (3) em DMSO-d₆ a 300 MHz.



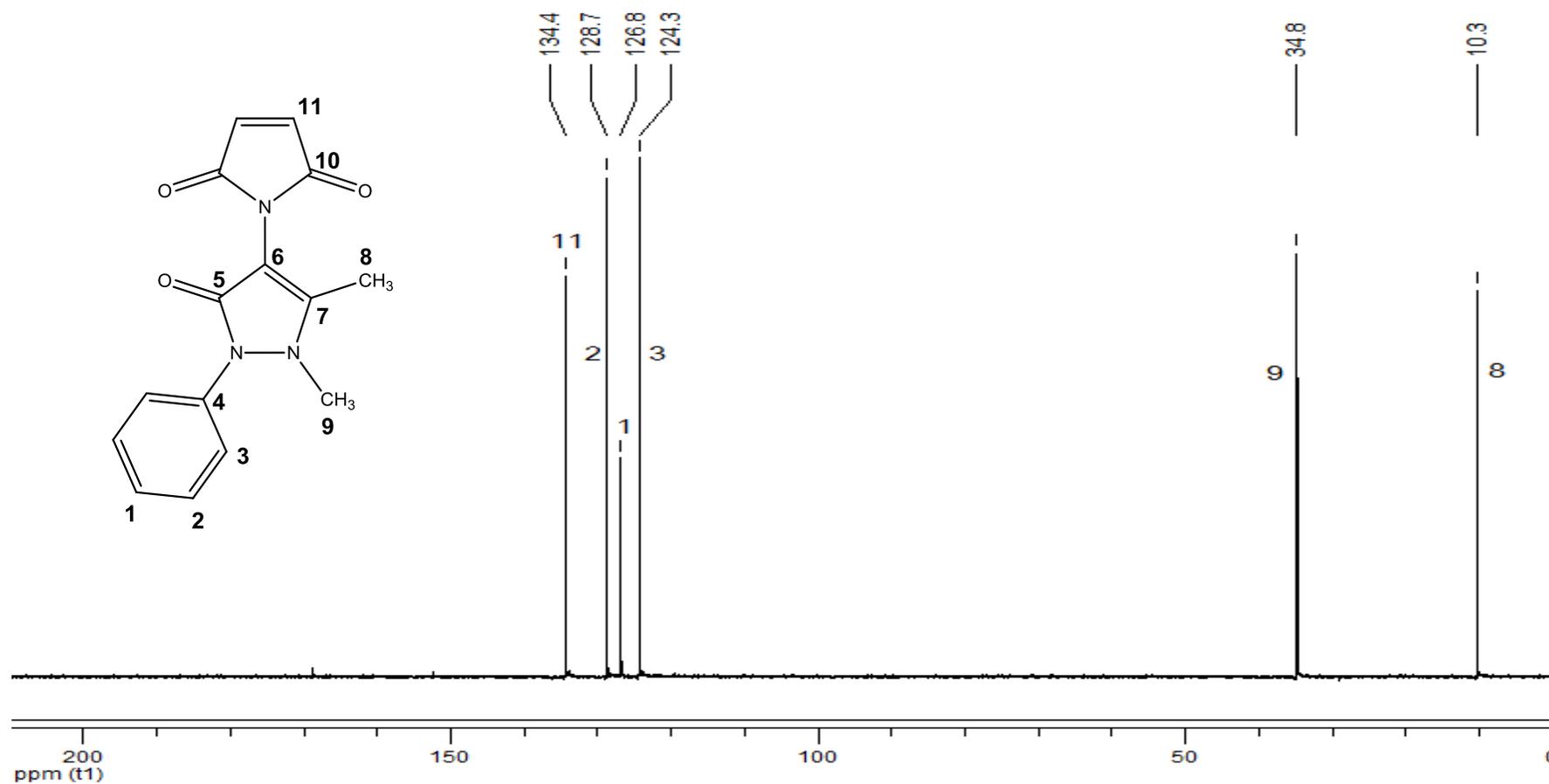
Anexo 3.2 – Espectro de RMN DEPT-135 do ácido (Z)-4-((1,5-dimetil-3-oxo-2-fenil-2,3-di-hidro-1H-pirazol-4-il)amino)-4-oxobut-2-enóico (**3**) em DMSO-d₆ a 75 MHz.



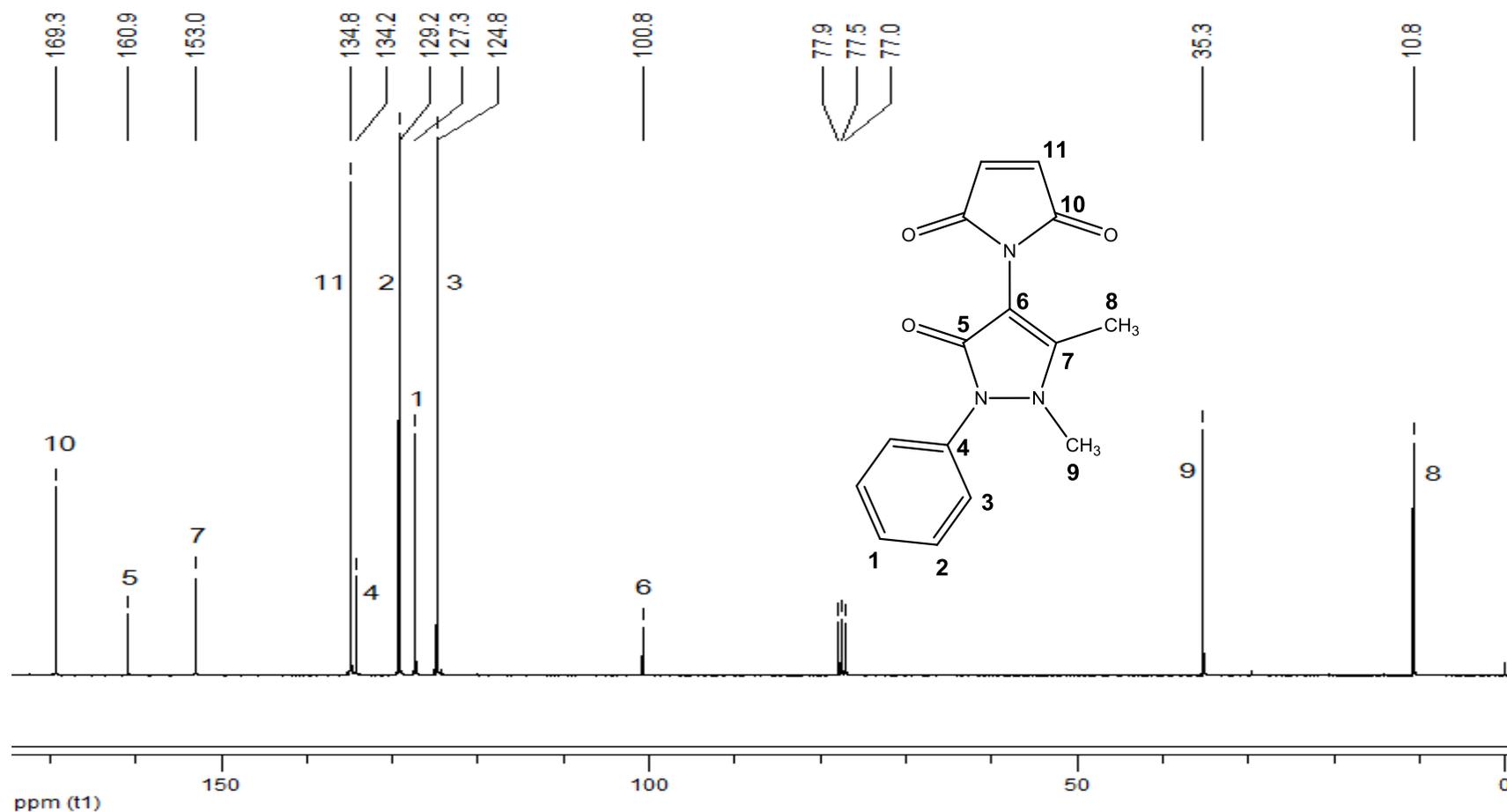
Anexo 3.3 – Espectro de RMN de ^{13}C do ácido (Z)-4-((1,5-dimetil-3-oxo-2-fenil-2,3-di-hidro-1H-pirazol-4-il)amino)-4-oxobut-2-enóico (3) em DMSO-d_6 a 75 MHz.



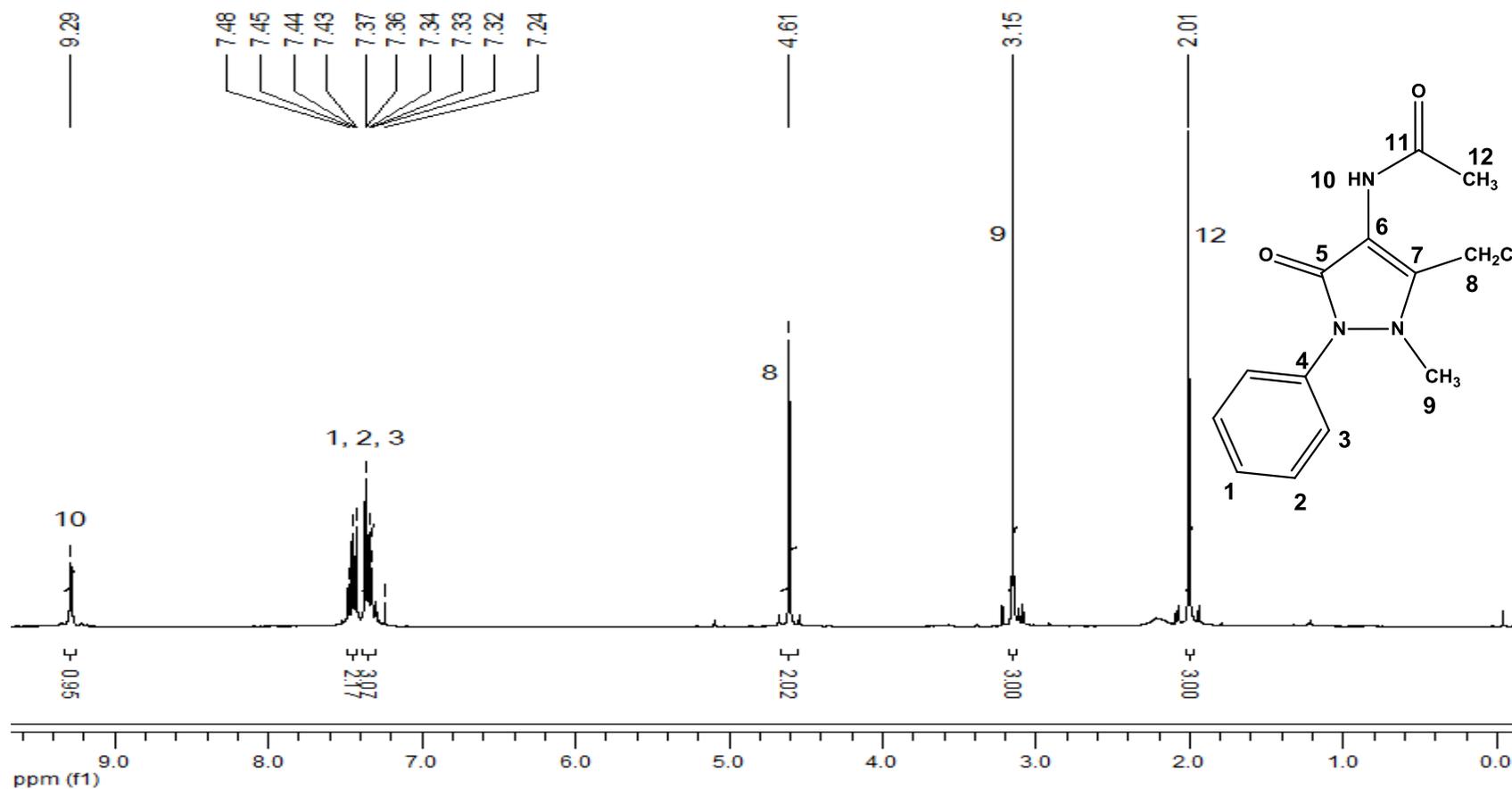
Anexo 4.1 – Espectro de RMN de ¹H da 1-(1,5-dimetil-3-oxo-2-fenil-2,3-di-hidro-1*H*-pirazol-4-il)-1*H*-pirrole-2,5-diona (**4**) em CDCl₃ a 300 MHz.



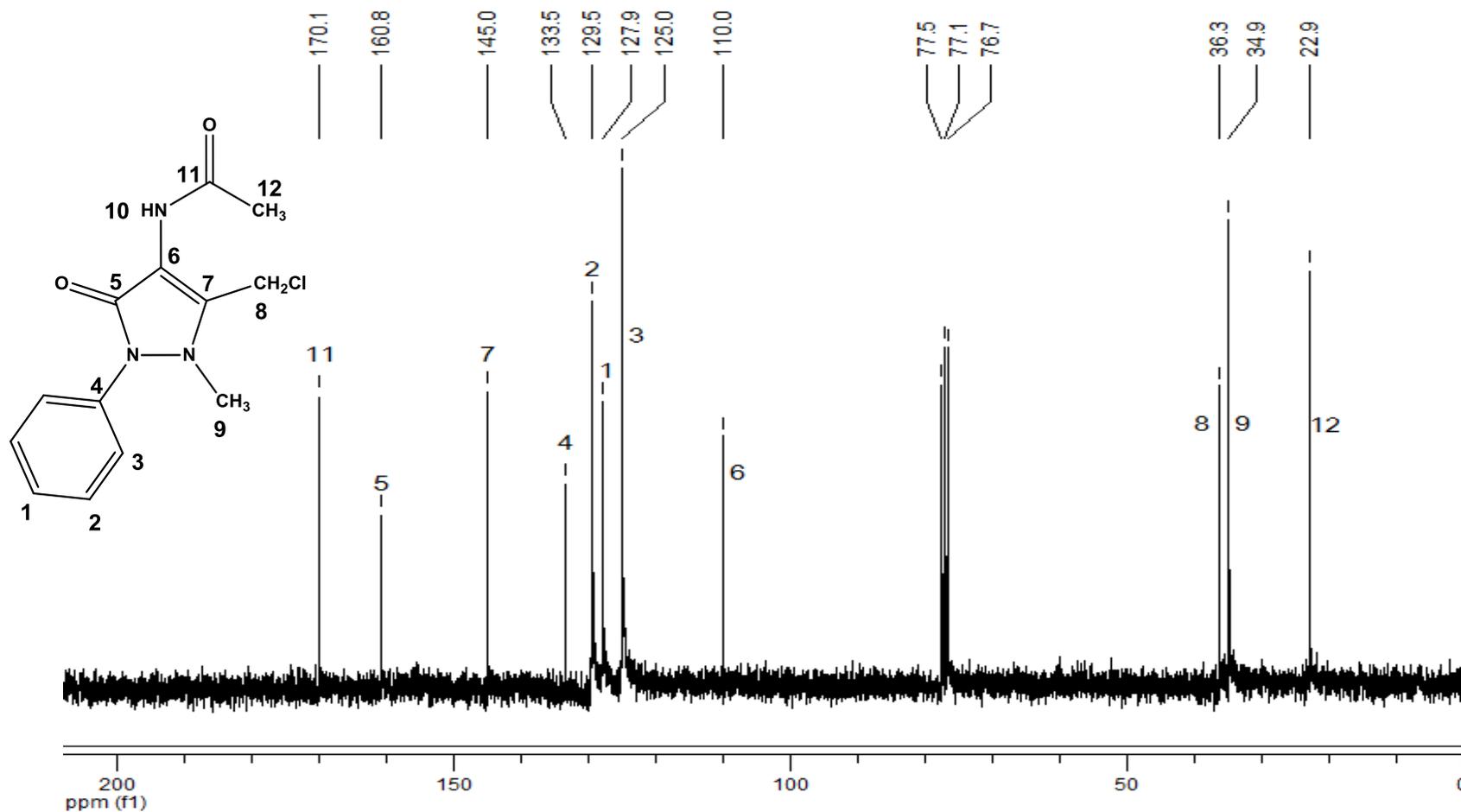
Anexo 4.2 – Espectro de RMN DEPT-135 da 1-(1,5-dimetil-3-oxo-2-fenil-2,3-di-hidro-1H-pirazol-4-il)-1H-pirrole-2,5-diona (**4**) em CDCl_3 a 75 MHz.



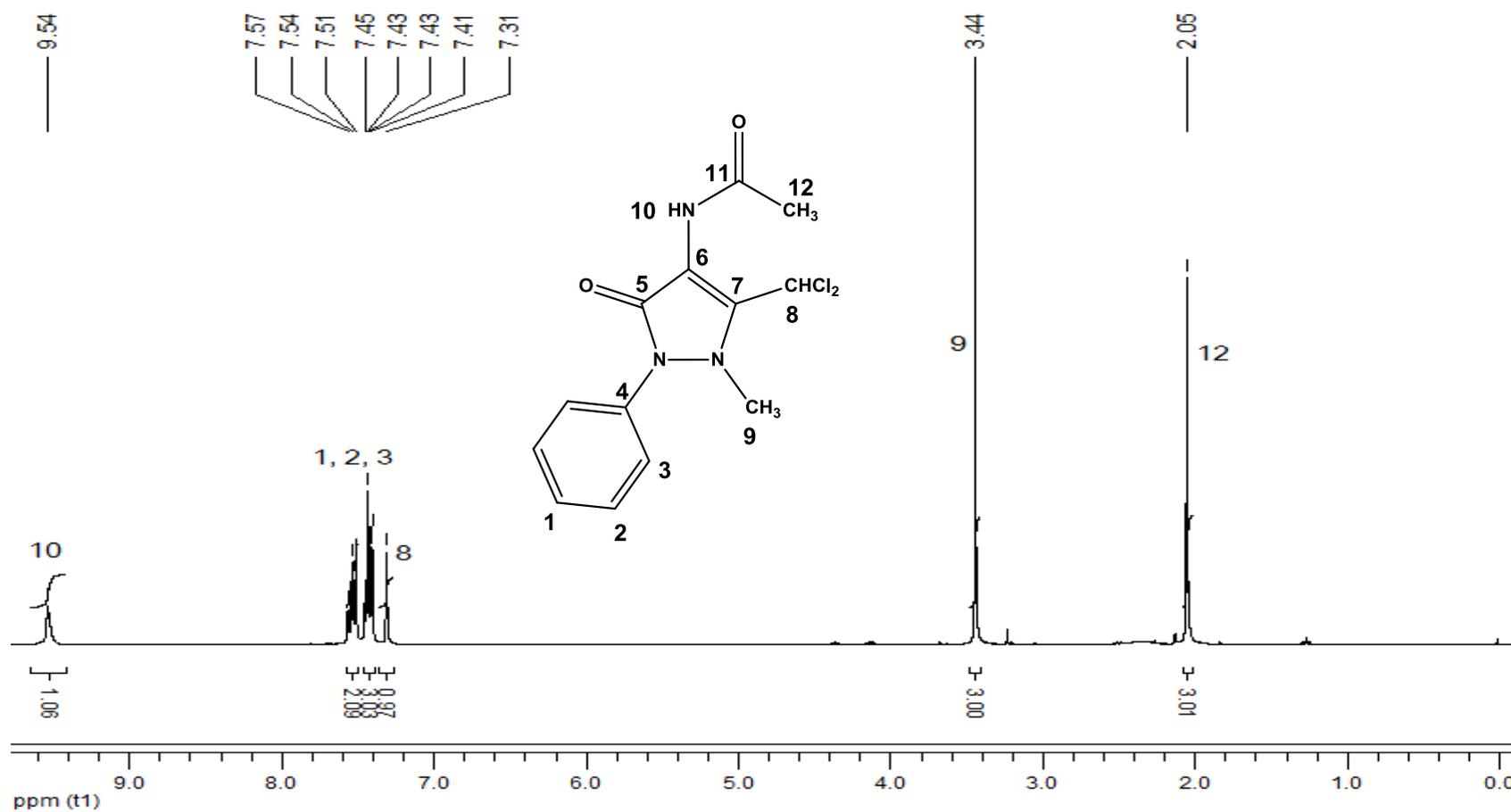
Anexo 4.3 – Espectro de RMN de ^{13}C da 1-(1,5-dimetil-3-oxo-2-fenil-2,3-di-hidro-1H-pirazol-4-il)-1H-pirrole-2,5-diona (**4**) em CDCl_3 a 75 MHz.



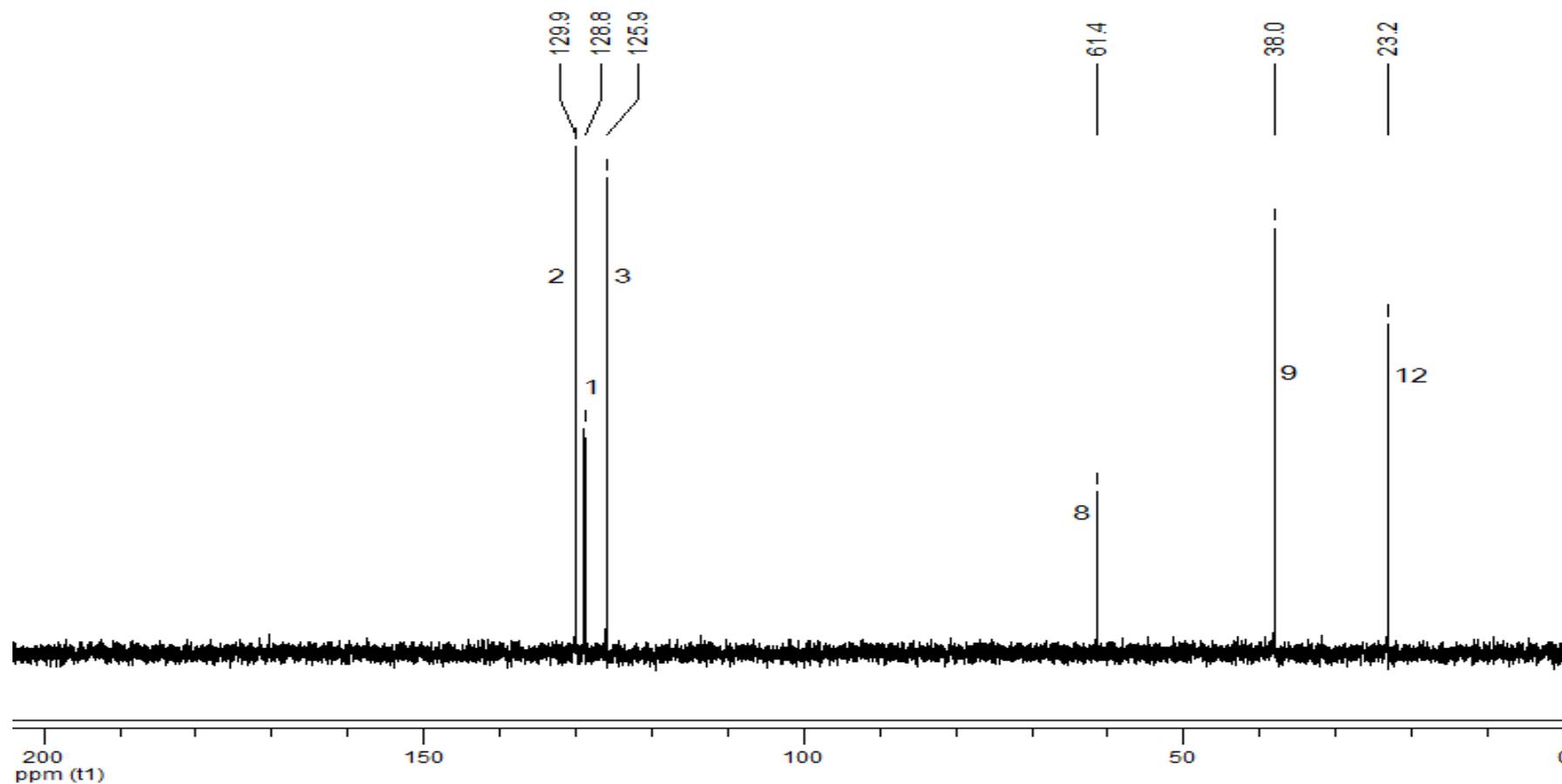
Anexo 5.1 – Espectro de RMN de ¹H da *N*-(5-(clorometil)-1-metil-3-oxo-2-fenil-2,3-di-hidro-1*H*-pirazol-4-il)acetamida (**5**) em CDCl₃ a 300 MHz.



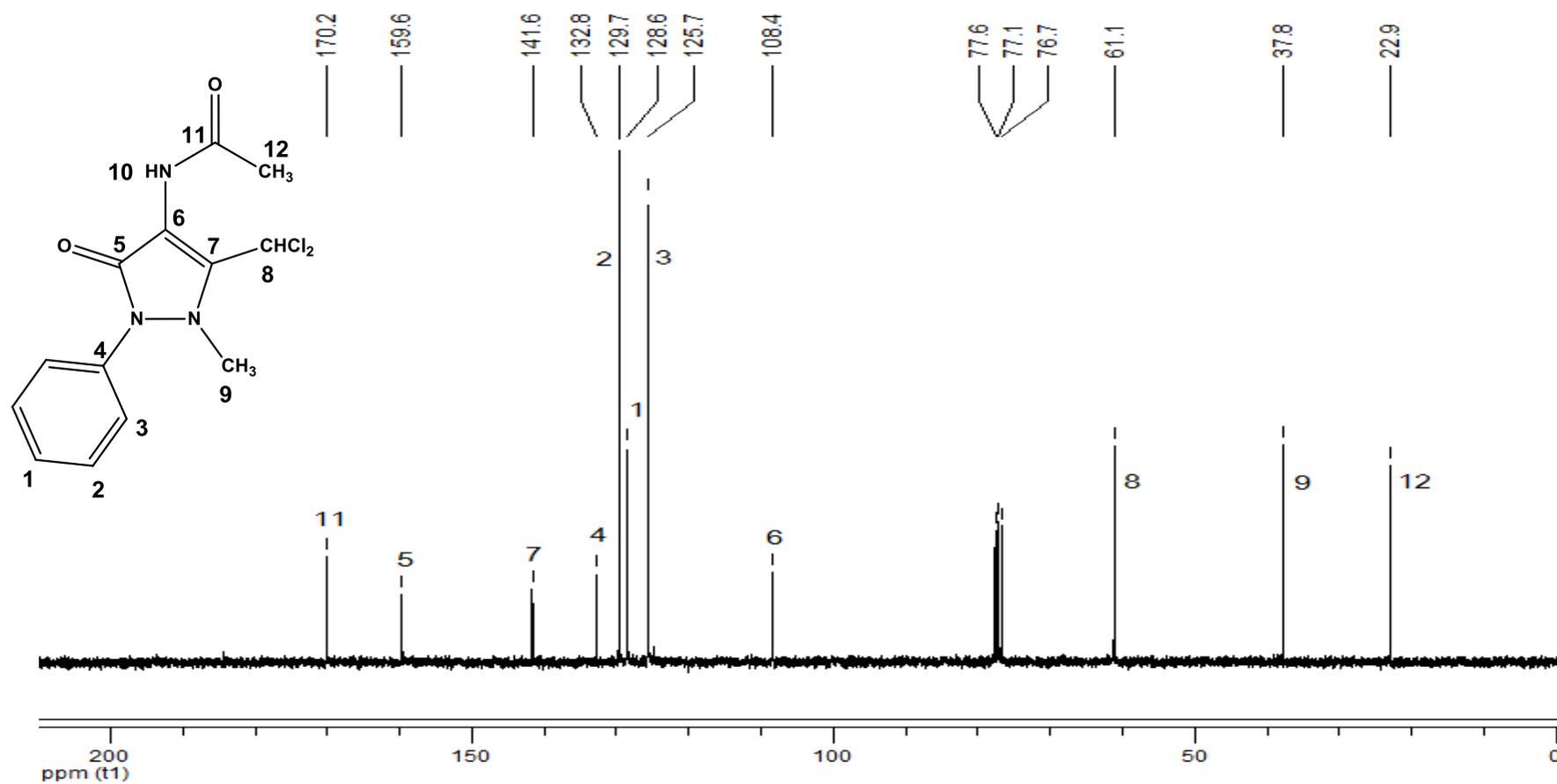
Anexo 5.2 – Espectro de RMN de ^{13}C da *N*-(5-(clorometil)-1-metil-3-oxo-2-fenil-2,3-di-hidro-1H-pirazol-4-il)acetamida (**5**) em CDCl_3 a 75 MHz.



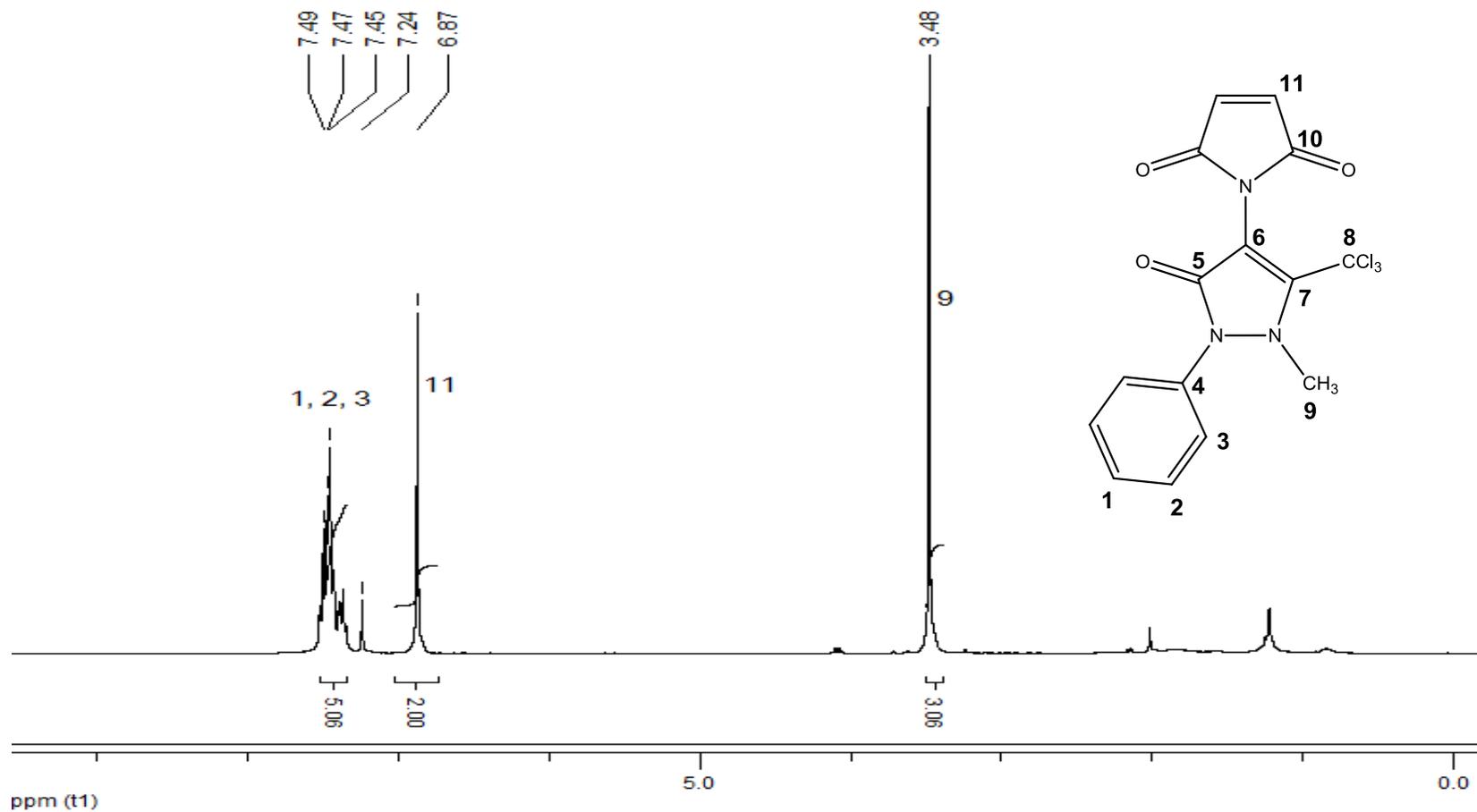
Anexo 6.1 – Espectro de RMN de ¹H da *N*-(5-(diclorometil)-1-metil-3-oxo-2-fenil-2,3-di-hidro-1*H*-pirazol-4-il)acetamida (**6**) em CDCl₃ a 300 MHz.



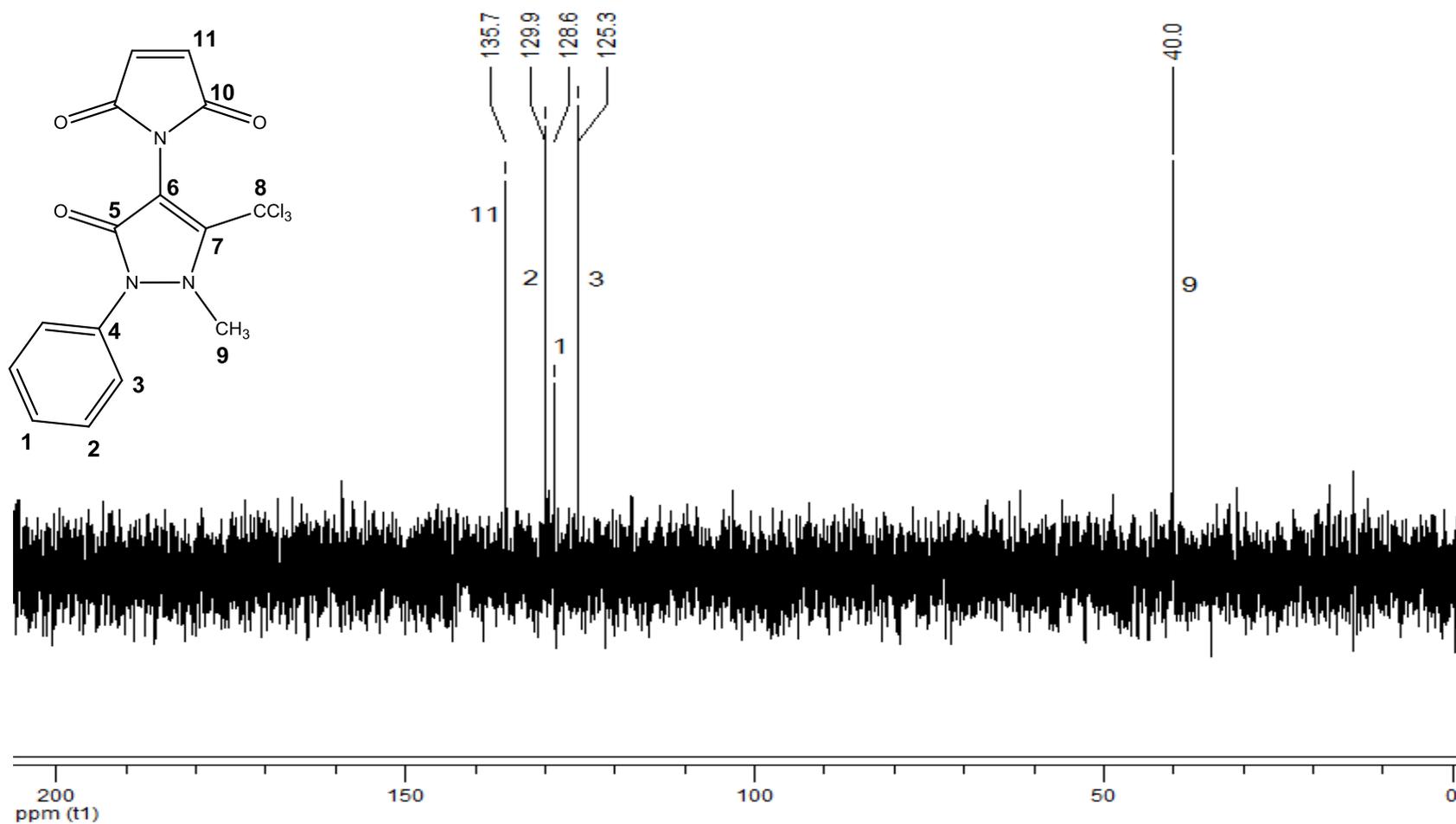
Anexo 6.2 – Espectro de RMN DEPT-135 da *N*-(5-(diclorometil)-1-metil-3-oxo-2-fenil-2,3-di-hidro-1*H*-pirazol-4-il)acetamida (**6**) em CDCl_3 a 75 MHz.



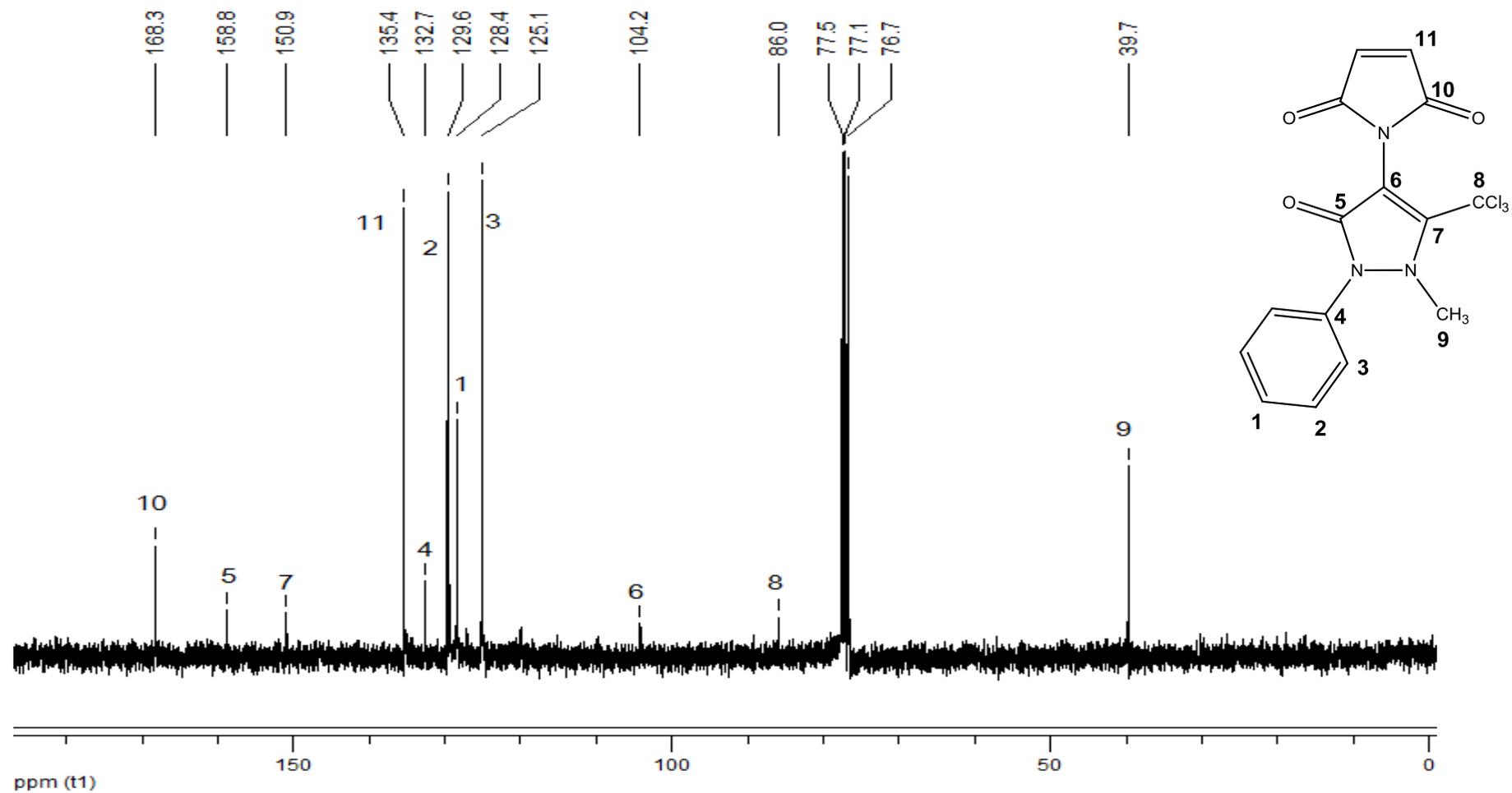
Anexo 6.3 – Espectro de RMN de ¹³C da *N*-(5-(diclorometil)-1-metil-3-oxo-2-fenil-2,3-di-hidro-1*H*-pirazol-4-il)acetamida (**6**) em CDCl₃ a 75 MHz.



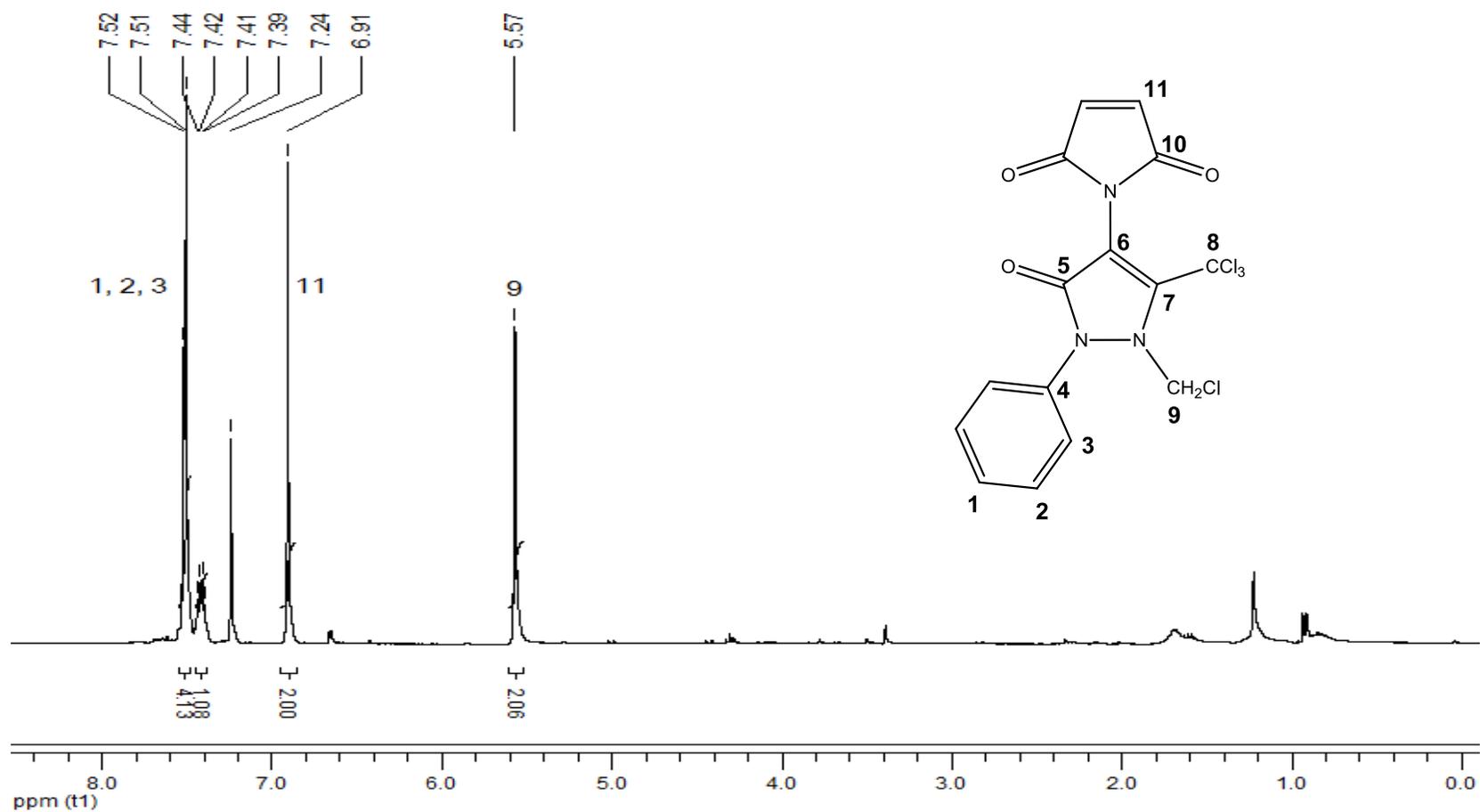
Anexo 7.1 – Espectro de RMN de ¹H da 1-(1-metil-3-oxo-2-fenil-5-(triclórometil)-2,3-di-hidro-1H-pirazol-4-il)-1H-pirrole-2,5-diona (**7**) em CDCl₃ a 300 MHz.



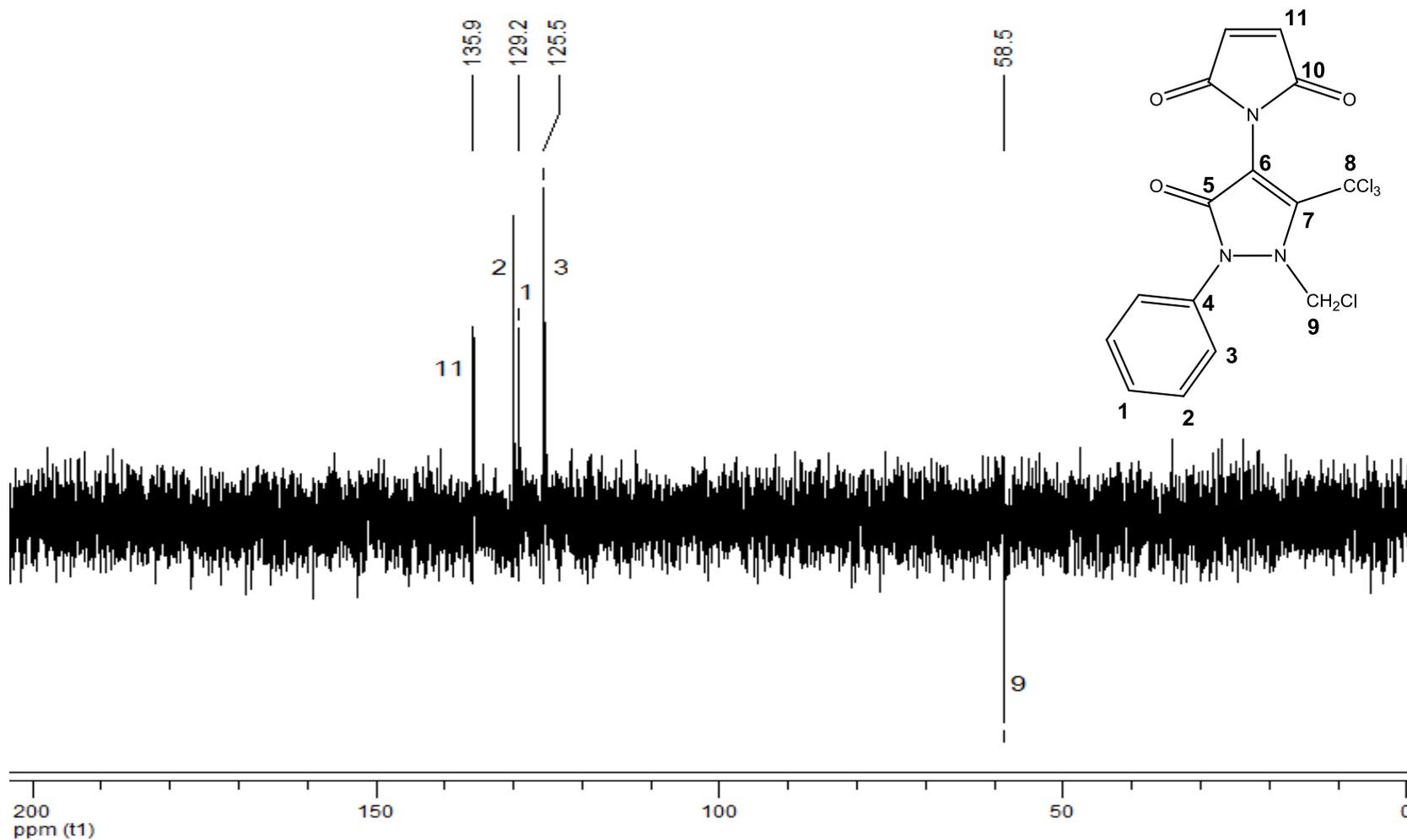
Anexo 7.2 – Espectro de RMN DEPT-135 da 1-(1-metil-3-oxo-2-fenil-5-(triclорометил)-2,3-di-hidro-1H-pirazol-4-il)-1H-pirrole-2,5-diona (**7**) em CDCl₃ a 75 MHz.



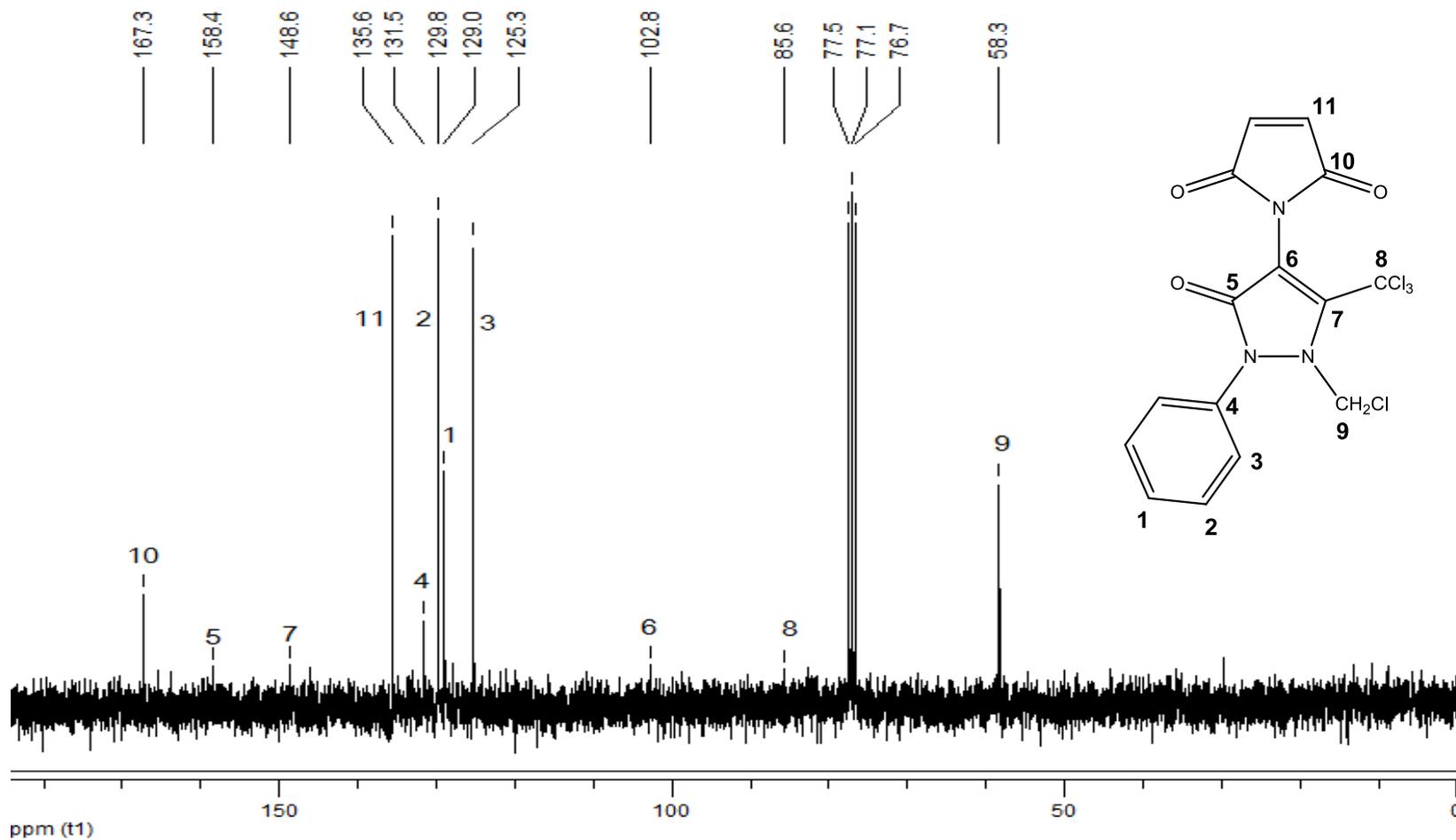
Anexo 7.3 – Espectro de RMN de ^{13}C da 1-(1-metil-3-oxo-2-fenil-5-(triclórometil)-2,3-di-hidro-1H-pirazol-4-il)-1H-pirrole-2,5-diona (**7**) em CDCl_3 a 75 MHz.



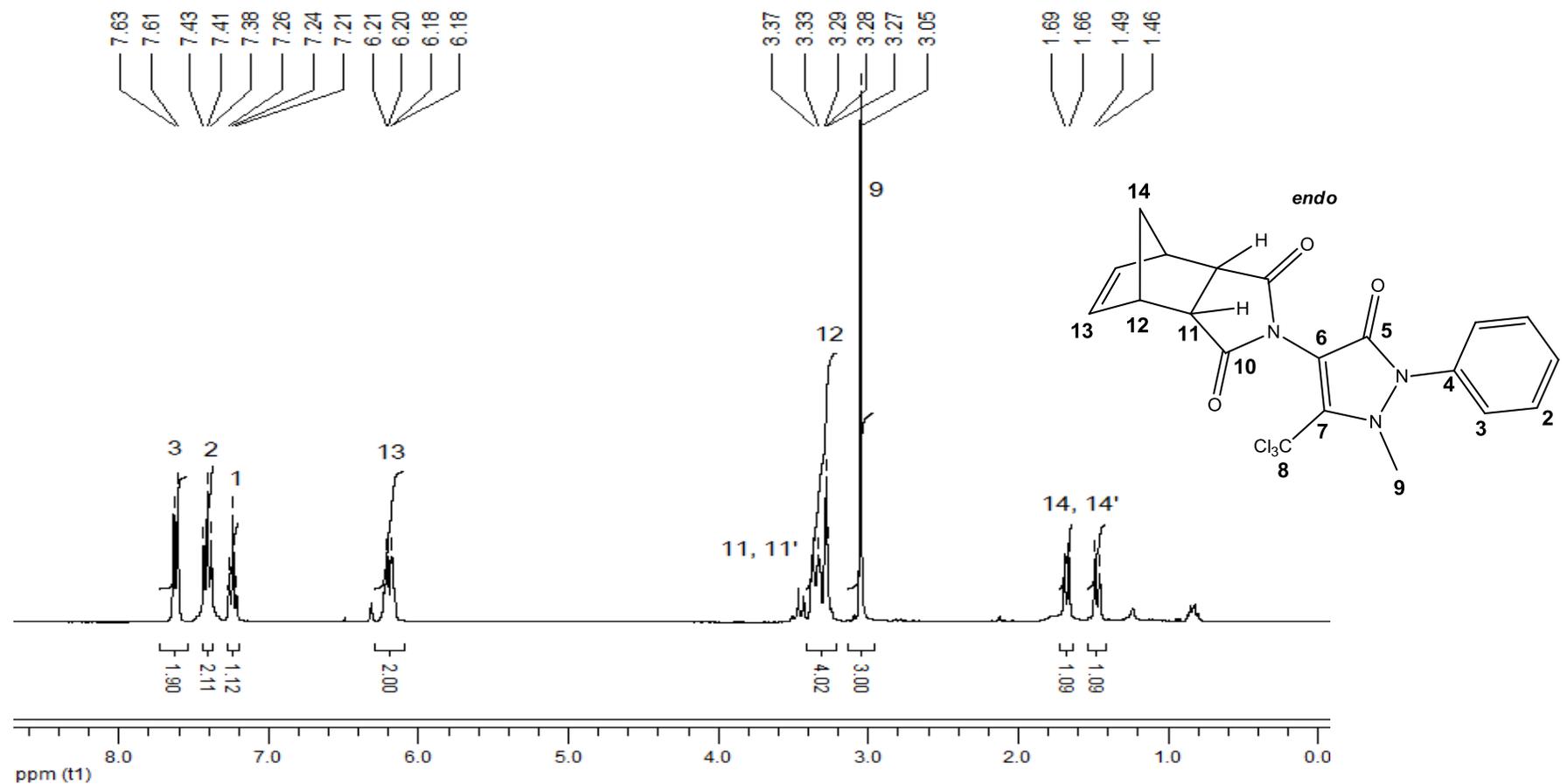
Anexo 8.1 – Espectro de RMN de ¹H da 1-(1-(clorometil)-3-oxo-2-fenil-5-(triclorometil)-2,3-di-hidro-1H-pirazol-4-il)-1H-pirrole-2,5-diona (**8**) em CDCl₃ a 300 MHz.



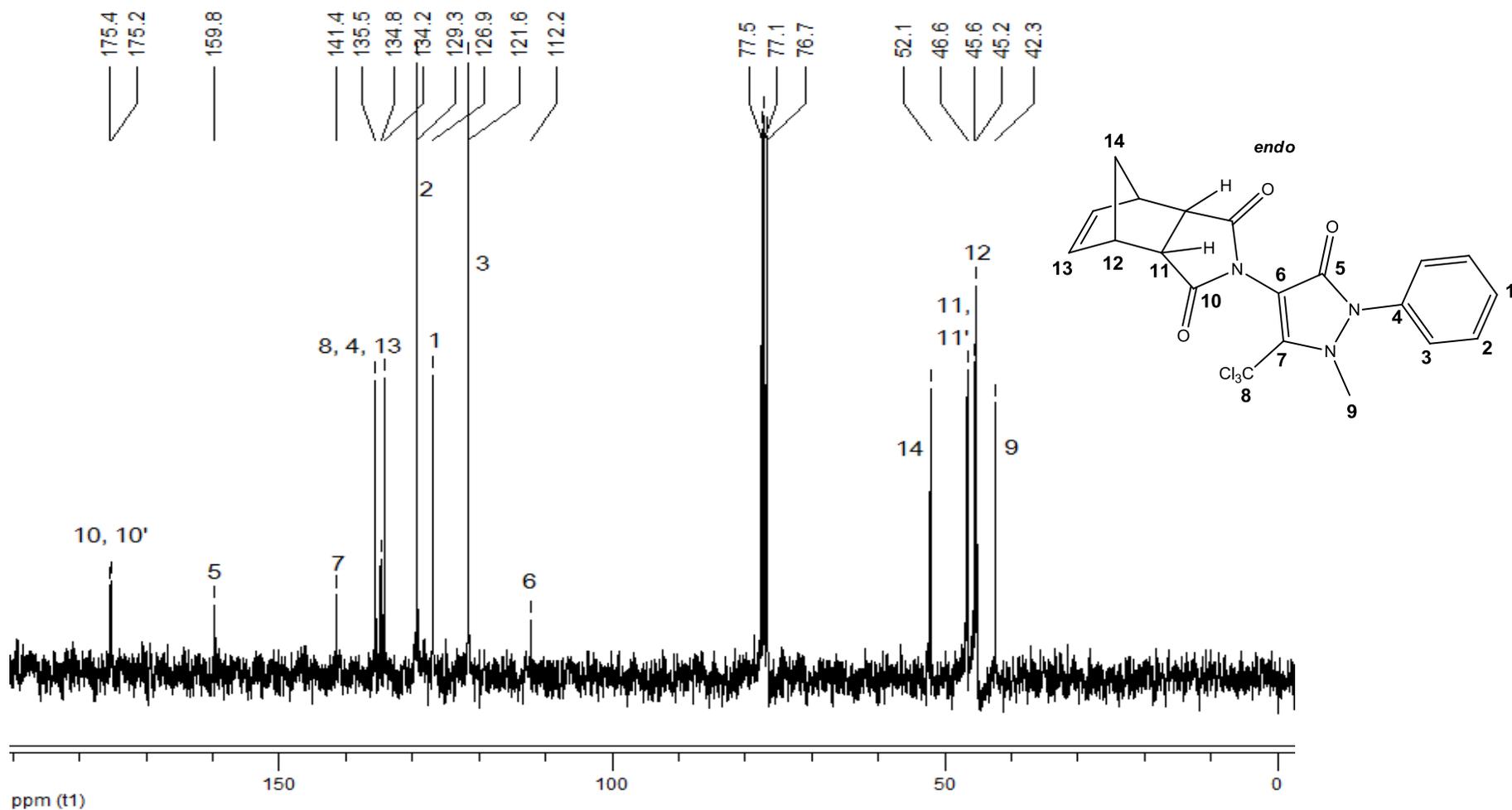
Anexo 8.2 – Espectro de RMN DEPT-135 da 1-(1-(clorometil)-3-oxo-2-fenil-5-(triclorometil)-2,3-di-hidro-1H-pirazol-4-il)-1H-pirrole-2,5-diona (**8**) em CDCl₃ a 75 MHz.



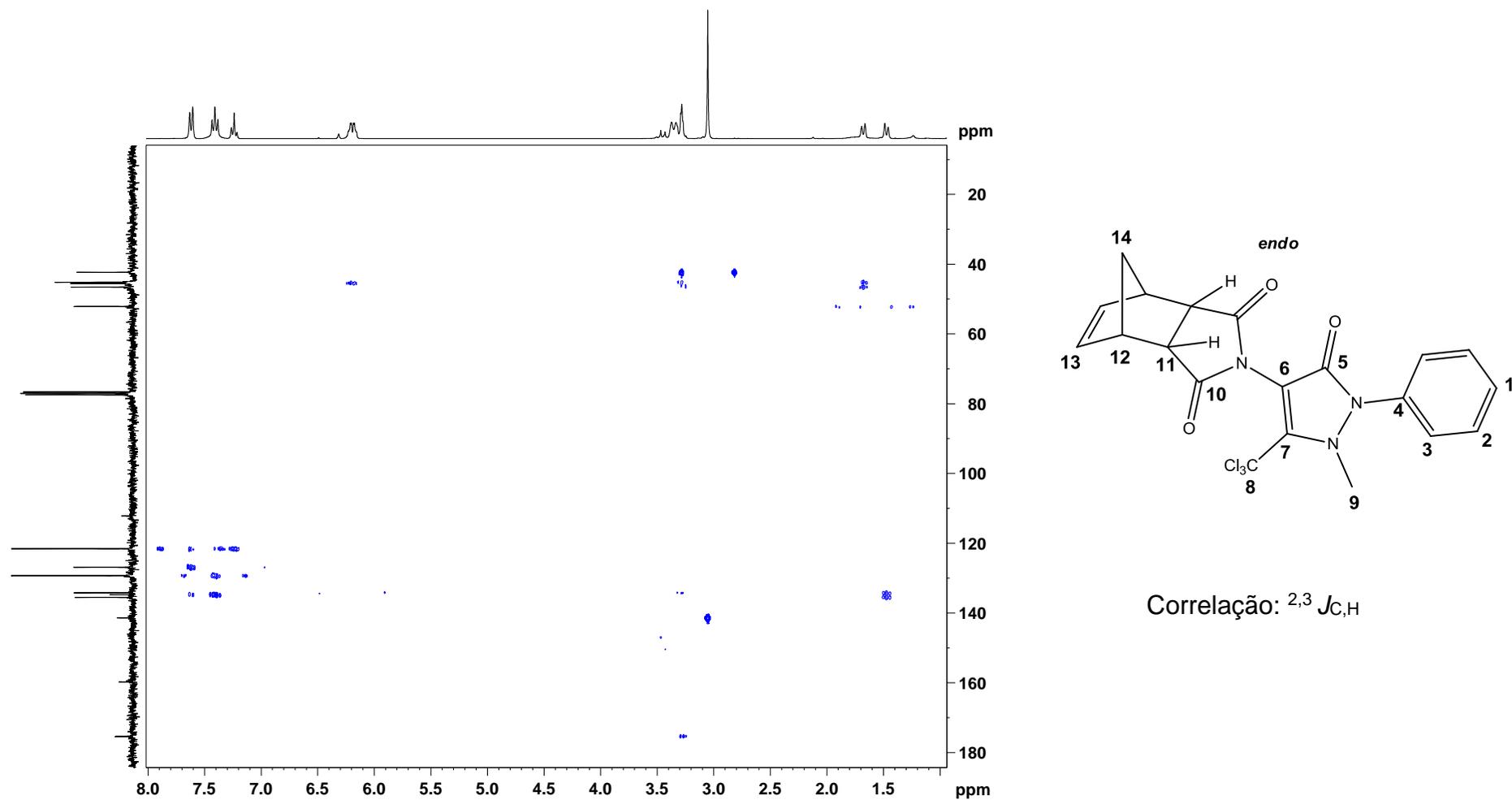
Anexo 8.3 – Espectro de RMN de ^{13}C da 1-(1-(clorometil)-3-oxo-2-fenil-5-(triclорometil)-2,3-di-hidro-1*H*-pirazol-4-il)-1*H*-pirrole-2,5-diona (**8**) em CDCl_3 a 75 MHz.



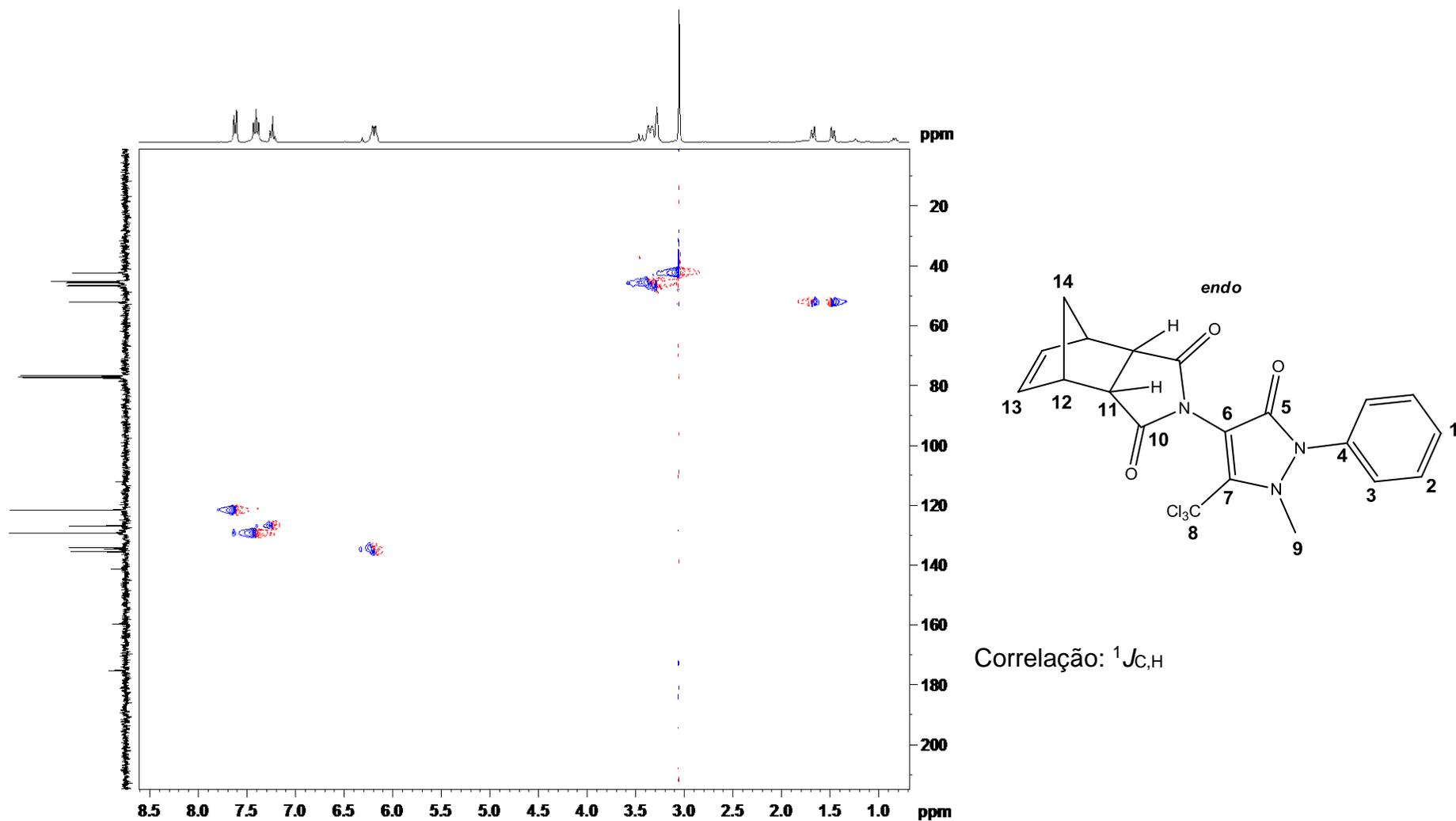
Anexo 9.1 – Espectro de RMN de ¹H da 2-(1-metil-3-oxo-2-fenil-5-(triclorometil)-2,3-di-hidro-1H-pirazol-4-il)-3a,4,7,7a-tetra-hidro-1H-4,7-metanoisindol-1,3(2H)-diona (**9**) em CDCl₃ a 300 MHz.



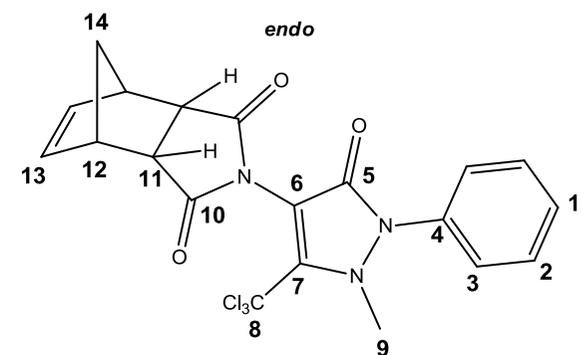
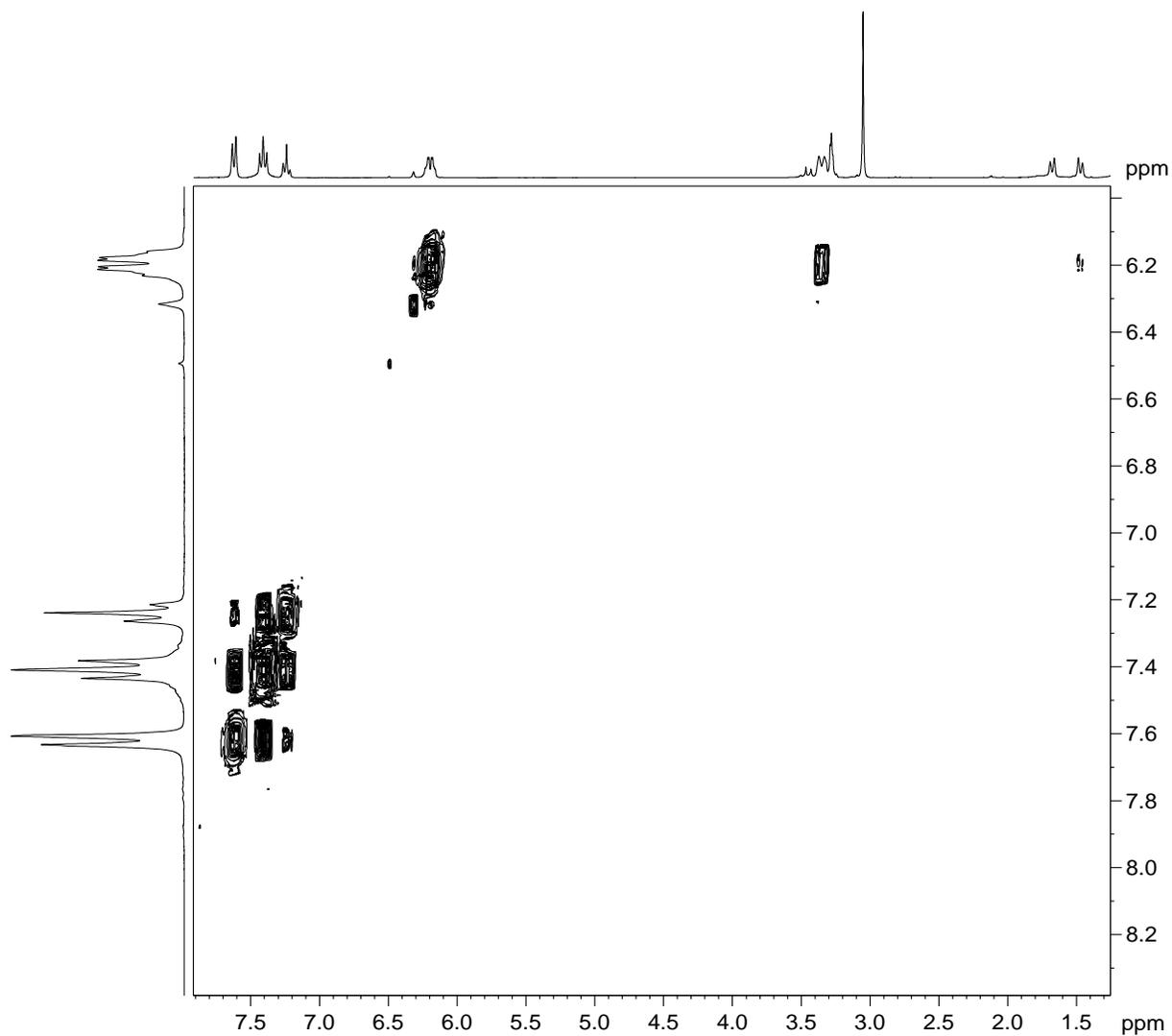
Anexo 9.2 – Espectro de RMN de ¹³C da 2-(1-metil-3-oxo-2-fenil-5-(triclórometil)-2,3-di-hidro-1H-pirazol-4-il)-3a,4,7,7a-tetra-hidro-1H-4,7-metanoisindol-1,3(2H)-diona (**9**) em CDCl₃ a 75 MHz.



Anexo 9.3 – Espectro 2D HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation) da 2-(1-metil-3-oxo-2-fenil-5-(triclorometil)-2,3-di-hidro-1*H*-pirazol-4-il)-3a,4,7,7a-tetra-hidro-1*H*-4,7-metanoisoindol-1,3(2*H*)-diona (**9**).

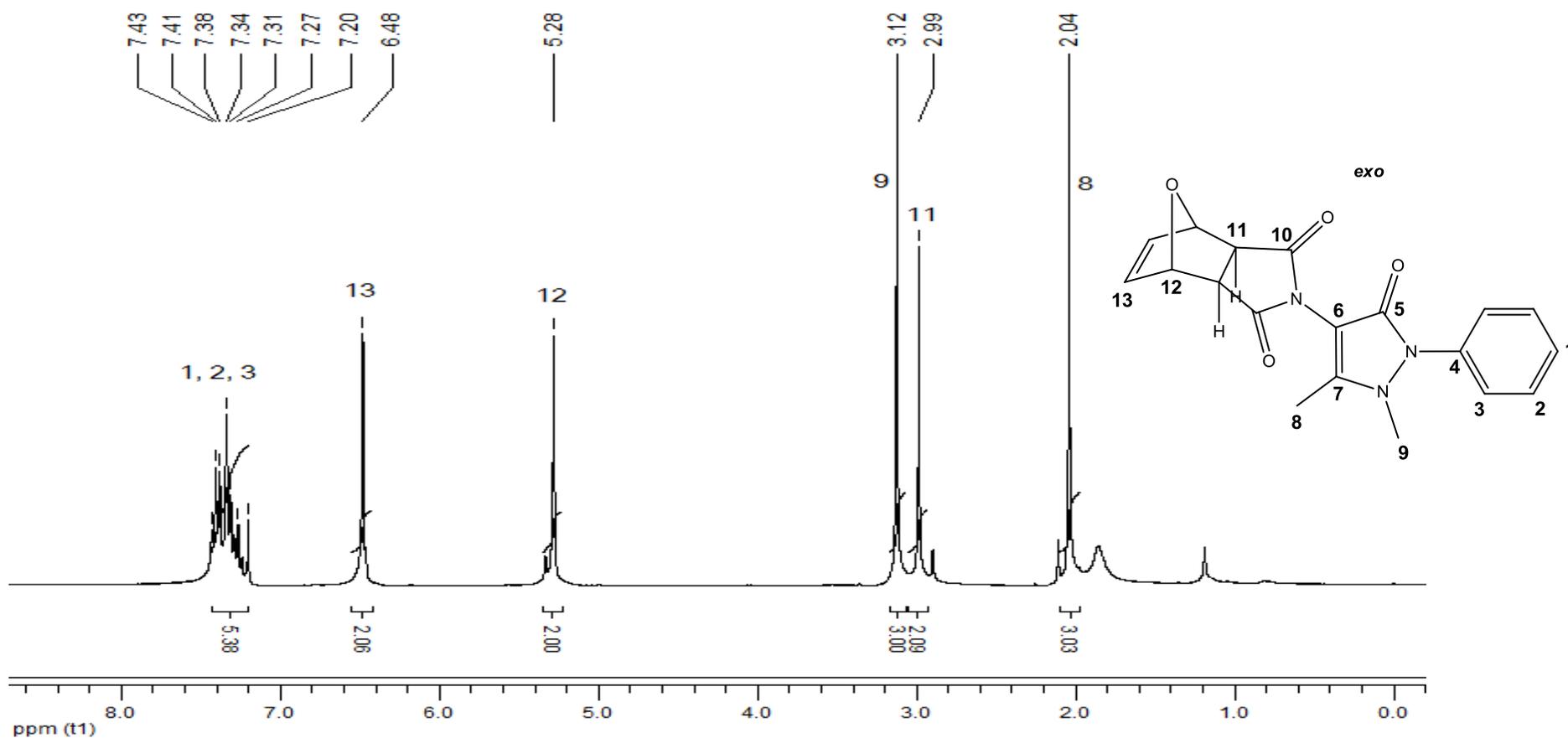


Anexo 9.4 – Espectro 2D HSQC (Heteronuclear Single-Quantum Correlation) da 2-(1-metil-3-oxo-2-fenil-5-(triclorometil)-2,3-di-hidro-1H-pirazol-4-il)-3a,4,7,7a-tetra-hidro-1H-4,7-metanoisoindol-1,3(2H)-diona (**9**).

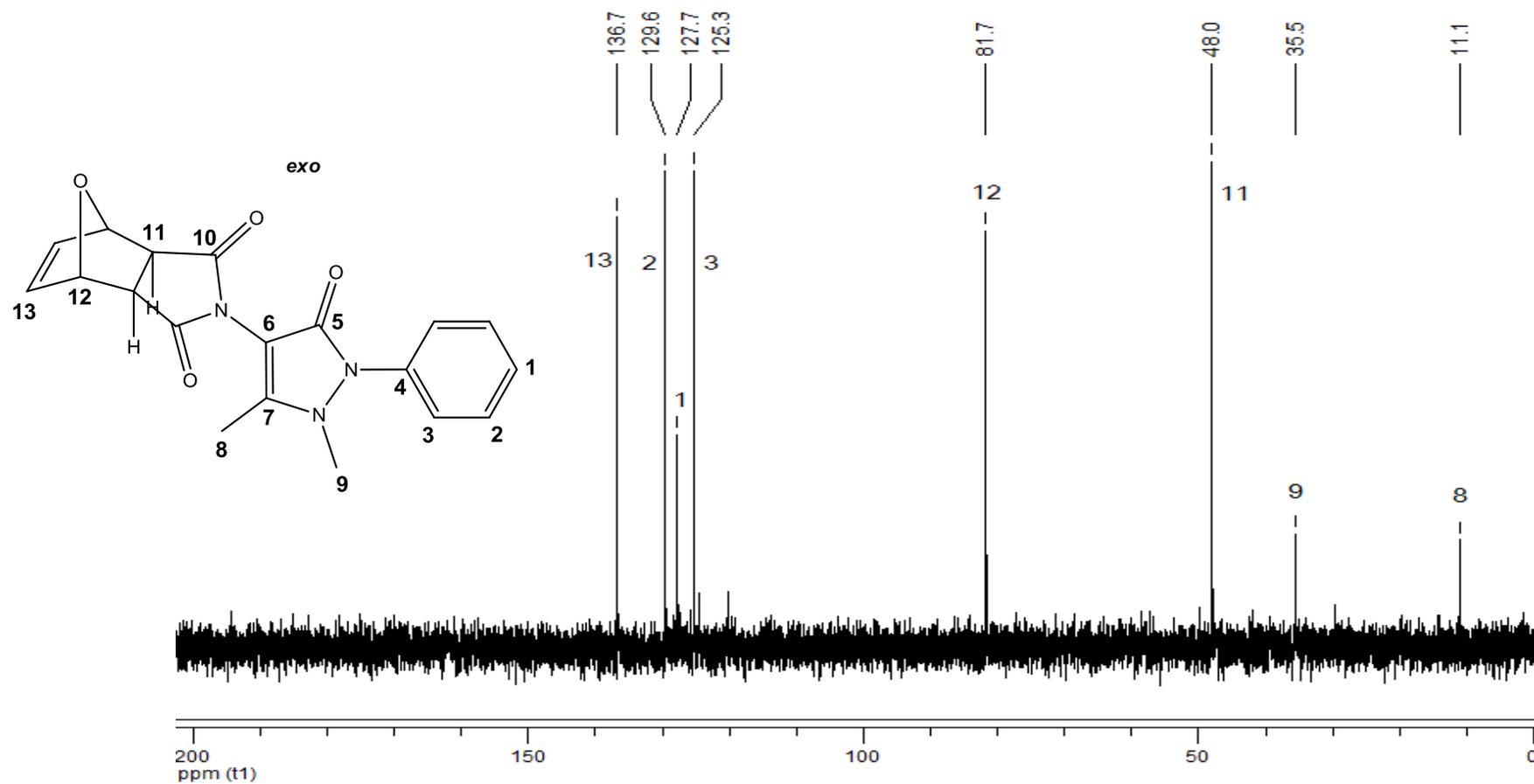


Correlação: ${}^{2,3}J_{H,H}$

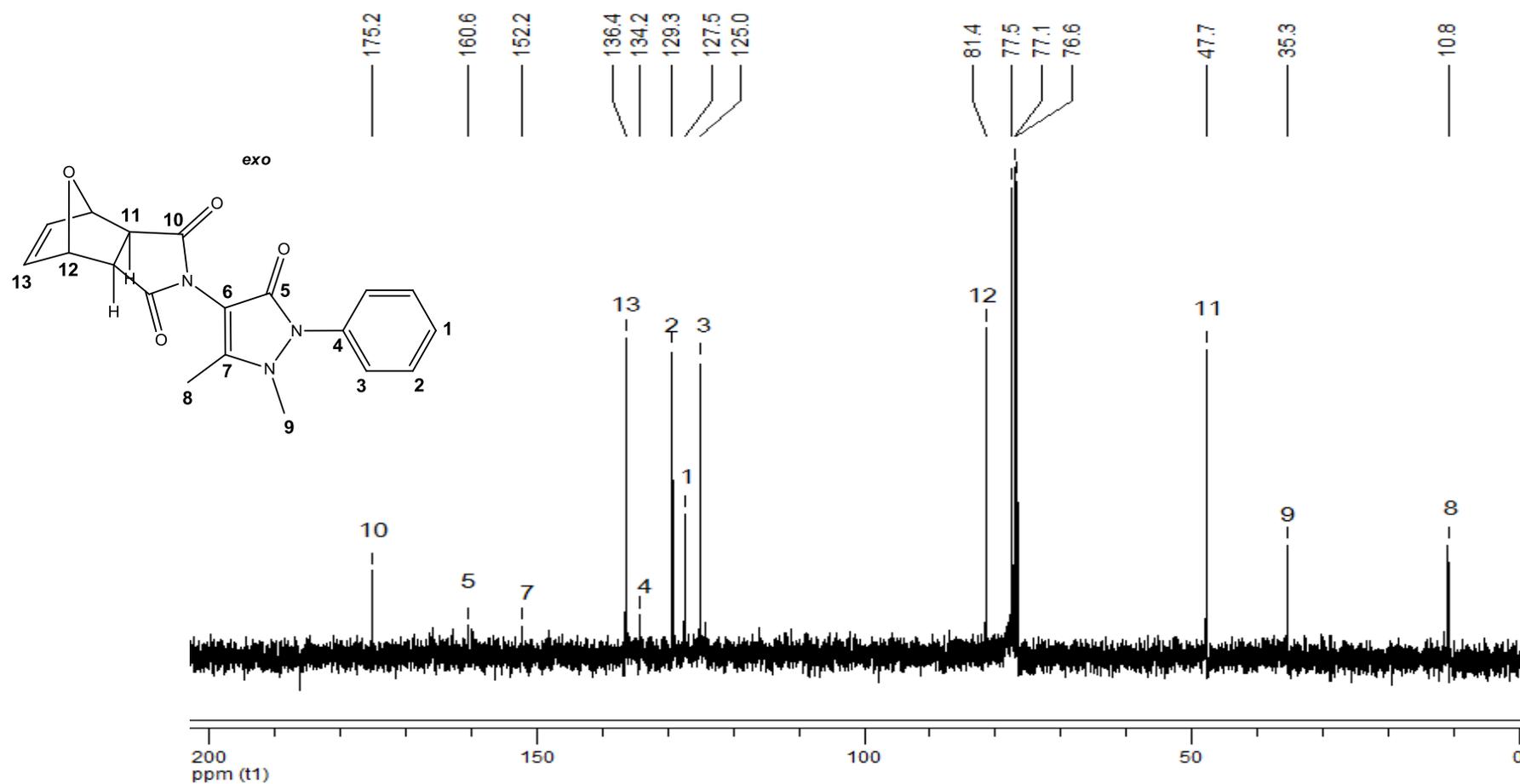
Anexo 9.5 – Espectro 2D COSY (Correlation Spectroscopy) da 2-(1-metil-3-oxo-2-fenil-5-(triclórometil)-2,3-di-hidro-1H-pirazol-4-il)-3a,4,7,7a-tetra-hidro-1H-4,7-metanoisindol-1,3(2H)-diona (**9**).



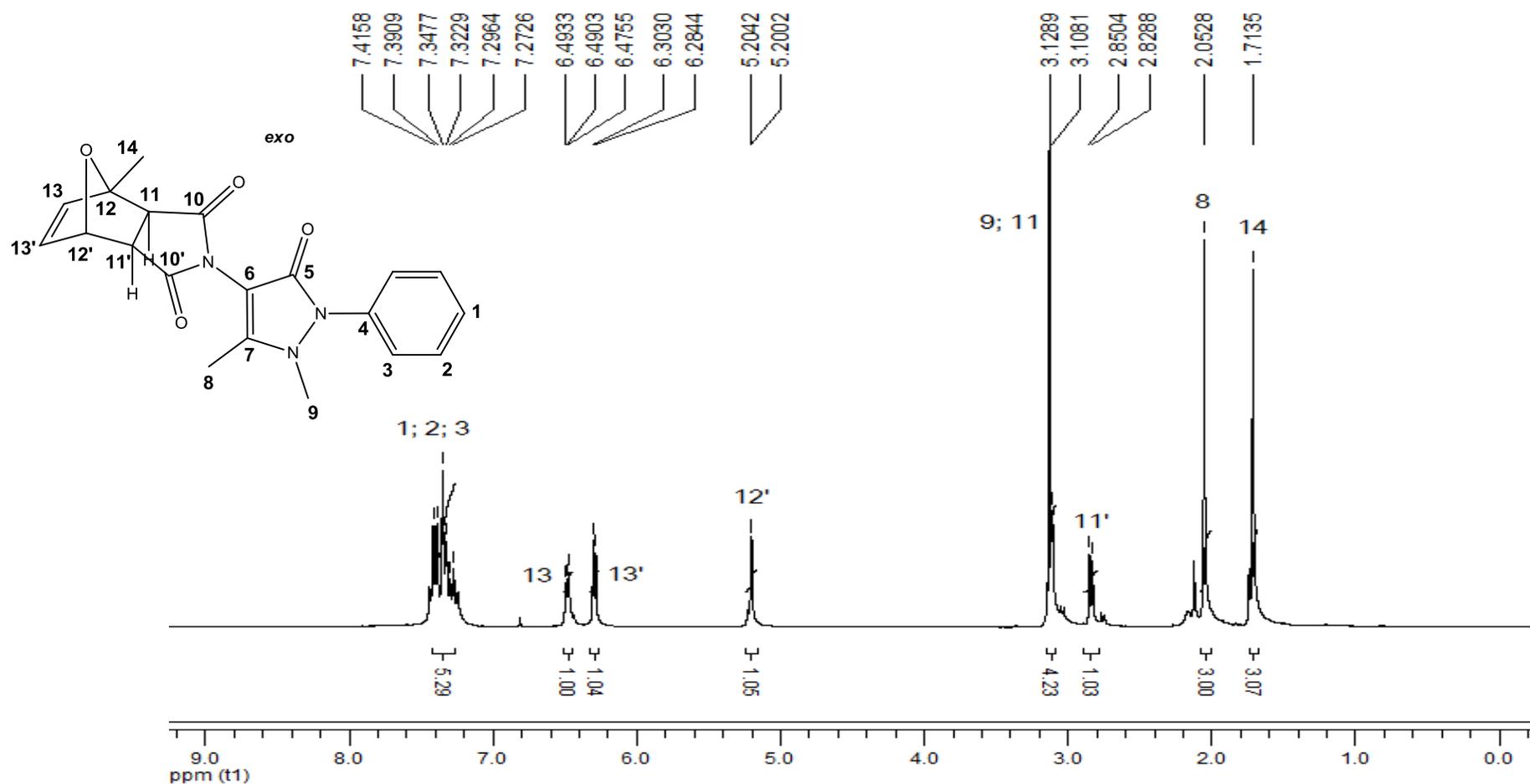
Anexo 10.1 – Espectro de RMN de ¹H do aduto exo de Diel-Alder 2-(1,5-dimetil-3-oxo-2-fenil-2,3-di-hidro-1*H*-pirazol-4-il)-3a,4,7,7a-tetra-hidro-1*H*-4,7-epoxi-isoindol-1,3(2*H*)-diona (**10**) em CDCl₃ a 300 MHz.



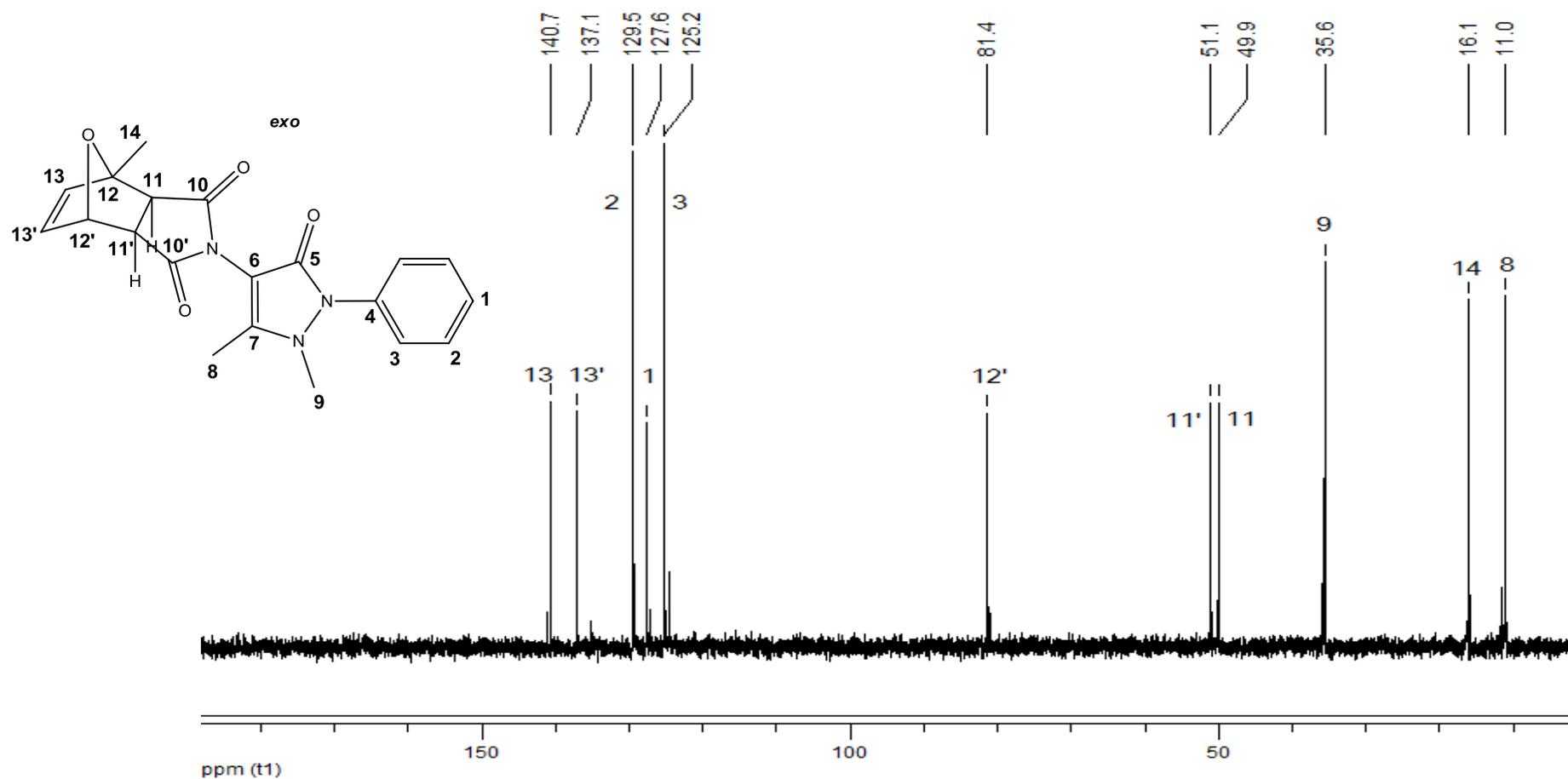
Anexo 10.2 – Espectro de RMN DEPT-135 do aduto *exo* de Diel-Alder 2-(1,5-dimetil-3-oxo-2-fenil-2,3-di-hidro-1*H*-pirazol-4-il)-3a,4,7,7a-tetra-hidro-1*H*-4,7-epoxi-isoindol-1,3(2*H*)-diona (**10**) em CDCl₃ a 75 MHz.



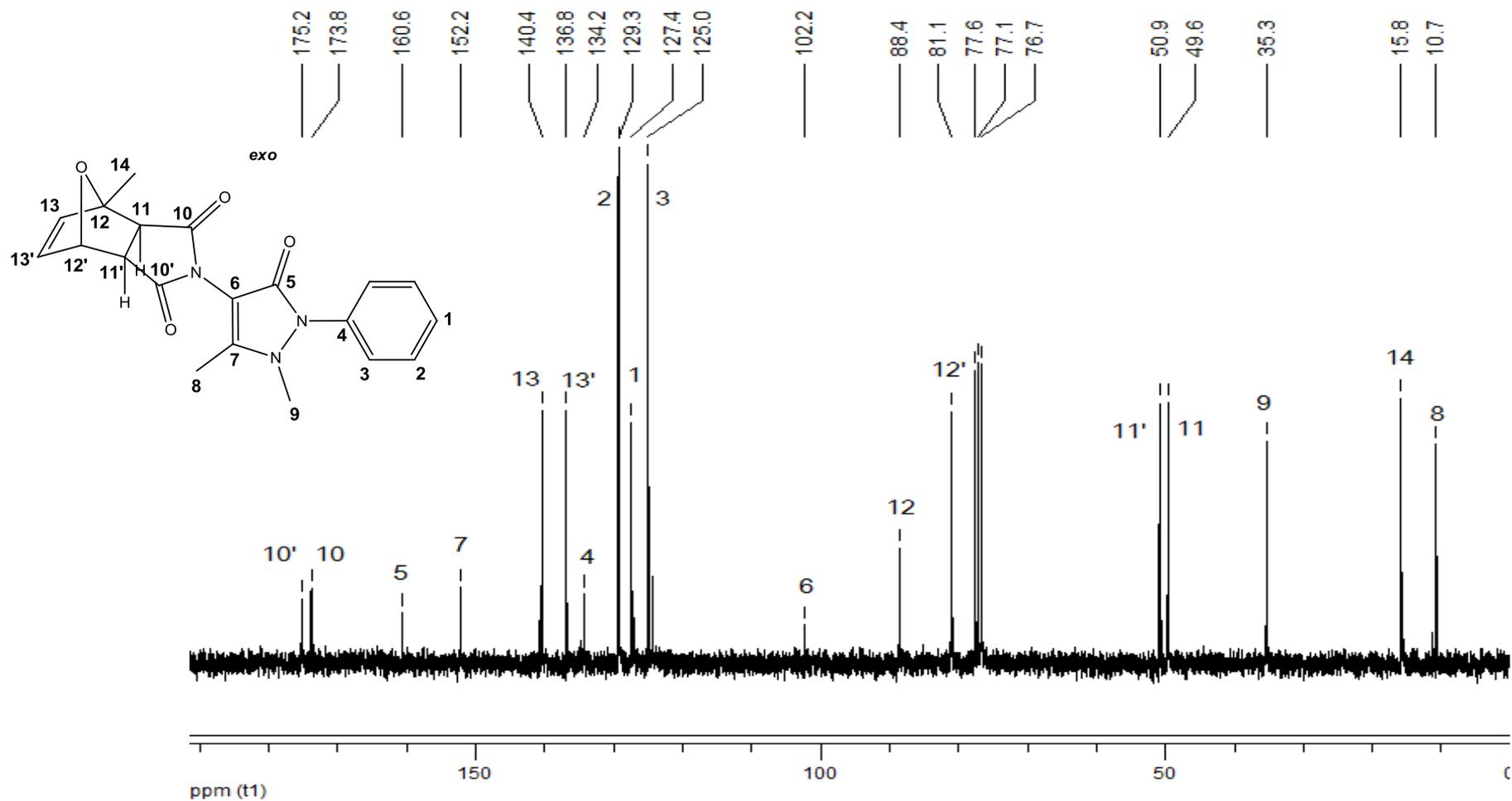
Anexo 10.3 – Espectro de RMN de ^{13}C do aduto exo de Diel-Alder 2-(1,5-dimetil-3-oxo-2-fenil-2,3-di-hidro-1*H*-pirazol-4-il)-3a,4,7,7a-tetra-hidro-1*H*-4,7-epoxi-isoindol-1,3(2*H*)-diona (**10**) em CDCl_3 a 75 MHz.



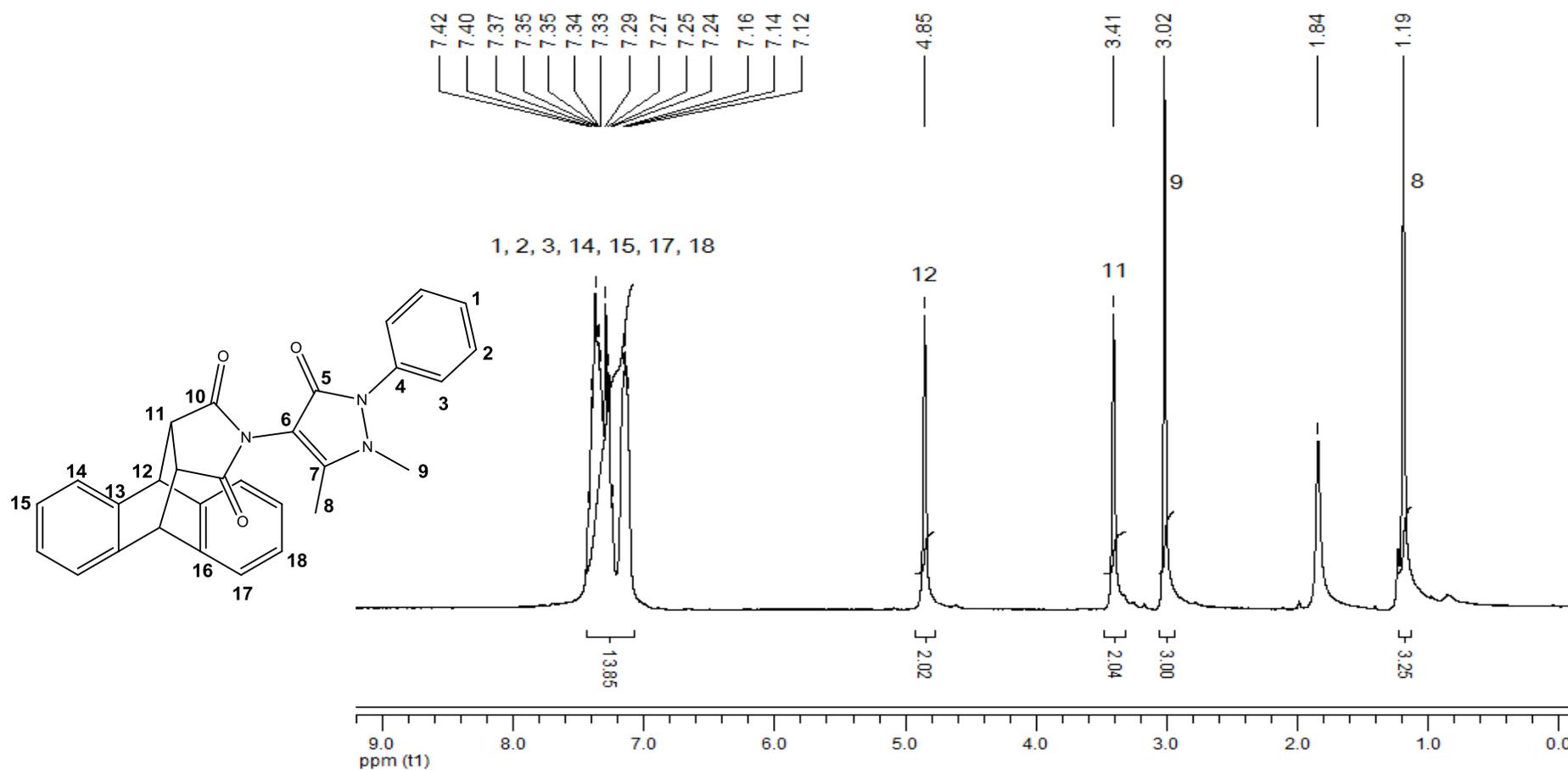
Anexo 11.1 – Espectro de RMN de ^1H do aduto exo de Diel-Alder 2-(1,5-dimetil-3-oxo-2-fenil-2,3-di-hidro-1H-pirazol-4-il)-4-metil-3a,4,7,7a-tetra-hidro-1H-4,7-epoxi-isoindol-1,3(2H)-diona (**11**) em CDCl_3 a 300 MHz.



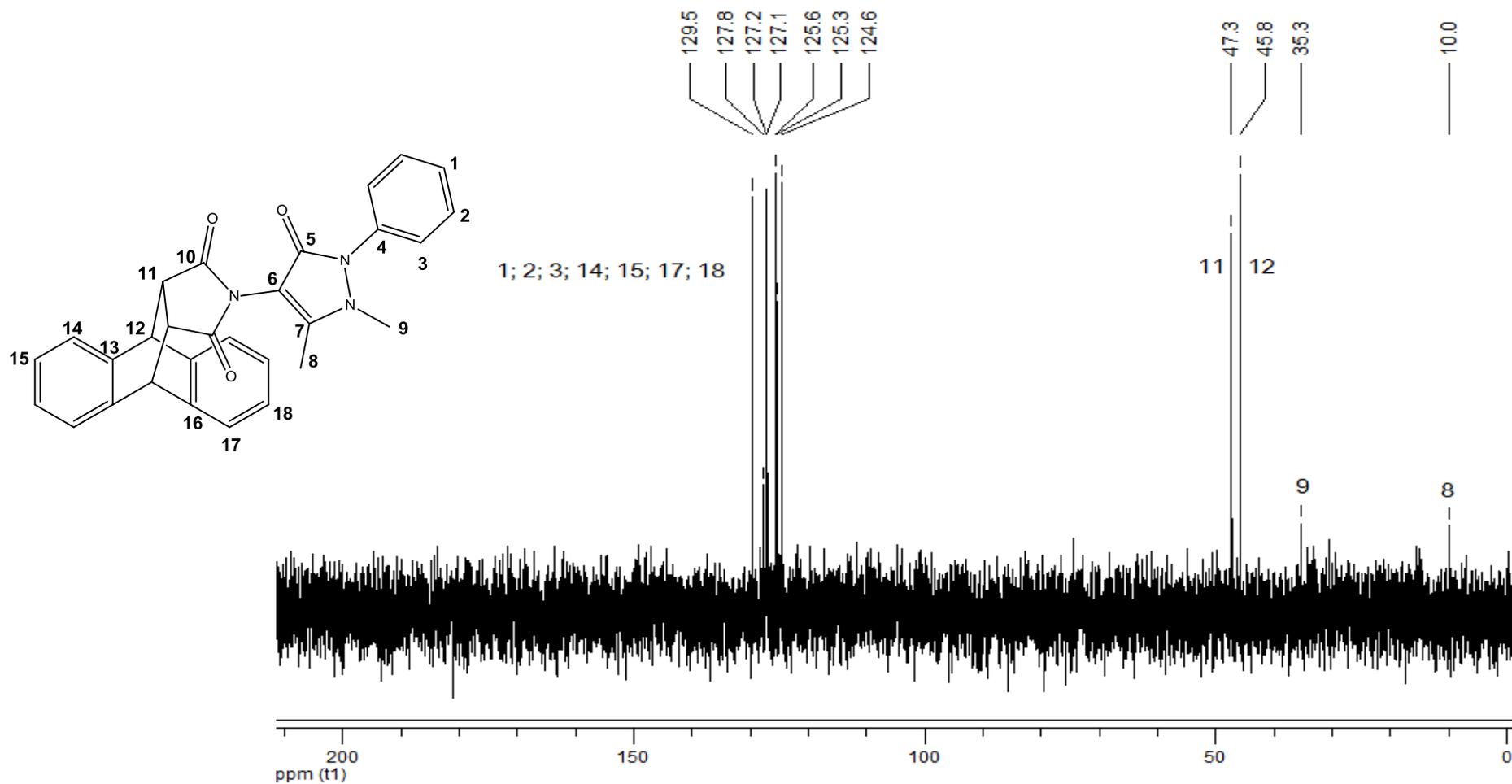
Anexo 11.2 – Espectro de RMN DEPT-135 do aduto *exo* de Diel-Alder 2-(1,5-dimetil-3-oxo-2-fenil-2,3-di-hidro-1*H*-pirazol-4-il)-4-metil-3a,4,7,7a-tetra-hidro-1*H*-4,7-epoxi-isoindol-1,3(2*H*)-diona (**11**) em CDCl_3 a 75 MHz.



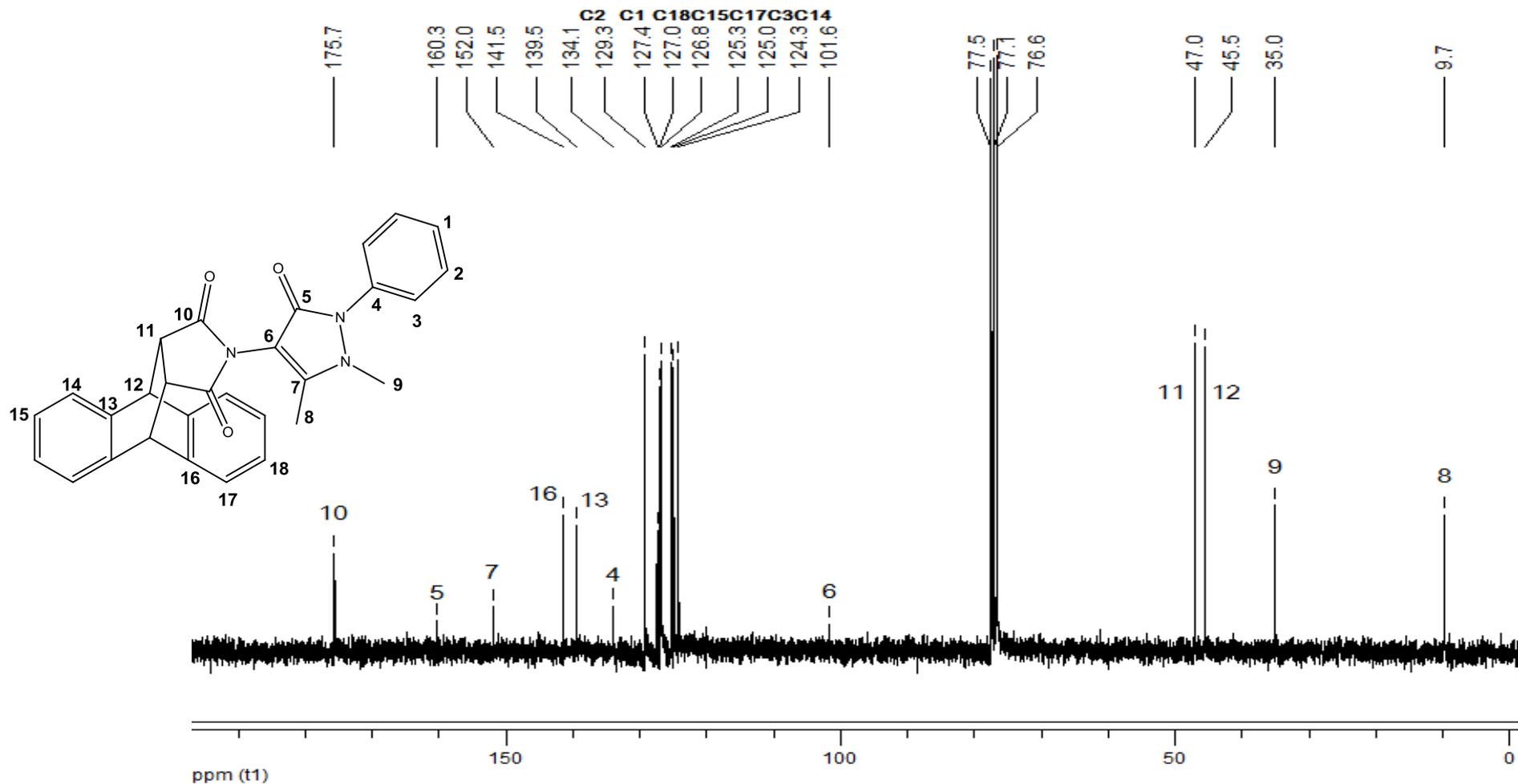
Anexo 11.3 – Espectro de RMN de ^{13}C do aduto *exo* de Diel-Alder 2-(1,5-dimetil-3-oxo-2-fenil-2,3-di-hidro-1*H*-pirazol-4-il)-4-metil-3a,4,7,7a-tetra-hidro-1*H*-4,7-epoxi-isoindol-1,3(2*H*)-diona (**11**) em CDCl_3 a 75 MHz.



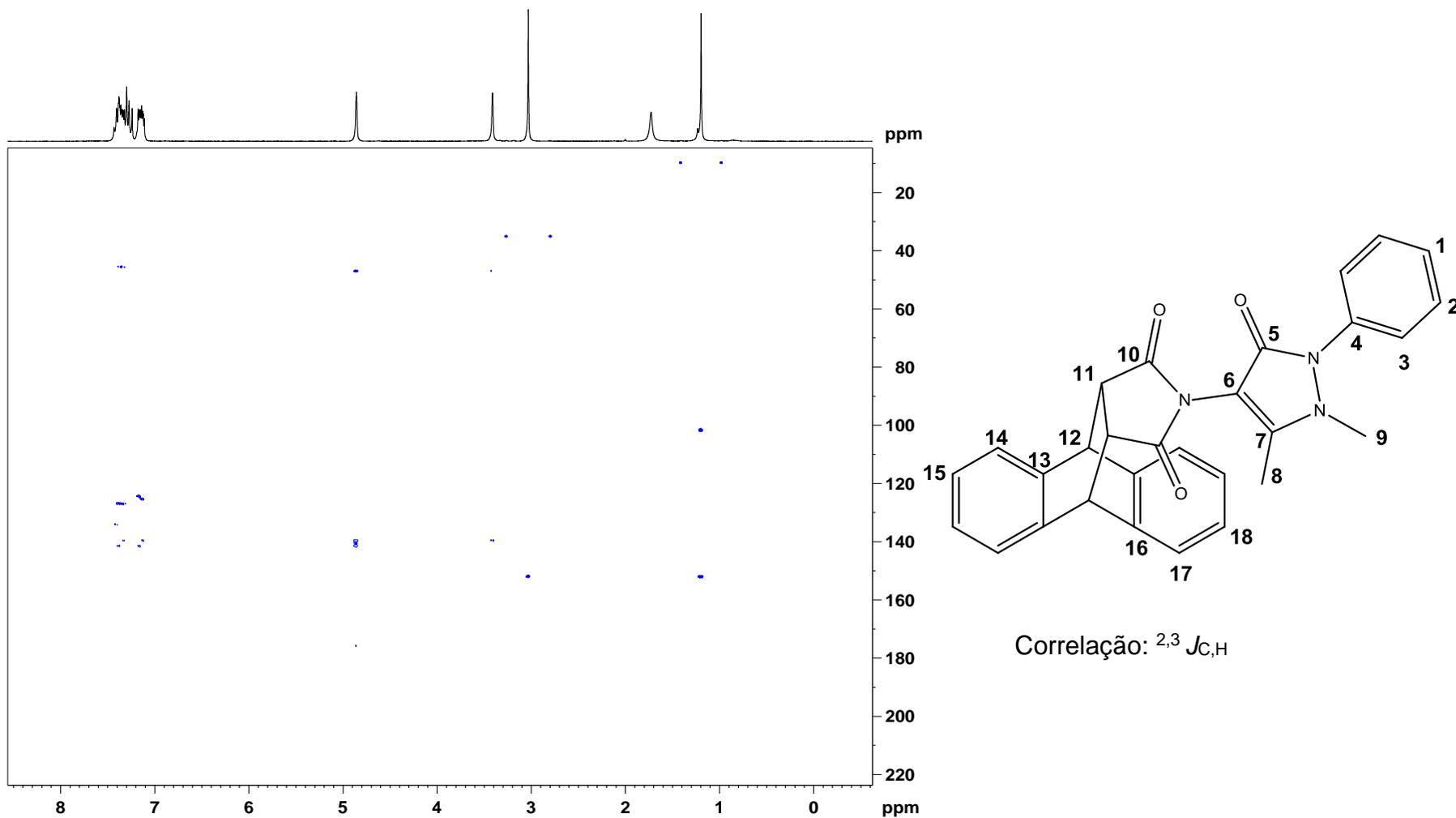
Anexo 12.1 – Espectro de RMN de ^1H de 13-(1,5-dimetil-3-oxo-2-fenil-2,3-di-hidro-1H-pirazol-4-il)-10,11-di-hidro-9H-9,10-[3,4]epipirroloantraceno-12,14(13H,15H)-diona (**12**) em CDCl_3 a 300 MHz.



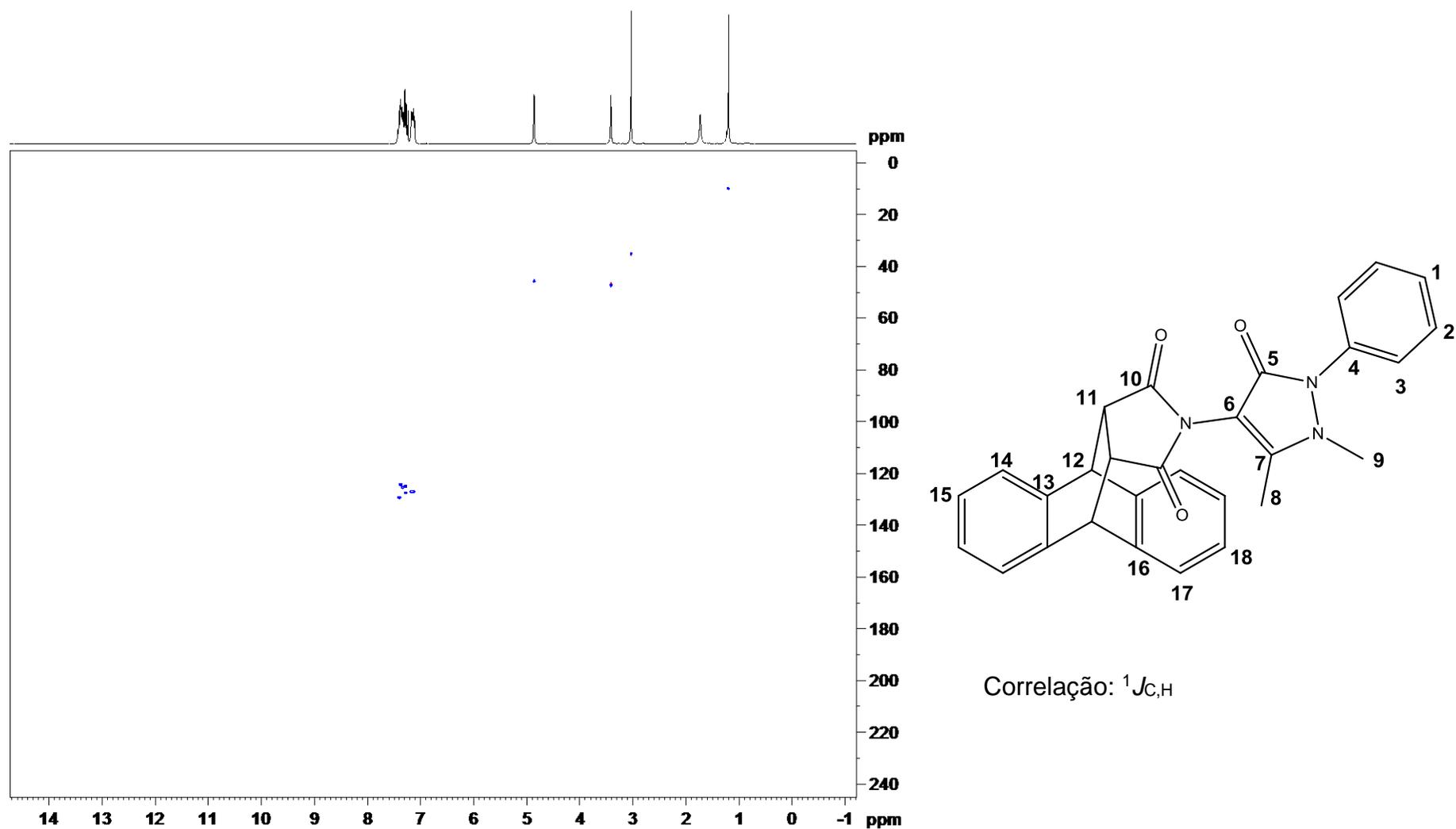
Anexo 12.2 – Espectro de RMN DEPT-135 de 13-(1,5-dimetil-3-oxo-2-fenil-2,3-di-hidro-1H-pirazol-4-il)-10,11-di-hidro-9H-9,10-[3,4]epipirroloantraceno-12,14(13H,15H)-diona (**12**) em CDCl₃ a 75 MHz.



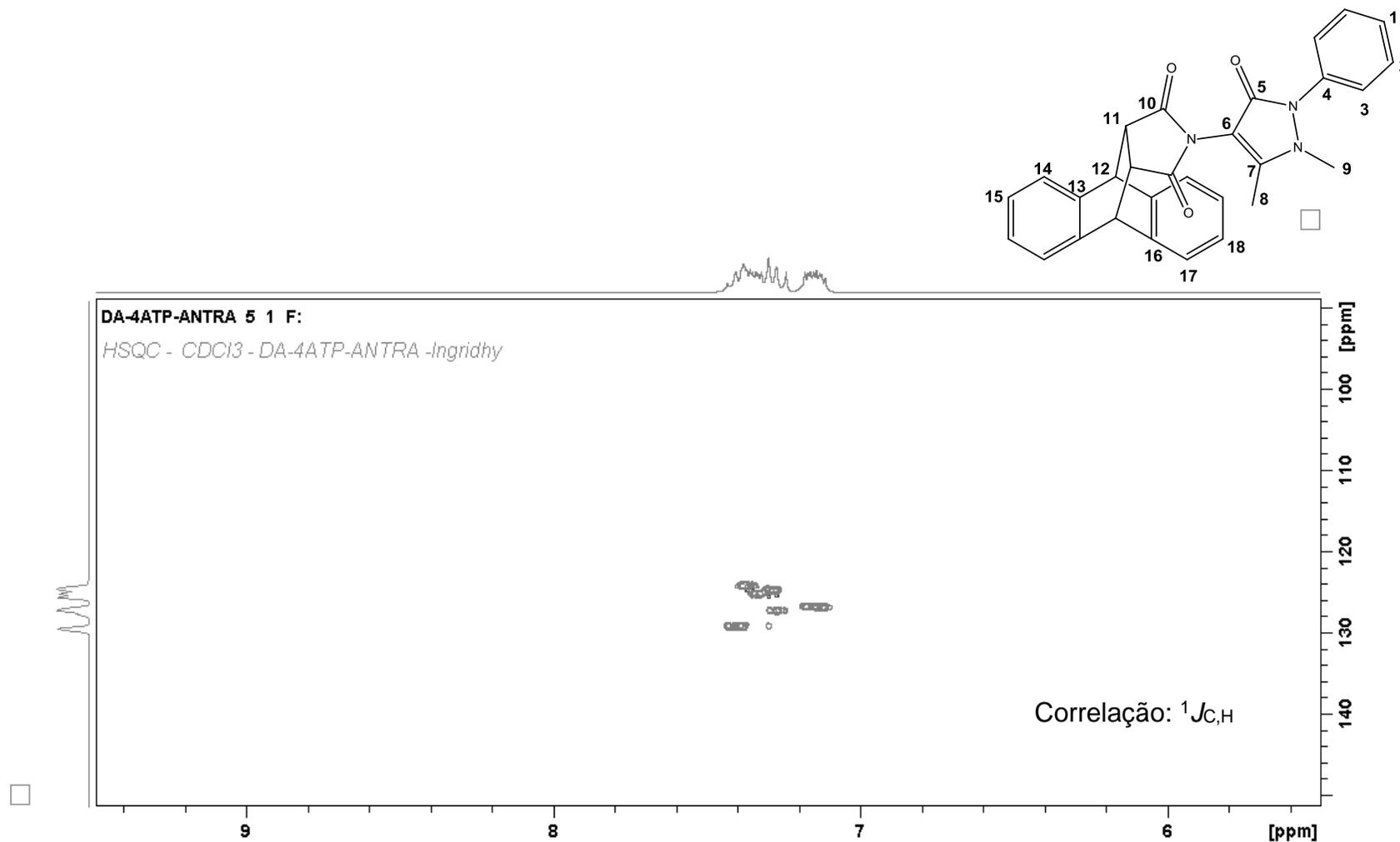
Anexo 12.3 – Espectro de RMN de ¹³C de 13-(1,5-dimetil-3-oxo-2-fenil-2,3-di-hidro-1H-pirazol-4-il)-10,11-di-hidro-9H-9,10-[3,4]epipirroloantraceno-12,14(13H,15H)-diona (**12**) em CDCl₃ a 75 MHz.



Anexo 12.4 – Espectro 2D HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation) da 13-(1,5-dimetil-3-oxo-2-fenil-2,3-di-hidro-1*H*-pirazol-4-il)-10,11-di-hidro-9*H*-9,10-[3,4] epipirrolantraceno-12,14(13*H*,15*H*)-diona (**12**).



Anexo 12.5 – Espectro 2D HSQC (Heteronuclear Single-Quantum Correlation) da 13-(1,5-dimetil-3-oxo-2-fenil-2,3-di-hidro-1*H*-pirazol-4-il)-10,11-di-hidro-9*H*-9,10-[3,4] epipirrolantraceno-12,14(13*H*,15*H*)-diona (**12**).



Anexo 12.5.1 – Espectro 2D ampliado HSQC (Heteronuclear Single-Quantum Correlation) da 13-(1,5-dimetil-3-oxo-2-fenil-2,3-dihidro-1H-pirazol-4-il)-10,11-di-hidro-9H-9,10-[3,4] epipirroloantraceno-12,14(13H,15H)-diona (**12**).