



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBÁ



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTICÊNTRICO EM QUÍMICA  
DE MINAS GERAIS (PPGMQ-MG)

TAINARA APARECIDA NUNES RIBEIRO

**SÍNTESE DE DERIVADOS IMIDAZO-PIRAZOLO-  
PIRIMIDÍNICOS PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE  
ANTIBACTERIANA**

Itajubá-MG



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBÁ



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTICÊNTRICO EM QUÍMICA  
DE MINAS GERAIS (PPGMQ-MG)

Tainara Aparecida Nunes Ribeiro

**SÍNTESE DE DERIVADOS IMIDAZO-PIRAZOLO-  
PIRIMIDÍNICOS PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE  
ANTIBACTERIANA**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação Multicêntrico em Química de Minas Gerais, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química.

**Orientador:** Prof. Dr. Maurício Silva dos Santos

**Co-orientadora:** Profa. Dra. Daniela Sachs

Itajubá-MG

## **Agradecimentos**

À Deus por toda força e bençãos.

Ao meu esposo Wellington pela compreensão, companheirismo, parceria e incentivo. Por estar presente nos momentos de angústia e quando o desanimo era grande, bem como entender as ausências no dia a dia.

Aos meus familiares e amigos por compreenderem minha ausência, darem suporte nos momentos difíceis e sempre torcerem por mim.

Aos colegas do LaSSH, em especial Byanca Ferreira, Cynthia Pereira, Rafaela Corrêa e Lucas Dutra por todo o suporte, pela paciência, por sempre me motivar e estarem dispostos a me ajudar bem como por acreditarem em meu potencial.

Ao meu orientador Maurício Santos por sua disponibilidade, paciência e por me levar a buscar sempre o melhor.

À professora Daniela Sachs, por todo suporte, conversas, por entender minhas dificuldades, medos e inseguranças, bem como todo cuidado e carinho que tem comigo.

Ao Programa de Pós-graduação Multicêntrico em Química de Minas Gerais e à Universidade Federal de Itajubá pela oportunidade de formação.

À todos os funcionários da UNIFEI pelas conversas e empenho em manter o bom funcionamento da Universidade.

Às agências de fomento FAPEMIG, CNPq e ao Instituto de Física e Química (IFQ) pelo financiamento de materiais consumo e de capital.

À FIOCRUZ-RJ, em particular à Rede de Plataformas Analíticas (PMA), pelas análises de RMN e HRMS.

À Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL pelas análises de RMN.

Aos membros da banca avaliadora, Prof. Dr. Fábio Aguiar Alves e ao Prof. Dr. Daniel Henriques Soares Leal pela disponibilidade em avaliar o presente trabalho.

## RESUMO

As doenças bacterianas têm sido um grande problema em nível mundial, uma vez que ocasionam inúmeras mortes todos os anos e elevados custos relacionados à saúde. Além disso, a resistência bacteriana tem aumentado significativamente. Dessa forma, é de grande importância que sejam realizadas pesquisas voltadas ao desenvolvimento de novas classes de antibacterianos. Inúmeros estudos têm demonstrado que compostos heterocíclicos nitrogenados apresentam grande potencial biológico, dentre os quais derivados pirazólicos se destacam como promissores agentes antimicrobianos. Assim teve-se como objetivo sintetizar sete derivados pirazólicos inéditos 7-aril-2,3,6,7-tetra-hidro-5*H*-imidazo[1,2-*c*]pirazolo[4,3-*e*]pirimidin-5-tionas **1(a-g)**. As matérias-primas 5-amino-1-aril-1*H*-pirazol-4-carbonitrilas **3(a-g)** e os intermediários-chave 5-amino-1-aril-4-(4,5-di-hidro-1*H*-imidazol-2-il)-1*H*-pirazóis **2(a-g)** foram obtidos com rendimentos de 47 a 71% e 24 a 88%, respectivamente. Os produtos finais **1(a-g)** foram sintetizados com rendimentos de 31 a 91% e completamente caracterizados por Espectroscopia na região do Infravermelho (FT-IR), Espectrometria de Massas de Alta Resolução (HRMS) e Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN). Os compostos **1(a-g)** estão sendo avaliados quanto à atividade antibacteriana, Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Concentração Mínima Bactericida (CMB), contra as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, não sendo observada a capacidade de inibição bacteriana para bactéria *E. coli*.

## ABSTRACT

Diseases caused by bacteria have been a major problem worldwide since they are responsible for many deaths every year around the world and high health-related costs. In addition, the drug resistance has been raised significantly. Therefore, it is very relevant the research in order to developing new classes of antibacterial. There are many reports in the literature showing that heterocyclic compounds containing nitrogen atom have great biological potential, specially pyrazole moiety, which has showed remarkable antimicrobial activity. Thus, in this work aimed to synthesize new seven pyrazole derivatives 7-aryl-2,3,6,7-tetrahydro-5*H*-imidazo[1,2-*c*]pyrazolo[4,3-*e*]pyrimidine-5-thiones **1(a-g)**. The raw materials 5-amino-1-aryl-1*H*-pyrazole-4-carbonitriles **3(a-g)** and the key intermediates 5-amino-1-aryl-4-(4,5-dihydro-1*H*-imidazole-2-yl)-1*H*-pyrazoles **2(a-g)** were obtained in 47 to 71 % and 24 to 88% yields, respectively. The final products **1(a-g)** were synthesized in 31 to 91% yields and completely characterized by Infrared Spectroscopy (FT-IR), High Resolution Mass Spectrometry (HRMS) and Nuclear Magnetic Resonance (NMR). The compounds **1(a-g)** are being evaluated against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* through Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC). These derivatives **1(a-g)** did not show antibacterial activity against *E. coli*.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estrutura celular simplificada de uma bactéria.....	1
<b>Figura 2.</b> Micrografias de bactérias Gram-positivas (a) e Gram-negativas (b).....	3
<b>Figura 3.</b> Esquema do método colorimétrico de Gram.....	3
<b>Figura 4.</b> Representação da estrutura da parede celular das bactérias Gram-negativas.....	4
<b>Figura 5.</b> Representação da estrutura da parede celular das bactérias Gram-positivas.....	4
<b>Figura 6.</b> Micrografias dos tipos de arranjos das bactérias da classe dos cocos.....	5
<b>Figura 7.</b> Micrografias dos tipos de arranjos das bactérias da classe dos bacilos.....	5
<b>Figura 8.</b> Micrografias dos tipos de arranjos das bactérias espiraladas.....	6
<b>Figura 9.</b> Bactérias frequentemente isoladas de pacientes em hospitais brasileiros.....	6
<b>Figura 10.</b> Estruturas dos fármacos salvarsan e penicilina G.....	7
<b>Figura 11.</b> Uso de antibacterianos em alguns países em 2015.....	8
<b>Figura 12.</b> Representações gerais das estruturas de compostos $\beta$ -lactâmicos.....	9
<b>Figura 13.</b> Antibacterianos mais consumidos no Brasil entre 2013 - 2016.....	9
<b>Figura 14.</b> Estruturas de alguns compostos penicilínicos.....	11
<b>Figura 15.</b> Exemplos de fármacos cefalosporínicos de 1ª a 5ª gerações.....	12
<b>Figura 16.</b> Estruturas dos derivados macrolídeos de importância clínica.....	13
<b>Figura 17.</b> Estruturas de compostos sulfonamídicos e trimetoprim.....	14
<b>Figura 18.</b> Estruturas de algumas tetraciclinas de 1ª, 2ª e 3ª gerações.....	15
<b>Figura 19.</b> Estruturas do ácido nalidíxico, ciprofloxacina e levofloxacina.....	16
<b>Figura 20.</b> Representantes de fármacos quinolônicos de 2ª a 4ª gerações.....	16
<b>Figura 21.</b> Dados sobre a resistência bacteriana nos anos de 2005 e 2015.....	17
<b>Figura 22.</b> Mecanismos de resistência aos antibacterianos.....	17
<b>Figura 23.</b> Representação da quantidade de candidatos a fármacos antibacterianos nos últimos 6 anos e as etapas para a sua aprovação.....	19
<b>Figura 24.</b> Representações estruturais de alguns heterociclos.....	19
<b>Figura 25.</b> Exemplos de fármacos contendo heterociclos.....	21
<b>Figura 26.</b> Representantes da classe dos azóis.....	21
<b>Figura 27.</b> Estrutura do pirazol.....	22
<b>Figura 28.</b> Estruturas de ressonância do pirazol.....	22
<b>Figura 29.</b> Estruturas tautoméricas de pirazóis não substituídos e monossubstituídos.....	23
<b>Figura 30.</b> Exemplos de compostos pirazólicos naturais com propriedades biológicas.....	27
<b>Figura 31.</b> Estruturas de alguns fármacos contendo o núcleo pirazólico.....	28
<b>Figura 32.</b> Rota de obtenção dos derivados <b>1(a-g)</b> .....	29
<b>Figura 33.</b> Sequência de preparação da solução 0,5 na escala McFarland.....	35
<b>Figura 34.</b> Sequência de preparação da placa de CMI.....	36
<b>Figura 35.</b> Sequência do procedimento de diluição e adição de bactéria.....	37

<b>Figura 36.</b> Representações estruturais das matérias-primas <b>3(a-g)</b> .....	38
<b>Figura 37.</b> Espectro de absorção no infravermelho do derivado <b>3a</b> .....	41
<b>Figura 38.</b> Representações estruturais dos derivados <b>2(a-g)</b> .....	42
<b>Figura 39.</b> Espectro de absorção no infravermelho do intermediário <b>2a</b> .....	45
<b>Figura 40.</b> Representações estruturais dos produtos finais <b>1(a-g)</b> .....	46
<b>Figura 41.</b> Espectro de absorção no infravermelho do derivado <b>1a</b> .....	48
<b>Figura 42.</b> Tautomerismo presente nos compostos <b>1(a-g)</b> .....	48
<b>Figura 43.</b> Espectro de massas do composto <b>1a</b> .....	50
<b>Figura 44.</b> Estrutura geral dos derivados <b>1(a-g)</b> com os átomos de hidrogênios numerados. ....	51
<b>Figura 45.</b> Estrutura geral dos derivados <b>1(a-g)</b> com os átomos de carbono numerados. ....	53
<b>Figura 46.</b> Resultados dos ensaios biológicos de CMI para a bactéria <i>E. coli</i> . ....	55
<b>Figura 47.</b> Resultado do ensaio biológico de CMB para a bactéria <i>E. coli</i> . ....	56

## LISTA DE ESQUEMAS

<b>Esquema 1.</b> Método de Knorr para a obtenção de pirazóis.....	24
<b>Esquema 2.</b> Reação de obtenção dos derivados 3,5-dissubstituídos-4-formil- <i>N</i> -arilpirazol.....	24
<b>Esquema 3.</b> Reação de obtenção de derivados 5-amino-1 <i>H</i> -pirazol-4-carbonitrila .....	25
<b>Esquema 4.</b> Reação de obtenção de pirazóis pelo método de Pechmann .....	25
<b>Esquema 5.</b> Síntese de compostos pirazólicos 3,5-dissubstituídos.....	25
<b>Esquema 6.</b> Reação de obtenção do derivado 4-formilpirazol substituído .....	26
<b>Esquema 7.</b> Síntese das matérias-primas 5-amino-1-aril-1 <i>H</i> -pirazol-4-carbonitrilas <b>3(a-g)</b> .....	31
<b>Esquema 8.</b> Síntese dos intermediários-chave 5-amino-1-aril-4-(4,5-di-hidro-1 <i>H</i> -imidazol-2-il)-1 <i>H</i> -pirazóis <b>2(a-g)</b> .....	32
<b>Esquema 9.</b> Síntese dos derivados finais 7-aril-2,3,6,7-tetra-hidro-5 <i>H</i> -imidazo[1,2- <i>c</i> ]pirazolo[4,3- <i>e</i> ]pirimidin-5- tíonas <b>1(a-g)</b> .....	33
<b>Esquema 10.</b> Mecanismo de obtenção das matérias-primas <b>3(a-g)</b> .....	39
<b>Esquema 11.</b> Mecanismo de formação do sulfeto de hidrogênio .....	43
<b>Esquema 12.</b> Mecanismo de obtenção dos intermediários-chave <b>2(a-g)</b> .....	44
<b>Esquema 13.</b> Mecanismo proposto para obtenção dos derivados <b>1(a-g)</b> .....	47

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Tempo de reação para a síntese dos derivados <b>1(a-g)</b> .....	34
<b>Tabela 2.</b> Rendimentos e faixas de fusão dos compostos <b>3(a-g)</b> .....	40
<b>Tabela 3.</b> Principais absorções na região do Infravermelho para os derivados <b>3(a-g)</b> .....	41
<b>Tabela 4.</b> Rendimentos e faixas de fusão dos compostos <b>2(a-g)</b> .....	42
<b>Tabela 5.</b> Principais absorções na região do Infravermelho para os derivados <b>2(a-g)</b> .....	45
<b>Tabela 6.</b> Rendimentos e faixas de fusão dos derivados finais <b>1(a-g)</b> .....	47
<b>Tabela 7.</b> Principais absorções na região do Infravermelho para os derivados finais <b>1(a-g)</b> .....	49
<b>Tabela 8.</b> Dados da espectrometria de massas para os derivados <b>1(a-g)</b> .....	49
<b>Tabela 9.</b> Dados de RMN- <sup>1</sup> H (300 MHz ou 400 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , δ em ppm, <i>J</i> em Hz) obtidos para os derivados <b>1(a-g)</b> .....	52
<b>Tabela 10.</b> Dados de RMN- <sup>13</sup> C (75 MHz ou 100 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , δ em ppm, <i>J</i> em Hz) obtidos para os derivados <b>1(a-g)</b> .....	54

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

BHI	Infusão cérebro coração, do inglês <i>Brain Heart Infusion</i>
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CMB	Concentração Mínima Bacteriostática
CMI	Concentração Mínima Inibitória
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub>	Dimetilsulfóxido hexadeuterado
DNA	Ácido desoxirribonucleico, do inglês <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
E.	<i>Escherichia</i>
FDA	Agência regulatória de alimentos e medicamentos, do inglês <i>Food and Drug Administration</i>
FT-IR	Infravermelho com Transformada de Fourier, do inglês <i>Fourier Transform Infrared</i>
HDL	Lipoproteína de Alta Densidade, do inglês <i>High Density Lipoprotein</i>
HRMS	Espectrometria de Massas de Alta Resolução, do inglês <i>High Resolution Mass Spectrometry</i>
<i>J</i>	Constante de acoplamento
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina, do inglês <i>meticillin resistance Staphylococcus aureus</i>
<i>m/z</i>	Relação massa/carga
OMS	Organização Mundial da Saúde
OTf	Triflato
<i>P.</i>	<i>Pseudomonas</i>
Pt	Pseudotripleto
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
<sup>1</sup> H-RMN	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

$^{13}\text{C}$ -RMN	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
RNA	Ácido ribonucleico, do inglês <i>ribonucleic acid</i>
S.	<i>Staphylococcus</i>
sp.	Espécie
TMS	Tetrametilsilano
TSA	Agar triptona de soja, do inglês <i>Tryptic Soy Agar</i>
$\nu$	Estiramento
$\nu_{as}$	Estiramento assimétrico
$\nu_s$	Estiramento simétrico
$\delta$	Deslocamento químico

## SUMÁRIO

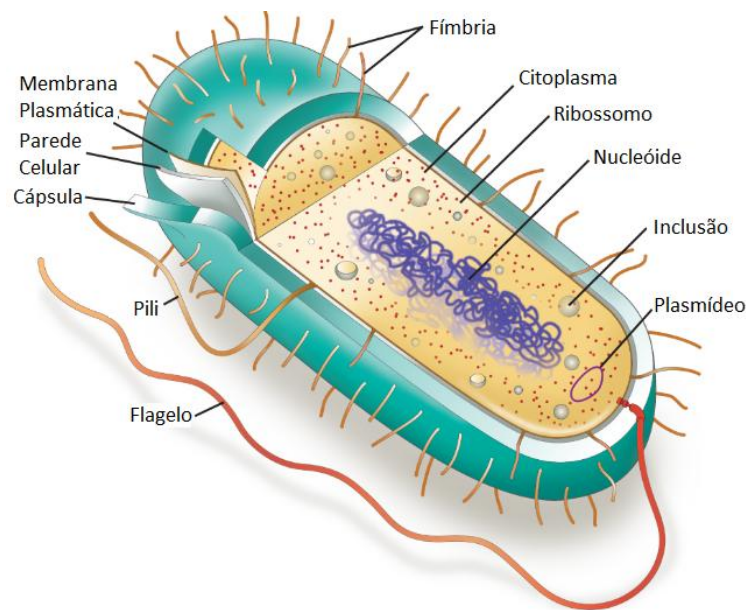
1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	DOENÇAS BACTERIANAS.....	1
1.2	HETEROCICLOS .....	19
1.2.1	PIRAZÓIS.....	22
2.	OBJETIVOS.....	29
2.1	OBJETIVOS GERAIS .....	29
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
3.	JUSTIFICATIVAS.....	30
4.	METODOLOGIAS .....	31
4.1	METODOLOGIAS DE SÍNTESE.....	31
4.2	CARACTERIZAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS .....	34
4.3	ENSAIOS BIOLÓGICOS.....	35
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	38
6.	CONCLUSÕES.....	57
7.	REFERÊNCIAS.....	58
8.	ANEXOS .....	63

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 DOENÇAS BACTERIANAS

As doenças de origem bacteriana têm sido uma grande preocupação durante toda a história da humanidade. Apesar dos avanços que ocorreram no século XX, quando inúmeros antibacterianos foram desenvolvidos, nos últimos anos se observa uma diminuição de pesquisas na área, ao mesmo tempo que um aumento significativo de casos de resistência bacteriana tem sido reportado (CUNHA; FONSECA; CALADO, 2019).

As bactérias são organismos unicelulares pertencentes ao Domínio Bactéria. Apresentam inúmeras estruturas celulares que variam conforme as espécies e condições ambientais. Suas células são procarióticas, uma vez que o material genético não está envolto por uma membrana e, em geral, não são observadas organelas como cloroplasto, mitocôndria e núcleo. Possuem uma membrana plasmática que envolve o citoplasma onde são encontrados os ribossomos, inclusões, plasmídeos e o nucleóide (ARWYN-JONES; DE, 2019; MADIGAN *et al.*, 2016; TORTORA; FUNKE; CASE, 2017). A Figura 1 apresenta uma representação simplificada da composição celular das bactérias.



**Figura 1.** Estrutura celular simplificada de uma bactéria.

Adaptado de PARKER *et al* (2016).

### 1.1.1 Classificação das bactérias

As bactérias podem ser classificadas quanto à demanda de oxigênio, modo de obtenção de energia, composição da parede celular e morfologia (ARWYN-JONES; DE, 2019; MADIGAN *et al.*, 2016; TORTORA; FUNKE; CASE, 2017).

#### 1.1.1.1 Demanda de oxigênio

Quanto à demanda de oxigênio pode-se classificar as bactérias em (ARWYN-JONES; DE, 2019; TRABULSI; ALTERTHUM, 2015):

- Aeróbicas: utilizam oxigênio livre ( $O_2$ ) na respiração celular e não sobrevivem sem ele.
- Anaeróbicas estritas: não suportam a presença de oxigênio livre, ou seja, morrem nessa condição.
- Anaeróbicas não-estritas: não utilizam o gás oxigênio, entretanto, o mesmo não é tóxico para as suas células.
- Facultativas: crescem em ambientes com a presença ou ausência de oxigênio livre.

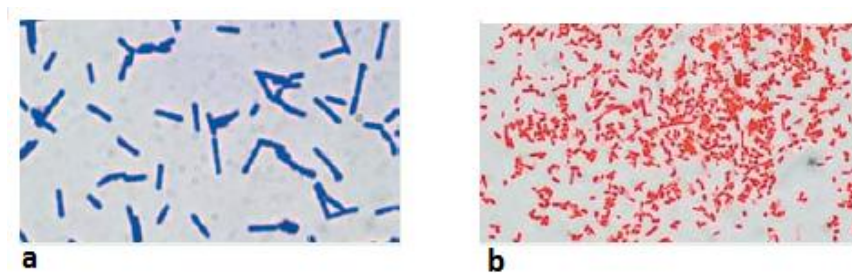
#### 1.1.1.2 Obtenção de energia

No que se refere a obtenção de energia as bactérias são subdivididas em (ARWYN-JONES; DE, 2019; TORTORA; FUNKE; CASE, 2017):

- Autotróficas: empregam o gás carbônico ( $CO_2$ ) ou íon bicarbonato ( $HCO_3^-$ ) para sintetizar todos os compostos orgânicos necessários para seu metabolismo e nutrição.
- Heterotróficas: necessitam de fontes orgânicas de carbono para produção de energia.
- Fototróficas: empregam pigmentos para conversão de energia luminosa em energia química.
- Quimiotróficas: usam reações de oxidação-redução de compostos orgânicos ou inorgânicos para a obtenção de energia.

### 1.1.1.3 Parede celular

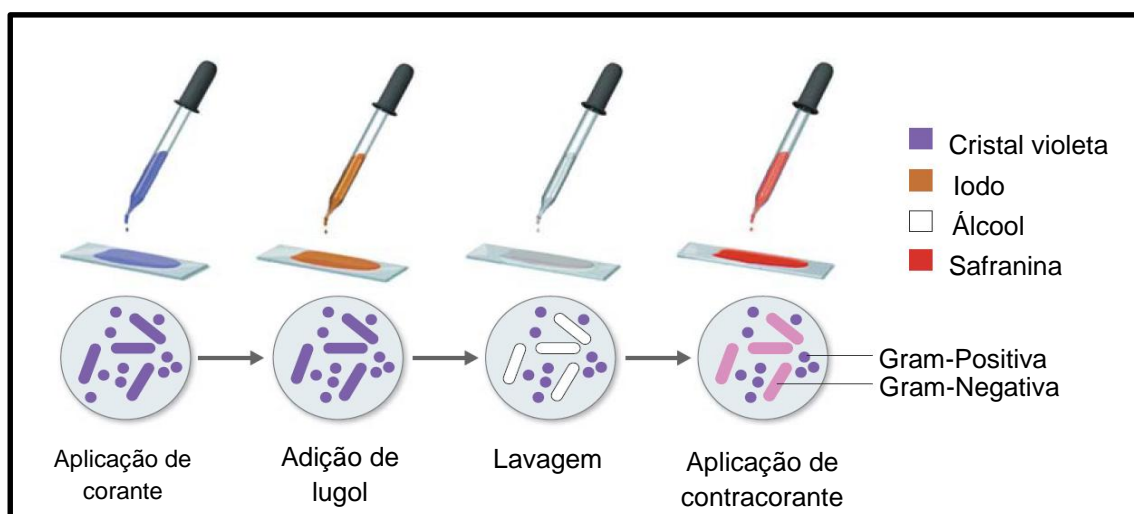
A parede celular bacteriana apresenta diferentes composições entre as variadas espécies, sendo que uma das formas de diferenciação foi desenvolvida em 1884, por Hans Christian Gram, possibilitando a classificação das bactérias em Gram-positivas e Gram-negativas a partir de um método colorimétrico (Figura 2) (ARWYN-JONES; DE, 2019; BOOTH; LEWIS, 2019; FISHER; MOBASHERY, 2020; SILHAVY; KAHNE; WALKER, 2010).



**Figura 2.** Micrografias de bactérias Gram-positivas (a) e Gram-negativas (b).

Adaptado de TORTORA; FUNKE; CASE (2017).

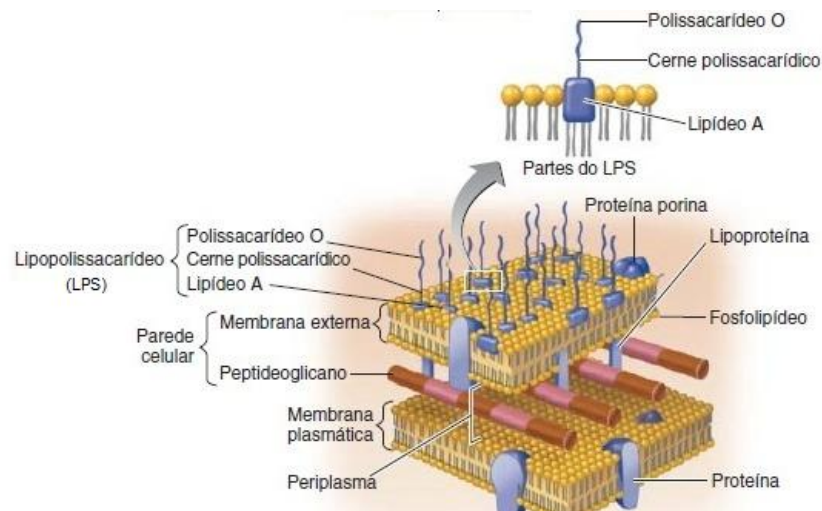
A técnica (Figura 3) consiste basicamente no tratamento sucessivo de um esfregaço bacteriano, inicialmente com o cristal violeta, corante utilizado para possibilitar a coloração de todas as células, seguido de solução de lugol, um fixador. Após, utiliza-se o etanol para descoloração das células e a safranina, outro corante, com o objetivo de visualização das células (TORTORA; FUNKE; CASE, 2017; TRABULSI; ALTERTHUM, 2015).



**Figura 3.** Esquema do método colorimétrico de Gram.

Adaptado de TORTORA; FUNKE; CASE (2017).

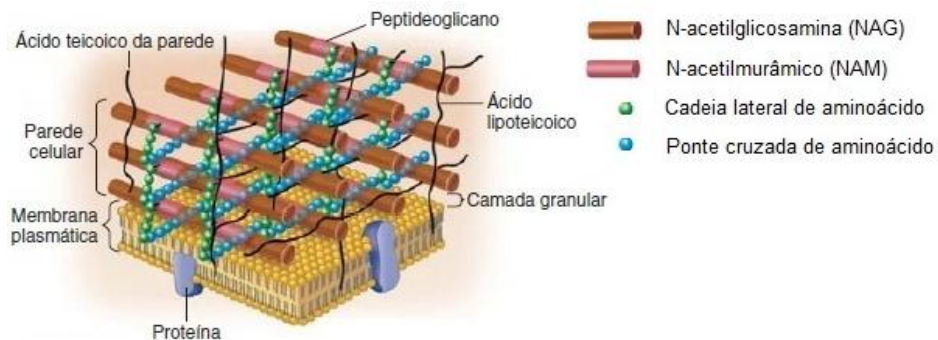
As bactérias Gram-negativas são compostas majoritariamente por lipoproteínas, fosfolípidos, lipopolissacarídeos e uma fina camada de peptideoglicano (Figura 4) na estrutura da parede celular. Adquirem a cor rósea/avermelhada, quando submetidas ao método de Gram, pois não retêm o corante. *Escherichia sp.*, *Salmonella* e *Pseudomonas sp.* são exemplos dessa classe (ARWYN-JONES; DE, 2019; BOOTH; LEWIS, 2019; FISHER; MOBASHERY, 2020; LIMA *et al.*, 2020; SILHAVY; KAHNE; WALKER, 2010).



**Figura 4.** Representação da estrutura da parede celular das bactérias Gram-negativas.

Adaptado de TORTORA; FUNKE; CASE (2017).

Já as bactérias Gram-positivas apresentam a parede celular constituída por ácido teicoico, ácido lipoteicoico e 70-75% de peptideoglicano (Figura 5), que torna a estrutura rígida e espessa ocasionando a retenção do corante. Dessa forma as Gram-positivas exibem a coloração violeta/púrpura, comportamento observado, por exemplo, nas bactérias *Staphylococcus sp.* e *Streptococcus sp.* (ARWYN-JONES; DE, 2019; BOOTH; LEWIS, 2019; FISHER; MOBASHERY, 2020; LIMA *et al.*, 2020; SILHAVY; KAHNE; WALKER, 2010; TRABULSI; ALTERTHUM, 2015).



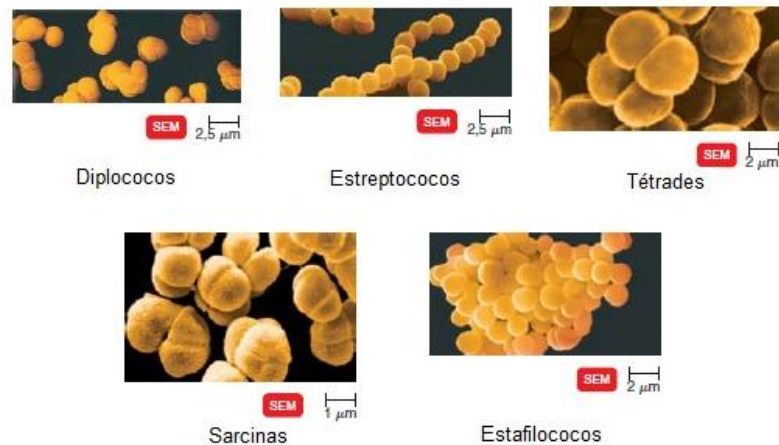
**Figura 5.** Representação da estrutura da parede celular das bactérias Gram-positivas.

Adaptado de TORTORA; FUNKE; CASE (2017).

### 1.1.1.4 Morfologia

As células bacterianas apresentam variadas formas e dividem-se em três grandes grupos (ARWYN-JONES; DE, 2019; BOOTH; LEWIS, 2019; TEESELING; PEDRO; CAVA, 2017):

- **Cocos:** possuem estrutura esférica, mas podem ser achatados, alongados ou ovais. Após a divisão celular, as células dos cocos podem permanecer unidas umas às outras (Figura 6), surgindo cocos em forma de cadeia, os estreptococos, agrupados em pares, chamados de diplococos, em forma de cachos, conhecidos como estafilococos, e arranjos menos comuns tais como as tétrades e sarcinas.



**Figura 6.** Micrografias dos tipos de arranjos das bactérias da classe dos cocos.

Adaptado de TORTORA; FUNKE; CASE (2017).

- **Bacilos:** são observados em formato de bastão e dividem-se somente ao longo do seu curto eixo, apresentando um menor número de arranjos celulares (Figura 7). Podem ser subdivididos em: bacilos únicos, que representam a grande maioria da classe e são bastonetes simples, os diplobacilos que aparecem aos pares, os estreptobacilos observados em cadeias, e os cocobacilos com forma oval e semelhante aos cocos.



**Figura 7.** Micrografias dos tipos de arranjos das bactérias da classe dos bacilos.

Adaptado de TORTORA; FUNKE; CASE (2017).

- **Espiraladas:** podem exibir uma ou mais curvaturas (Figura 8). As bactérias que são semelhantes a bastões curvos são chamados de vibriões. Outras são conhecidas como espiroquetas e têm forma helicoidal e flexível. Já o grupo dos espirilos apresenta o corpo bem rígido e são helicoidais, com forma semelhante a um “saca-rolha”.



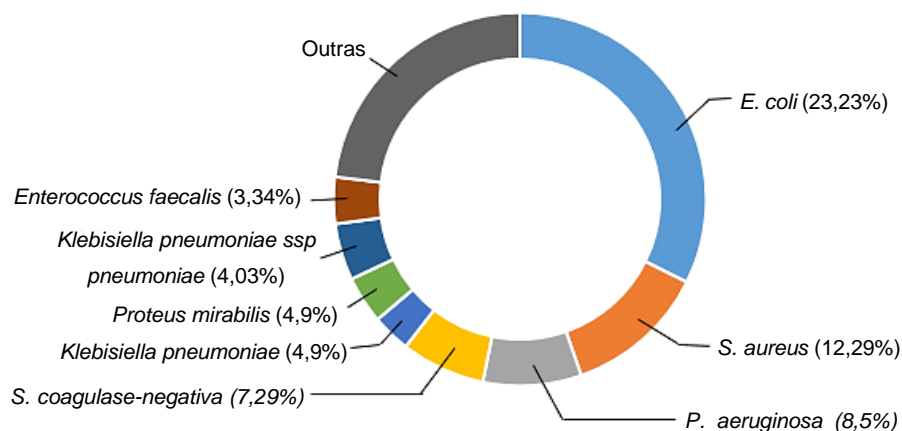
**Figura 8.** Micrografias dos tipos de arranjos das bactérias espiraladas.

Adaptado de TORTORA; FUNKE; CASE (2017).

### 1.1.2 Infecções bacterianas

As bactérias patogênicas são responsáveis por diversas doenças e estão incluídas entre as 10 principais causas de mortalidade e morbidade no mundo, onde as infecções do trato respiratório baixo ocasionam a morte de cerca de 2,4 milhões de pessoas todos os anos (MURDOCH; HOWIE, 2018; WANG *et al.*, 2016).

No Brasil, um estudo feito por Pillonetto e colaboradores (2021), aponta que as bactérias *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) e *Escherichia coli* (*E. coli*) destacam-se por estarem presentes na maioria das cepas isoladas de pacientes nos hospitais estudados e ocasionam uma gama de doenças (Figura 9) (GIACOMINI *et al.*, 2021; PILLONETTO *et al.*, 2021).



**Figura 9.** Bactérias frequentemente isoladas de pacientes em hospitais brasileiros.

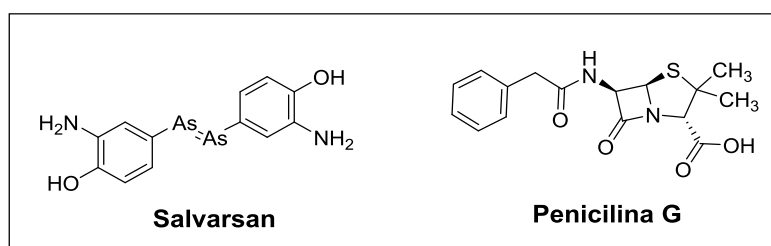
Adaptado de PILLONETTO *et al.*, 2021.

A bactéria *S. aureus* é um estafilococo Gram-positivo e é observada em infecções de peles e tecidos moles, bacteremia, gastrite, pneumonia e meningite (LI, 2018). Lee e colaboradores (2020) em um trabalho recente publicaram que a incidência dessa bactéria em infecções de pele corresponde a mais de 100 casos por 100 mil pessoas, gerando um gasto de US \$ 4 bilhões nos Estados Unidos.

A *E. coli* é um bacilo Gram-negativo que normalmente coloniza o trato intestinal. É responsável por gastroenterites e doenças do trato urinário, sendo um patógeno formador de biofilme, o que dificulta seu tratamento (SHARMA *et al.*, 2016). Estima-se que ocasione mais de 2 milhões de mortes por ano e que acarrete 400 mil mortes anuais, especialmente em crianças com idade inferior a cinco anos que residem em locais com baixas condições socioeconômicas e de saneamento. Além disso, cerca de 900 mil casos, 90% devido à cateteres urinários, são associados a infecções urinárias ocasionadas principalmente pela *E. coli* (JANG *et al.*, 2017; TORTORA; FUNKE; CASE, 2017; TRABULSI; ALTERTHUM, 2015).

### 1.1.3 Quimioterapia

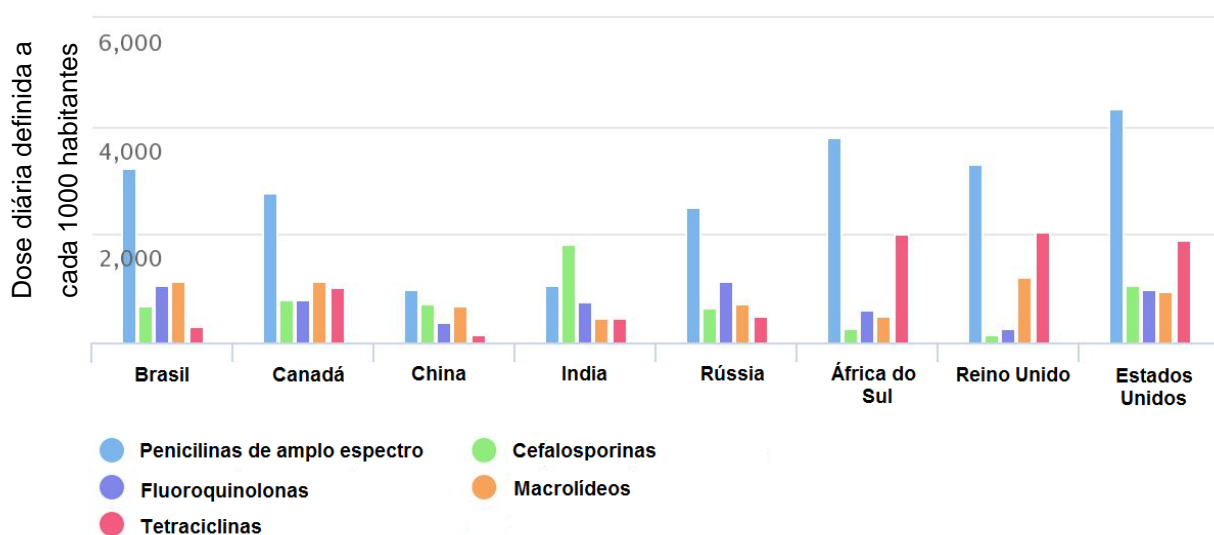
A introdução de compostos químicos no combate a infecções bacterianas é creditada a Paul Ehrlich, considerado o pai da quimioterapia, responsável pelo desenvolvimento do primeiro composto sintético com propriedades antimicrobianas: o salvarsan (Figura 10). Em 1909, Erlich iniciou uma pesquisa com diversos derivados, sendo o composto 606 (salvarsan) o que apresentou melhor atividade antimicrobiana. Assim, o salvarsan começou a ser utilizado contra sífilis e o seu uso foi descontinuado em 1945. Outro marco ocorreu em 1928, quando Alexander Fleming descobriu um novo agente antibacteriano, a penicilina G (Figura 10), isolado posteriormente por Flory e Chain do fungo *Penicillium chrysogenum* (AMINOV, 2017; GAYNES, 2017; PATRICK, 2013; TORTORA; FUNKE; CASE, 2017).



**Figura 10.** Estruturas dos fármacos salvarsan e penicilina G.

Ao longo dos anos novas classes de compostos foram desenvolvidas, como por exemplo,  $\beta$ -lactâmicos, sulfonamidas, aminoglicosídeos, tetraciclina, polipeptídeos, macrolídeos, glicopeptídeos, rifamicinas, polimicinas, quinolonas oxazolidinonas e lincosaminas. Vale ressaltar que atualmente tem-se empregado terapias combinadas envolvendo diversos fármacos pertencentes às classes supracitadas.

Dentre as várias classes de antibacterianos disponíveis no mercado, destacam-se as penicilinas, as cefalosporinas, os macrolídeos, as tetraciclina e as quinolonas, devido à ampla utilização no mundo, conforme pode-se observar na Figura 11, a qual apresenta as categorias de fármacos antibacterianos mais utilizadas em alguns países no ano de 2015 (BEGUM *et al.*, 2021).



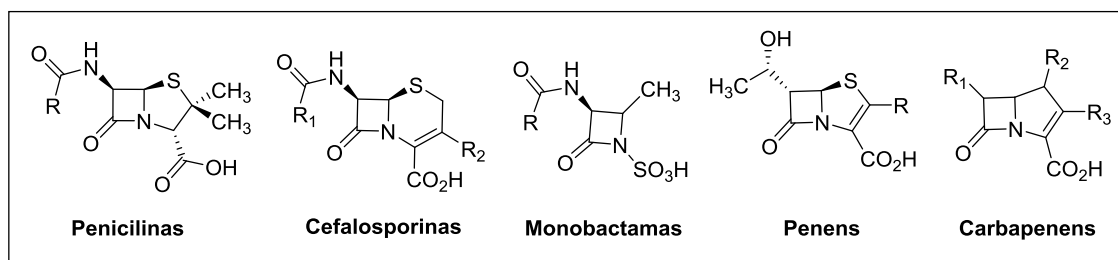
Center for Disease Dynamics, Economics & Policy (cddep.org)

**Figura 11.** Uso de antibacterianos em alguns países em 2015.

Adaptado de CDDEP (*Center for Disease Dynamics, Economics & Policy*).

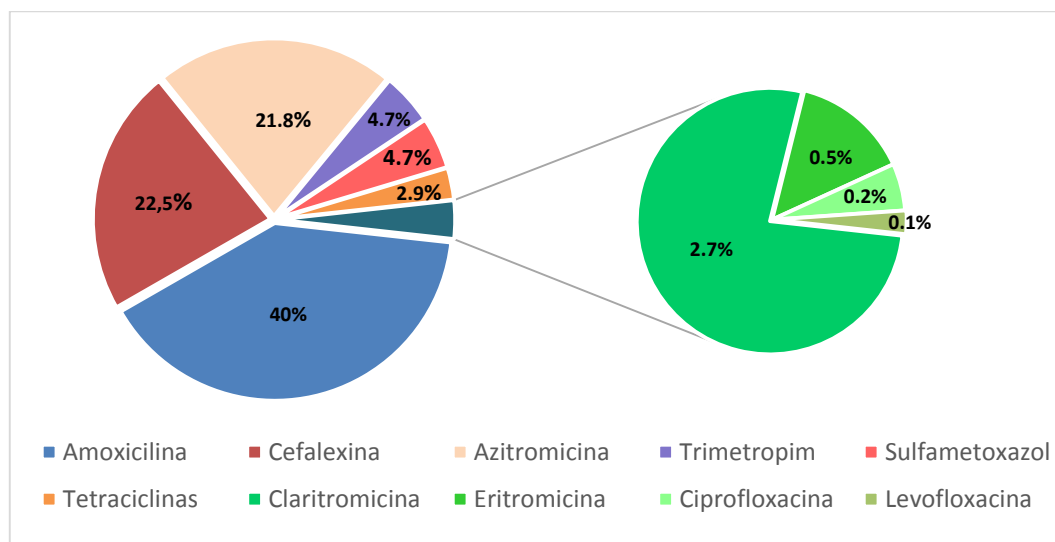
### 1.1.3.1 $\beta$ -lactâmicos

Os antibacterianos  $\beta$ -lactâmicos são um grupo de compostos bactericidas que possuem como estrutura básica o anel  $\beta$ -lactâmico, uma lactama de 4 membros, podendo ser obtidos de forma natural ou sintética. Podem ser subdivididos em: penicilinas, cefalosporinas, monobactamas, penens e carbapenens (Figura 12) (BEGUM *et al.*, 2021; FAIR; TOR, 2014; ZANGO *et al.*, 2019).



**Figura 12.** Representações gerais das estruturas de compostos  $\beta$ -lactâmicos.

Os principais representantes  $\beta$ -lactâmicos são as penicilinas e as cefalosporinas, possuindo grande importância médica, devido à eficácia, excelente perfil de segurança e amplo espectro de atividade atuando contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas bem como anaeróbicas e aeróbias, sendo a classe de antibacterianos mais prescrita no mundo (BEGUM *et al.*, 2021; FAIR; TOR, 2014; GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010). No Brasil, dois fármacos  $\beta$ -lactâmicos, amoxicilina e cefalexina, correspondem a 62,5% dos antibacterianos mais consumidos entre os anos de 2013 e 2016 (Figura 13) (CASTRO *et al.*, 2020).



**Figura 13.** Antibacterianos mais consumidos no Brasil entre 2013 - 2016.

Adaptado de CASTRO *et al.* (2020).

#### a- Penicilinas:

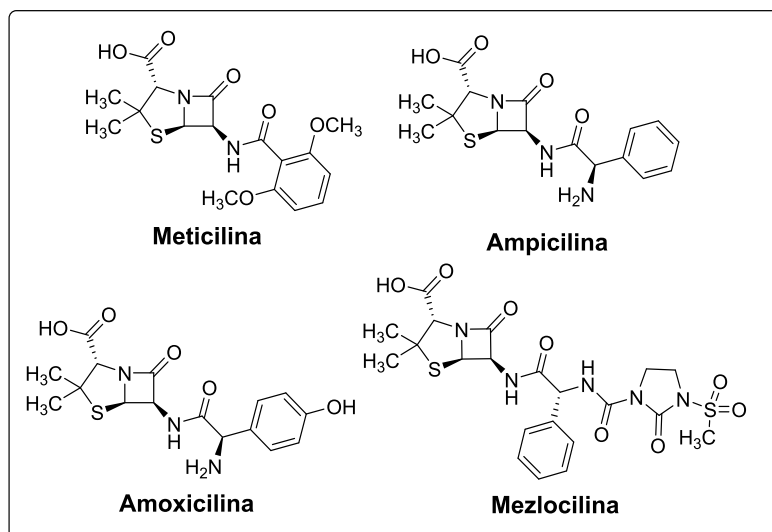
As penicilinas são compostos que apresentam um anel  $\beta$ -lactâmico fundido a um anel tiazolidínico. Apesar do primeiro composto da classe, a benzilpenicilina - penicilina G (Figura 10), ter sido descoberto em 1928, a produção e a distribuição de compostos penicilínicos teve início apenas anos mais tarde. Com a identificação do

ácido 6-aminopenicilânico por cientistas do laboratório de pesquisa Beechan e com a elucidação da estrutura da penicilina em 1945, por Dorathy Hodgkin foi possível o desenvolvimento das penicilinas semissintéticas (AMINOV, 2017; BEGUM *et al.*, 2021; FAIR; TOR, 2014; GAYNES, 2017; PARKER *et al.*, 2016).

As primeiras modificações levaram a inclusão de grupos volumosos na posição orto do anel benzênico da molécula da penicilina, acarretando um impedimento estérico e possibilitando a proteção do anel  $\beta$ -lactâmico contra a destruição enzimática realizada pelas  $\beta$ -lactamases. Um exemplo desses compostos é a meticilina, a qual possuía estabilidade frente à desativação hidrolítica das  $\beta$ -lactamases devido à presença de dois grupos metóxi na posição orto do anel benzênico (Figura 14) (LIMA *et al.*, 2020; PARKER *et al.*, 2016).

Com o objetivo de ampliar o espectro de ação bem como melhorar as propriedades farmacodinâmicas dos compostos penicilínicos adicionou-se um grupo amino ( $-NH_2$ ) à estrutura da penicilina G, o que possibilitou a maior difusão do composto através das porinas na maioria das membranas externas das Gram-negativas, ocasionando maior ação nesses organismos. Dessa forma, desenvolveu-se a subclasse denominada aminopenicilinas, tendo como representantes fármacos amplamente empregados atualmente, como a ampicilina e a amoxicilina (Figura 14). No caso da amoxicilina a inserção de uma hidroxila ao anel benzênico melhorou a absorção e a estabilidade frente a ácidos (LIMA *et al.*, 2020; LOBANOVSKA; PILLA, 2017; PARKER *et al.*, 2016).

Por fim, as ureidopenicilinas são uma subclasse mais recente de penicilinas, as quais foram obtidas a partir da inserção de um grupo ureido, como por exemplo, na mezlocilina (Figura 14) (LIMA *et al.*, 2020; LOBANOVSKA; PILLA, 2017; TORTORA; FUNKE; CASE, 2017; ZAFFIRI, GARDNER, TOLEDO-PEREYRA, 2012).



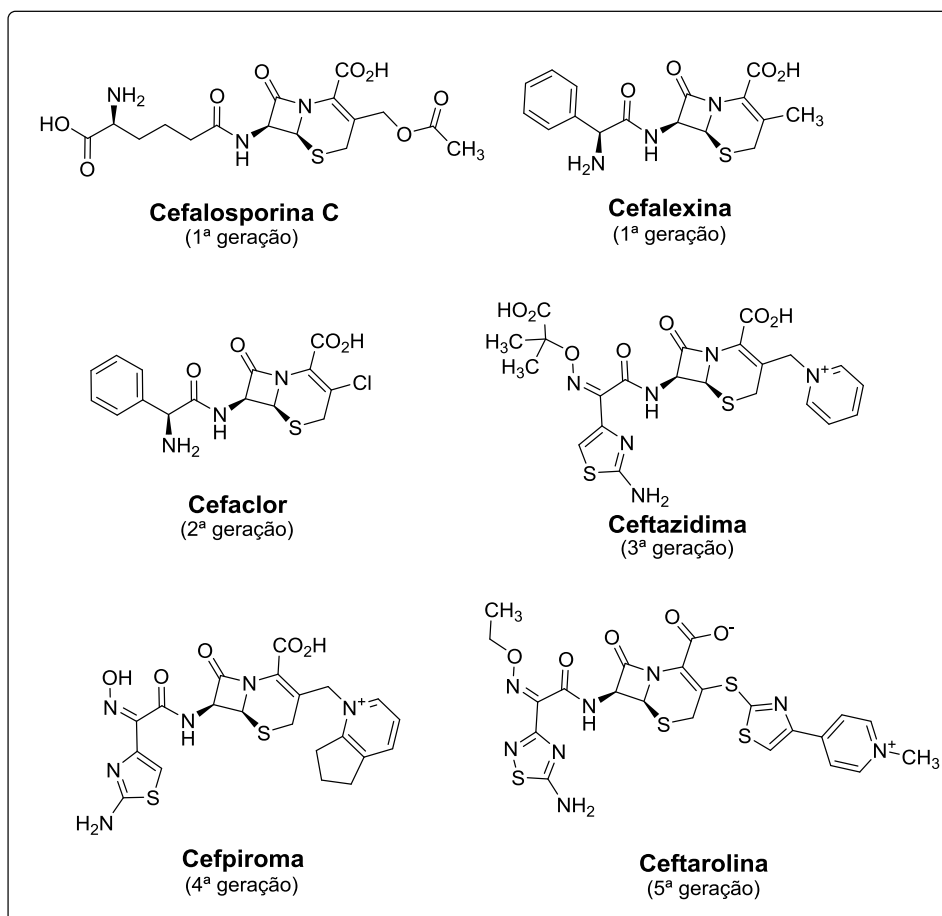
**Figura 14.** Estruturas de alguns compostos penicilínicos.

*b- Cefalosporinas:*

Esta classe de antibacterianos apresenta estrutura e modo de ação semelhante às penicilinas, exibindo o ácido 7-aminocefalosporânico como estrutura básica. O primeiro composto dessa classe, a cefalosporina C (Figura 15), foi isolado do fungo *Cephalosporium acremonium*, em 1948 por Guiseppe Brotzu (BEGUM *et al.*, 2021; PATRICK, 2013; LIMA *et al.*, 2020; ZANGO *et al.*, 2019).

Os derivados cefalosporínicos podem ser subdivididos em 5 gerações, de acordo com a contribuição para o espectro de ação, sendo alguns desses compostos representados na Figura 15. A primeira geração atuava contra Gram-positivas e um limitado número de Gram-negativas, possuindo menor atividade do que as penicilinas, como a cefalexina (Figura 15) (CHAUDHRY; MICHAEL; WAGNER, 2019; LIMA *et al.*, 2020; ZANGO *et al.*, 2019).

As gerações posteriores sofreram modificações estruturais visando a ampliação e a potência do espectro de atividade contra patógenos Gram-negativos, a partir do aumento da penetração celular bem como a resistência as lactamases. Exemplos desses compostos são o cefaclor (2ª geração), ceftazidima (3ª geração) e cefpiroma (4ª geração) (Figura 15). Por fim, na quinta geração tem-se compostos cefalosporínicos com maior espectro de ação e atividade contra cepas resistentes, como por exemplo, a ceftarolina (Figura 15) (CHAUDHRY; MICHAEL; WAGNER, 2019; FAIR; TOR, 2014; LIMA *et al.*, 2020; PARKER *et al.*, 2016; ZANGO *et al.*, 2019).



**Figura 15.** Exemplos de fármacos cefalosporínicos de 1ª a 5ª gerações.

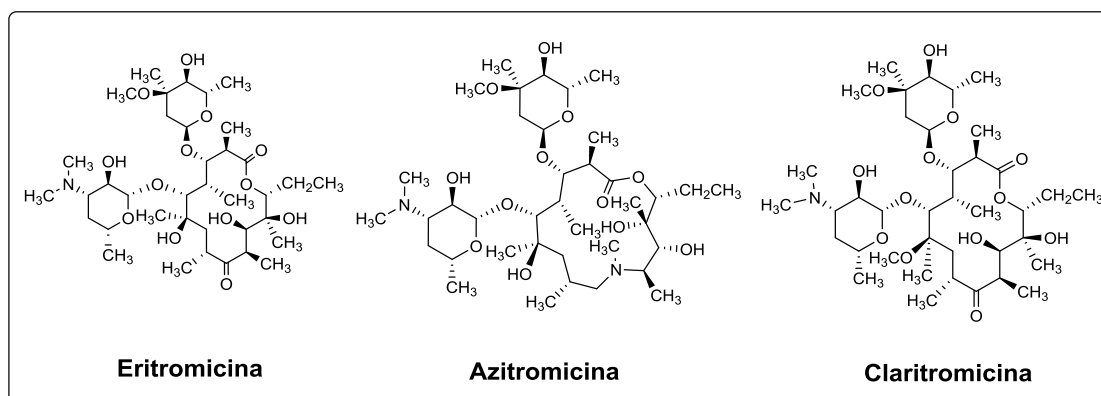
### 1.1.3.2 Macrolídeos

O primeiro composto da classe – eritromicina (Figura 16), foi isolado do fungo *Streptomyces erytheas* em 1952, por James M. McGuire (BEGUM *et al.*, 2021). Possui como estrutura básica lactonas macrocíclicas de 14, 15 ou 16 membros ligados à unidades glicosídicas (AMINOV, 2017; VÁZQUEZ-LASLOP; MANKIN, 2018).

Os fármacos macrolídeos são bacteriostáticos e possuem amplo espectro, porém exibem uma reduzida eficiência contra bactérias Gram-negativas (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010). Atuam inibindo a síntese proteica, ligando-se ao RNA ribossomal 23S da subunidade 50S, intervindo na elongação da cadeia peptídica e bloqueando a síntese de proteínas bacterianas (SINGH; YOUNG; SILVER, 2017; VÁZQUEZ-LASLOP; MANKIN, 2018).

Os derivados macrolídeos apresentam grande importância clínica contra infecções respiratórias e de pele, sendo a azitromicina e a claritromicina (Figura 16), frequentemente empregadas, visto que possuem maior espectro antimicrobiano

(BEGUM *et al.*, 2021; GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010; SINGH; YOUNG; SILVER, 2017; TORTORA; FUNKE; CASE, 2017).



**Figura 16.** Estruturas dos derivados macrolídeos de importância clínica.

### 1.1.3.3 Sulfonamidas

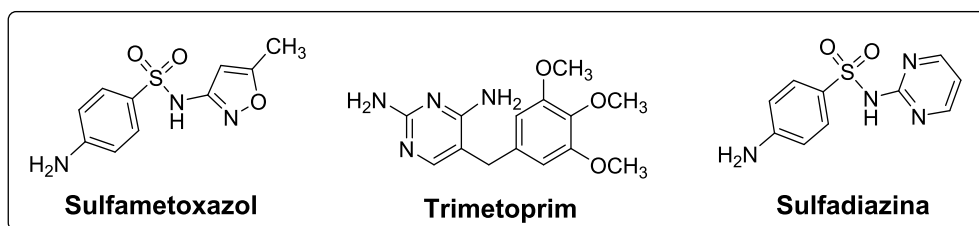
As sulfonamidas foram introduzidas em 1935, por Gerhard Domagk, sendo o prontossil o precursor dos antibacterianos desta classe, a qual é composta por um grupo sulfonamida ligado a um anel benzênico ou um heterociclo (APAYDIN; TÖRÖK, 2019; HASSANEIN, 2019; TAČIĆ *et al.*, 2017).

Os derivados sulfonamídicos são uma das primeiras classes de antimicrobianos sintéticos a serem comercializados em ampla escala. Apresentam-se como fármacos bacteriostáticos de amplo espectro, sendo efetivos contra bactérias Gram-positivas e certas bactérias Gram-negativas, tais como: *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Shigella* e *Enterobacter* (TAČIĆ *et al.*, 2017; ZAFFIRI; GARDNER; TOLEDO-PEREYRA, 2012).

O mecanismo de ação da classe é baseado na inibição da síntese da enzima di-hidropteroato sintetase, pois atuam como análogo do ácido *p*-aminobenzoico (PABA), ocasionando o bloqueio de uma etapa do metabolismo do ácido fólico (APAYDIN; TÖRÖK, 2019; HASSANEIN, 2019; TAČIĆ *et al.*, 2017; ZAFFIRI; GARDNER; TOLEDO-PEREYRA, 2012).

Apesar da diminuição do uso de fármacos sulfonamídicos nas últimas décadas, o sulfametoxazol (Figura 17), em conjunto com o trimetoprim, tem sido amplamente utilizado no tratamento de infecções do trato urinário, visto que, amplia o espectro de ação e leva a diminuição significativa de possíveis linhagens resistentes. Outra substância sulfa ainda empregada no controle de infecções por queimaduras é a

sulfadiazina de prata (Figura 17) (HASSANEIN, 2019; TAČIĆ *et al.*, 2017; TORTORA; FUNKE; CASE, 2017).



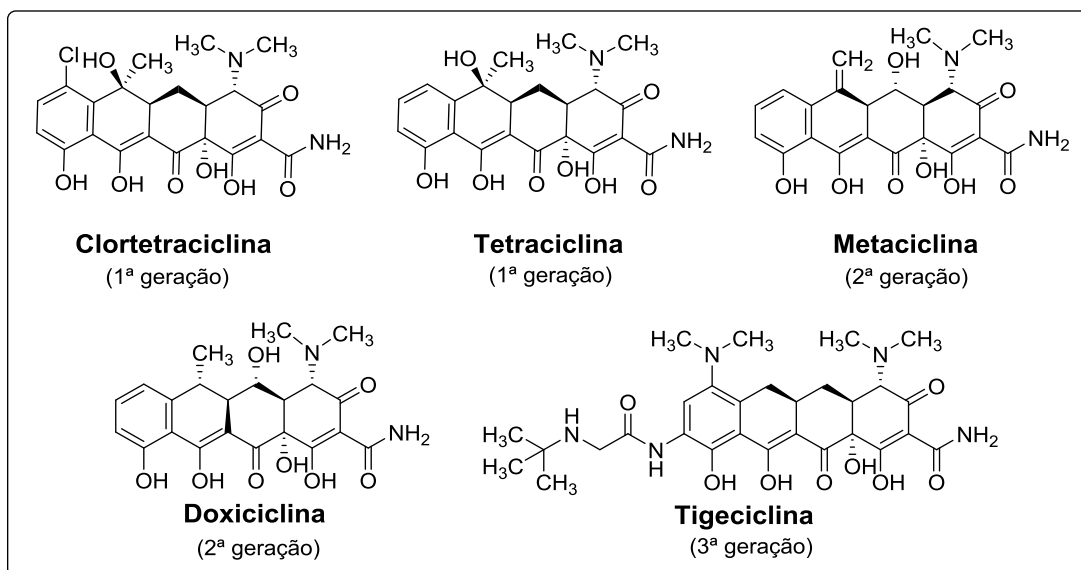
**Figura 17.** Estruturas de compostos sulfonamídicos e trimetoprim.

#### 1.1.3.4 Tetraciclinas

As tetraciclinas são fármacos bacteriostáticos de amplo espectro que atuam na célula bacteriana interferindo na ligação do RNA transportador, pois se fixam a subunidade ribossomal 30S, impedindo a adição dos aminoácidos a cadeias polipeptídicas que estão sendo formadas (BEGUM *et al.*, 2021; SINGH; YOUNG; SILVER, 2017; TORTORA; FUNKE; CASE, 2017).

A primeira tetraciclina - clortetraciclina (Figura 18), foi obtida por Benjamin Duggar, em 1945, a partir da bactéria *Streptomyces aureofaciens* (AMINOV, 2017; BEGUM *et al.*, 2021). Possuem a capacidade de difundir-se no interior das células do hospedeiro e, portanto, são eficazes no tratamento de infecções urinárias, intestinais e de pele, pneumonia por micoplasma, gonorreia e infecções por clamídias e rickettsias intracelulares (AMINOV, 2017; TORTORA; FUNKE; CASE, 2017).

Com o crescimento da resistência à classe, o uso dos fármacos de primeira e segunda gerações de tetraciclinas, como por exemplo, a tetraciclina, metaciclina e doxiciclina (Figura 18), vem se enfraquecendo. Entretanto, a 3ª geração apresenta o fármaco semissintético tigeciclina (Figura 18), o qual exibe potencial de inibição das bombas de efluxo, um dos mecanismos de resistência bacteriana, e vem promovendo o contínuo interesse do uso clínico dessa classe de antimicrobianos (SINGH; YOUNG; SILVER, 2017; GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010).



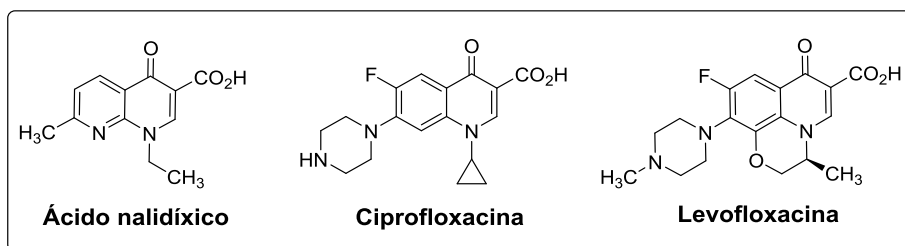
**Figura 18.** Estruturas de algumas tetraciclina de 1ª, 2ª e 3ª gerações.

#### 1.1.3.5 Quinolonas e fluoroquinolonas

O início do desenvolvimento das quinolonas foi baseado na descoberta realizada pelo químico George Leshner, em 1962, que obteve acidentalmente, como subproduto da síntese do composto antimalarial cloroquina, o ácido nalidíxico (Figura 19). As quinolonas atuam inibindo as enzimas bacterianas DNA girase e a topoisomerase IV, ocasionando o bloqueio da síntese dos ácidos nucleicos (AMINOV, 2017; BEGUM *et al.*, 2021; DHIMAN *et al.*, 2019; PHAM; ZIORA; BLASKOVICH, 2019).

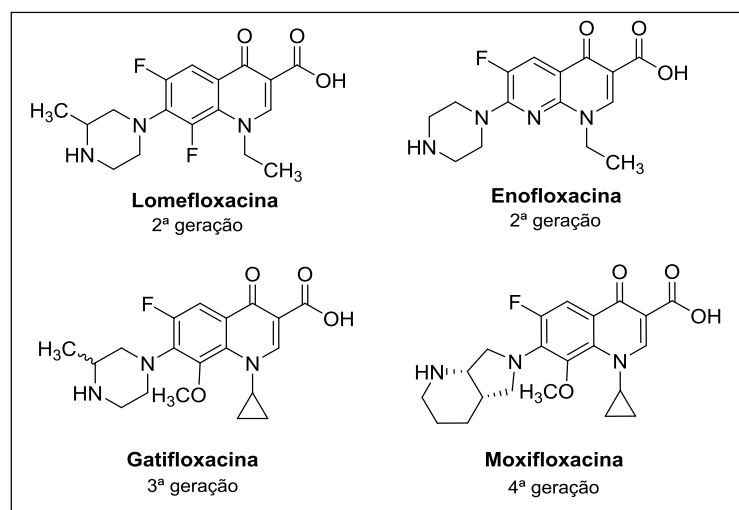
Os antibacterianos quinolônicos são bactericidas de amplo espectro e vem sendo empregados no tratamento de infecções do trato urinário, gastrointestinal e respiratório, destacando-se a ciprofloxacina e a levofloxacina (Figura 19) como fármacos de escolha. Os fármacos da classe podem ser divididos em 4 gerações de acordo com o espectro de atividade (AMINOV, 2017; DHIMAN *et al.*, 2019; PHAM; ZIORA; BLASKOVICH, 2019).

A 1ª geração possuía ação antibacteriana restrita apenas às Gram-negativas. Dessa forma, novos compostos foram desenvolvidos a partir de estudos de relação estrutura-atividade do núcleo quinolônico visando a ampliação do espectro de ação (PHAM; ZIORA; BLASKOVICH, 2019; SINGH; YOUNG; SILVER, 2017).



**Figura 19.** Estruturas do ácido nalidíxico, ciprofloxacina e levofloxacina.

Na 2<sup>a</sup> geração de compostos quinolônicos, denominadas fluoroquinolonas, fez-se modificações estruturais como a adição de um átomo de flúor na posição 6 do anel quinolônico e a inserção do anel piperidínico na posição 7, possibilitando a ampliação da potência e espectro de ação. Entretanto, apenas com a inclusão do anel piperidínico alquilado na posição 7 obteve-se ação contra bactérias Gram-positivas. Como exemplos, têm-se a lomefloxacina e a enofloxacina (Figura 20). Nas 3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> gerações de quinolonas expandiu-se o espectro de ação contra Gram-positivas e microrganismos anaeróbicos. Como representantes tem-se a gatifloxacina e a moxifloxacina (Figura 20) (DHIMAN *et al.*, 2019; PHAM; ZIORA; BLASKOVICH, 2019).

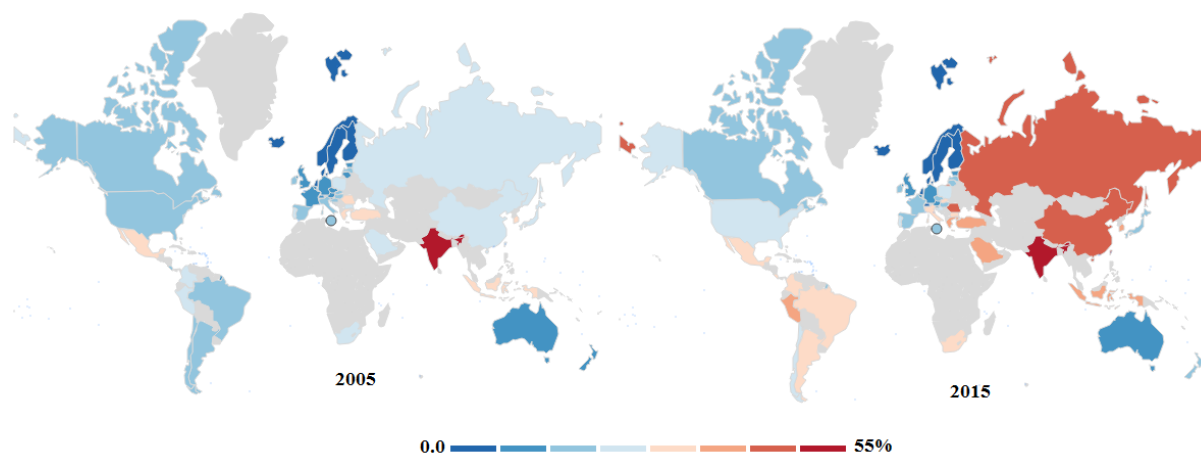


**Figura 20.** Representantes de fármacos quinolônicos de 2<sup>a</sup> a 4<sup>a</sup> gerações.

#### 1.1.4 Resistência bacteriana

A resistência bacteriana é um fenômeno natural intrínseco, relacionada à vasta capacidade adaptativa das bactérias, tendo em vista que podem sofrer mutações e alterações genéticas como resposta ao ambiente ou adquirir via alterações cromossomais e transferência horizontal (GIACOMINI *et al.*, 2021; HAMDANI *et al.*, 2020).

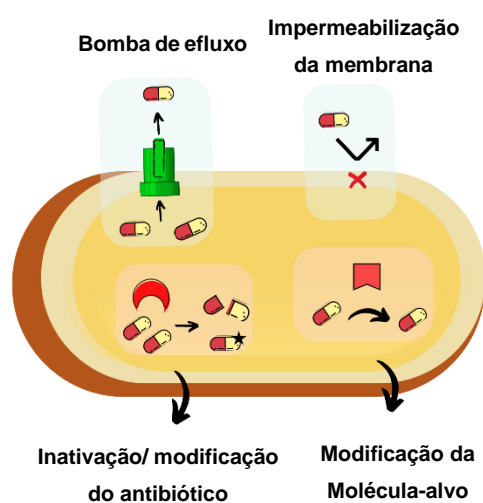
Entretanto, nos últimos anos tem-se observado um aumento no número de cepas resistentes, conforme pode ser observado na Figura 21, onde são apresentados mapas comparativos com as porcentagens de resistência bacteriana no mundo nos anos de 2005 e 2015 (BEGUM *et al.*, 2021; GIACOMINI *et al.*, 2021; HAMDANI *et al.*, 2020).



**Figura 21.** Dados sobre a resistência bacteriana nos anos de 2005 e 2015.

Adaptado de OECD (Organization for Economic and Co-operation and Development).

Dessa forma, um grande problema de saúde pública surge, visto que a resistência bacteriana acarreta a diminuição da eficácia dos antibióticos, pois as bactérias utilizam vários mecanismos celulares (Figura 22) que ocasionam a inibição da ação dos fármacos (BEGUM *et al.*, 2021; GIACOMINI *et al.*, 2021; HAMDANI *et al.*, 2020).



**Figura 22.** Mecanismos de resistência aos antibacterianos.

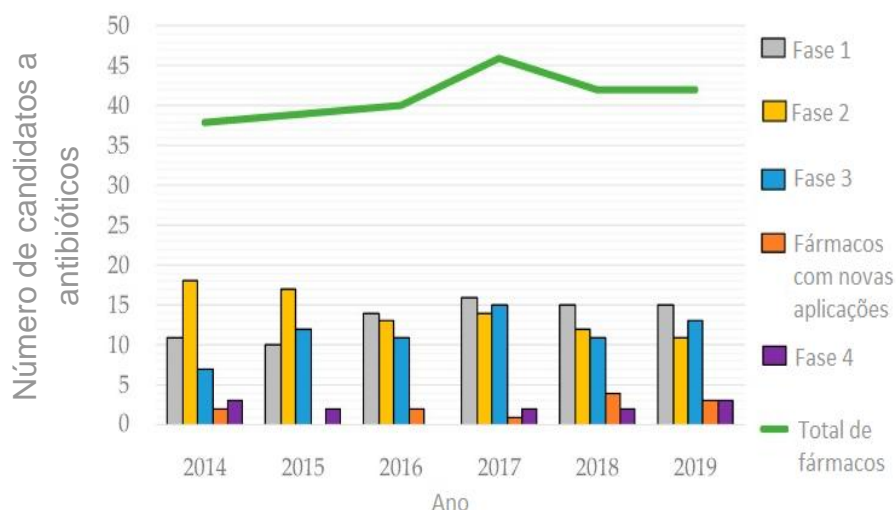
Dentre os fatores que contribuem para a ampliação da resistência bacteriana destacam-se o uso incorreto e o consumo excessivo de antibacterianos, prescrições

inadequadas que variam entre 30-50% das terapias com antibacterianos e uso extensivo de antimicrobianos na agricultura (ASLAM *et al.*, 2018; BEGUM *et al.*, 2021; GIACOMINI *et al.*, 2021).

Estima-se que anualmente ocorrem 23 mil mortes na América do Norte e 33 mil na Europa em consequência de infecções causadas por bactérias resistentes, ocasionando o aumento da morbidade e de gastos com a saúde que totalizam mais de 1,5 bilhão de dólares por ano na Europa. Além disso, calcula-se que em 2050 a resistência a antimicrobianos será responsável pelo óbito de 10 milhões de pessoas por ano (CUNHA; FONSECA; CALADO, 2019; GIACOMINI *et al.*, 2021, SINGH; YOUNG; SILVER, 2017).

Com números tão alarmantes, evidencia-se a necessidade de pesquisas voltadas ao desenvolvimento de novas classes de fármacos. Todavia, uma diminuição de pesquisa e desenvolvimento de novas moléculas com ação antimicrobiana tem sido observada nos últimos anos, resultado da redução do investimento de indústrias farmacêuticas. Ciabusch e Lindahl, em 2018, relataram que fatores como o alto custo e risco envolvido em pesquisas e desenvolvimento de novos antibacterianos, o dinamismo do mercado, baixa da lucratividade e declínio das taxas de sucesso nas fases finais de testes têm direcionado as pesquisas para outros segmentos, como por exemplo, tratamento de doenças crônicas destacando-se as oncológicas e cardiovasculares (CUNHA; FONSECA; CALADO, 2019).

Dados apresentados por Cunha e colaboradores, em 2019, apontam para o reduzido número de candidatos à antibacterianos que chegaram à última fase (fase 4) entre os anos de 2014-2019 (Figura 23). Além disso, nos últimos seis anos apenas dois antibacterianos foram, em média, aprovados por ano, um número pequeno e alarmante, demonstrando a necessidade de estímulo a pesquisas e desenvolvimento de novos antibacterianos (CIABUSCHI; LINDAHL, 2018). Dentre os vários compostos que vem sendo avaliados quanto à atividade antibacteriana, sistemas heterocíclicos merecem destaque pois estão presentes em diversas classes de antibacterianos, como os  $\beta$ -lactâmicos, macrolídeos, sulfonamidas e quinolonas.

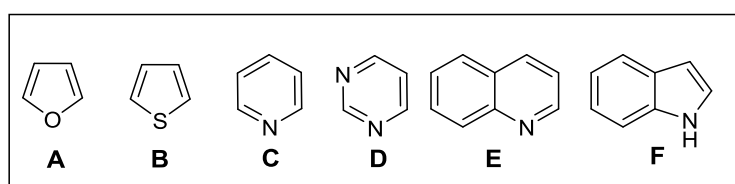


**Figura 23.** Representação da quantidade de candidatos a fármacos antibacterianos nos últimos 6 anos e as etapas para a sua aprovação.

Adaptado de Cunha, Fonseca e Calado (2019).

## 1.2 HETEROCICLOS

Os heterociclos são compostos cíclicos que possuem pelo menos um átomo diferente de carbono em sua composição. Os heteroátomos comumente encontrados são oxigênio, nitrogênio e enxofre, entretanto outros átomos também podem ser encontrados (Figura 24).



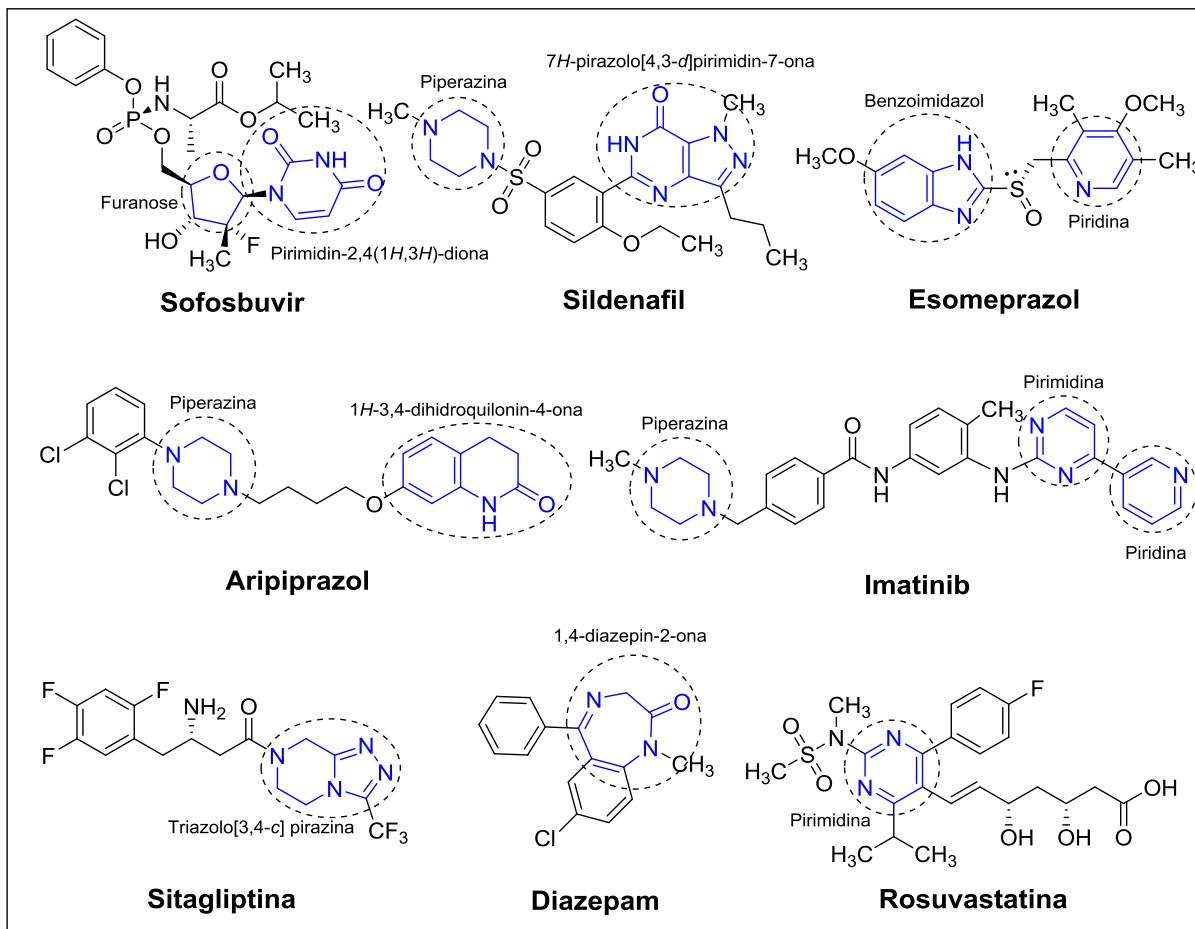
**Figura 24.** Representações estruturais de alguns heterociclos.

Os compostos heterocíclicos possuem aplicações diversificadas encontrando-se presentes em polímeros, corantes, agroquímicos e, principalmente, em fármacos e compostos bioativos. Estima-se que cerca de 85% das moléculas biologicamente ativas encontradas na natureza apresentam ao menos um heterociclo (JAMPILEK, 2019; KERRU *et al.*, 2020; HAIDER, 2017).

Vale destacar que inúmeros fármacos contendo a porção heterocíclica estão entre os mais vendidos no mundo, sendo alguns representados na Figura 25 (CABRELE; RAISER, 2016; KERRU *et al.*, 2020; HAIDER, 2017):

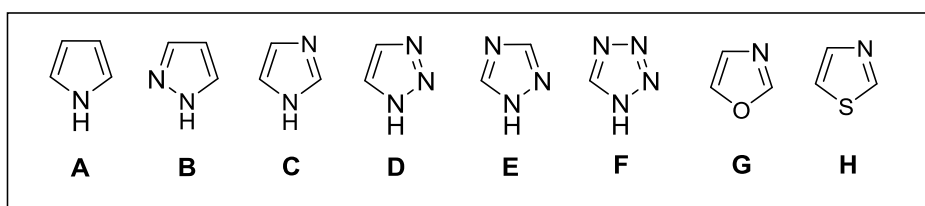
- o antiviral sofosbuvir (Sovaldi<sup>®</sup> - Gilead) que apresenta os heterociclos tetra-hidrofurano (furanose) e pirimidin-2,4(1*H*,3*H*)-diona em sua estrutura.
- o sildenafil (Viagra<sup>®</sup> - Pfizer), um fármaco empregado no tratamento da disfunção erétil, tem em sua estrutura uma piperazina e um pirazol fundido a um derivado pirimidínico gerando o sistema 7*H*-pirazolo[4,3-*d*]pirimidin-7-ona.
- o esomeprazol (Nexium<sup>®</sup> - AstraZeneca), um antiulcerante contendo os núcleos benzoimidazol e piridina.
- o antipsicótico aripiprazol (Abilify<sup>®</sup> - Bristol-Myers), apresentando uma piperazina e o ciclo 1*H*-3,4-di-hidroquinolin-2-ona.
- o antineoplásico imatinib (Gleevec<sup>®</sup> - Novartis), constituído por 3 heterociclos: piperazina, pirimidina e piridina.
- a sitagliptina (Januvia<sup>®</sup> - Merck), usada no tratamento do diabetes *mellitus* tipo 2, possui o sistema triazolo[3,4-*c*]pirazina.
- o diazepam (Valium<sup>®</sup> - Roche), utilizado no tratamento de insônia, ansiedade e espasmos musculares, que contém um núcleo 1,4-diazepin-2-ona.
- a rosuvastatina (Crestor<sup>®</sup> - AstraZeneca), que possui o núcleo pirimidina, sendo empregada como inibidora da síntese do colesterol LDL (lipoproteína de baixa densidade do inglês *low density lipoprotein*).

Outra observação importante é que grande parte dos fármacos heterocíclicos são nitrogenados, representando aproximadamente 75% de novos compostos aprovados pela FDA (Administração de alimentos e drogas, do inglês: *Food and Drug Administration*) (KERRU *et al.*, 2020; HAIDER, 2017). Dessa forma, muitos grupos de pesquisa têm direcionado suas investigações para heterociclos nitrogenados, principalmente da classe dos azóis.



**Figura 25.** Exemplos de fármacos contendo heterociclos.

Os azóis são um grupo de compostos aromáticos de 5 membros que contêm pelo menos um átomo de nitrogênio, sendo que os principais representantes são: pirrol (**A**), pirazol (**B**), imidazol (**C**), 1,2,3-triazol (**D**), 1,2,4-triazol (**E**), tetrazol (**F**), oxazol (**G**) e tiazol (**H**) (Figura 26).

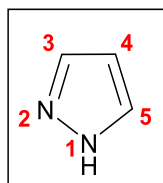


**Figura 26.** Representantes da classe dos azóis.

Os compostos azólicos possuem ampla atividade biológica e destacam-se por estarem presentes em muitos antimicrobianos, como por exemplo, na cefpiroma, ceftarolina, ceftazidima e no sulfametoxazol (Figuras 15 e 17), já apresentados no item 1.1.3.

### 1.2.1 Pirazóis

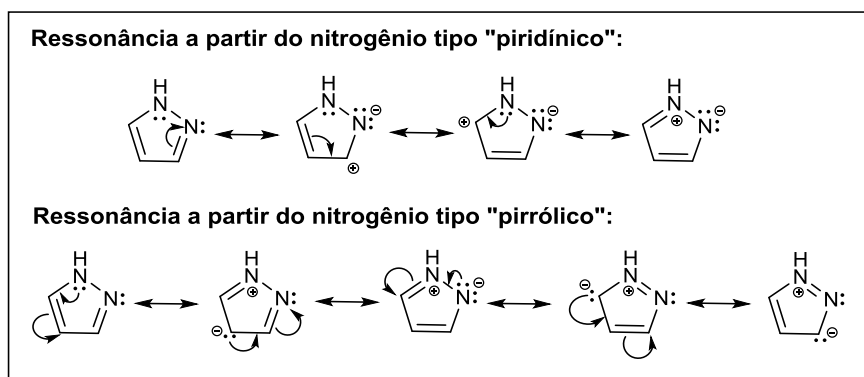
Conforme relatado anteriormente, o pirazol (Figura 27) é um sistema heterocíclico de 5 membros pertencente a classe dos azóis, formado por 2 átomos de nitrogênio adjacentes e 3 átomos de carbono. Vem sendo extensamente estudado devido às diversas aplicações, principalmente na química medicinal (FAISAL *et al.*, 2019; KARROUCHI *et al.*, 2018; SECRIERU; O'NEILL; CRISTIANO, 2020).



**Figura 27.** Estrutura do pirazol.

Os átomos de nitrogênio que compõem o pirazol exibem diferentes comportamentos. O átomo de nitrogênio na posição 1 é do tipo “pirrólico” (N1), possuindo um par de elétrons comprometido com a ressonância e o átomo de hidrogênio ligado a N1 possui certa acidez com pKa próximo a 14,2. O átomo de nitrogênio tipo “piridínico” (N2) apresenta um par de elétrons em um orbital não-ligante perpendicular ao plano, com hibridização  $sp^2$ , não participando da ressonância, o que possibilita que esse átomo atue como uma base, cujo pKa do ácido conjugado é de 2,5 (FAISAL *et al.*, 2019; KARROUCHI *et al.*, 2018; SECRIERU; O'NEILL; CRISTIANO, 2020).

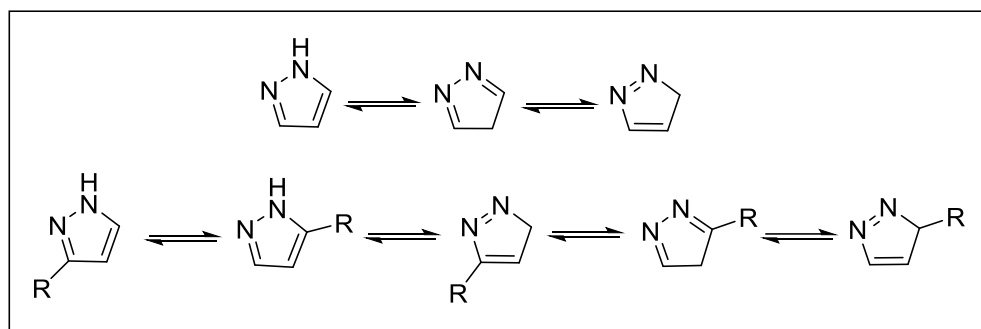
Quanto às estruturas de ressonância, o pirazol exhibe 4 formas canônicas a partir do nitrogênio “piridínico” e 5 estruturas canônicas iniciando a ressonância pelo nitrogênio “pirrólico” (Figura 28).



**Figura 28.** Estruturas de ressonância do pirazol.

O pirazol é um sistema heterocíclico aromático já que segue a regra de Hückel e possui 6 elétrons  $\pi$  deslocalizados por todo o anel. Conforme pode ser observado nas estruturas de ressonância (Figura 28), as substituições eletrofílicas aromáticas ocorrem preferencialmente na posição 4, devido à maior densidade eletrônica, e o ataque nucleofílico, que raramente ocorre, nas posições 3 e 5 (FAISAL *et al.*, 2019; KARROUCHI *et al.*, 2018; SECRIERU; O'NEILL; CRISTIANO, 2020).

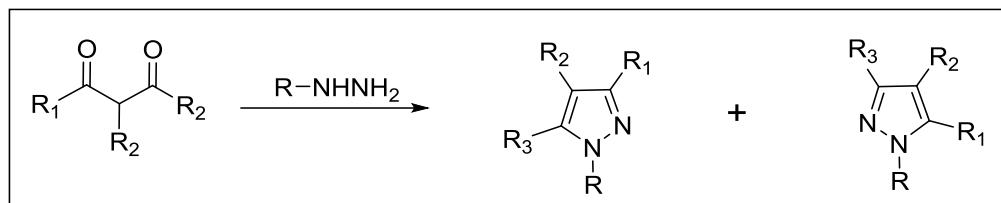
Uma característica estrutural dos derivados pirazólicos é o tautomerismo prototrópico, que é a transferência rápida de um próton para outro átomo da mesma molécula, levando a um equilíbrio de difícil separação dos tautômeros. Para pirazóis não substituídos são possíveis 3 formas tautoméricas (Figura 29), sendo a primeira prevalente, já que é aromática e, portanto, a mais estável. No caso de pirazóis monossustituídos, a princípio 5 tautômeros podem existir. (FARIA *et al.*, 2017; SECRIERU; O'NEILL; CRISTIANO, 2020).



**Figura 29.** Estruturas tautoméricas de pirazóis não substituídos e monossustituídos.

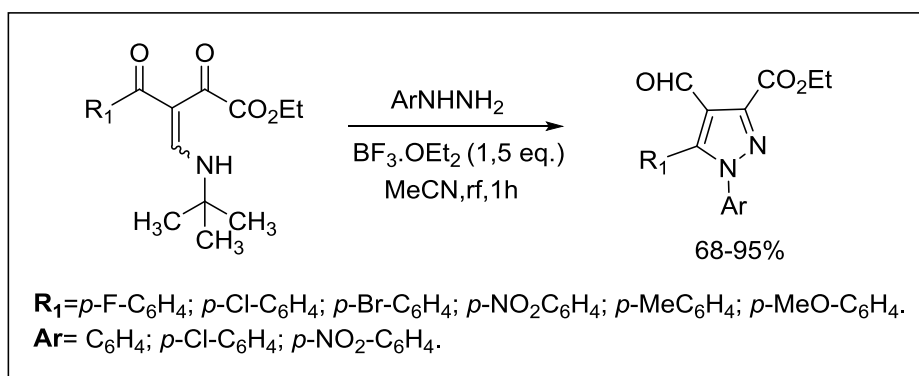
### 1.2.1.1 Métodos de obtenção

O principal método de obtenção de pirazóis envolve a ciclocondensação entre hidrazinas e compostos 1,3-dicarbonílicos publicado pela primeira vez por Ludwig Knorr, em 1883 (Esquema 1). A metodologia vem sendo empregada como rota sintética viável, entretanto a utilização de compostos carbonílicos não simétricos, gera uma mistura de isômeros, tornando a síntese muitas vezes inviável devido a difícil separação dos produtos. Dessa forma, inúmeras variações no método vem sendo realizadas com foco na síntese regioseletiva (KARROUCHI *et al.*, 2018; KNORR, 1883; LI, 2014).



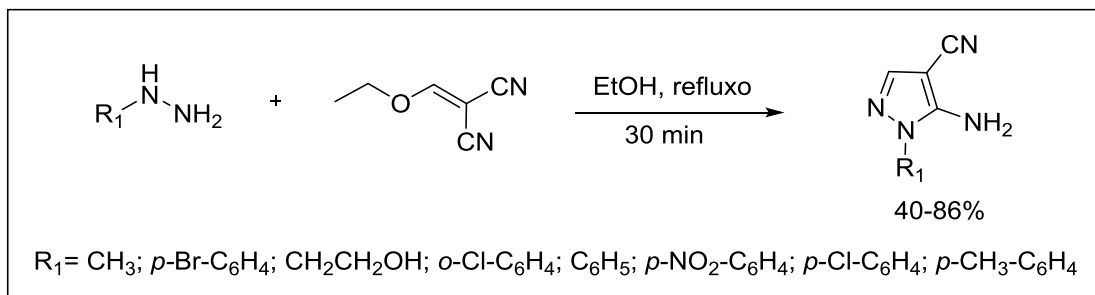
**Esquema 1.** Método de Knorr para a obtenção de pirazóis.

Em 2017, Silva e colaboradores realizaram uma modificação na síntese de Knorr e obtiveram os derivados 3,5-dissubstituídos-4-formil-*N*-arilpirazol com regiosseletividade controlada a partir da reação entre β-enaminodietonas e fenilhidrazinas, em refluxo, durante 1 hora (Esquema 2). Além disso, foi utilizado como agente ativante da carbonila o ácido de Lewis éterato dietílico de trifluoreto de boro (BF<sub>3</sub>.OEt<sub>2</sub>) em acetonitrila (SILVA *et al.*, 2017).



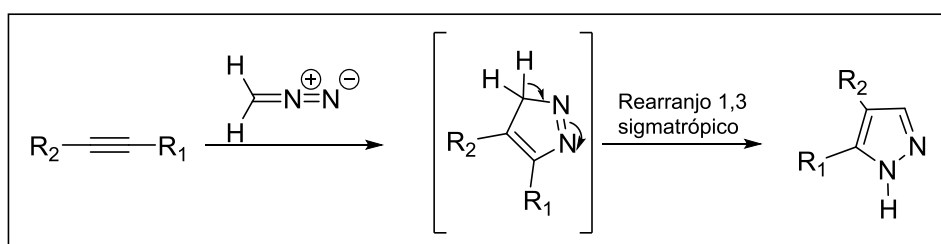
**Esquema 2.** Reação de obtenção dos derivados 3,5-dissubstituídos-4-formil-*N*-arilpirazol.

Nosso grupo de pesquisa tem sintetizado compostos pirazólicos 4,5-dissubstituídos baseando-se na reação desenvolvida por Cheng e Robins (1956), a qual é considerada uma modificação do método de Knorr (CHENG; ROBINS, 1956; DOS SANTOS *et al.*, 2011). Para a obtenção dos pirazóis, Cheng e Robins empregaram como reagentes etoximetilenomalononitrila, o qual atua de maneira análoga ao aduto 1,3-dicarbonílico, e hidrazinas monosubstituídas, empregando etanol como solvente. A reação deve ser mantida sob refluxo por 30 minutos. Diversos derivados 5-amino-1*H*-pirazol-4-carbonitrila (Esquema 3) foram obtidos com rendimentos na faixa 40 a 86% (CHENG; ROBINS, 1956).



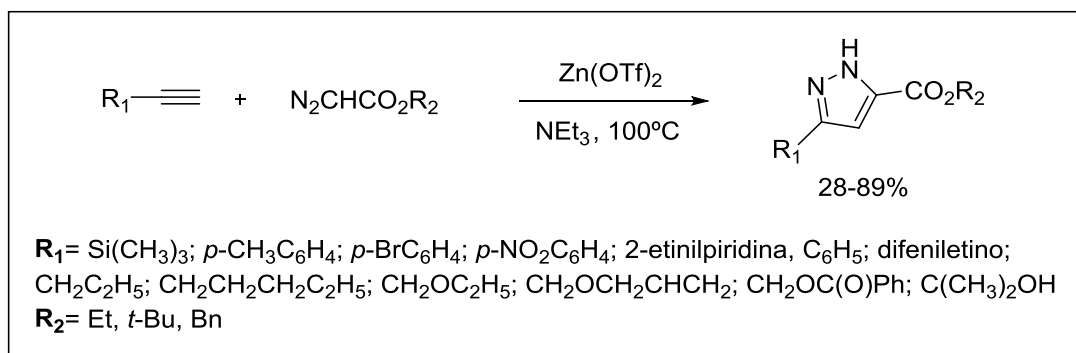
**Esquema 3.** Reação de obtenção de derivados 5-amino-1H-pirazol-4-carbonitrila.

Outro método em destaque na literatura foi descrito por Pechmann em 1898, onde a formação do pirazol ocorre via cicloadição [3+2] entre um diazometano e um derivado acetilênico, gerando o 3H-pirazol que, após um rearranjo 1,3-sigmatrópico, leva à aromatização do sistema, ou seja, o isômero 1H-pirazol é formado (Esquema 4) (LI, 2014; KARROUCHI *et al.*, 2018; PECHMANN, 1898).



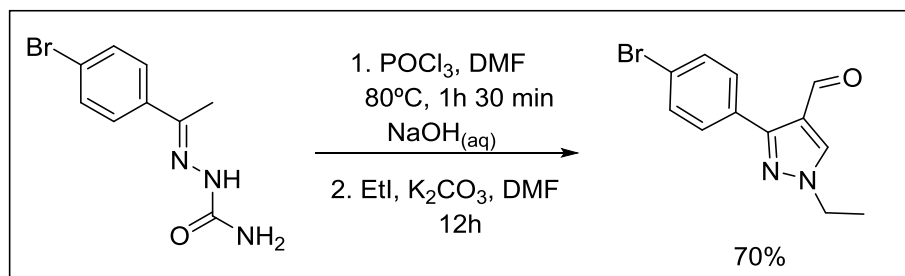
**Esquema 4.** Reação de obtenção de pirazóis pelo método de Pechmann.

No trabalho publicado por He e colaboradores, em 2009, diversos compostos pirazólicos 3,5-dissubstituídos (Esquema 5) foram obtidos a partir do método de Pechmann. Eles utilizaram compostos acetilênicos e diazoésteres que reagiram na presença do catalisador trifluorometanossulfonato (triflato) de zinco anidro e trietilamina. A mistura reacional foi agitada por 8 horas a 100 °C e os produtos foram obtidos com rendimentos entre 28-89% (HE *et al.*, 2009; KARROUCHI *et al.*, 2018).



**Esquema 5.** Síntese de compostos pirazólicos 3,5-dissubstituídos.

Outro método para obtenção de pirazóis foi descrito por Fahmy e colaboradores que, em 2016, sintetizaram o derivado 4-formilpirazol substituído a partir da reação de formilação de semicarbazona, via Vilsmeier–Haack, com rendimento de 70% (Esquema 6) (FAHMY *et al.*, 2016).



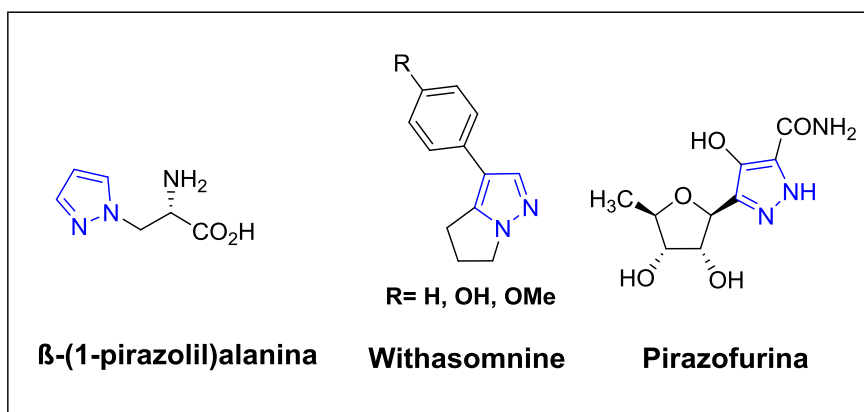
**Esquema 6.** Reação de obtenção do derivado 4-formilpirazol substituído.

Vale ressaltar que o núcleo pirazólico estimulou o desenvolvimento de inúmeras metodologias além daquelas relatadas ao longo deste trabalho. Existem diversas publicações de revisão envolvendo metodologias de sínteses de pirazóis (BROWN, 2018; FAISAL *et al.*, 2019; FUSTERO; SIMÓN-FUENTES; SANZ-CERVERA, 2009; KARROUCHI *et al.*, 2018; SAPKAL; KAMBLE, 2020; SINGH; NATH, 2019).

#### 1.2.1.2 Aplicações

Os pirazóis são compostos que contêm um amplo perfil farmacodinâmico possuindo uma vasta aplicação na área medicinal. O núcleo pirazólico pode ser encontrado em derivados empregados como analgésico, antitérmico, antimicrobiano, antifúngico, antineoplásico, anticonvulsivo, antimalarial, antiviral e antidepressivo (ANSARI; ALI; SHAMSUZZAMAN, 2017; FAISAL *et al.*, 2019; KARROUCHI *et al.*, 2018).

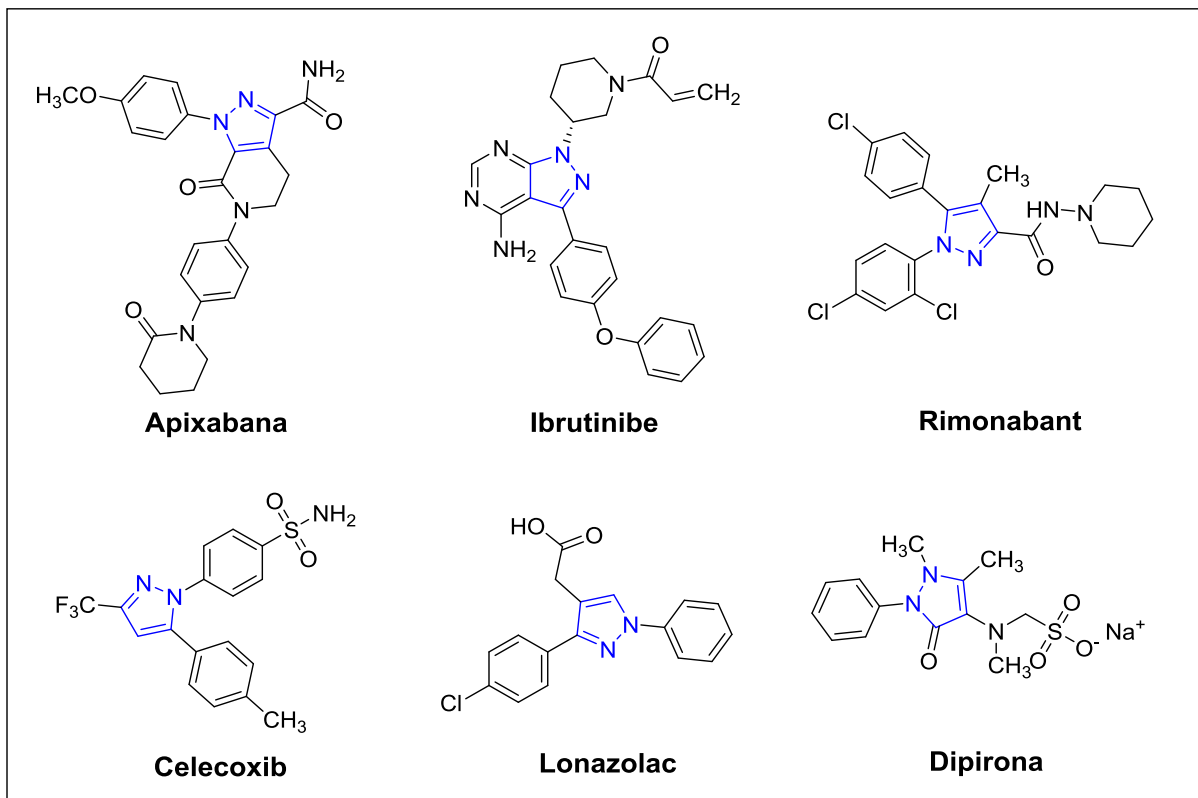
O primeiro composto pirazólico natural com aplicação biológica foi a  $\beta$ -(1-pirazolil)alanina (Figura 30), encontrado na semente da melancia (*Citrullus vulgaris*), o qual tem sido usado no tratamento da diabetes. Outras substâncias naturais com propriedades biológicas como o withasomnine (analgésico e anti-inflamatório) e pirazofurina (antitumoral e antiviral) também apresentam o anel pirazólico (Figura 30) (ANSARI; ALI; SHAMSUZZAMAN, 2017).



**Figura 30.** Exemplos de compostos pirazólicos naturais com propriedades biológicas.

Inúmeros fármacos contendo a porção pirazólica têm sido aprovados e utilizados pela indústria farmacêutica. Dentre os fármacos comercializados, o anticoagulante apixabana (Figura 31) é um composto que atua inibindo o fator Xa e previne a formação de coágulos sanguíneos (BROWN, 2018). O ibrutinibe (Imbruvica® - Abbvie) (Figura 31) é um fármaco antineoplásico empregado no tratamento da leucemia linfocítica crônica e que tem como alvo o receptor de antígeno de células B. Outro composto é o rimonabant (Acomplia® - Sanofi) (Figura 31) o qual auxilia na redução do peso pois age em nível cerebral, inibindo o receptor canabinoide CB1, promovendo a saciedade e diminuição da fome (BROWN, 2018; KARROUCHI *et al.*, 2018).

Os fármacos pirazólicos celecoxib (Celebra® - Pfizer) e lonazolac (Figura 31) atuam como anti-inflamatórios não-esteroidais e inibem as enzimas da classe ciclo-oxigenase. Quanto à dipirona (Novalgina® - Sanofi) (Figura 31), suas ações antiespasmódica, antipirética e analgésica ocorrem pela inibição da síntese de prostaglandina (FAISAL *et al.*, 2019; KARROUCHI *et al.*, 2018).



**Figura 31.** Estruturas de alguns fármacos contendo o núcleo pirazólico.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVOS GERAIS

- Sintetizar sete derivados inéditos 7-aryl-2,3,6,7-tetra-hidro-5H-imidazo[1,2-c]pirazolo[4,3-e]pirimidin-5-tionas **1(a-g)** (Figura 32);

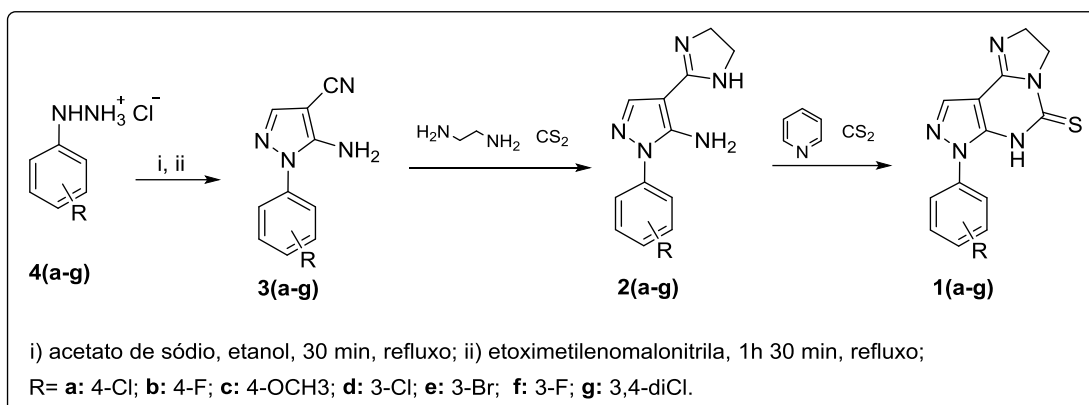


Figura 32. Rota de obtenção dos derivados **1(a-g)**.

- Avaliar a atividade antibacteriana dos derivados **1(a-g)** contra as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar os intermediários-chave 5-amino-1-aryl-4-(4,5-di-hidro-1H-imidazol-2-il)-1H-pirazóis **2(a-g)** (Figura 32);
- Sintetizar as matérias-primas 5-amino-1-aryl-1H-pirazol-4-carbonitrilas **3(a-g)** (Figura 32);
- Caracterizar as matérias-primas **3(a-g)** e os intermediários-chave **2(a-g)** utilizando a Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR) e a determinação do ponto de fusão;
- Caracterizar os produtos finais **1(a-g)** a partir das técnicas descritas acima, além da Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de Hidrogênio (<sup>1</sup>H RMN) e de Carbono (<sup>13</sup>C RMN), e Espectrometria de Massas de Alta Resolução (HRMS);
- Determinar a concentração mínima inibitória (CMI) e a concentração mínima bactericida (CMB) do crescimento bacteriano para os compostos **1(a-g)**.

### 3 JUSTIFICATIVAS

As doenças de origem bacteriana têm sido um grave problema de saúde pública durante toda a história da humanidade. Nas últimas décadas, inúmeros antibacterianos foram desenvolvidos, o que ocasionou o aumento da qualidade e da expectativa de vida. Entretanto, as doenças bacterianas ainda estão incluídas entre as 10 principais causas de mortalidade e morbidade no mundo (CUNHA; FONSECA; CALADO, 2019; MURDOCH; HOWIE, 2018, WANG *et al.*, 2016).

Além disso, um aumento significativo de casos de resistência bacteriana têm sido reportado recentemente, conforme apresentado no tópico 1.1.4. Com isso, a Organização Mundial da Saúde (OMS) criou em 2019 um documento sobre resistência antimicrobiana - AMR (do inglês, *antimicrobial resistance*), alertando sobre a necessidade de pesquisas voltadas ao desenvolvimento de novas classes de fármacos (AMR, 2019; CUNHA; FONSECA; CALADO, 2019).

Nesse cenário, os compostos nitrogenados de 5 membros, dentre eles derivados pirazólicos, têm se destacado por apresentarem amplo espectro de atividade biológica, inclusive antibacteriana contra diversas espécies de bactérias (ANSARI; ALI; SHAMSUZZAMAN, 2017; FARIA *et al.*, 2017; FAISAL *et al.*, 2019).

Dessa forma, o desenvolvimento de novos fármacos antimicrobianos contendo derivados pirazólicos se torna uma promissora área de estudo. Portanto, nesse trabalho, planejou-se a síntese de derivados pirazólicos 7-aril-2,3,6,7-tetra-hidro-5H-imidazo[1,2-c]pirazolo[4,3-e]pirimidin-5-tionas **1(a-g)** (Figura 32) a fim de avaliar a eficácia em modelos de infecções bacterianas *in vitro*, ocasionadas por *S. aureus* e *E. coli*, uma vez que essas cepas têm destaque no cenário brasileiro por sua virulência bem como a presença em grande parte das doenças bacterianas brasileiras, como mencionado no tópico 1.1.2.

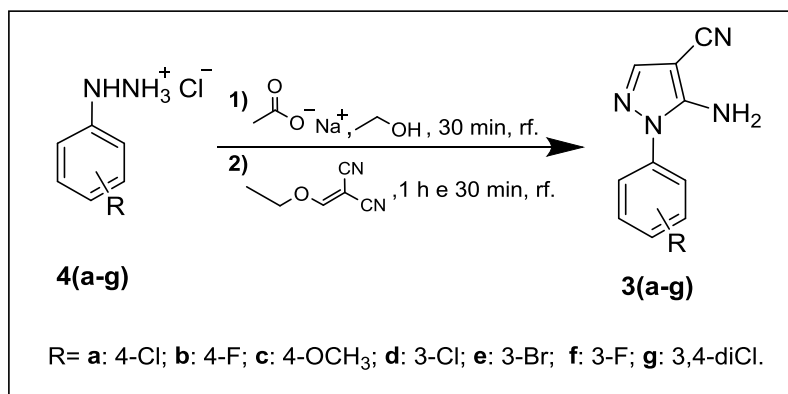
## 4 METODOLOGIAS

### 4.1 METODOLOGIAS DE SÍNTESE

#### 4.1.1 Síntese dos produtos finais 7-aryl-2,3,6,7-tetra-hidro-5H-imidazo[1,2-c]pirazolo[4,3-e]pirimidin-5-tionas 1(a-g)

##### 4.1.1.1 Primeira etapa: Síntese das matérias-primas 5-amino-1-aryl-1H-pirazol-4-carbonitrilas 3(a-g)

A um balão de fundo redondo, acoplado com condensador de refluxo, foram adicionados 16 mmol de cloridrato de 4-clorofenilhidrazina **4a**, 32 mmol de acetato de sódio e 50 mL de etanol 95% (Esquema 7). Manteve-se a mistura sob agitação magnética e aquecimento até entrar em refluxo. Aguardou-se 30 minutos e foram colocados 16 mmol de etoximetilenomalononitrila. Após 1 hora e 30 minutos, evidenciou-se o final da reação por cromatografia em camada delgada (CCD), usando diclorometano como eluente. O produto foi vertido em cerca de 150 mL de água gelada, filtrado a vácuo e lavado com aproximadamente 100 mL de água gelada (DOS SANTOS *et al.*, 2011). Os derivados **3(b-g)** foram obtidos de maneira similar, a partir das respectivas arilhidrazinas **4(b-g)**.

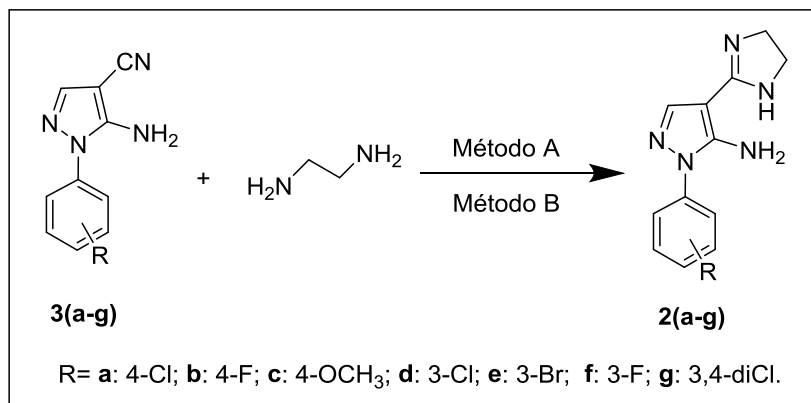


**Esquema 7.** Síntese das matérias-primas 5-amino-1-aryl-1H-pirazol-4-carbonitrilas **3(a-g)**.

##### 4.1.1.2 Segunda etapa: Síntese dos intermediários-chave 5-amino-1-aryl-4-(4,5-dihidro-1H-imidazol-2-il)-1H-pirazóis 2(a-g)

A síntese dos intermediários **2(a-g)** foi realizada a partir da reação entre 2 mmol das matérias-primas **3(a-g)**, 3 mL de etilenodiamina e 2 mmol de dissulfeto de carbono, empregando-se duas metodologias, conforme mostrado no Esquema 8. Na

metodologia A, foi utilizada a técnica de micro-ondas, onde a mistura reacional foi irradiada a 70 W por 30 minutos enquanto que, na metodologia B, foi usado o método de aquecimento convencional, em refluxo, por 20 horas.



**Esquema 8.** Síntese dos intermediários-chave 5-amino-1-aryl-4-(4,5-di-hidro-1*H*-imidazol-2-il)-1*H*-pirazóis **2(a-g)**.

### METODOLOGIA A:

A um balão de fundo redondo, 2,36 mmol de 5-amino-1-(4-clorofenil)-1*H*-pirazol-4-carbonitrila **3a** e 4 mL de etilenodiamina foram adicionados sob agitação. Em seguida, colocou-se 2,36 mmol (0,6 mL) de dissulfeto de carbono. O balão foi levado ao micro-ondas, acoplado a um condensador de refluxo e a mistura foi irradiada durante 30 minutos, na potência de 70 W. Acompanhou-se a reação por CCD e como eluente foi usada uma mistura de NH<sub>4</sub>OH/acetato de etila (10% v/v). Após o término da reação, verteu-se a mistura em água gelada com agitação constante e realizou-se uma filtração a vácuo. O sólido foi lavado com cerca de 100 mL de água destilada gelada (ROSA *et al*, 2019). Os derivados **2(b,d-g)** foram obtidos de forma similar, partindo das matérias-primas 5-amino-1-aryl-1*H*-pirazol-4-carbonitrilas **3(b,d-g)** correspondentes.

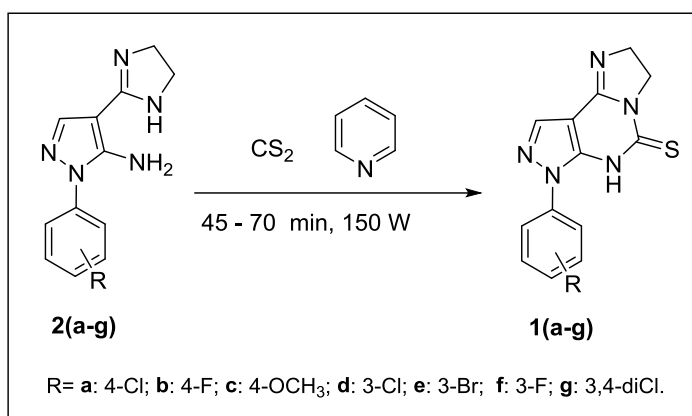
### METODOLOGIA B:

A um balão de fundo redondo, acoplado a um condensador de refluxo, foram adicionados 2,71 mmol de 5-amino-4-clorofenil-1*H*-pirazol-4-carbonitrila **3a**, 4 mL de etilenodiamina e 2,71 mmol (0,7 mL) de dissulfeto de carbono sob agitação magnética. A reação foi mantida em refluxo por 20 horas e o progresso foi acompanhado por CCD, onde empregou-se acetato de etila como eluente. O produto foi isolado em

aproximadamente 80 mL de água gelada com agitação constante e, em seguida, filtrado a vácuo. O sólido foi lavado com cerca de 100 mL de água destilada gelada. Os derivados **2(c-f)** foram obtidos baseando-se no procedimento acima citado e partindo das matérias-primas 5-amino-1-*H*-pirazol-4-carbonitrilas **3(c-f)** correspondentes.

#### 4.1.2.3 Síntese dos derivados 7-*aril*-2,3,6,7-tetra-hidro-5*H*-imidazo[1,2-*c*]pirazolo[4,3-*e*]pirimidin-5-tionas **1(a-g)**

Para a síntese do derivado **1a**, adicionou-se a um balão de fundo redondo, 0,191 mmol do intermediário **2a** e 2 mL de piridina (Esquema 9), mantendo-se a mistura sob agitação magnética. Em seguida, adicionou-se, gota a gota, 16,5 mmol (1 mL) de dissulfeto de carbono. O balão foi levado ao micro-ondas onde acoplou-se a um condensador de refluxo. A mistura foi irradiada por 45 minutos a uma potência de 150 W. Acompanhou-se a reação por CCD, onde foi usada uma solução de NH<sub>4</sub>OH/acetato de etila (10% v/v) como eluente. Verteu-se a mistura em cerca de 7 mL de metanol gelado e o sólido formado foi filtrado, lavado com 10 mL de metanol e levado ao dessecador (FARGHALY; EL-KASHEF, 2006).



**Esquema 9.** Síntese dos derivados finais 7-*aril*-2,3,6,7-tetra-hidro-5*H*-imidazo[1,2-*c*]pirazolo[4,3-*e*]pirimidin-5-tionas **1(a-g)**.

Os demais derivados **1(b-g)** foram obtidos partindo dos intermediários-chave **2(b-g)** correspondentes. O tempo de reação variou de 45 a 70 min, conforme apresentado na Tabela 1.

**Tabela 1.** Tempo de reação para a síntese dos derivados **1(a-g)**.

	<b>Derivado</b>	<b>Tempo (min)</b>
<b>1a</b>	4-Cl	45
<b>1b</b>	4-F	45
<b>1c</b>	4-OCH <sub>3</sub>	45
<b>1d</b>	3-Cl	70
<b>1e</b>	3-Br	60
<b>1f</b>	3-F	60
<b>1g</b>	3,4-diCl	45

\*potência fixa de 150 W.

## 4.2 CARACTERIZAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS

### 4.2.1 Determinação das faixas de fusão

As faixas de fusão foram determinadas no aparelho Allerbest, sem modelo, acoplado a um termômetro analógico, do Laboratório de Síntese de Sistemas Heterociclicos (LaSSH/UNIFEI), sem correção da temperatura e em duplicata.

### 4.2.2 Espectroscopia na região do infravermelho (FT-IR)

Os espectros na região do infravermelho foram obtidos no equipamento Spectrum 100, PerkinElmer, por refletância atenuada (ATR), com cristal de diamante-ZnSe e empregando-se 16 varreduras com resolução de 4 cm<sup>-1</sup>, à temperatura ambiente, no Laboratório de Espectroscopia (UNIFEI).

### 4.2.3 Espectrometria de massas de alta resolução (HRMS)

As análises foram realizadas em um espectrômetro de massas Q-TOF ZQ-4000 Micromass/Waters de alta resolução, com cone 30,0 V, capilar 3,0 kV, lente RF 1,0 V, extrator 1 V, temperatura da fonte 150 °C, temperatura de dessolvatação 300 °C, com ionização por eletrospray (ESI-MS), na Central Analítica da FIOCRUZ-RJ.

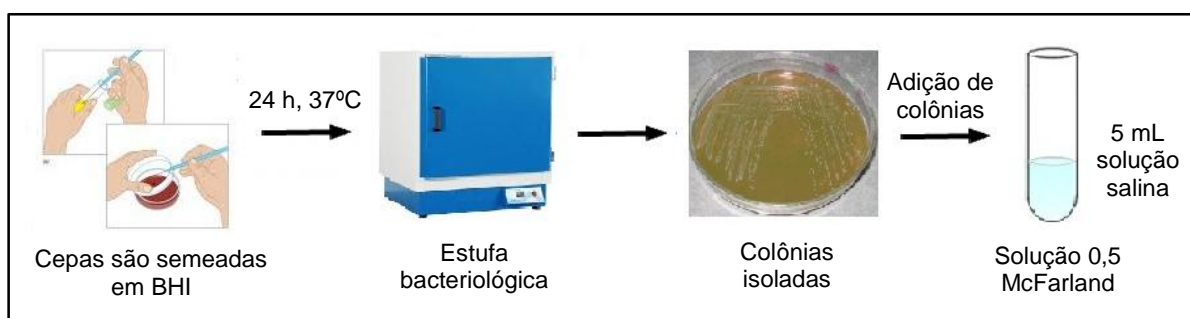
#### 4.2.4 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

As análises de Ressonância Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  foram executadas no equipamento BRUKER Avance 400 MHz na Central Analítica da FIOCRUZ-RJ ou no laboratório de Ressonância Magnética Nuclear no aparelho BRUKER Avance 300 MHz da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL). Utiliza-se tetrametilsilano (TMS –  $\text{Si}(\text{CH}_3)_4$ ) como padrão interno e dimetilsulfóxido deuterado ( $\text{DMSO}-d_6$ ) como solvente.

### 4.3 ENSAIOS BIOLÓGICOS

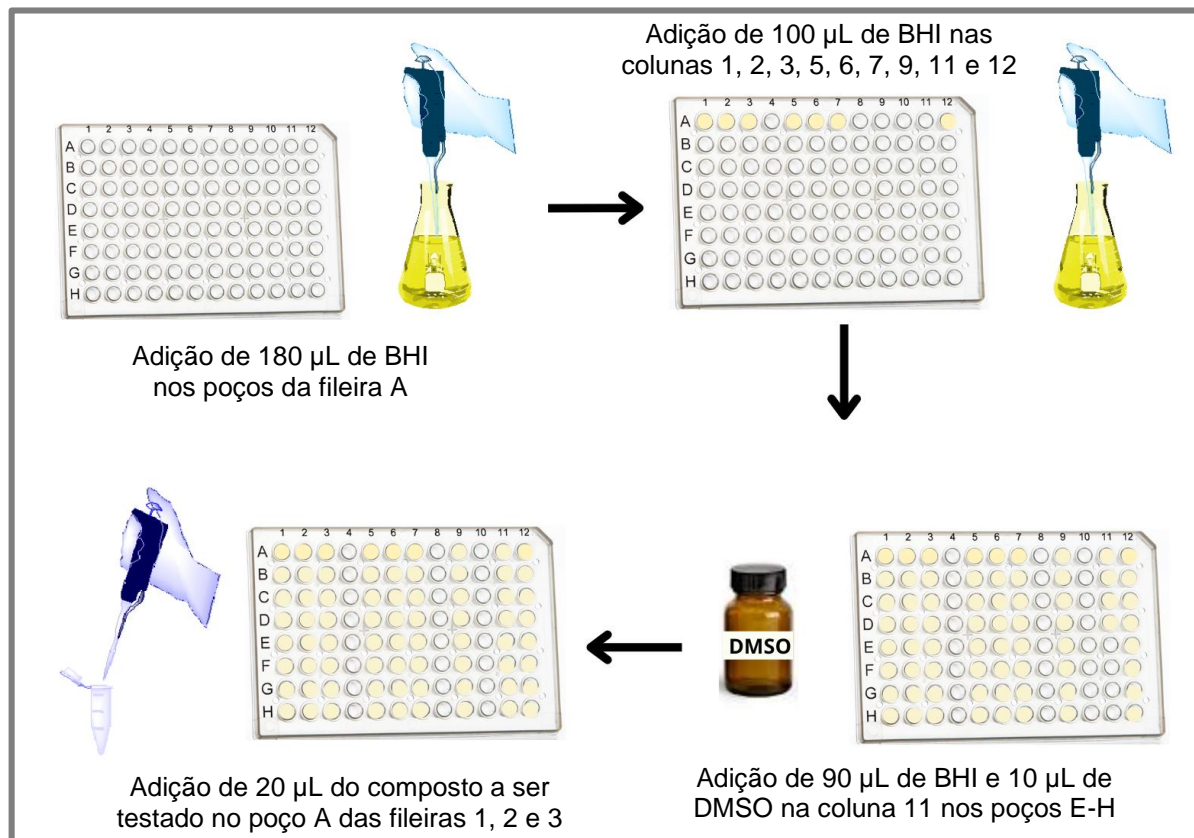
#### 4.3.1 Concentração Mínima Inibitória (CMI)

O procedimento para a análise biológica está sendo realizado de acordo com o proposto por André e colaboradores (2020) onde utiliza-se as cepas *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus aureus* MRSA - HU25 (cepa clínica resistente à meticilina isolada no Hospital Universitário Clementino Fraga Filho) e *Escherichia coli* (ATCC 25922). A bactéria *E. coli* foi semeada em uma placa de *Tryptic Soy Agar* - TSA e incubada por 24 h a 37 °C. Após, adicionou-se de 3 a 5 colônias de *S. aureus* do repique em 5 mL de solução salina (cloreto de sódio 0,9% estéril) até adquirir a turbidez de 0,5 na escala de McFarland (Figura 33).



**Figura 33.** Sequência de preparação da solução 0,5 na escala McFarland.

Em uma placa estéril de 96 poços, adicionou-se 180  $\mu\text{L}$  de meio BHI nos poços 1, 2, 3, 5, 6, 7 e 12 da fileira A, completando-se as respectivas colunas com 100  $\mu\text{L}$  do meio. Na coluna 11, foi colocada uma alíquota de 100  $\mu\text{L}$  de BHI nos poços A, B, C e D. Nos poços E, F, G e H, foram aplicados 90  $\mu\text{L}$  de BHI e 10  $\mu\text{L}$  de dimetilsulfóxido (DMSO). Em toda a coluna 9 adicionou-se 100  $\mu\text{L}$  de BHI (Figura 34).

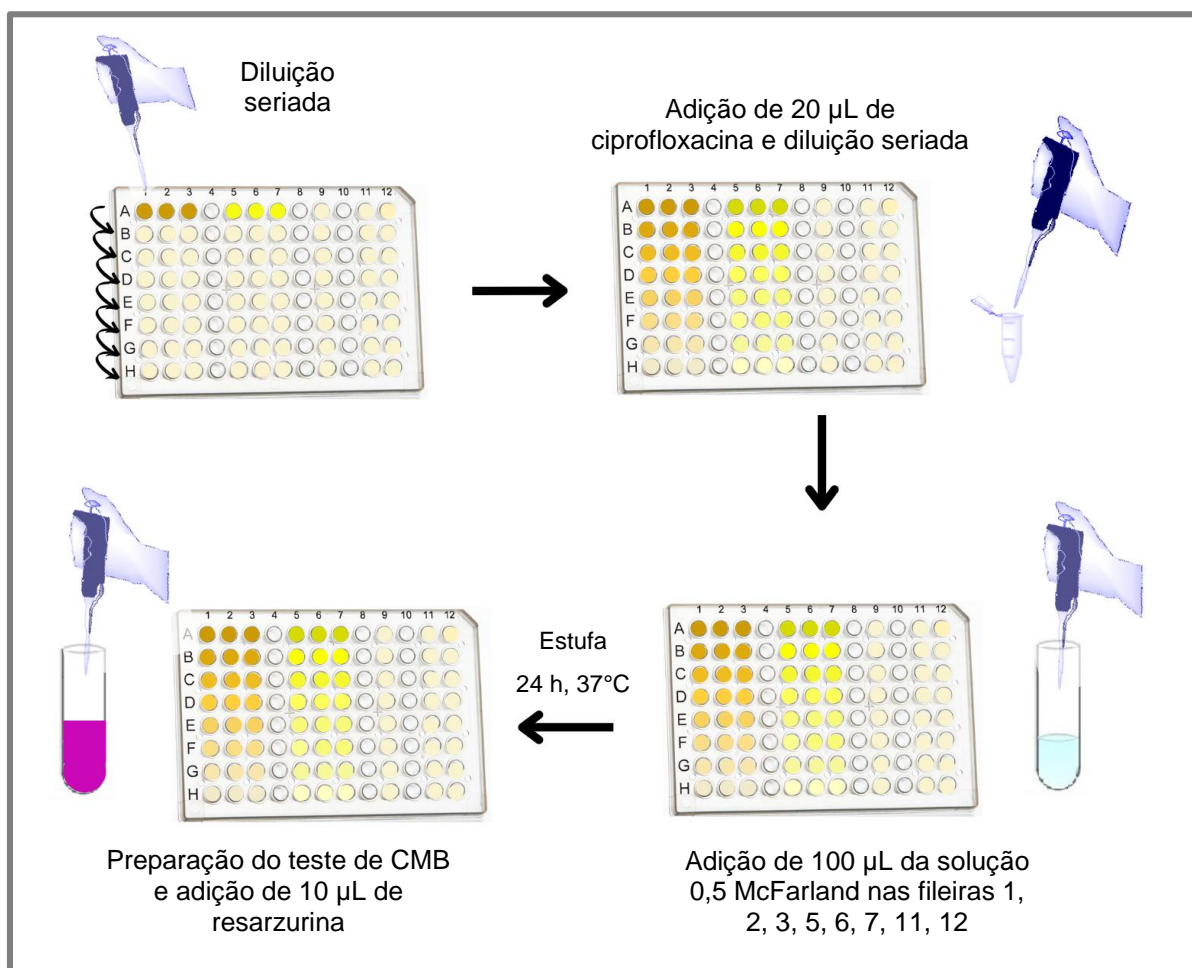


**Figura 34.** Sequência de preparação da placa de CMI.

As substâncias testadas **1(a-g)** foram preparadas diluindo-se 2,5 mg de cada composto em 250 µL de DMSO, usando-se o vórtex e obteve-se uma solução com concentração de 10 mg/mL. Em seguida, 20 µL do composto **1a** diluído foram colocados nos poços 1A, 2A e 3A, tendo como concentração final no primeiro poço 512 µg/mL. Após, realizou-se uma diluição seriada transferindo 100 µL dos poços 1A, 2A e 3A para os poços 1B, 2B e 3B, repetindo o procedimento sucessivamente até a linha H, descartando os últimos 100 µL, dessa forma a concentração nos poços variou de 512 µg/mL a 4 µg/mL. Para o composto **1b**, o procedimento foi repetido nos poços 5A, 6A e 7A (Figura 34).

No poço 12A, foram colocados 20 µL do controle, uma solução de ciprofloxacina (cipro B). A ciprofloxacina foi preparada previamente partindo de uma solução estoque, denominada cipro A, onde tem-se 1 mg de ciprofloxacina em 1.000 µL de DMSO. A obtenção da cipro B, foi feita retirando uma alíquota de 80 µL e adicionada à um tubo contendo 420 µL de DMSO, onde a concentração final obtida foi de 16 µg/mL. Dessa solução foram transferidos 20 µL para o poço A. Após, realizou-se uma diluição seriada transferindo 100 µL do poço 12A para o poço 12B e

assim sucessivamente para os poços de 12C-H, descartando-se os últimos 100  $\mu\text{L}$  (Figura 35). A concentração da substância controle variou de 8  $\mu\text{g/mL}$  à 0,0625  $\mu\text{g/mL}$ .



**Figura 35.** Sequência do procedimento de diluição e adição de bactéria.

Nas colunas 1, 2, 3, 5, 6, 7, 11 e 12 foram aplicados 100  $\mu\text{L}$  do inóculo. Em seguida, a placa foi levada à estufa, a 37 °C, por 24 h. Após esse período, antes de se aplicar 10  $\mu\text{L}$  de resazurina diluída com concentração de 0,1 mg/mL em cada poço e se levar novamente à estufa por 1 h, preparou-se a placa para o protocolo de concentração mínima bactericida como segue no tópico 4.3.2 (Figura 35).

#### 4.3.2 Concentração Mínima Bactericida (CMB)

Para a avaliação da CMB, utilizou-se uma placa de Petri contendo ágar TSA, para cada fármaco a ser testado. A placa foi dividida em 9 partes e em cada uma anotou-se a diluição correspondente. Foram aplicados 10  $\mu\text{L}$  no campo referente à diluição anotada (de acordo com aquelas analisadas na CMI) e a placa foi levada à

estufa, à 37°C, por 24 h. Após esse intervalo, observou-se se houve ou não crescimento bacteriano e qual a concentração correspondente.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS

#### 5.1.1 Síntese dos derivados 7-aryl-2,3,6,7-tetra-hidro-5H-imidazo[1,2-c]pirazolo[4,3-e]pirimidin-5-tionas 1(a-g)

##### 5.1.1.1 Primeira etapa: Síntese das matérias-primas 5-amino-1-aryl-1H-pirazol-4-carbonitrilas 3(a-g)

As matérias-primas 5-amino-1-aryl-1H-pirazol-4-carbonitrilas **3(a-g)** foram sintetizadas a partir da reação de cloridatos de arilhidrazina **4(a-g)**, acetato de sódio em etanol, seguida por adição de etoximetilenomalononitrila, conforme metodologia apresentada no item 4.1.1.1. Os derivados obtidos estão apresentados na Figura 36.

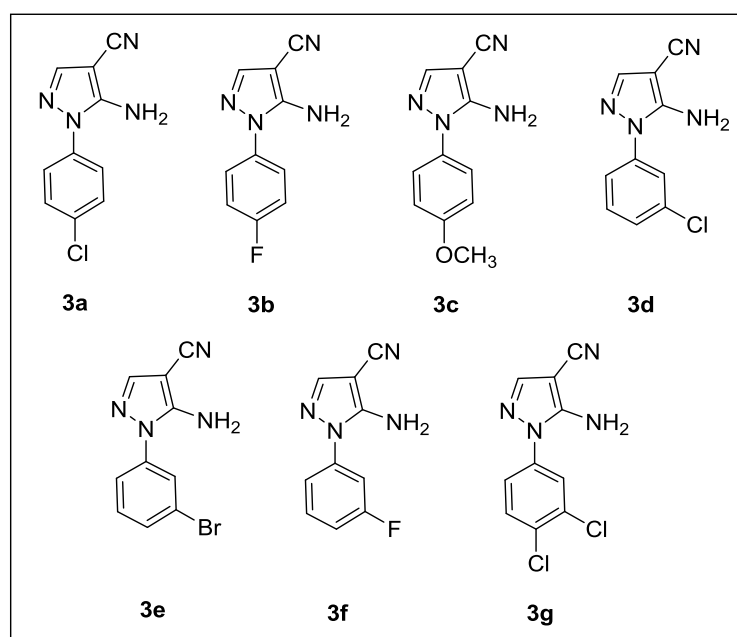
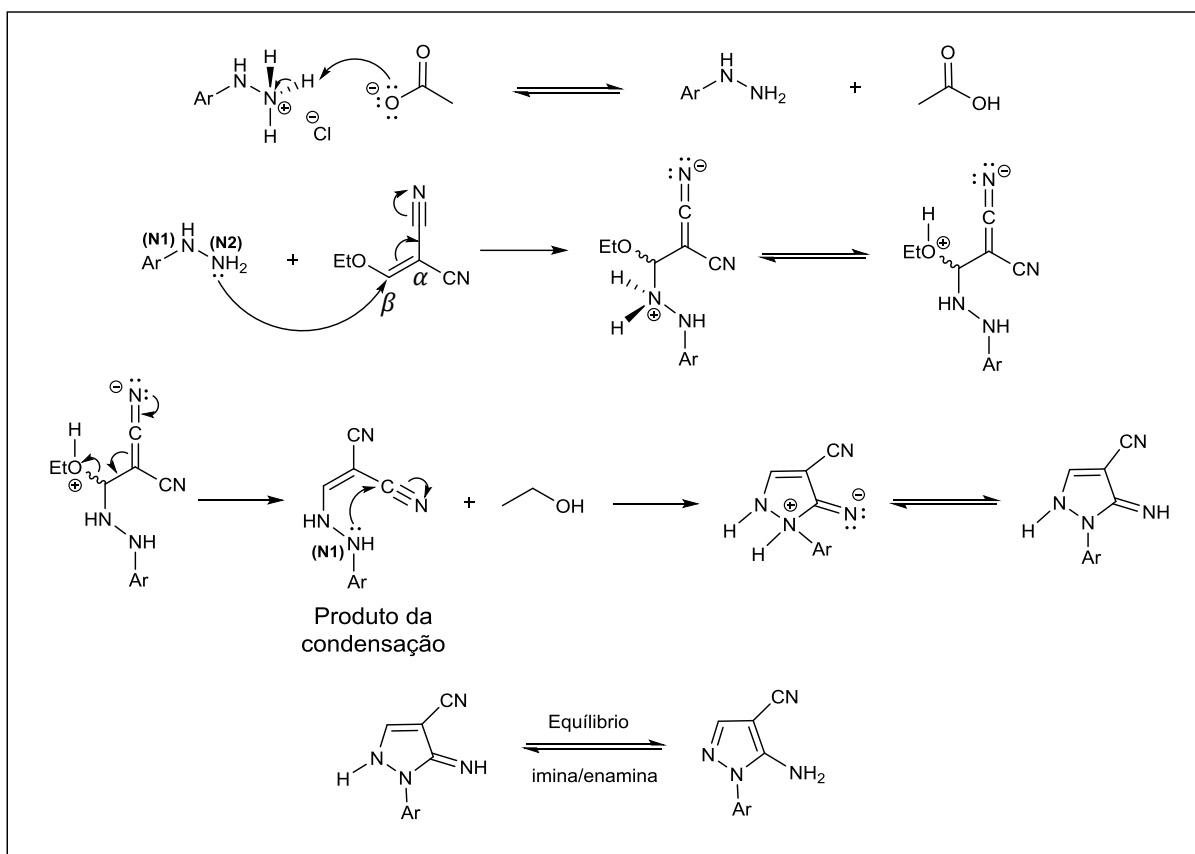


Figura 36. Representações estruturais das matérias-primas **3(a-g)**.

O mecanismo proposto para a reação de obtenção dos derivados **3(a-g)** ocorre em várias etapas. Inicialmente acontece a desprotonação do cloridrato de arilhidrazina pelo acetato de sódio, gerando ácido etanoico (ácido acético) e arilhidrazina. Em seguida, ao adicionar o etoximetilenomalononitrila ao sistema, ocorre uma reação de

adição tipo Michael, onde o par de elétrons do nitrogênio (N2) da arilhidrazina adiciona ao carbono  $\beta$  do etoximetilenomalononitrila e, após equilíbrio ácido-base, seguido de eliminação de etanol, tem-se a adição nucleofílica do par de elétrons não-ligante do nitrogênio (N1) a um carbono de um dos grupos ciano, promovendo a ciclização. Por fim, o pirazol é gerado a partir de um tautomerismo imina/enamina, sendo que a forma enamina é favorecida uma vez que forma o sistema aromático (Esquema 10) (DOS SANTOS, 2009).



**Esquema 10.** Mecanismo de obtenção das matérias-primas **3(a-g)**.

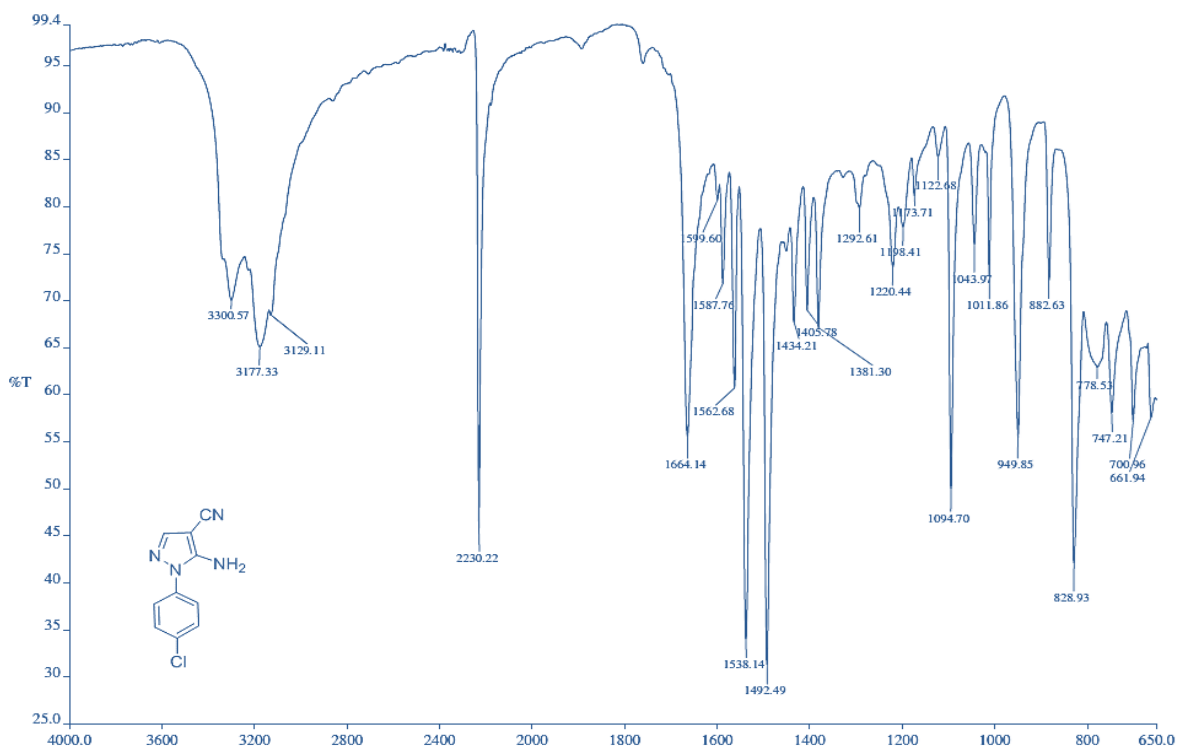
Os rendimentos e as faixas de fusão das matérias-primas **3(a-g)** estão na Tabela 2. Os derivados foram obtidos com rendimentos de 47-71%, os quais podem ser considerados regulares a bons. As faixas de fusão variaram de 1 a 4 °C.

**Tabela 2.** Rendimentos e faixas de fusão dos compostos **3(a-g)**.

Derivado	R	Rendimento (%)	Faixas de Fusão (°C)	
			Experimental	Literatura
<b>3a</b>	4-Cl	60	180 – 182	167 – 167,5 <sup>a</sup> / 168 – 170 <sup>b</sup>
<b>3b</b>	4-F	55	183 – 184	183 – 185 <sup>b</sup> / 172 – 173 <sup>c</sup>
<b>3c</b>	4-OCH <sub>3</sub>	52	128 – 132	128 – 131 <sup>c</sup> / 135 – 136 <sup>d</sup>
<b>3d</b>	3-Cl	65	160 – 164	164 – 165 <sup>c</sup> /181-182 <sup>d</sup>
<b>3e</b>	3-Br	71	191 – 193	175 – 176 <sup>c</sup> / 180 – 182 <sup>d</sup>
<b>3f</b>	3-F	55	160 – 164	157– 158 <sup>d</sup>
<b>3g</b>	3,4-diCl	47	188 – 189	Não consta na literatura

CHENG, 1956<sup>a</sup>, HARDEN *et al.*, 1991<sup>b</sup>, FAIÕES *et al.*, 2014<sup>c</sup>, DOS SANTOS, 2009<sup>d</sup>

As matérias-primas **3(a-g)** foram analisadas a partir da Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR). Para o derivado **3a** (Figura 37) evidenciou-se a presença de bandas em 3300 cm<sup>-1</sup> e 3177 cm<sup>-1</sup> relativas aos estiramentos assimétrico ( $\nu_{as}$ ) e simétrico ( $\nu_s$ ), respectivamente, do grupo amino. A banda em 1664 cm<sup>-1</sup> é associada à deformação angular do grupo amino, confirmando assim sua presença no composto. Em 2230 cm<sup>-1</sup> pode-se identificar a banda referente ao estiramento da ligação C≡N. As bandas entre 1599 e 1434 cm<sup>-1</sup> são relativas aos estiramentos das ligações C=N e C=C dos anéis aromáticos. A banda em 3129 cm<sup>-1</sup> é associada aos estiramentos da ligação C-H (Csp<sup>2</sup>).



**Figura 37.** Espectro de absorção no infravermelho do derivado **3a**.

Para os demais derivados, os espectros mostraram similaridades em relação ao composto **3a**. As principais absorções estão apresentadas na Tabela 3. Os espectros encontram-se no Anexo A – Espectros 1-7.

**Tabela 3.** Principais absorções na região do Infravermelho para os derivados **3(a-g)**.

Grupos/ Ligação química		NH <sub>2</sub>	C - H (sp <sup>2</sup> )	C ≡ N	NH <sub>2</sub>	C = C/ C = N
Movimentos vibracionais		v	v	v	δ	v
<b>3a</b>	4-Cl	3301 – 3177	3129	2230	1664	1600 – 1434
<b>3b</b>	4-F	3300 – 3181	3129	2227	1664	1607 – 1438
<b>3c</b>	4-OCH <sub>3</sub>	3355 – 3166	3118 – 3000	2217	1662	1614 – 1445
<b>3d</b>	3-Cl	3456 – 3190	3130 – 3079	2239	1638	1594 – 1444
<b>3e</b>	3-Br	3455 – 3183	3126 – 3071	2241	1637	1591 – 1442
<b>3f</b>	3-F	3316 – 3230	3191	2221	1655	1614 – 1439
<b>3g</b>	3,4-diCl	3334 – 3201	3123 – 3068	2229	1655	1599 – 1477

#### 5.1.1.2 Segunda etapa: Síntese dos intermediários-chave 5-amino-1-aryl-4-(4,5-dihidro-1H-imidazol-2-il)-1H-pirazóis **2(a-g)**

Os intermediários-chave 5-amino-1-aryl-4-(4,5-dihidro-1H-imidazol-2-il)-1H-pirazóis **2(a-g)** foram sintetizados a partir da reação entre os derivados **3(a-g)**,

etilenodiamina e dissulfeto de carbono, conforme descrito no item 4.1.1.2. Os produtos obtidos são apresentados na Figura 38.

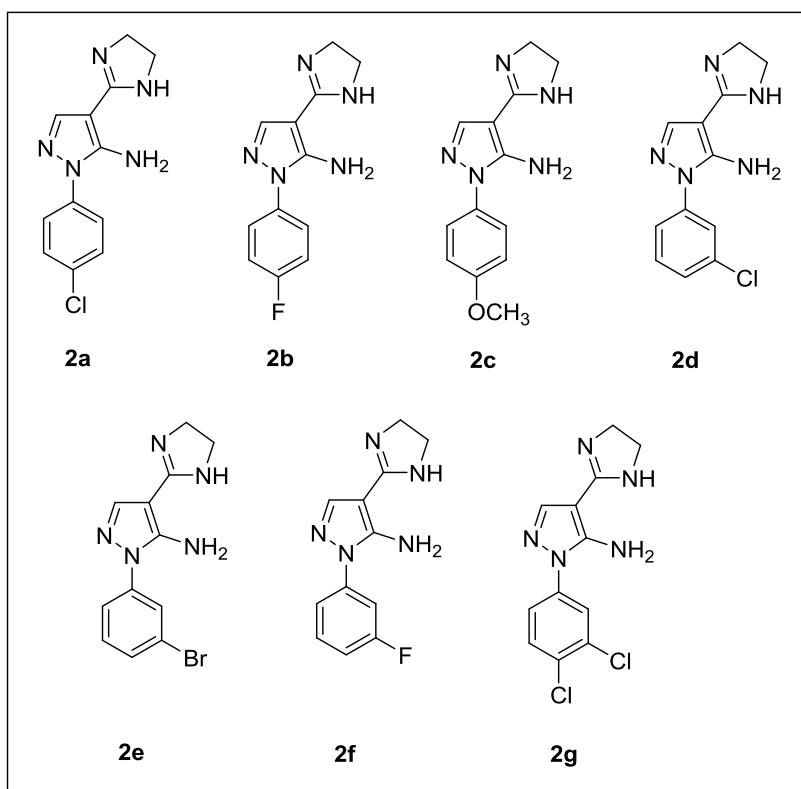


Figura 38. Representações estruturais dos derivados **2(a-g)**.

Os rendimentos e as faixas de fusão dos intermediários **2(a-g)** estão organizados na Tabela 4. Os derivados foram obtidos com uma faixa de rendimento de 24-88% e a faixa de fusão variou de 2 a 5°C.

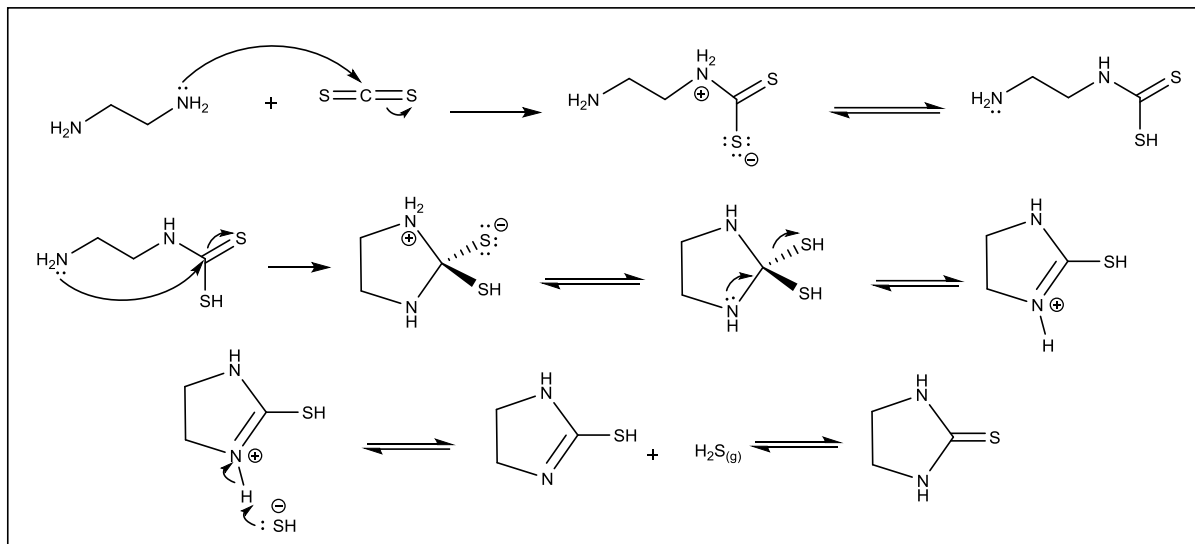
Tabela 4. Rendimentos e faixas de fusão dos compostos **2(a-g)**.

Derivado	R	Rendimento (%)	Faixas de Fusão (°C)	
			Experimental	Literatura
<b>2a</b>	4-Cl	76	197 – 200	179 – 181 <sup>a</sup>
<b>2b</b>	4-F	24	168 – 171	164 – 166 <sup>a</sup>
<b>2c</b>	4-OCH <sub>3</sub>	66	184 – 186	171 – 173 <sup>a</sup>
<b>2d</b>	3-Cl	88	162 – 165	160 – 162 <sup>a</sup>
<b>2e</b>	3-Br	79	86 – 91	88 – 92 <sup>a</sup>
<b>2f</b>	3-F	50	170 – 173	164 – 166 <sup>a</sup>
<b>2g</b>	3,4-diCl	67	231 – 235	197 – 199 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>Rosa *et al.*, 2019.

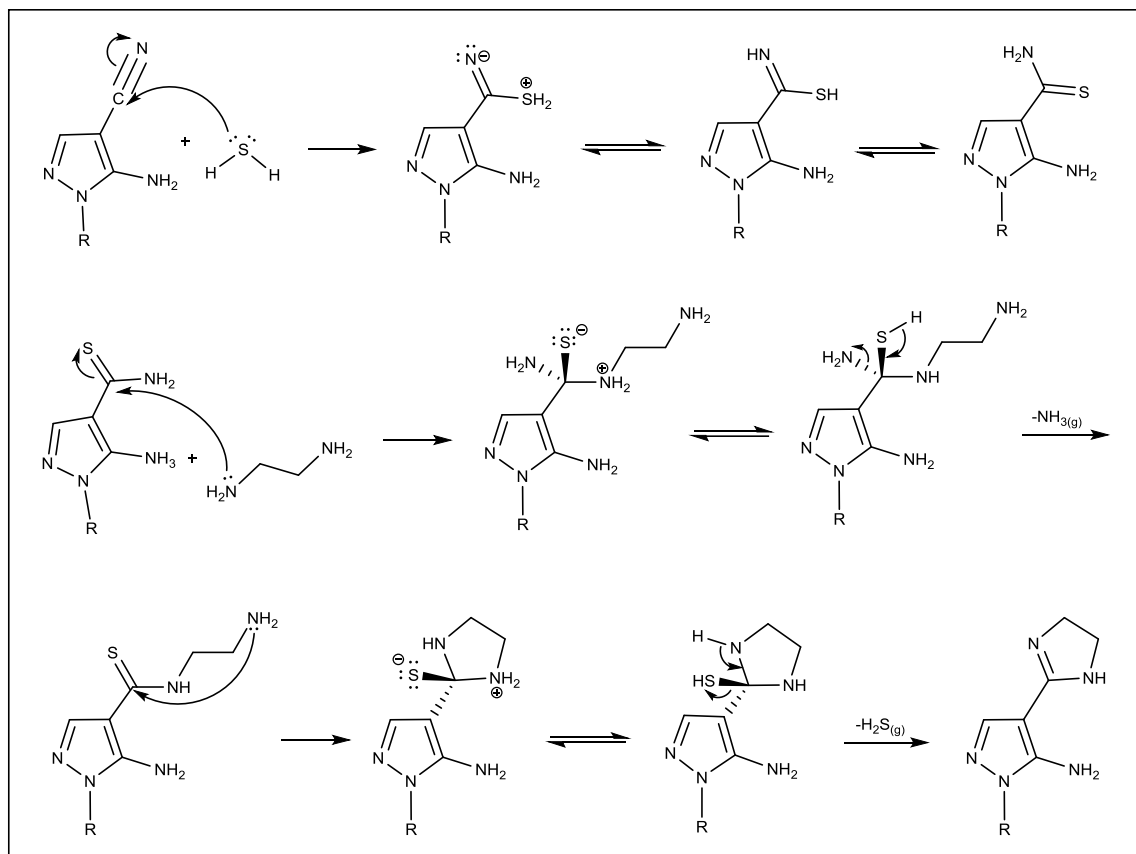
O mecanismo proposto para a obtenção dos derivados **2(a-g)** é dividido em várias etapas. Inicialmente um dos átomos de nitrogênio da etilenodiamina faz uma adição nucleofílica ao carbono do dissulfeto. Após, há um tautomerismo prototrópico

seguido de um ataque nucleofílico, o qual leva a ciclização do sistema. Novamente ocorre um tautomerismo prototrópico e eliminação do sulfeto de hidrogênio (Esquema 11) (FERREIRA, 2020).



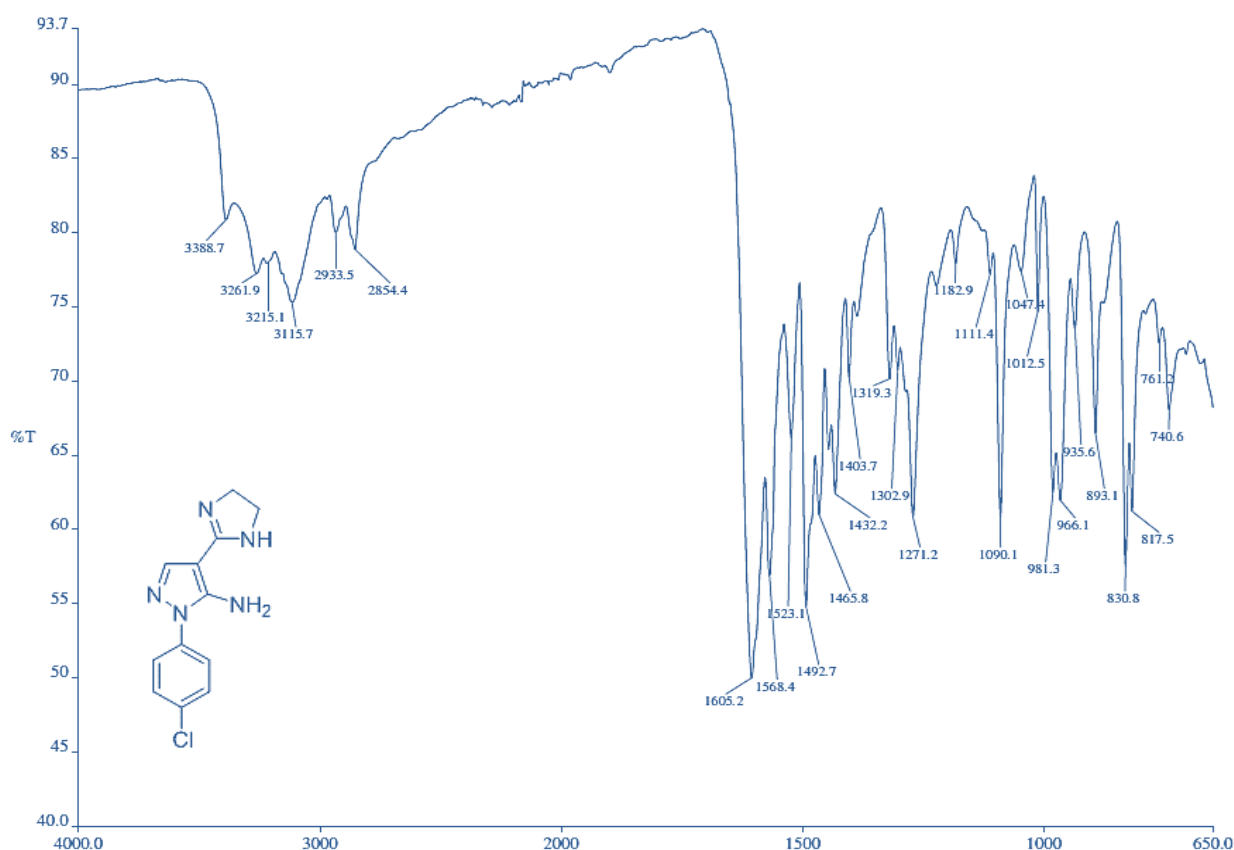
**Esquema 11.** Mecanismo de formação do sulfeto de hidrogênio.

O sulfeto de hidrogênio formado na primeira etapa realiza um ataque nucleofílico ao carbono do grupo nitrila da matéria-prima **3(a-g)**. Após, ocorre um equilíbrio ácido-base seguido de equilíbrio imina/tioamida, que leva à formação do intermediário tioamida. Em seguida, a etilendiamina faz uma adição nucleofílica ao carbono da tioamida. Posteriormente, um tautomerismo prototrópico ocorre e amônia é liberada. Na última etapa, há a ciclização do sistema que, após um tautomerismo prototrópico, forma o produto e libera sulfeto de hidrogênio (Esquema 12) (FERREIRA, 2020).



**Esquema 12.** Mecanismo de obtenção dos intermediários-chave **2(a-g)**.

Os intermediários-chave **2(a-g)** foram analisados a partir da Espectroscopia na região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR). Para o derivado **2a** (Figura 39) a principal evidência de reação é a ausência da banda em  $2230\text{ cm}^{-1}$ . Evidenciou-se a presença de bandas em  $3388\text{ cm}^{-1}$  a  $3115\text{ cm}^{-1}$  as quais são associadas aos estiramentos das ligações N-H. A banda em  $1605\text{ cm}^{-1}$  é relativa à deformação axial C=N do anel imidazólico. Entre  $1568$  e  $1432\text{ cm}^{-1}$  tem-se bandas referentes aos estiramentos das ligações C=N e C=C dos anéis aromáticos. As bandas em  $2933$  e  $2854\text{ cm}^{-1}$  são relativas aos estiramentos das ligações C-H ( $\text{Csp}^3$ ) e são associadas à formação do anel imidazolina. As bandas próximas a  $1600\text{ cm}^{-1}$  são referentes ao estiramento da ligação C=N do anel imidazolina.



**Figura 39.** Espectro de absorção no infravermelho do intermediário **2a**.

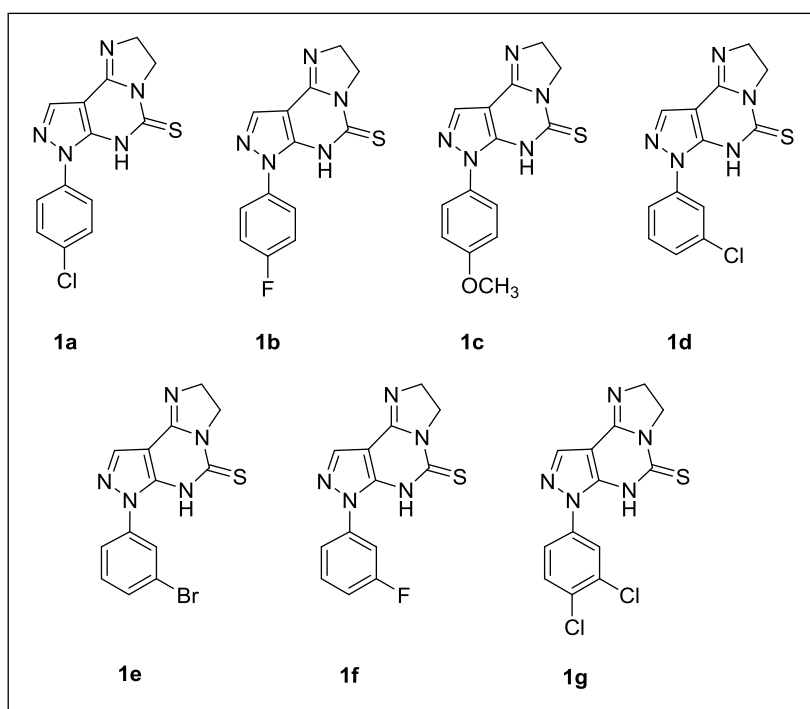
Os demais derivados apresentaram bandas com valores análogos aos do composto **2a** e as principais absorções estão apresentadas na tabela 5. Os espectros encontram-se no Anexo B – Espectros 8-14.

**Tabela 5.** Principais absorções na região do Infravermelho para os derivados **2(a-g)**.

Grupos/ Ligação química	NH / NH <sub>2</sub>	C-H (sp <sup>3</sup> )	C=N	C=C/C=N
Movimentos vibracionais	$\nu$	$\nu$	$\nu$ imidazolina	$\nu$
<b>2a</b> 4-Cl	3389 – 3116	2933 – 2854	1605	1568 – 1432
<b>2b</b> 4-F	3361 – 3259	2943 – 2873	1600	1561 – 1433
<b>2c</b> 4-OCH <sub>3</sub>	3326 – 3252	2936 – 2867	1600	1560 – 1442
<b>2d</b> 3-Cl	3382 – 3161	2924 – 2877	1609	1594 – 1433
<b>2e</b> 3-Br	3392 – 3164	2928 – 2872	1609	1588 – 1443
<b>2f</b> 3-F	3370 – 3114	2935 – 2862	1601	1567 – 1445
<b>2g</b> 3,4-diCl	3418 – 3253	2945 – 2873	1612	1596 – 1428

### 5.1.1.3 Síntese dos derivados 7-aryl-2,3,6,7-tetra-hidro-5H-imidazo[1,2-c]pirazolo[4,3-e]pirimidin-5-tionas **1(a-g)**

Os produtos finais **1(a-g)** estão representados na Figura 40. A metodologia empregada para a obtenção de tais derivados baseia-se na reação dos intermediários **2(a-g)** e dissulfeto de carbono, em piridina, como descrito no item 4.1.2.3.



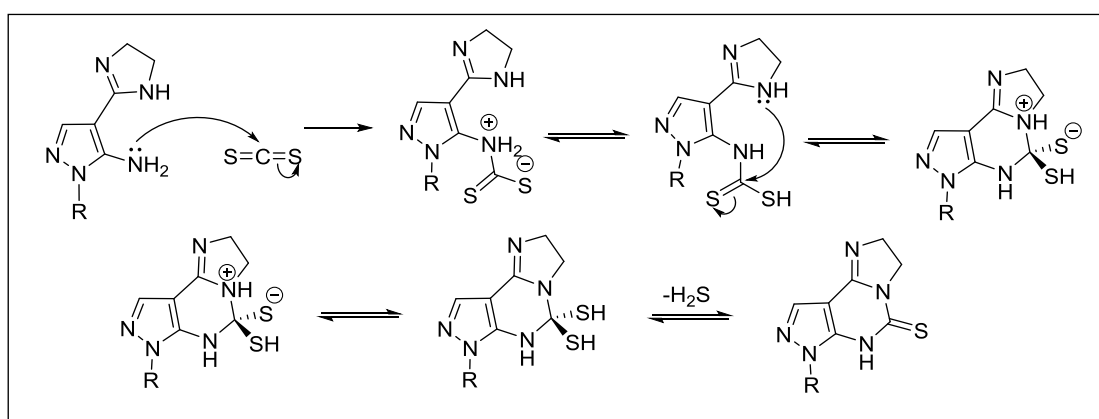
**Figura 40.** Representações estruturais dos produtos finais **1(a-g)**.

Os rendimentos e os pontos de fusão dos produtos finais **1(a-g)** estão organizados na Tabela 6. Os rendimentos variaram de 31-91%. Não foi possível determinar o ponto de fusão dos derivados **1(a,b,d-g)** porque a temperatura máxima atingida pelo equipamento é de 350°C e mesmo nessa temperatura não foram observadas variações no aspecto do sólido. Determinou-se a faixa de fusão de **1c** (308 - 310°C) entretanto, como o composto é inédito, não há dados apresentados na literatura.

**Tabela 6.** Rendimentos e faixas de fusão dos derivados finais **1(a-g)**.

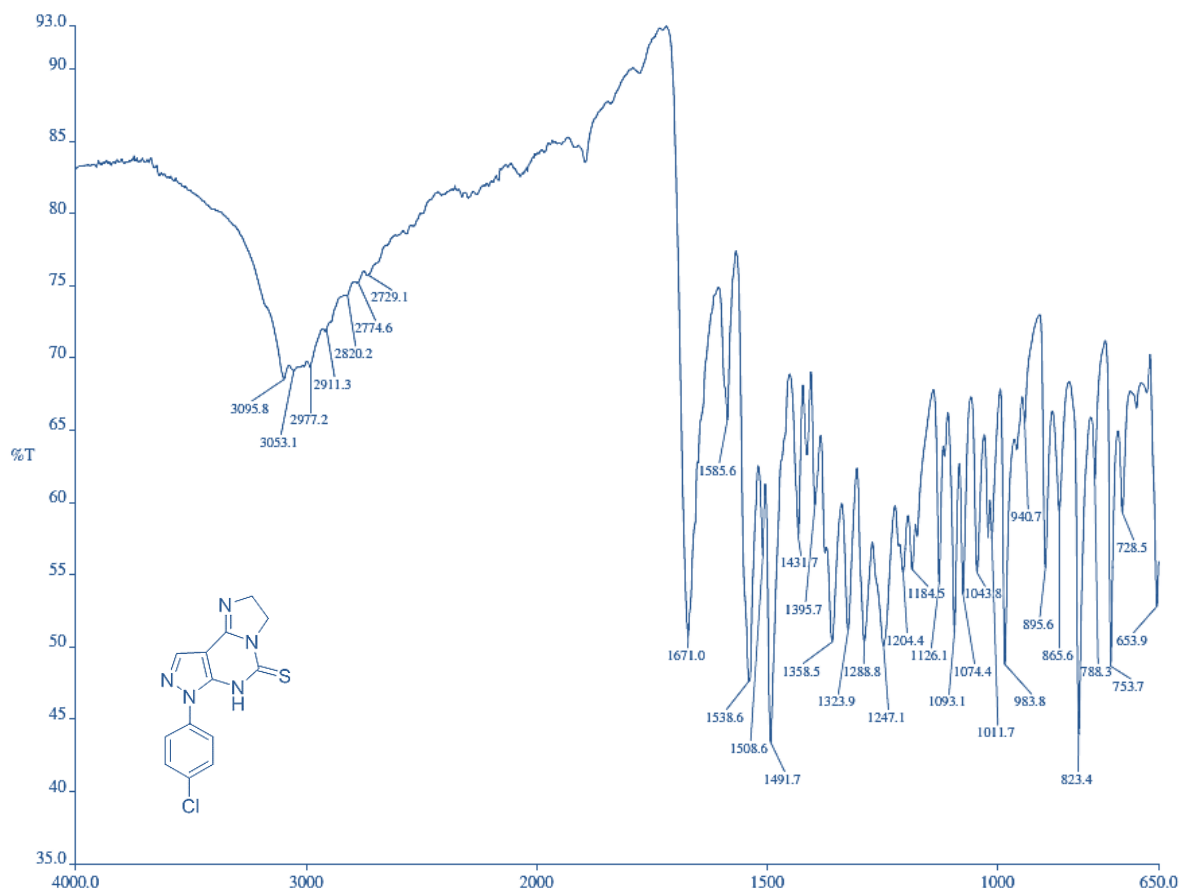
Derivado	R	Rendimento (%)	Faixa de Fusão (°C)	
			Experimental	Literatura
<b>1a</b>	4-Cl	32	ND	Inédito
<b>1b</b>	4-F	31	ND	Inédito
<b>1c</b>	4-OCH <sub>3</sub>	91	308-310	Inédito
<b>1d</b>	3-Cl	37	ND	Inédito
<b>1e</b>	3-Br	60	ND	Inédito
<b>1f</b>	3-F	33	ND	Inédito
<b>1g</b>	3,4-diCl	70	ND	Inédito

O mecanismo proposto (Esquema 13) para a reação baseia-se na adição nucleofílica do nitrogênio ao carbono do dissulfeto. Em seguida, ocorre um tautomerismo prototrópico, seguido de um ataque nucleofílico do nitrogênio imidazolinico ao átomo de carbono da tiocarbonila, levando à ciclização do composto. Após uma sequência de tautomerismos prototrópicos, ocorre a liberação de dissulfeto de hidrogênio, ocasionando a formação do produto. É importante ressaltar que não há publicação sobre o mecanismo em questão. A proposta foi baseada no fato da amina primária em geral ser mais reativa. Contudo, análises computacionais seriam uma importante ferramenta para confirmar o mecanismo proposto.

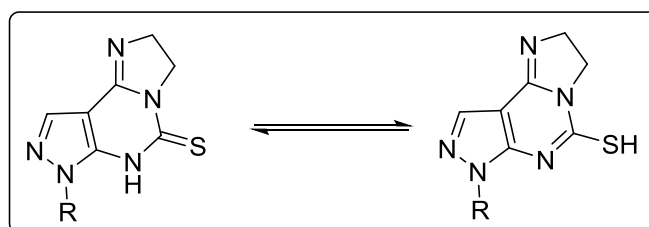
**Esquema 13.** Mecanismo proposto para obtenção dos derivados **1(a-g)**.

Os produtos finais **1(a-g)** foram analisados a partir da Espectroscopia na região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR). Para o derivado **1a** (Figura 41), observou-se a banda em 1671 cm<sup>-1</sup> que pode ser atribuída a ligação C=N do anel imidazolinico. Além disso, as bandas na região entre 2977-2779 cm<sup>-1</sup> confirmam a presença de ligações C-H (Csp<sup>3</sup>). As bandas entre 1585 e 1431 cm<sup>-1</sup> são referentes

aos estiramentos das ligações C=N e C=C dos anéis aromáticos. Bandas associadas aos estiramentos da ligação C=S foram identificadas na região de 1247 e 1093  $\text{cm}^{-1}$ . A presença de bandas na região próxima a 2700  $\text{cm}^{-1}$  são associadas aos estiramentos da ligação S-H, indicando a possibilidade de tautomerismo (Figura 42).



**Figura 41.** Espectro de absorção no infravermelho do derivado **1a**.



**Figura 42.** Tautomerismo presente nos compostos **1(a-g)**.

Para os demais derivados **1(b-g)** foram observadas bandas com valores semelhantes aos do derivado **1a**, as quais estão apresentadas na Tabela 7. Os espectros encontram-se no Anexo C – Espectros 15-21.

**Tabela 7.** Principais absorções na região do Infravermelho para os derivados finais **1(a-g)**.

Grupos/ Ligação química	C-H (sp <sup>3</sup> )	C=S	N-C=S	C=N	C=C/C=N	
Movimentos vibracionais	v	v	v	v imidazolina	v	
<b>1a</b>	4-Cl	2977 – 2775	1247	1093	1671	1586 – 1432
<b>1b</b>	4-F	2966 – 2785	1235	1082	1671	1544 – 1440
<b>1c</b>	4-OCH <sub>3</sub>	2992 – 2770	1243	1083	1667	1592 – 1441
<b>1d</b>	3-Cl	2921 – 2886	1246	1082	1673	1576 – 1436
<b>1e</b>	3-Br	2963 – 2788	1244	1075	1668	1590 – 1450
<b>1f</b>	3-F	2967 – 2785	1246	1093	1672	1611 – 1453
<b>1g</b>	3,4-diCl	2968 – 2790	1255	1087	1680	1589 – 1433

As análises por Espectrometria de Massas de Alta Resolução (HRMS) dos derivados **1(a-g)** mostraram que as massas encontradas estão condizentes com os valores teóricos, com erros na faixa de 0 a 2,8 ppm (Tabela 8), os quais foram calculados empregando a equação 1, onde  $V_t$  = Valor teórico e  $V_{exp}$  = Valor experimental.

$$E = \frac{V_t - V_{exp}}{V_t} \times 100\% \quad \text{Eq. 1}$$

Todos os espectros obtidos estão no Anexo D – Espectros 22-28, sendo esses resultados resumidos na Tabela 8.

**Tabela 8.** Dados da espectrometria de massas para os derivados **1(a-g)**.

Derivado	R	$m/z$ experimental [M+H] <sup>+</sup>	$m/z$ teórico [M+H] <sup>+</sup>	Erro (ppm)	$m/z$ experimental [M+Na] <sup>+</sup>	$m/z$ teórico [M+Na] <sup>+</sup>	Erro (ppm)
<b>1a</b>	4-Cl	304,0418	304,0424	2,0	326,0236	326,0243	2,1
<b>1b</b>	4-F	288,0727	288,0719	2,8	310,0547	310,0539	2,6
<b>1c</b>	4-OCH <sub>3</sub>	300,0913	300,0919	2,0	322,0733	322,0739	1,9
<b>1d</b>	3-Cl	304,0419	304,0424	1,6	326,0237	326,0243	1,8
<b>1e</b>	3-Br	349,9891*	349,9998	2,0	371,9711	371,9718**	1,9
<b>1f</b>	3-F	288,0723	288,0719	1,4	310,0542	310,0539	1,0
<b>1g</b>	3,4-diCl	338,0034	338,0034	0	359,9851	359,9853	0,6

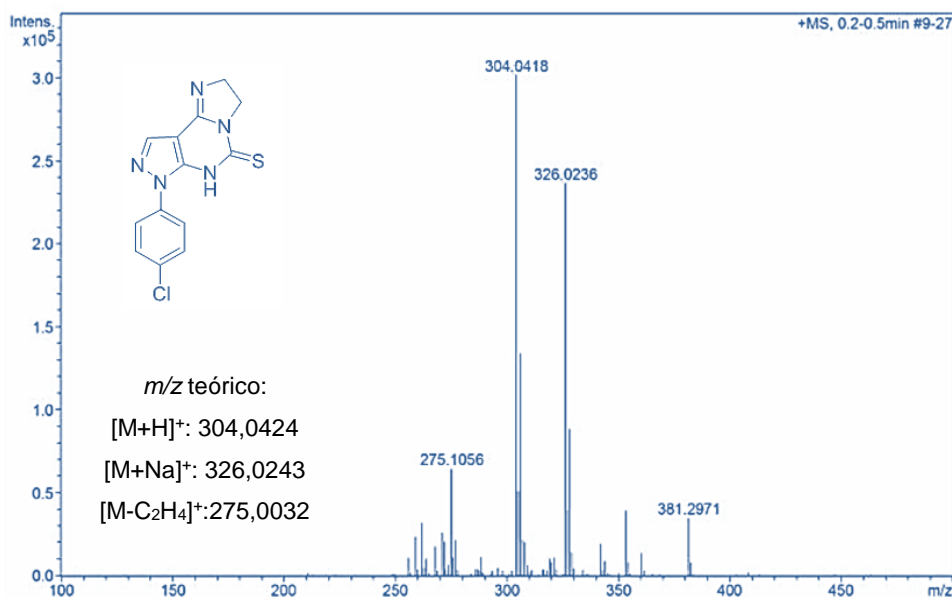
\*Marcado [M+2+H]<sup>+</sup> = 349,9898 (teórico) no espectro. \*\*Marcado [M+2+Na]<sup>+</sup> = 371,9718 (teórico) no espectro.

Para o composto **1a** o pico base detectado é referente à molécula protonada [M+H]<sup>+</sup>, entretanto pode-se observar o pico referente à molécula cationizada com sódio [M+Na]<sup>+</sup>, conforme é apresentado na Figura 43. Para os demais derivados **1(b-g)** ambos os picos [M+H]<sup>+</sup> e [M+Na]<sup>+</sup> foram observados.

No espectro do composto monoclorado **1a** identificou-se o pico [M+2+H]<sup>+</sup> com intensidade de aproximadamente 1/3 em relação ao pico [M+H]<sup>+</sup>, conforme esperado

para um derivado monoclorado. Tal fato é observado pelo fato do átomo de cloro possuir 2 isótopos,  $^{35}\text{Cl}$  e  $^{37}\text{Cl}$ , com abundância isotópica 75,76% e 24,24%, respectivamente. No caso do composto diclorado **1g**, o pico  $[\text{M}+2+\text{H}]^+$  apresentou intensidade de cerca de 2/3 em relação ao  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , uma vez que possui dois átomos de cloro na sua estrutura.

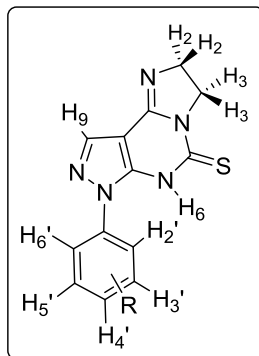
Para o derivado bromado **1e** identificou-se o pico  $[\text{M}+2+\text{H}]^+$  com intensidade de aproximadamente 97% em relação ao pico  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , o que é observado pelo fato da existência dos isótopos  $^{79}\text{Br}$  e  $^{81}\text{Br}$  com 50,69% e 49,31%, de abundância isotópica, respectivamente. Em alguns espectros também foi possível observar picos referentes à impurezas contidas no equipamento, tais como: triton (381,2971 e 353,2676) e trifluoroacetato (158,9640) (KELLER, 2008).



**Figura 43.** Espectro de massas do composto **1a**.

### **Análises dos espectros de $^1\text{H}$ -RMN:**

Na Figura 44 está representada a estrutura geral dos derivados **1(a-g)** com os átomos de hidrogênio numerados para facilitar a discussão dos resultados obtidos e os espectros de  $^1\text{H}$ -RMN se encontram no Anexo E – Espectros 29-35. Todos os dados se encontram na tabela 9.



**Figura 44.** Estrutura geral dos derivados **1(a-g)** com os átomos de hidrogênios numerados.

Para os derivados **1(a-c,e,g)** os sinais referentes aos hidrogênios H<sub>2</sub> e H<sub>3</sub> foram identificados na faixa de  $\delta$  3,89 – 3,92 ppm e 4,36 – 4,38 ppm, respectivamente, sendo ambos tripletos. Para os compostos **1d** e **1f** observou-se pseudotripletos e dessa forma a constante de acoplamento foi calculada a partir da média dos valores obtidos. O átomo de hidrogênio do anel pirazólico H<sub>9</sub> gerou um simpleto na faixa de  $\delta$  8,03 à 8,51 ppm, entretanto esse sinal não foi observado para o composto **1f** o que pode ser explicado por uma possível sobreposição de sinais já que a integral mostra a presença de 3 hidrogênios na região, conforme esperado. Para os compostos **1(a, c-e)** foi possível visualizar um sinal alargado referente ao H<sub>6</sub> próximo a  $\delta$  10 ppm.

Para o derivado diclorossustituído **1g**, o simpleto presente em  $\delta$  8,10 ppm é referente ao H<sub>2</sub>'. O duplete observado em  $\delta$  7,80 com  $^3J = 8,85$  é associado ao átomo de hidrogênio H<sub>5</sub>'. Para H<sub>6</sub>' um multipletos pode ser atribuído em  $\delta$  8,21-8,24.

- *Derivados para-substituídos 1a (R=4-Cl), 1b (R=4-F) e 1c (R=4-OCH<sub>3</sub>)*

Para o produto *para*-substituído **1a** identificou-se dois dupletos com  $^3J = 8,9$  Hz, característico de acoplamento orto, referentes aos átomos de hidrogênio do anel benzênico, com  $\delta$  7,60 ppm para H<sub>2</sub>' e H<sub>6</sub>' e  $\delta$  8,22 ppm para H<sub>3</sub>' e H<sub>5</sub>'.

O mesmo padrão foi observado para o derivado *para*-substituído **1c**, com  $\delta$  7,95 ppm para H<sub>3</sub>' e H<sub>5</sub>' com  $^3J = 8,9$  Hz e  $\delta$  7,06 ppm para H<sub>2</sub>' e H<sub>6</sub>' com  $^3J = 8,9$  Hz. No espectro de **1c** ainda foi observado um sinal simpleto, com  $\delta$  3,79 ppm, o qual é associado aos átomos de hidrogênio do grupo metóxi (OCH<sub>3</sub>).

Com relação ao derivado **1b**, ocorre um acoplamento entre os átomos de hidrogênio do anel benzênico com o átomo de flúor, ocasionando uma multiplicidade diferente dos demais compostos *para*-substituídos, apresentando um tripleto com  $\delta$  7,37 ppm e  $^3J = 8,82$  Hz referente aos átomos de hidrogênio H<sub>3</sub>' e H<sub>5</sub>' e um duplete de

dupletos com  $\delta$  8,14 ppm relativo aos átomos de hidrogênio H<sub>2</sub>'/H<sub>6</sub>' com  ${}^3J = 8,9$  e  ${}^4J = 4,9$  Hz, os quais são de  $J$  típicos de acoplamento *orto* e *meta*, respectivamente.

- *Derivados meta*-substituídos **1d** ( $R=3\text{-Cl}$ ), **1e** ( $R=3\text{-Br}$ ) e **1f** ( $R=3\text{-F}$ )

No espectro do derivado *meta*-substituído **1d** foi identificado um simpleto em  $\delta$  8,29 ppm o qual está associado a H<sub>2</sub>'. Os demais sinais se apresentaram multipletos em  $\delta$  7,35 a 7,57 associados a H<sub>5</sub>' e H<sub>6</sub>' e  $\delta$  8,07 a 8,17 referente aos hidrogênios H<sub>2</sub>' e H<sub>4</sub>'.

Para o derivado **1e** identificou-se um multipletos em  $\delta$  7,45-7,50 ppm o qual é referente aos sinais de H<sub>5</sub>' e H<sub>6</sub>'. Para H<sub>4</sub>' pode-se associar o dupletos em  $\delta$  8,20 ppm e com  ${}^3J = 6,7$  Hz. O simpleto em  $\delta$  8,09 é relacionado ao H<sub>2</sub>'.

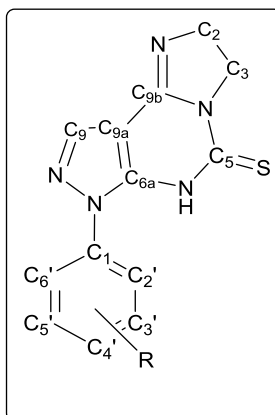
Para o composto **1f** observou-se um multipletos referente a H<sub>5</sub>' com  $\delta$  7,12 – 7,18 ppm. Para os hidrogênios H<sub>2</sub>'/H<sub>6</sub>' e H<sub>9</sub> foi observado um multipletos em  $\delta$  8,03 - 8,11 ppm e para H<sub>4</sub>' um multipletos em 7,52 -7,59.

**Tabela 9.** Dados de RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz ou 400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>,  $\delta$  em ppm,  $J$  em Hz) obtidos para os derivados **1(a-g)**.

Derivado	H <sub>2</sub>	H <sub>3</sub>	H <sub>6</sub>	H <sub>9</sub>	H <sub>2</sub> '	H <sub>3</sub> '	H <sub>4</sub> '	H <sub>5</sub> '	H <sub>6</sub> '
<b>1a</b> 4-Cl	3,92 (t, 9,6)	4,38 (t, 7,19)	10,14 (br)	8,10 (s)	7,60 (d, 8,9)	8,22 (d, 8,9)	-	8,22 (d, 8,9)	7,60 (d, 8,9)
<b>1b</b> 4-F	3,90 (t, 9,7)	4,37 (t, 9,7)	-	8,06 (s)	8,14 (dd, 8,9; 4,9)	7,37 (t, 8,9)	-	7,37 (t, 8,9)	8,14 (dd, 8,9; 4,9)
<b>1c</b> 4-OCH <sub>3</sub>	3,89 (t, 9,5)	4,36 (t, 9,4)	10,05 (br)	8,03 (s)	7,06 (d, 8,9)	7,95 (d, 8,9)	-	7,95 (d, 8,9)	7,06 (d, 8,9)
<b>1d</b> 3-Cl	3,89 (pt, 8,6)	4,36 (pt, 8,6)	10,13 (br)	8,29 (s)	8,07- 8,17 (m)	-	8,07- 8,17 (m)	7,35- 7,57 (m)	7,35-7,57 (m)
<b>1e</b> 3-Br	3,90 (t, 9,6)	4,37 (t, 9,6)	10,13 (br)	8,42 (s)	8,10 (s)	-	8,20 (d, 6,7)	7,45- 7,50 (m)	7,45-7,50 (m)
<b>1f</b> 3-F	3,90 (pt, 8,6)	4,37 (pt, 8,6)	-	8,03- 8,11 (m)	8,03- 8,11 (m)	-	7,52- 7,59 (m)	7,12- 7,18 (m)	8,03-8,11 (m)
<b>1g</b> 3,4-diCl	3,90 (t, 8,8)	4,36 (t, 8,8)	-	8,51 (s)	8,10 (s)	-	-	7,80 (d, 8,8)	8,21-8,24 (m)

### Análises dos espectros de $^{13}\text{C}$ -RMN:

Na Figura 45 está representada a estrutura base dos derivados **1(a-g)** com os átomos de carbono numerados com o objetivo de facilitar a discussão dos resultados obtidos. Os dados das análises de  $^{13}\text{C}$ -RMN dos compostos **1(a-g)** estão organizados na tabela 10 e os espectros se encontram no Anexo F – Espectros 36 - 42.



**Figura 45.** Estrutura geral dos derivados **1(a-g)** com os átomos de carbono numerados.

Os sinais apresentados no espectro com deslocamento entre 42,0 e 42,7 bem como 50,1 e 50,5 ppm são referentes aos átomos de carbono  $\text{C}_2$  e  $\text{C}_3$ , respectivamente. Os sinais referentes aos átomos de carbono do anel benzênico foram identificados na região típica de aromático: 132,0 a 140,5 ( $\text{C}_1'$ ), 107,7 a 122,0 ( $\text{C}_2'$ ), 123,0 a 164,1 ( $\text{C}_3'$ ), 113,0 a 158,2 ( $\text{C}_4'$ ), 123,1 a 131,6 ( $\text{C}_5'$ ) e 114,9 a 122,2 ( $\text{C}_6'$ ).

Os sinais atribuídos à  $\text{C}_{6a}$ ,  $\text{C}_9$  e  $\text{C}_{9a}$  foram observados entre  $\delta$  134,9 a 136,9,  $\delta$  152,2 a 153,2 e  $\delta$  93,2 a 93,8 ppm, respectivamente. O sinal entre  $\delta$  174,9 a 176,0 ppm é associado ao  $\text{C}_5$  e o sinal identificado na faixa de 154,0 a 154,7 ppm é relacionado ao  $\text{C}_{9b}$ . No espectros do derivado fluorado **1f** foram identificados o acoplamento entre os átomos de carbono do anel benzênico e o átomo de flúor:  $^1J$  243,3 Hz ( $\text{C}_4'$ ),  $^2J$  26,7 Hz ( $\text{C}_2'$ ),  $^2J$  21,1 Hz ( $\text{C}_4'$ ),  $^3J$  8,7 Hz ( $\text{C}_5'$ ) para **1f**.

**Tabela 10.** Dados de RMN-<sup>13</sup>C (75 MHz ou 100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ em ppm, *J* em Hz) obtidos para os derivados **1(a-g)**.

Derivado		C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>5</sub>	C <sub>6a</sub>	C <sub>9</sub>	C <sub>9a</sub>	C <sub>9b</sub>	C <sub>1'</sub>	C <sub>2'</sub>	C <sub>3'</sub>	C <sub>4'</sub>	C <sub>5'</sub>	C <sub>6'</sub>
<b>1a</b>	4-Cl	42,0	50,1	175,0	135,4	152,2	93,2	154,0	137,6	122,0	129,1	130,1	129,1	122,0
<b>1b</b>	4-F	42,5	50,5	175,3	135,5	152,7	93,4	154,2	-	116,4	123,2	-	123,1	116,1
<b>1c</b>	4-OCH <sub>3</sub>	42,7	50,5	174,9	134,9	153,2	93,4	-	132,0	114,9	123,1	158,2	123,1	114,9
<b>1d</b>	3-Cl	42,5	50,5	175,6	136,1	152,6	93,8	154,7	140,4	119,2	133,8	126,2	131,3	120,2
<b>1e</b>	3-Br	42,5	50,5	175,6	136,1	152,7	93,7	154,7	140,5	119,6	123,0	129,2	131,6	122,2
<b>1f</b>	3-F	42,5	50,5	175,7	136,0	152,7	93,8	154,7	140,5	107,7 (d 26,7)	162,5 (d 243,3)	113,0 (d 21,1)	131,4 (d 9,2)	116,5
<b>1g</b>	3,4-diCl	42,6	50,5	176,0	136,9	152,8	93,8	154,4	139,3	120,4	131,6	128,7	131,9	122,1

\*também identificado um sinal com δ 56 (OCH<sub>3</sub>).

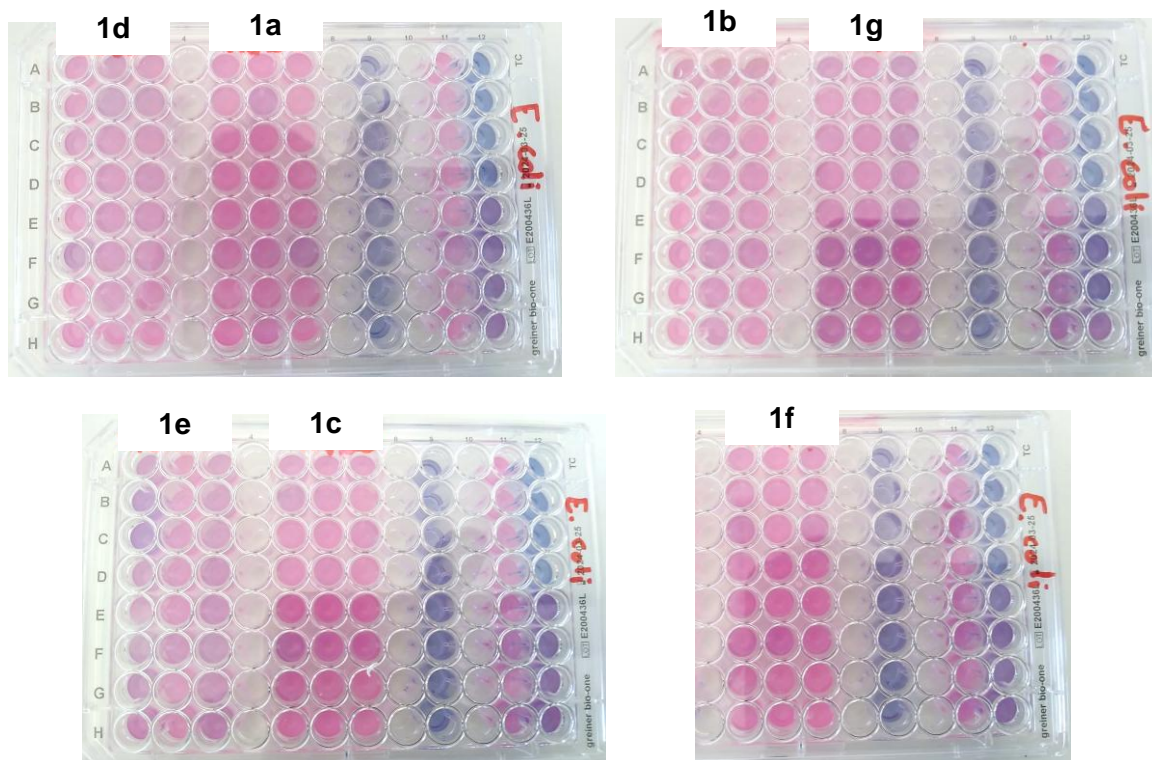
### Análises biológicas:

Os derivados **1(a-g)** foram avaliados quanto a atividade antibacteriana, conforme a metodologia descrita no item 4.3. Observou-se que todos os compostos apresentaram boa solubilidade em dimetilsulfóxido, entretanto para completa solubilização foi necessário o uso de um aparelho vortéx com um tempo variando entre 30 segundos a 3 minutos. Além disso, quando os compostos foram adicionados ao meio de cultivo BHI pode-se constatar pequena turbidez, entretanto não houve precipitação dos derivados estudados.

Para melhorar a solubilidade dos derivados em BHI, inicialmente optou-se por levar a solução do poço A (180 uL de BHI + 20 uL do derivado estudado), ao vórtex, antes de sua adição na placa, para melhor homogeneização. Num primeiro momento também substituiu-se a estufa de cultivo por uma incubadora com agitação e controle de temperatura para que a solução permanecesse homogênea. Em uma segunda análise realizou-se o teste empregando a estufa convencional de crescimento bacteriano e concluiu-se que a homogeneização dos derivados em BHI não influenciava na inibição, visto que o resultado foi semelhante para ambas as metodologias.

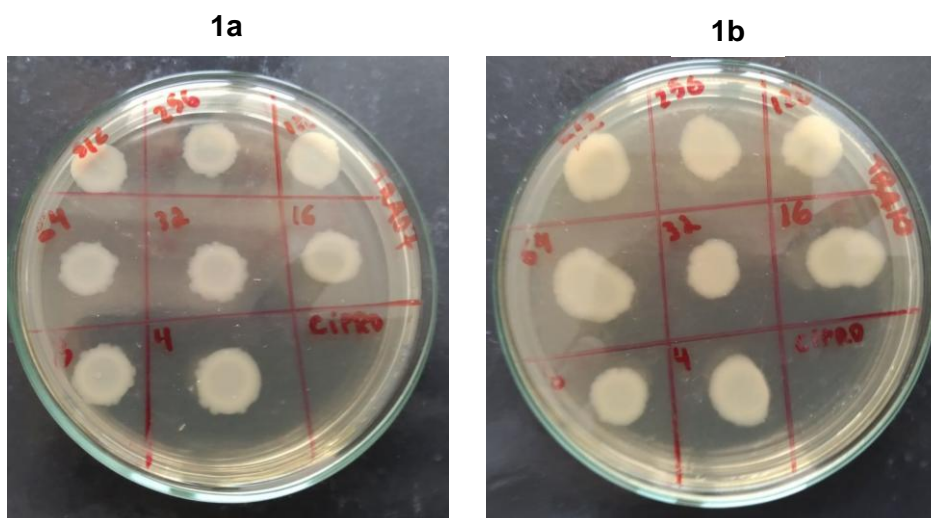
Com os ensaios pode-se concluir que os derivados apresentaram uma CMI superior à 512 mg/mL para a bactéria *E. coli*, uma vez que a coloração rosa foi visualizada após a adição do corante em todos os poços contendo os compostos estudados, o que indica a presença de viabilidade celular bacteriana. Vale destacar que não foram observadas contaminações (coloração azul em toda a coluna 9 que contém apenas BHI), o que é observado quando não há a presença de bactérias com

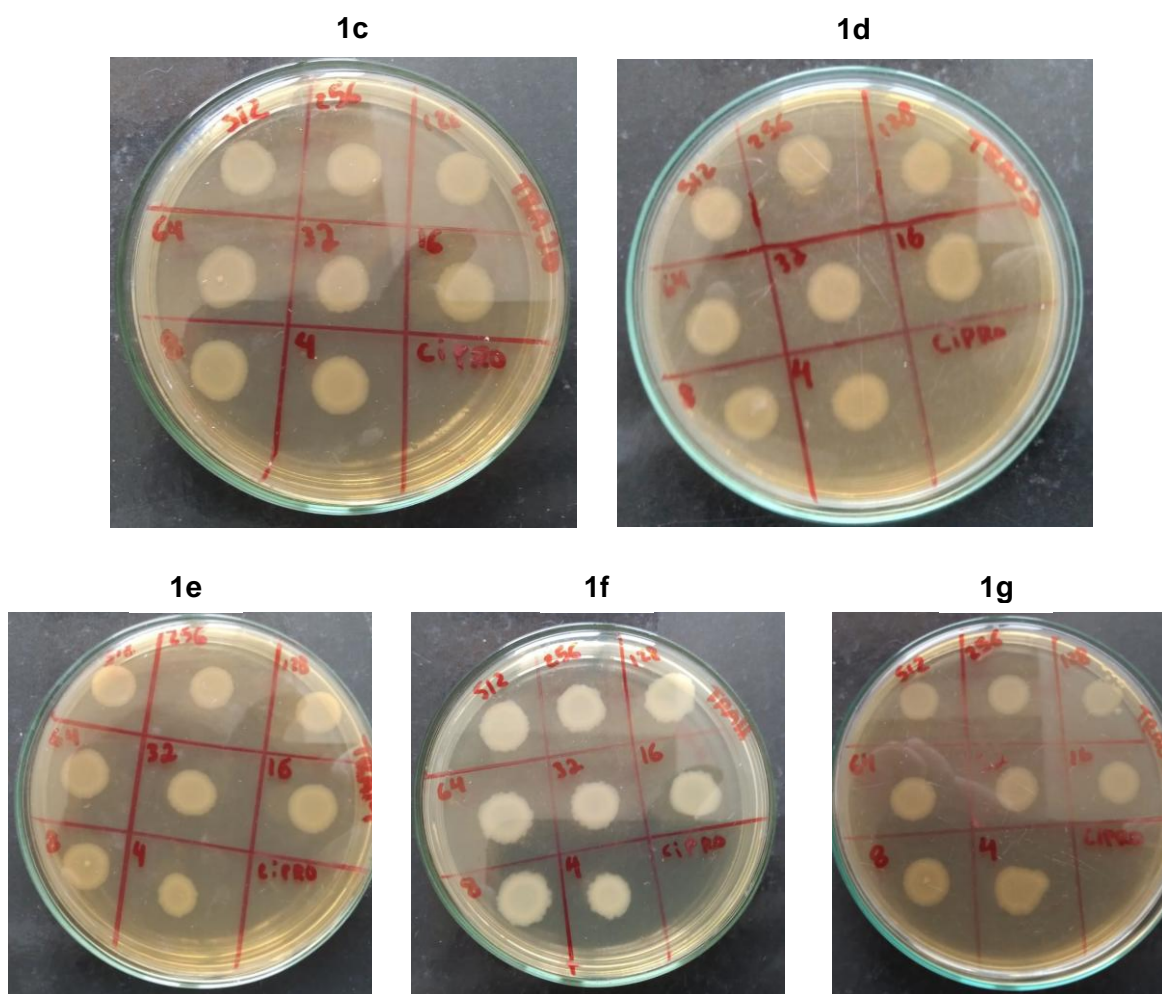
células viáveis e que houve inibição pelo controle empregado (ciprofloxacina) (Figura 46), uma vez que também foi observada a coloração azul. Os testes para as bactérias *S. aureus* (ATCC 25923) e *S. aureus* HU25 estão sendo realizados.



**Figura 46.** Resultados dos ensaios biológicos de CMI para a bactéria *E. coli*.

Também realizou-se os ensaios de CMB e todos os compostos apresentaram um valor maior que 512 mg/mL frente à bactéria *E. coli* (Figura 47). Tais resultados indicam que os derivados não têm ação sobre essas espécies de bactérias.





**Figura 47.** Resultado do ensaio biológico de CMB para a bactéria *E. coli*.

Com os resultados obtidos pode-se observar que inicialmente os compostos não apresentam atividade antibacteriana contra a bactéria *E. coli*. Entretanto procedimentos podem ser feitos com o objetivo de melhorar o potencial biológico através da transformação dos compostos em seus respectivos cloridratos para aumento da solubilidade bem como realizar modificações no anel aromático, adicionando grupos como nitro, metila, diclorados, dibromados ou difluorados, os quais podem levar a uma possível inibição do crescimento bacteriano.

## 6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Foram sintetizados 7 compostos 5-amino-1-aryl-1*H*-pirazol-4-carbonitrilas **3(a-g)** com rendimento na faixa de 47-71% e 7 derivados 5-amino-1-aryl-4-(4,5-di-hidro-1*H*-imidazol-2-il)-1*H*-pirazóis **2(a-g)** com rendimento de 24-88%.

Os 7 produtos finais 7-aryl-2,3,6,7-tetra-hidro-5*H*-imidazo[1,2-*c*]pirazolo[4,3-*e*]pirimidin-5-*tionas* **1(a-g)** foram sintetizados com rendimentos variando de regulares a excelentes, na faixa de 31-91%, sendo todos os derivados sintetizados inéditos. As análises de massas de alta resolução (HMRS) de todos os 7 compostos mostraram que as massas estão condizentes como o esperado. A partir das análises de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foi possível confirmar que as estruturas dos derivados **1(a-g)**.

Os ensaios biológicos de CMI e CMB mostraram que os derivados **1(a-g)** não apresentam ação contra a cepa *E. coli* estudada no presente trabalho. Estudos com as bactérias *S. aureus* (ATCC29523) e *S. aureus* HU25 estão sendo realizados.

Como perspectivas, serão realizados estudos com novos substituintes e novos planejamentos estruturais a fim de investigar a atividade antibacteriana.

## 7 REFERÊNCIAS

AMINOV, R. History of antimicrobial drug discovery: Major classes and health impact. **Biochemistry Pharmacy**, v.133, p.4-19, 2017.

AMR. Turning plans into action for antimicrobial resistance. Working paper 2.0: implementation and coordination. Geneva: World Health Organization; 2019.

ANDRÉ, L. S. P.; PEREIRA, R. F. A.; PINHEIRO, F. R.; PASCOAL, A. C. R. F.; FERREIRA, V. F.; SILVA, F. C.; GONZAGA, D. T. G.; COSTA, D. C. S.; RIBEIRO, T.; SACHS, D.; AGUIAR-ALVES, F. Biological evaluation of selected 1,2,3-triazole derivatives as antibacterial and antibiofilm agents. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v.20, p.2186-2191, 2020.

ANSARI, A.; ALI, A.; SHAMSUZZAMAN, A. M. Review: biologically active pyrazole derivatives. **New Journal Chemistry**, v.41, p.16-41, 2017.

APAYDIN, S.; TÖRÖK, M. Sulfonamide derivatives as multi-target agents for complex diseases. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.29, n.16, p.2042-2050, 2019.

ARWYN-JONES, J.; DE, S. K. Microbiology as applied to surgical practice. **Surgery**, v.37, n.1, p.9-18, 2019.

ASLAM, B.; WANG, W.; ARSHAD, M. I.; KHURSHID, M.; MUZAMMIL, S.; RASOOL M. H.; NISAR, M. A.; ALVI, R. F.; ASLAM, M. A.; QAMAR, M. U.; SALAMAT, M. K. F.; BALOCH, Z. Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. **Infection and Drug Resistance**, v.11, p.1645-1658, 2018.

BEGUM, S.; BEGUM, T.; RAHMAN, N.; KHAN, R. A. A review on antibiotic resistance and way of combating antimicrobial resistance. **GSC Biological and Pharmacy Science**, v.14, n.2, p.87-97, 2021.

BOOTH, S.; LEWIS, R. J. Structural basis for the coordination of cell division with the synthesis of the bacterial cell envelope. **Protein Science**, n.28, v.12, p.2042-2054, 2019.

BROWN, A. W. **Recent developments in the chemistry of pyrazoles**. In: Advances in Heterocyclic Chemistry, v.126, p.55-107, 2018.

CABRELE, C.; REISER, O. The modern face of synthetic heterocyclic chemistry. **The Journal of Organic Chemistry**, v.81, n.21, p.10109-10125, 2016.

CASTRO, P. B. N.; RODRIGUES, D. A. S.; ROESER, H. M.; SANTIAGO, A. F.; AFONSO, R. J. C. F. Antibiotic consumption in developing countries defies global commitments: an overview on Brazilian growth in consumption. **Environmental Science and Pollution Research**, v.27, p.21013-21020, 2020.

Center for Disease Dynamics, Economics & Policy – CDDEP. Disponível em: <https://resistancemap.cddep.org/>, acesso em 06 de fevereiro de 2022.

CHAUDHRY, S. B.; MICHAEL, P. V.; WAGNER, J. L. Cephalosporins: a focus on side chains and  $\beta$ -Lactam cross-reactivity. **Pharmacy**, v.7, n.3, p.1-16, 2019.

CHENG, C. C.; ROBINS, R. K. Synthesis of 1-alkyl and 1-aryl-4-substituted pyrazolo[3,4-d]pyrimidin. **Journal Organic Chemistry**, v.21, p.1240-1256, 1956.

CIABUSCHI, F.; LINDAHL, O. **The Decline of Innovation in the Antibiotics Industry and the Global Threat of Antibiotic Resistance: When Entrepreneurial Efforts are Not Enough**. In: *Entrepreneurship and the Industry Life Cycle*, p.205-229, Springer, 2018.

CUNHA, B. R.; FONSECA, L. P.; CALADO, C. R. C. Antibiotic discovery: where have we come from, where do we go? **Antibiotics**, v.8, n.45, p.1-21, 2019.

DHIMAN, P.; ARORA, N.; THANIKACHALAM, P. V.; MONGA, V. Recent advances in the synthetic and medicinal perspective of quinolones: A review. **Bioorganic Chemistry**, v.92, n.103291, p.1-45, 2019.

DOS SANTOS, M. S. **Planejamento e síntese de derivados azólicos para avaliação das atividades leishmanicida e antibacteriana**. Tese. 368p. Universidade Federal Fluminense, 2009.

DOS SANTOS, M. S.; OLIVEIRA, M. L. V.; BERNARDINO, A. M. R.; DE LÉO, R. M.; AMARAL, V. F.; DE CARVALHO, F. T.; LEON, L. L.; CANTO-CAVALHEIRO, M. M. Synthesis and antileishmanial evaluation of 1-aryl-4-(4,5-dihydro-1H-imidazol-2-yl)-1H-pyrazole derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.21, n.24, p.7451-7454, 2011.

FAIÕES, V. S.; LEON, L. L.; CANTO-CAVALHEIRO, M. M.; TORRES-SANTOS, E. C.; BERNARDINO, A. M. R.; VEGI, P. F.; DOS SANTOS, M. S. Effectiveness of novel 5-(5-amino-1-aryl-1H-pyrazol-4-yl)-1H-tetrazole derivatives against promastigotes and amastigotes of *Leishmania Amazonensis*. **Chemical Biological Drug Design**, v.83, n.3, p.272-277, 2014.

FAIR, R. J.; TOR, Y. Antibiotics and bacterial resistance in the 21st century. **Perspectives in Medicinal Chemistry**, v.6, p.25-64, 2014.

FAISAL, M.; SAEED, A.; HUSSAIN, S.; DAR, P.; LARIK, F. A. Recent developments in synthetic chemistry and biological activities of pyrazole derivatives. **Journal of Chemistry Science**, v.131, n.70, p.1-30, 2019.

FAHMY, H. H.; SROUR, A. M.; ISMAIL, M. A.; KHATER, M. A.; SERRYA, R. A.; EL-MANAWAT, M. A. Design and synthesis of some new tri-substituted pyrazole derivatives as anticancer agents. **Research on Chemical Intermediates**, v.42, p.6881-6892, 2016.

FARGHALY, A.-R.; EL-KASHEF, H. Synthesis of imidazo[1,2-c]pyrazolo[4,3-e]pyrimidines derived from indole and related heterocycles. **Monatshefte für Chemie**, v.137, p.1195-1202, 2006.

FARIA, J. V.; VEGI, P. F.; MIGUITA, A. G. C.; DOS SANTOS, M. S.; BOECHAT, N.; BERNARDINO, A. M. R. Recently reported biological activities of pyrazole compounds. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.25, n.21, p.5891-5903, 2017.

FERREIRA, B. S. **Síntese de sistemas híbridos pirazol-tetrazólicos, pirazol-tiazolínicos e pirazol-carboxamídicos com potencial atividade biológica**. 272p. Dissertação. Universidade Federal de Itajubá, 2020.

FISHER, J. F.; MOBASHERY, S. Constructing and deconstructing the bacterial cell wall. **Protein Science**, v.29, n.3, p.629-646, 2020.

FUSTERO, S.; SIMÓN-FUENTES, A.; SANZ-CERVERA, J. F. Recent advances in the synthesis of pyrazoles. A review. **Organic Preparation Procedures International**, v.41, n.4, p.253-290, 2009.

GAYNES, R. The discovery of penicillin-new insights after more than 75 years of clinical use. **Emerging Infection Diseases**, v.35, n.5, p.849–853, 2017.

GIACOMINI, E.; PERRONE, V.; ALESSANDRINI, D.; PAOLI, D.; NAPPI, C.; ESPOSTI, D. L. Evidence of antibiotic resistance from population-based studies: a narrative review. **Infection Drug Resistance**, v.14, p.849-858, 2021.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. DA S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v.33, n.3, p.667-679, 2010.

HAIDER, S. Heterocycles, back bone of drug design. **Journal Phytochemistry Biochemistry**, v.1, n.1, p.e101, 2017.

HAMDANI, S. S.; BHAT, B. A.; TARIQ, L.; YASEEN, S. I.; ARA I.; RAFI, B.; HAMDANI S. N.; HASSAN, T.; RASHID, O. Antibiotic resistance: the future disaster. **International Journal for Research in Applied Sciences and Biotechnology**, v.7, n.4, p.133-145, 2020.

HARDEN, F.A; QUINN, R.J.; SCAMMELLS, P.J. Synthesis and adenosine receptor affinity of a series of pyrazolo[3,4-*d*] pyrimidine analogues of 1-methylisoguanosine. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.34, p.2892-2898, 1991.

HASSANEIN, M. M. Sulfonamides: far from obsolete. **International Journal of Contemporary Pediatrics**, v.6, n.6, p.2740-2745, 2019.

HE, S.; CHEN, L.; NIU, Y.; WU, L.; LIANG, Y. 1,3-Dipolar cycloaddition of diazoacetate compounds to terminal alkynes promoted by Zn(OTf)<sub>2</sub>: An efficient way to the preparation of pyrazoles. **Tetrahedron Letters**, v.50, p.2443-2445, 2009.

JAMPILEK, J. Heterocycles in medicinal chemistry. **Molecules**, v.24, n.3839, p.1-4, 2019.

JANG, J.; HUR, H.-G.; SADOWSKY, M.J.; BYAPPANAHALLI, M.N.; YAN, T.; ISHII, S. Environmental Escherichia coli: ecology and public health implications - a review. **Journal of Applied Microbiology**, v.123, p.570-581, 2017.

KARROUCHI, K.; RADI, S.; RAMLI, Y.; TAOUFIK, J.; MABKHOT, Y.; AL-AIZARI, F.; ANSAR, M. Synthesis and pharmacological activities of pyrazole derivatives: a review. **Molecules**, v.23, p.134-219, 2018.

KELLER, B. O.; SUI, J.; YOUNG, A. B.; WHITTAL, R. M. Interferences and contaminants encountered in modern mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v.627, n.1, p.71-81, 2008.

KERRU, N.; GUMMIDI, L.; MADDILA, S.; GANGU, K. K., JONNALAGADDA, S. B. A review on recent advances in nitrogen-containing molecules and their biological applications. **Molecules**, v. 25, n.1909, p.1-42, 2020.

KNORR, L. Einwirkung substituierter acetessigester auf phenylhydrazin. **Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft**, v.16, n.2, p.2597-2599, 1883.

LEE, B.; OLANIYI, R.; KWIECINSKI, J.M.; WARDENBURG, J.B. Staphylococcus aureus toxin suppresses antigen-specific T cell responses. **Journal Clinical Investment**, v.130, n.3, p.1122-1127, 2020.

LI, J. J. **Knorr pyrazole synthesis**. In: Name Reactions. Cham: Springer International Publishing, p. 347-348, 2014.

LI, Z. A review of Staphylococcus aureus and the emergence of drug-resistant problem. **Advances in Microbiology**, v.8, p.65-76, 2018.

LIMA, L. M.; SILVA, B. N. M.; BARBOSA, G.; BARREIRO, E. J.  $\beta$ -Lactam antibiotics: an overview from a medicinal chemistry perspective. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 208, p.1-25, 2020.

LOBANOVSKA, M.; PILLA, G. Penicillin's discovery and antibiotic resistance: lessons for the future? **Yale Journal of Biology and Medicine**, v.90, n.1, p.135-145, 2017.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; BENDER, K. S.; BUCKLEY, D. H.; STAHL, D. A. **Microbiologia de Brock**. 14. ed. Porto Alegre: Artmed, 2016.

MURDOCH, D. R.; HOWIE, S. R. C. The global burden of lower respiratory infections: making progress, but we need to do better. **The Lancet Infectious Diseases**, v.18, n.11, p.1162-1163, 2018.

Organization for Economic and Co-operation and Development - OECD. Disponível em: <http://www1.compareyourcountry.org/antimicrobial-resistance/en/0/all/default/2015>, acesso em 23 de outubro de 2021.

PARKER, N.; SCHNEEGURT, M.; THI TU, A.-H.; FORSTER, B. M.; LISTER, P. "**Microbiology**". Open Educational Resources Collection 3. - *OpenStax*, 1. ed., 2016. Disponível em: <https://irl.umsl.edu/oer/3>, acesso em: 06 de fevereiro de 2022.

PATRICK, G. L. **An Introduction to Medicinal Chemistry**. 5. ed. Oxford: Oxford University Press, 2013.

PECHMANN, H. VON. Pyrazol aus acetylen und diazomethan. **Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft**, v. 31, p. 2950-2951, 1898.

PHAM, T. D. M.; ZIORA, Z. M.; BLASKOVICH, M. A. T. Quinolone antibiotics. **Medicinal Chemistry Community**, v.10, p.1719-1739, 2019.

PILLONETTO, M.; JORDÃO, R. T. S.; ANDRAUS, G. S.; BERGAMO, R.; ROCHA, F. B.; ONISHI, M. C.; ALMEIDA, B. M. M.; NOGUEIRA, K. S.; DAL, M. L.; DIAS, V.M.C.H.; ABREU, A. L. The experience of implementing a national antimicrobial resistance surveillance system in brazil. **Frontiers in Public Health**, v.8, n.575536, p.1-20, 2021.

ROSA, G. S., SOUTO, B. A.; PEREIRA, C. N.; TEIXEIRA, B. C.; DOS SANTOS, M. S. Convenient synthesis of pyrazole-imidazoline derivatives by microwave irradiation. **Journal of Heterocyclic Chemistry**, v.56, n.6, p.1825-1830, 2019.

SAPKAL, A.; KAMBLE, S. Greener and environmentally benign methodology for the synthesis of pyrazole derivatives. **ChemistrySelect**, v.5, n.42, p.12971-13026, 2020.

SECRIERU, A.; O'NEILL, P. M.; CRISTIANO, M. L. S. Revisiting the structure and chemistry of 3(5)-substituted pyrazoles. **Molecules**, v.24, n.42, p.1-28, 2020.

SHARMA, G.; SHARMA, S.; SHARMA, P.; CHANDOLA, D.; DANG, S.; GUPTA, S.; GABRANI, R. Escherichia coli biofilm: development and therapeutic strategies. **Journal of Applied Microbiology**, v.121, p.309-319, 2016.

SILHAVY, T. J.; KAHNE, D.; WALKER, S. The bacterial cell envelope. **Cold Spring Harb Perspect Biology**, v.2, n.5, p.1-16, 2010.

SILVA, M. J. V.; POLETO, J.; JACOMINI, A. P.; PIANOSKI, K. E.; GONÇALVES, D. S.; RIBEIRO, G. M.; MELO, S. M. S.; BACK, D. F.; MOURA, S.; ROSA, F. A. Unconventional method for synthesis of 3-carboxyethyl-4-formyl(hydroxy)-5-aryl-N-arylpyrazoles. **The Journal of Organic Chemistry**, v.82, p.12590-12602, 2017.

SINGH, P.; NATH, M. A concise account on eco-friendly: synthetic strategies for pyrazole heterocycles. **Current Green Chemistry**, v.6, n.3, p.198-209, 2019.

SINGH, R.; KAUR, R.; AHLAWAT, P.; KAUSHIK, P.; SINGH, K. Green methods for the synthesis of pyrazoles: a review. **Organic Preparations and Procedures International**, v.53, n.4, p.317-351, 2021.

SINGH, S. B.; YOUNG, K.; SILVER, L. L. What is an "ideal" antibiotic? Discovery challenges and path forward. **Biochemical Pharmacology**, v.133, p.63-73, 2017.

TAČIĆ, A.; NIKOLIĆ, V.; NIKOLIĆ, L.; SAVIĆ, I. Antimicrobial sulfonamide drugs. **Advanced Technologies**, v.6, n.1, p.58-71, 2017.

TEESELING, M. C. F.; PEDRO, M. A.; CAVA, F. Determinants of bacterial morphology: From fundamentals to possibilities for antimicrobial targeting. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n.1264, p.1-18, 2017.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 6. ed. São Paulo: Ed. Atheneu, 2015.

VÁZQUEZ-LASLOP, N.; MANKIN, A. S. How macrolide antibiotics work. **Trends in Biochemical Sciences**, v.43, n.9, p.668-684, 2018.

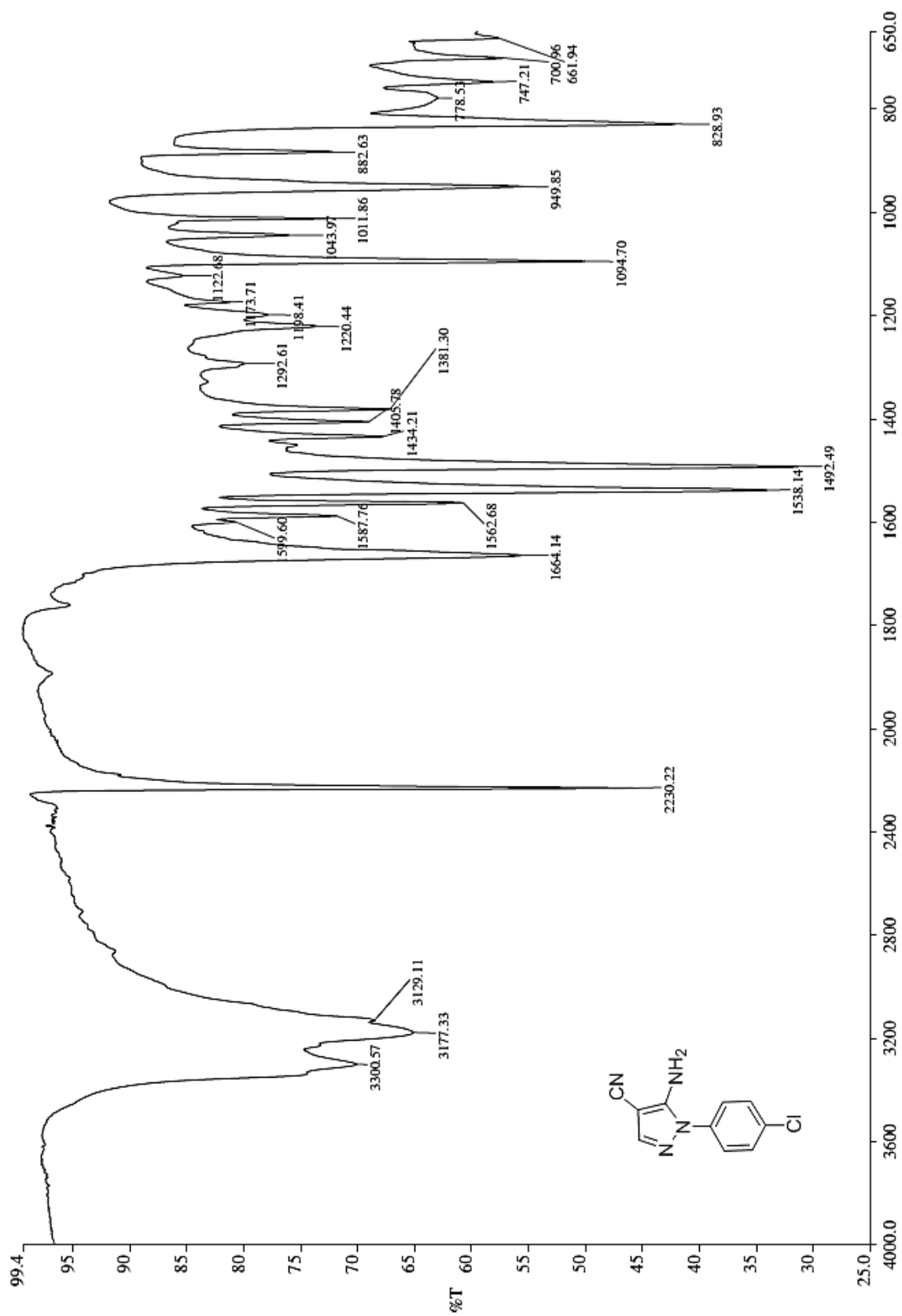
WANG, *et al.* Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. **The Lancet**, v.388, p.1459-544, 2016.

ZAFFIRI, F.; GARDNER, J.; TOLEDO-PEREYRA, L. H. History of antibiotics. From salvarsan to cephalosporins. **Journal of Investigative Surgery**, v.25, n.2, p.67-77, 2012.

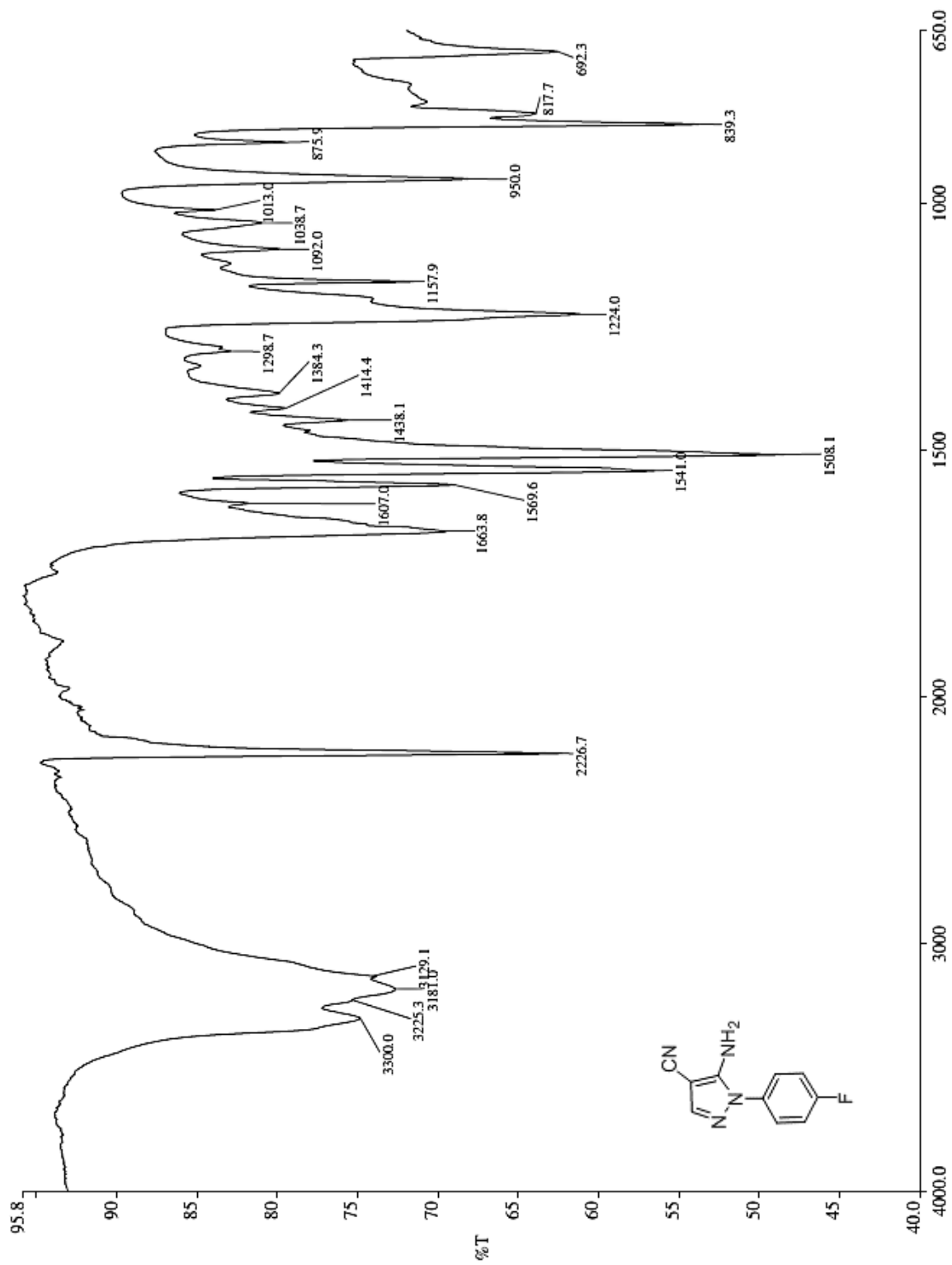
ZANGO, U. U.; IBRAHIM, M.; SHAWAI, S. A. A.; SHAMSUDDIN, I. M. A review on  $\beta$ -lactam antibiotic drug resistance. **MOJ Drug Desing Development & Therapy**, v.3, n.2, p.52-58, 2019.

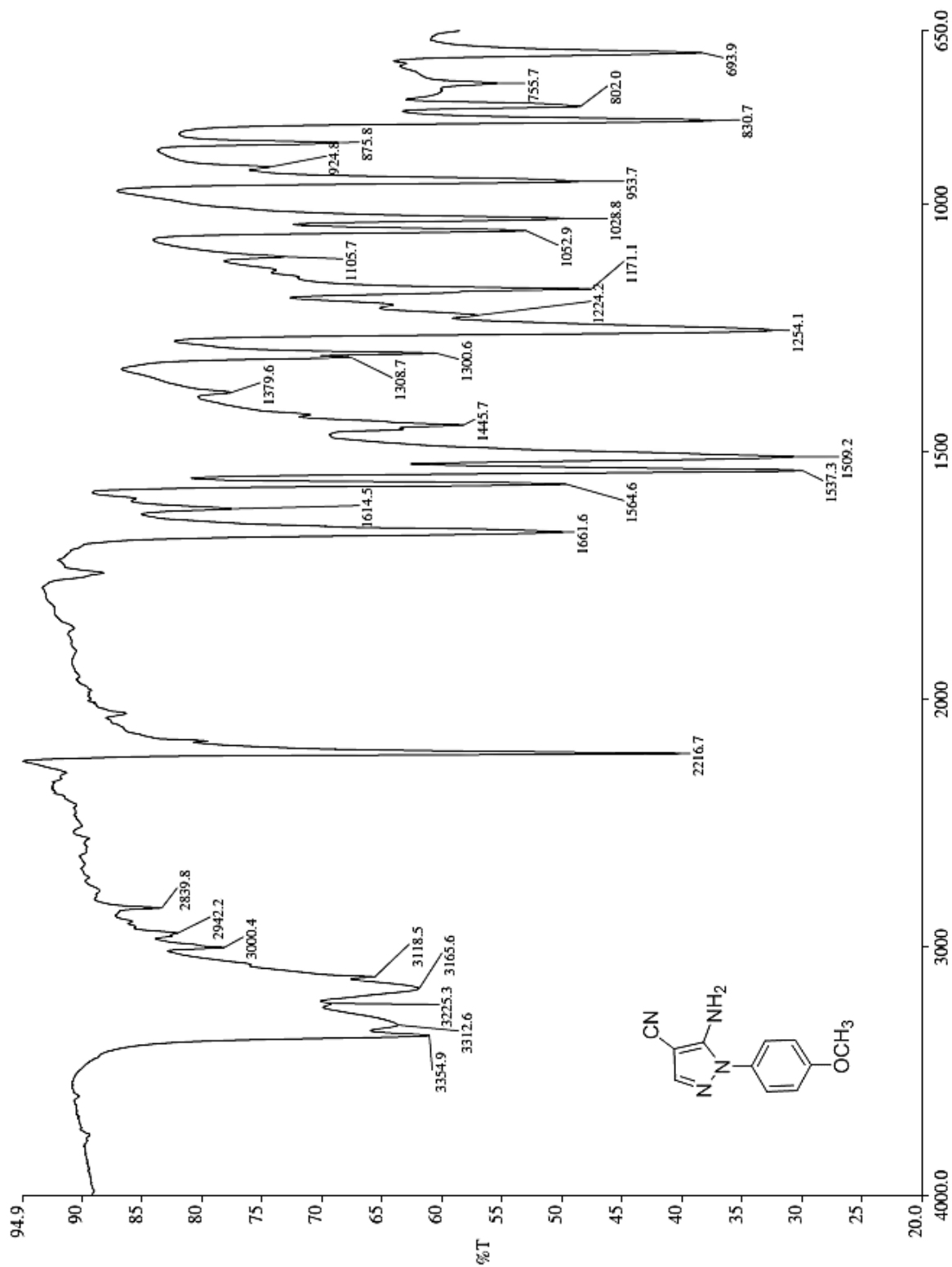
## **8. Anexos**

### **Anexo A- Espectros de absorção na região do infravermelho das matérias-primas 3(a-g)**

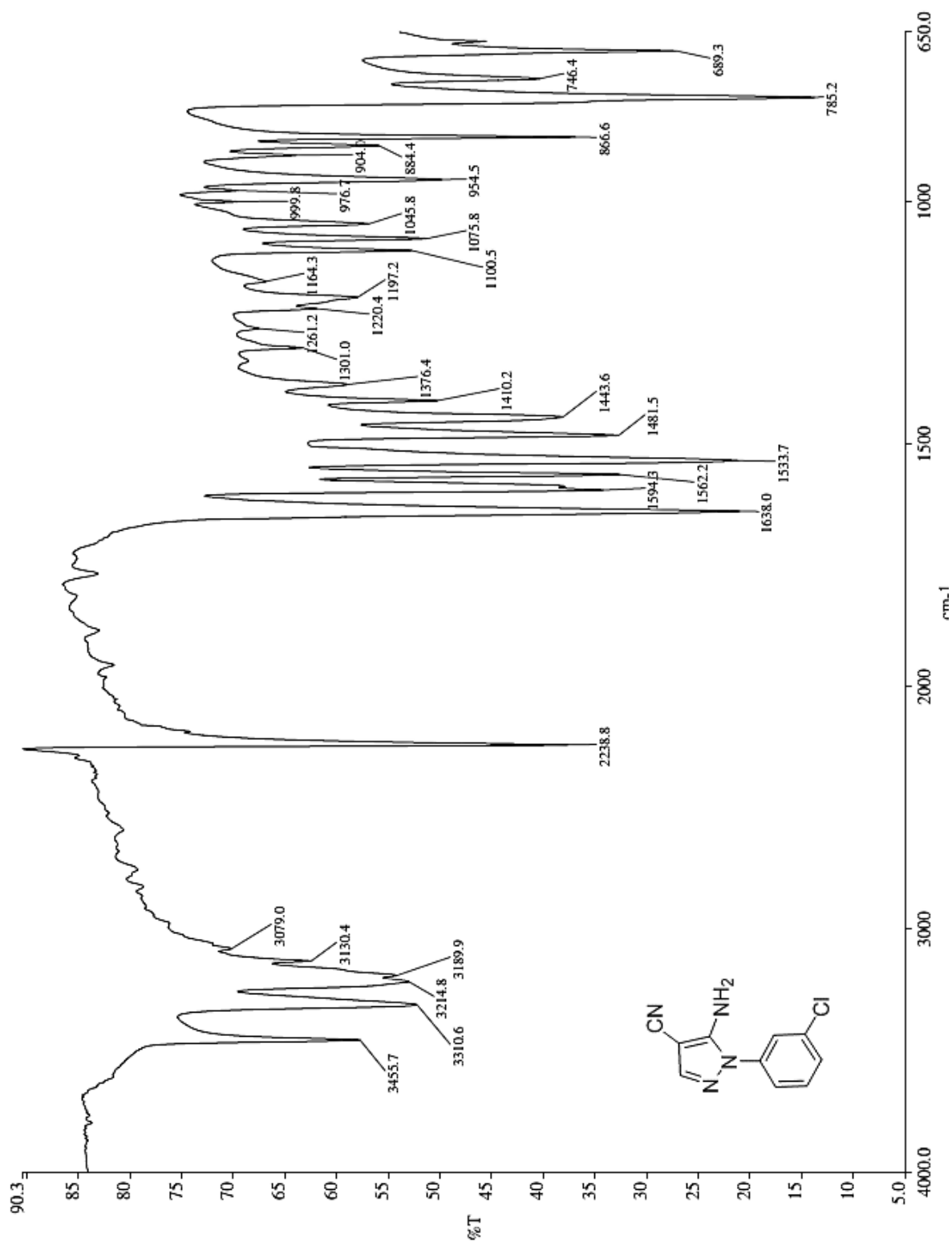
**Espectro 1.** Espectro de absorção na região do Infravermelho da matéria-prima **3a**.

**Espectro 2.** Espectro de absorção na região do Infravermelho da matéria-prima **3b**.

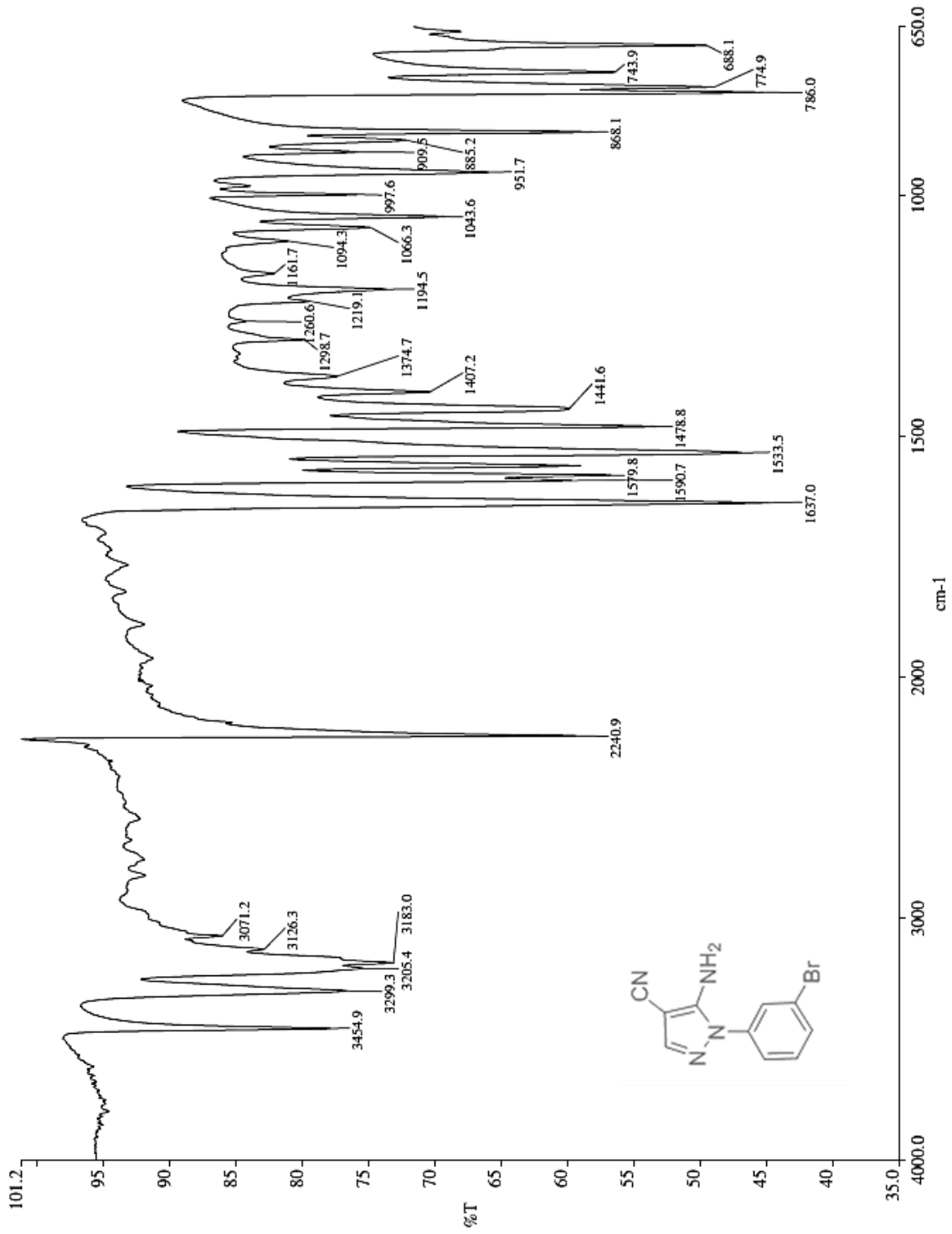


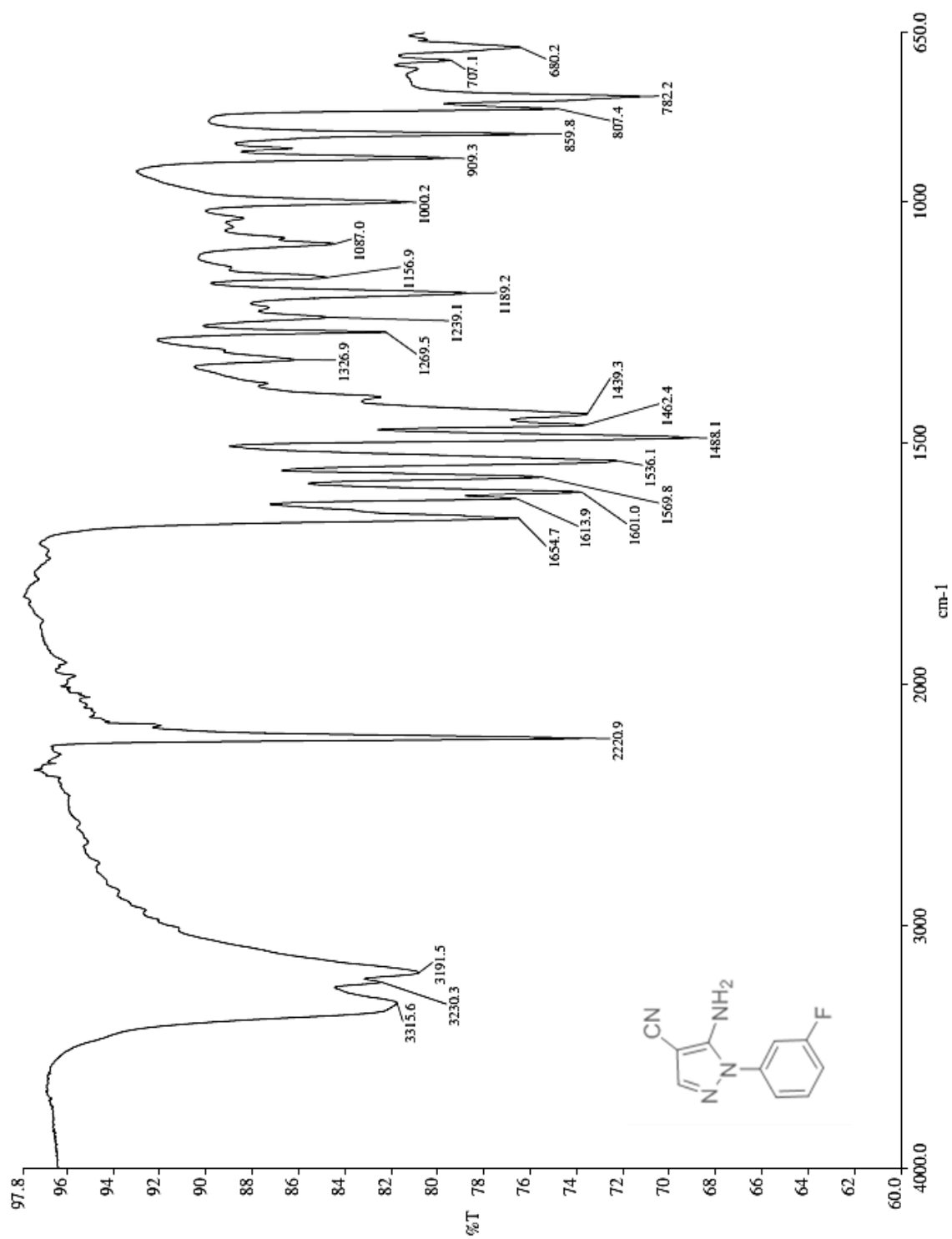
**Espectro 3.** Espectro de absorção na região do Infravermelho da matéria-prima **3c**.

**Espectro 4.** Espectro de absorção na região do Infravermelho da matéria-prima **3d**.

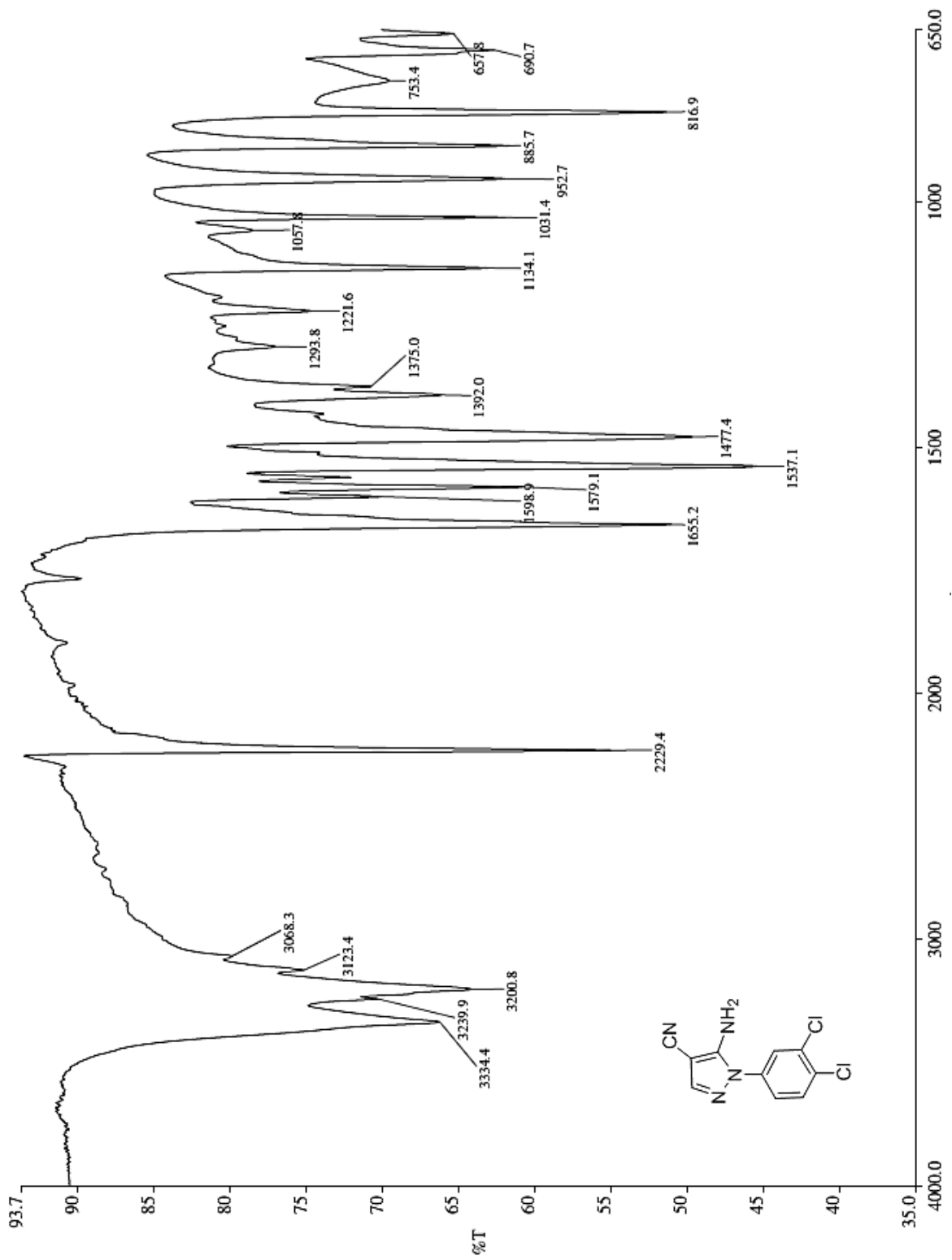


**Espectro 5.** Espectro de absorção na região do Infravermelho da matéria-prima **3e**.

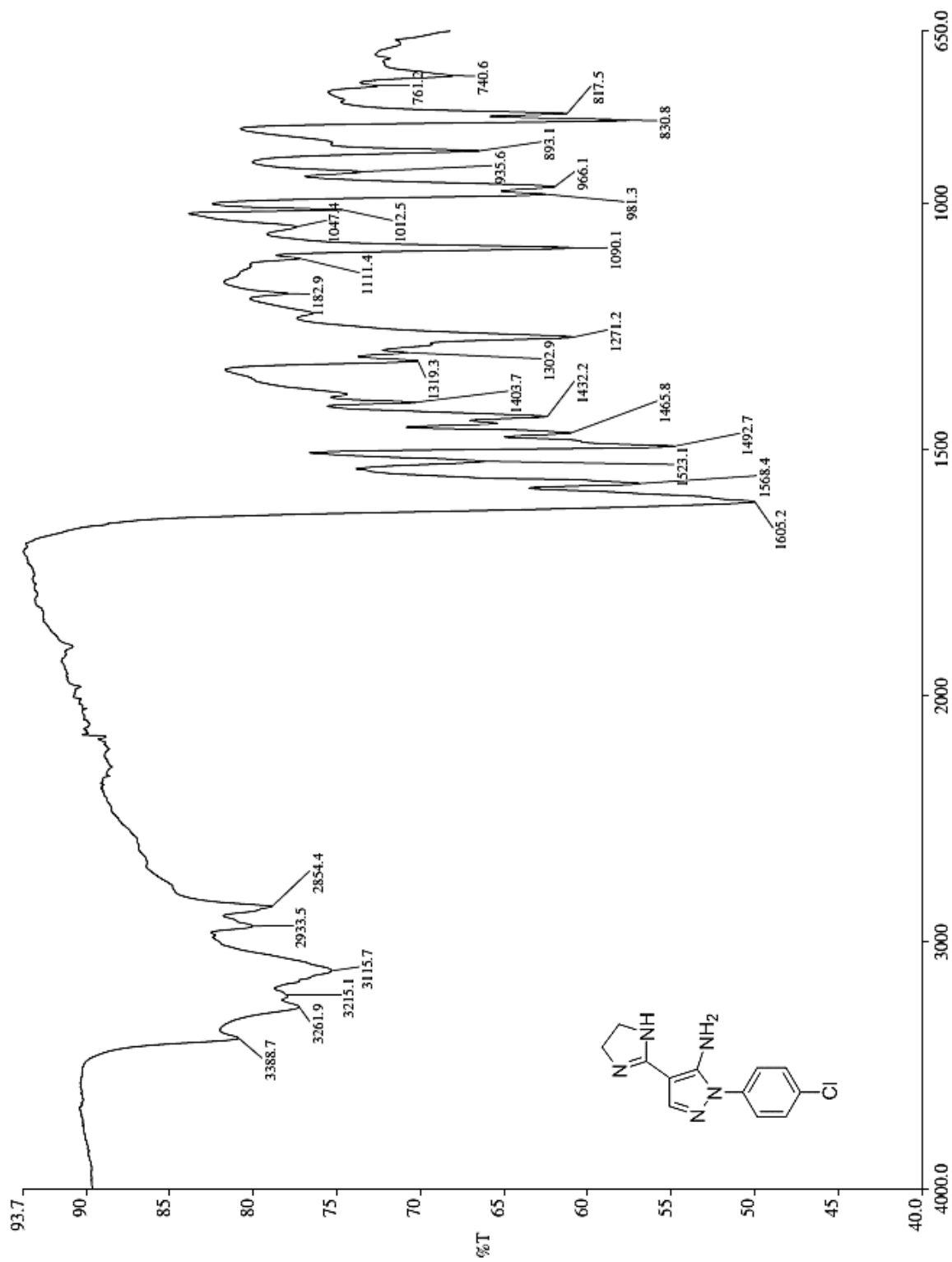


**Espectro 6.** Espectro de absorção na região do Infravermelho da matéria-prima **3f**.

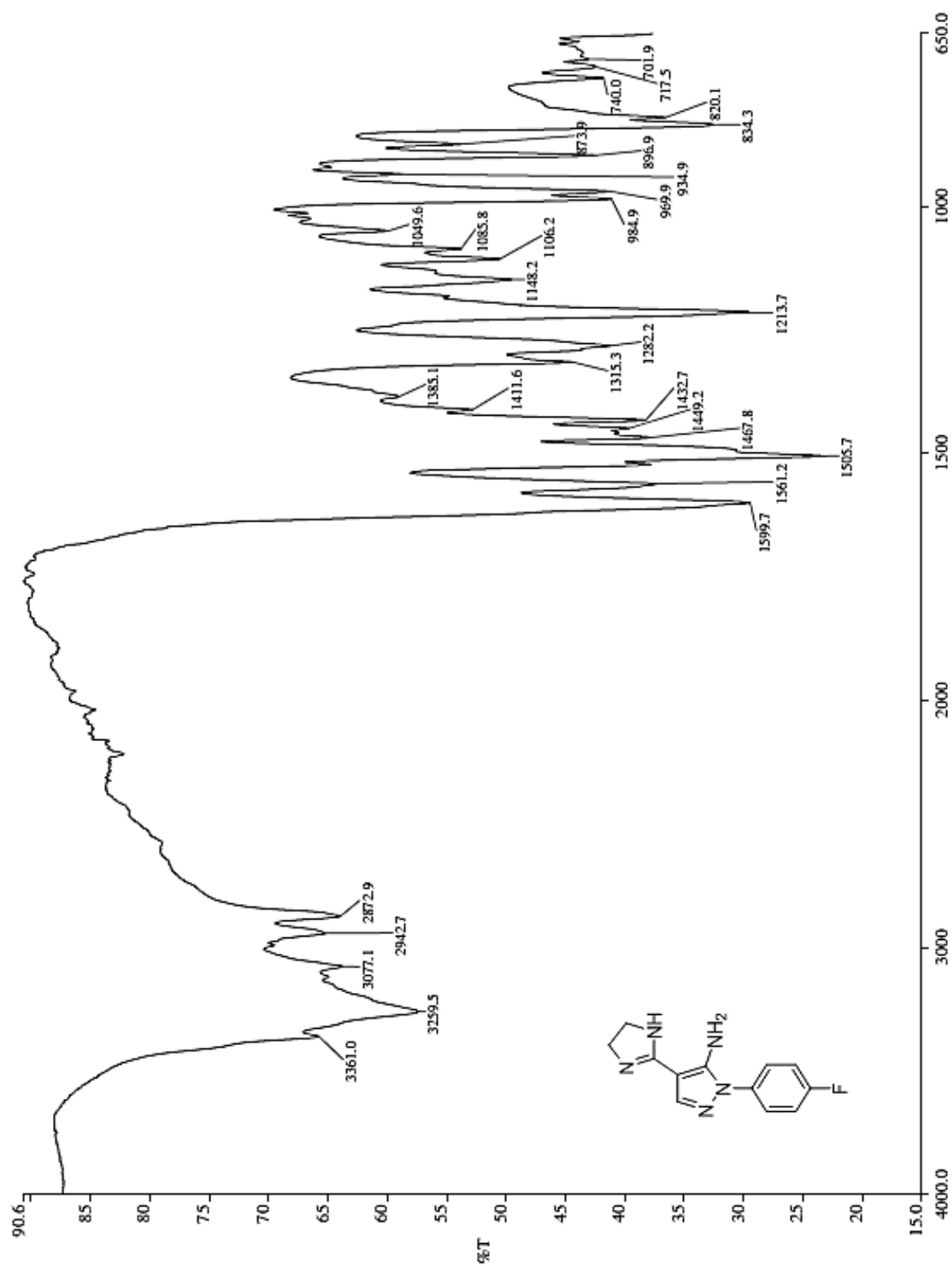
Espectro 7. Espectro de absorção na região do Infravermelho da matéria-prima 3g.

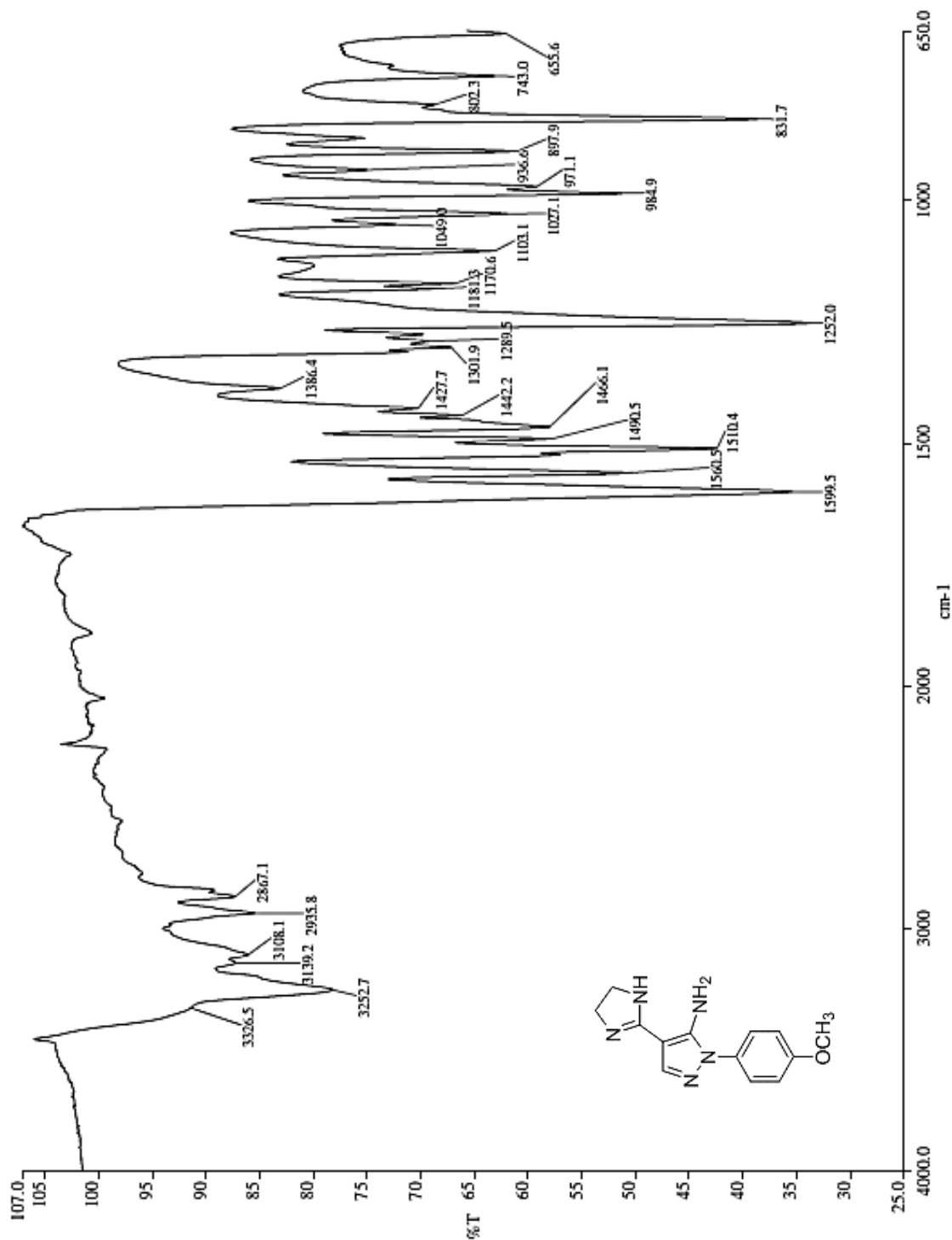


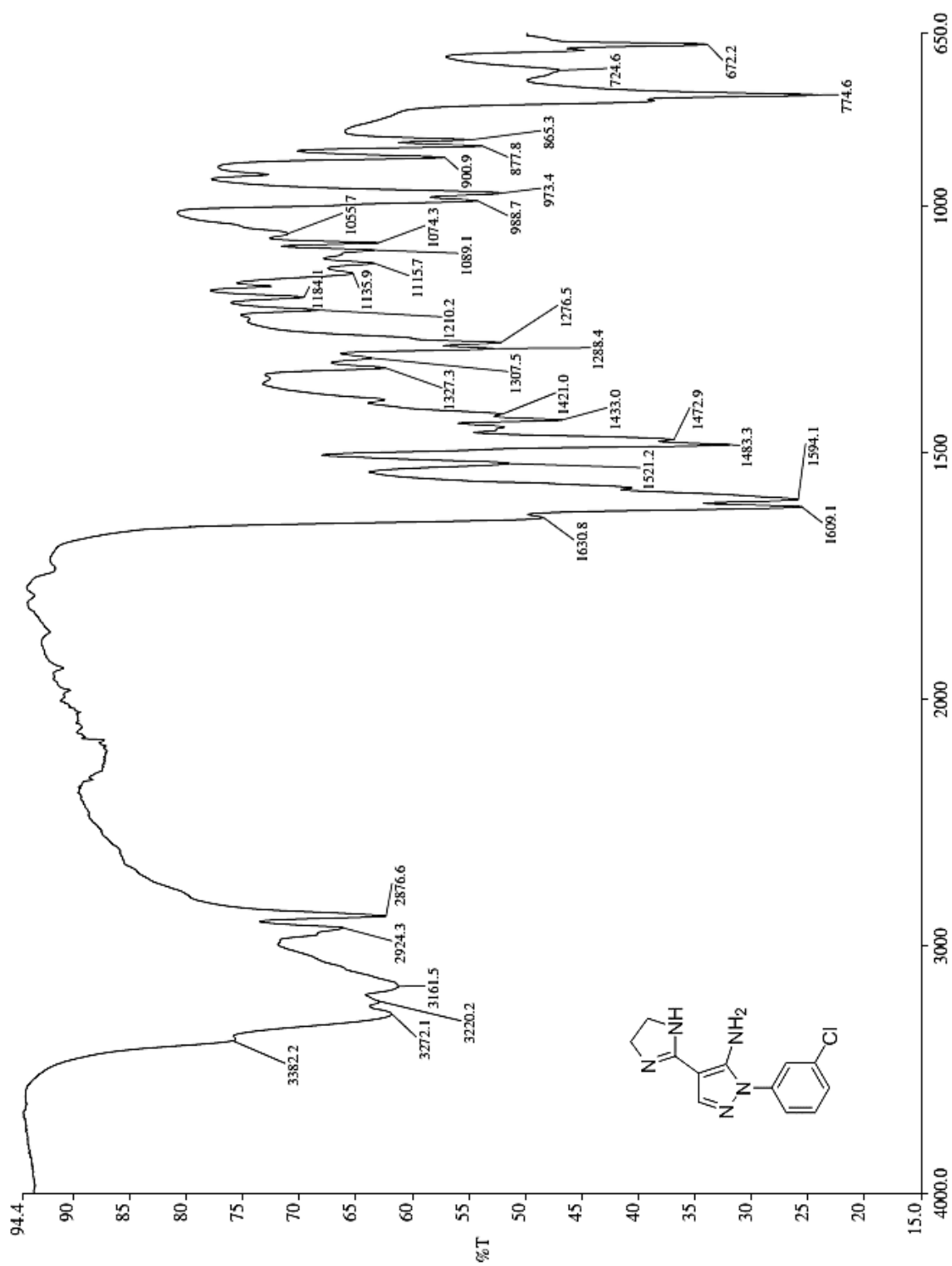
**Anexo B - Espectros de absorção na região do  
Infravermelho dos intermediários-chave 2(a-g)**

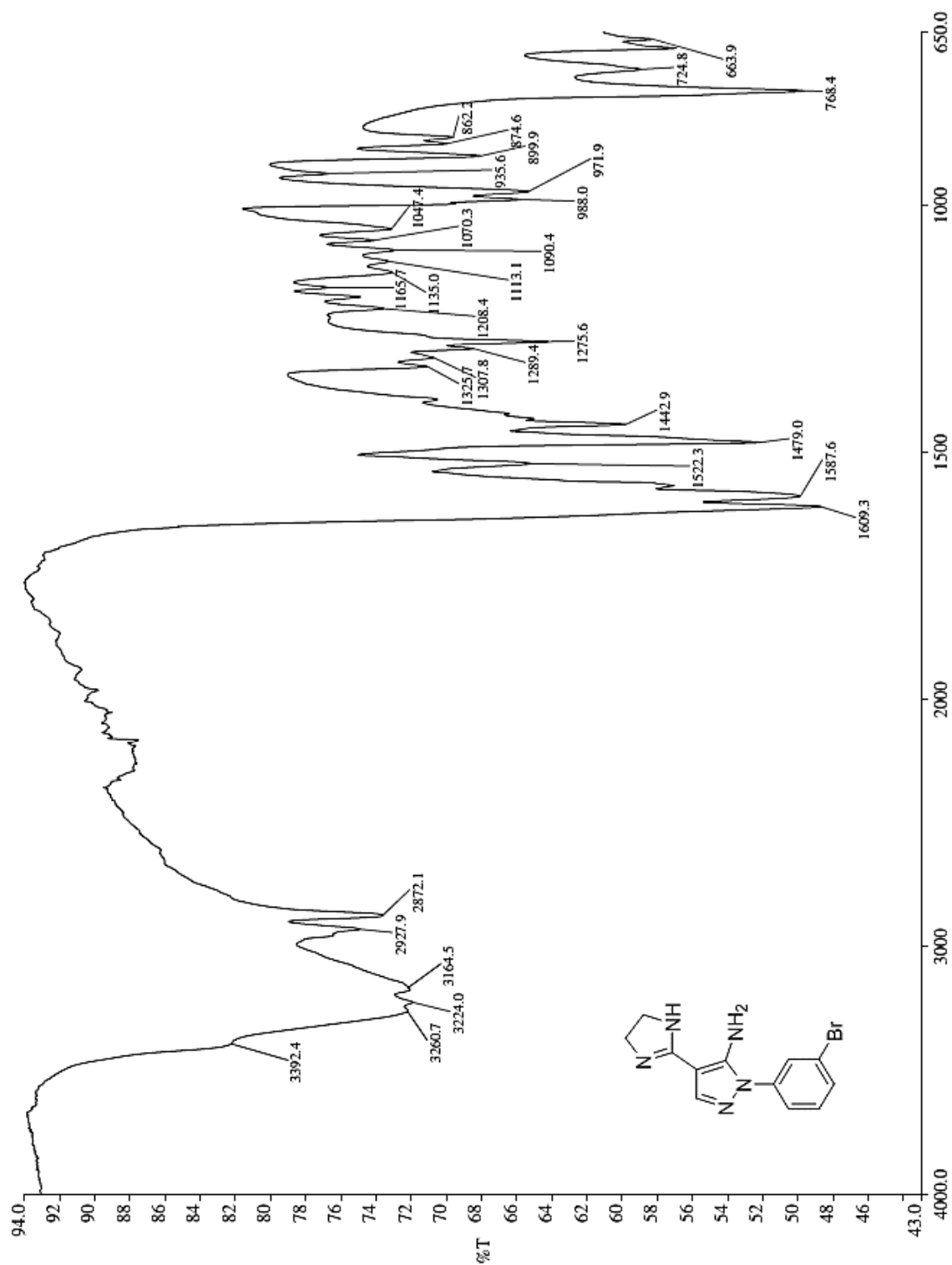
**Espectro 8.** Espectro de absorção na região do infravermelho do intermediário-chave **2a**.

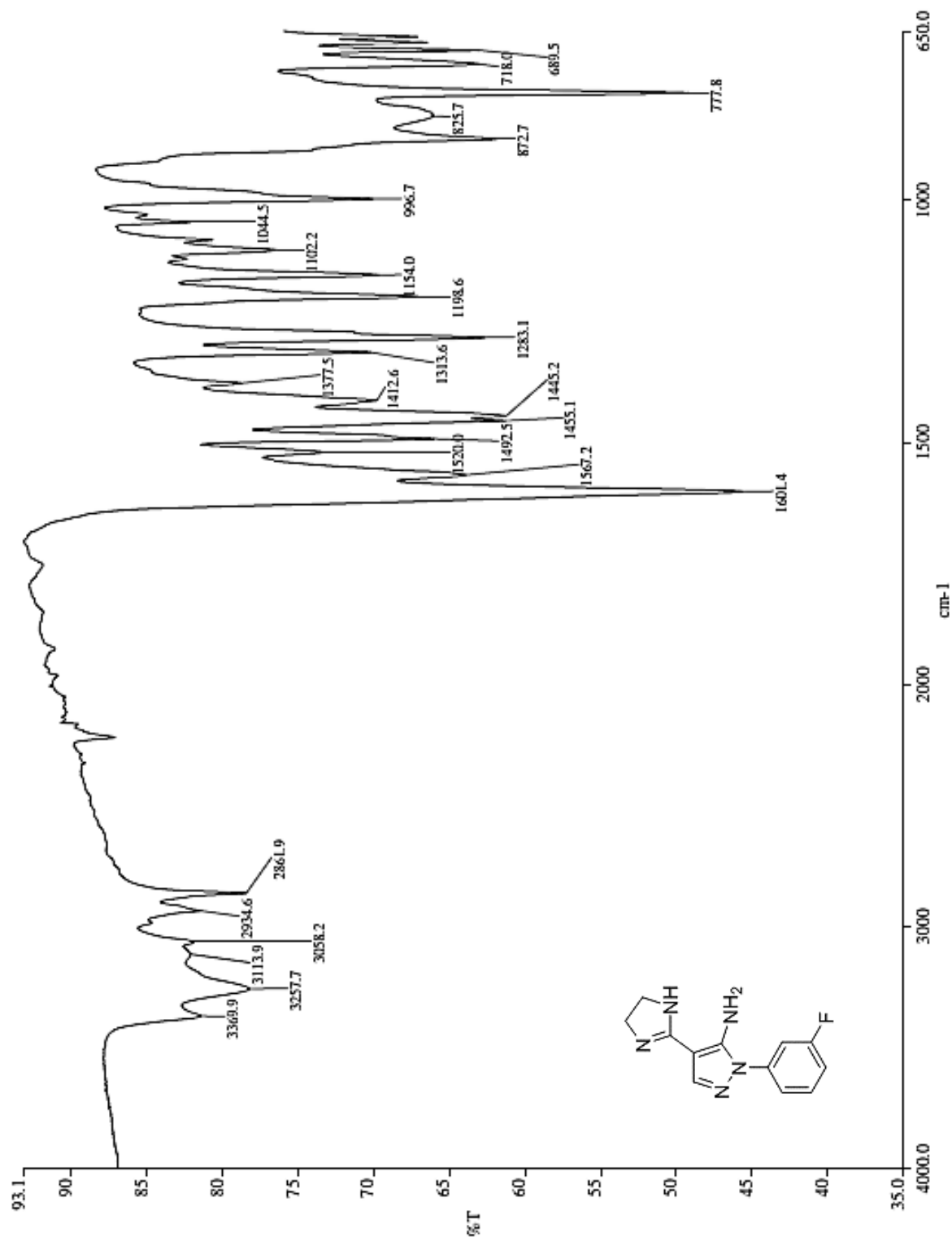
**Espectro 9.** Espectro de absorção na região do Infravermelho do intermediário-chave **2b**.

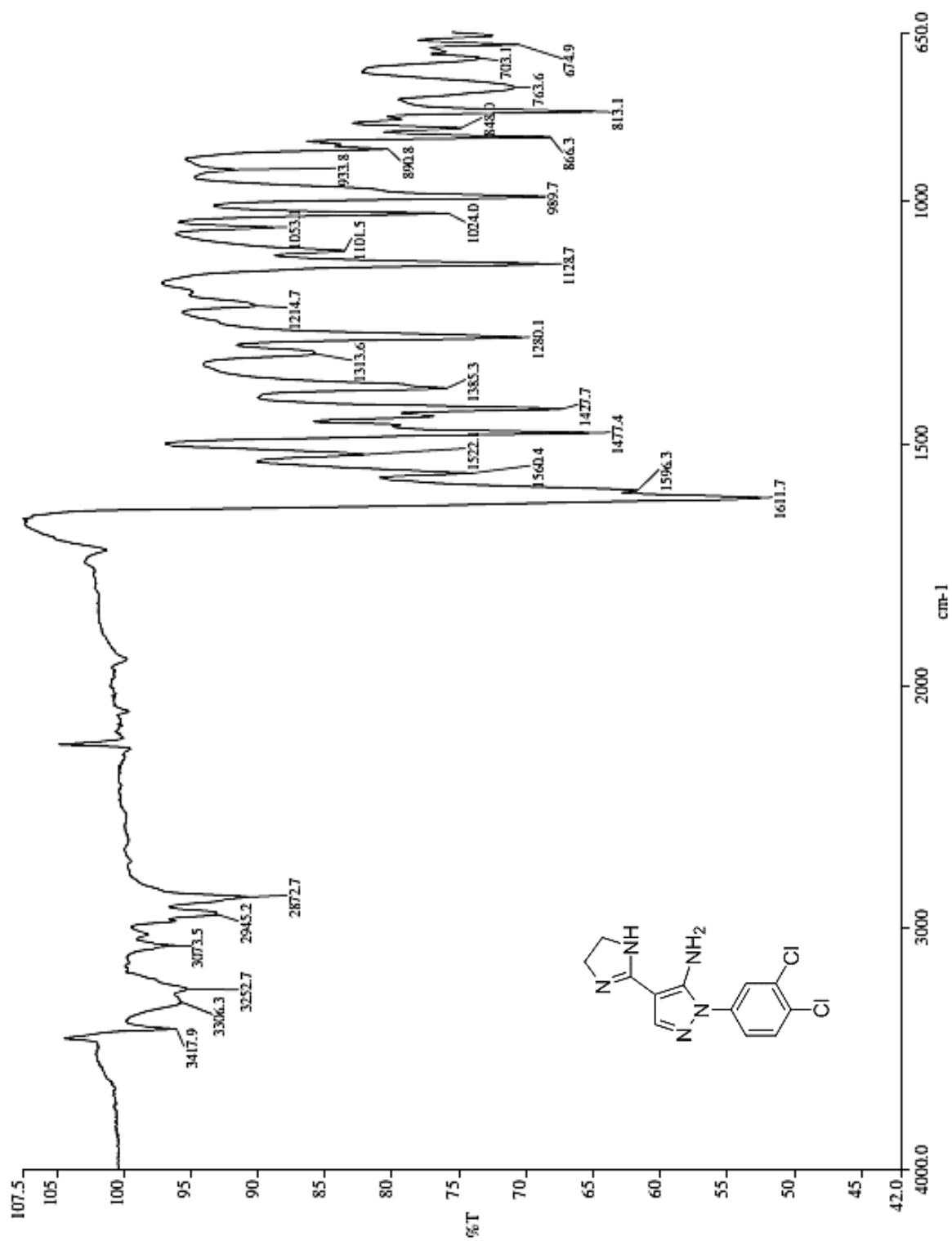


**Espectro 10.** Espectro de absorção na região do infravermelho do intermediário-chave 2c.

**Espectro 11.** Espectro de absorção na região do Infravermelho do intermediário-chave **2d**.

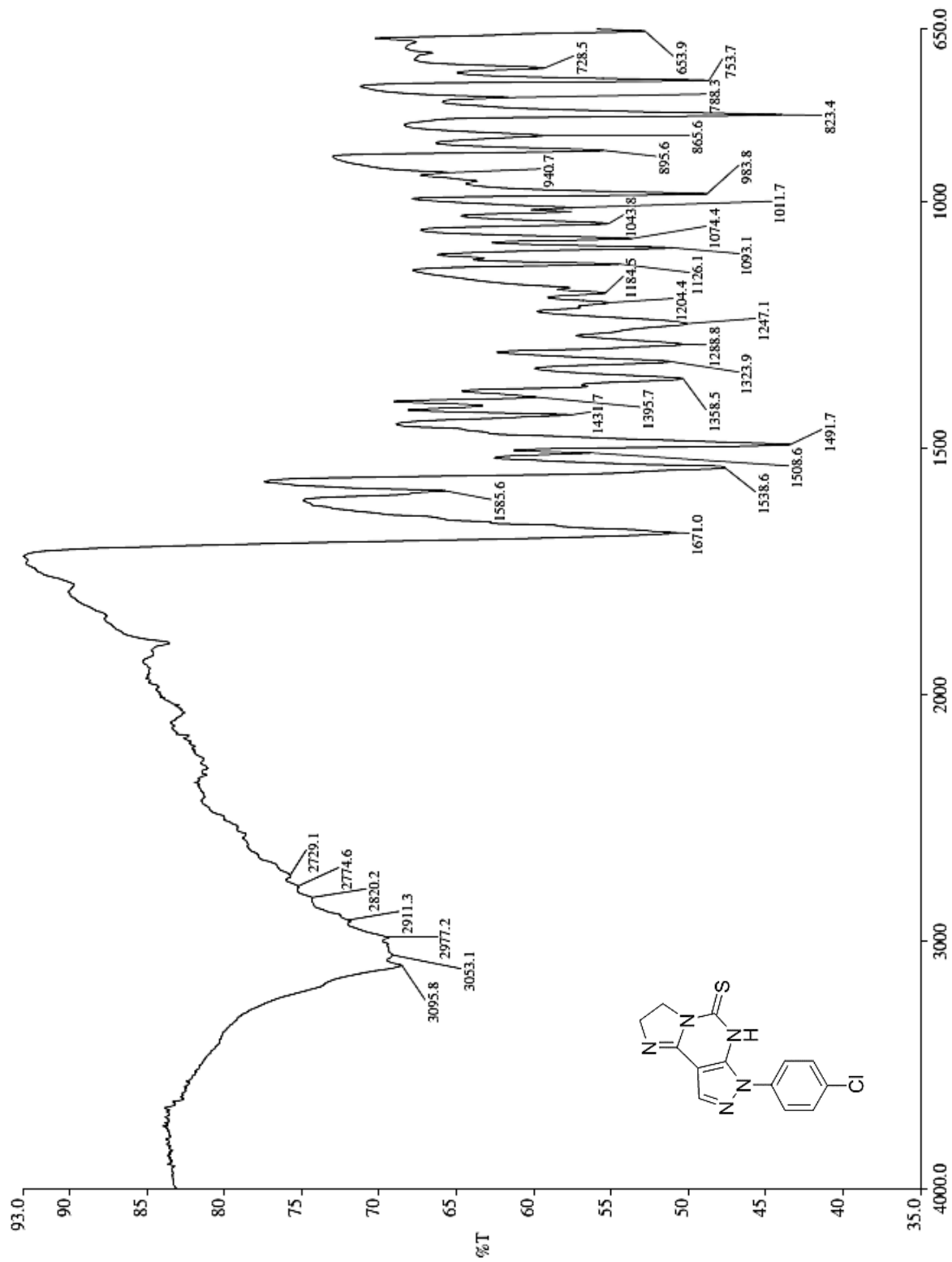
**Espectro 12.** Espectro de absorção na região do infravermelho do intermediário-chave **2e**.

**Espectro 13.** Espectro de absorção na região do Infravermelho do intermediário-chave **2f**.

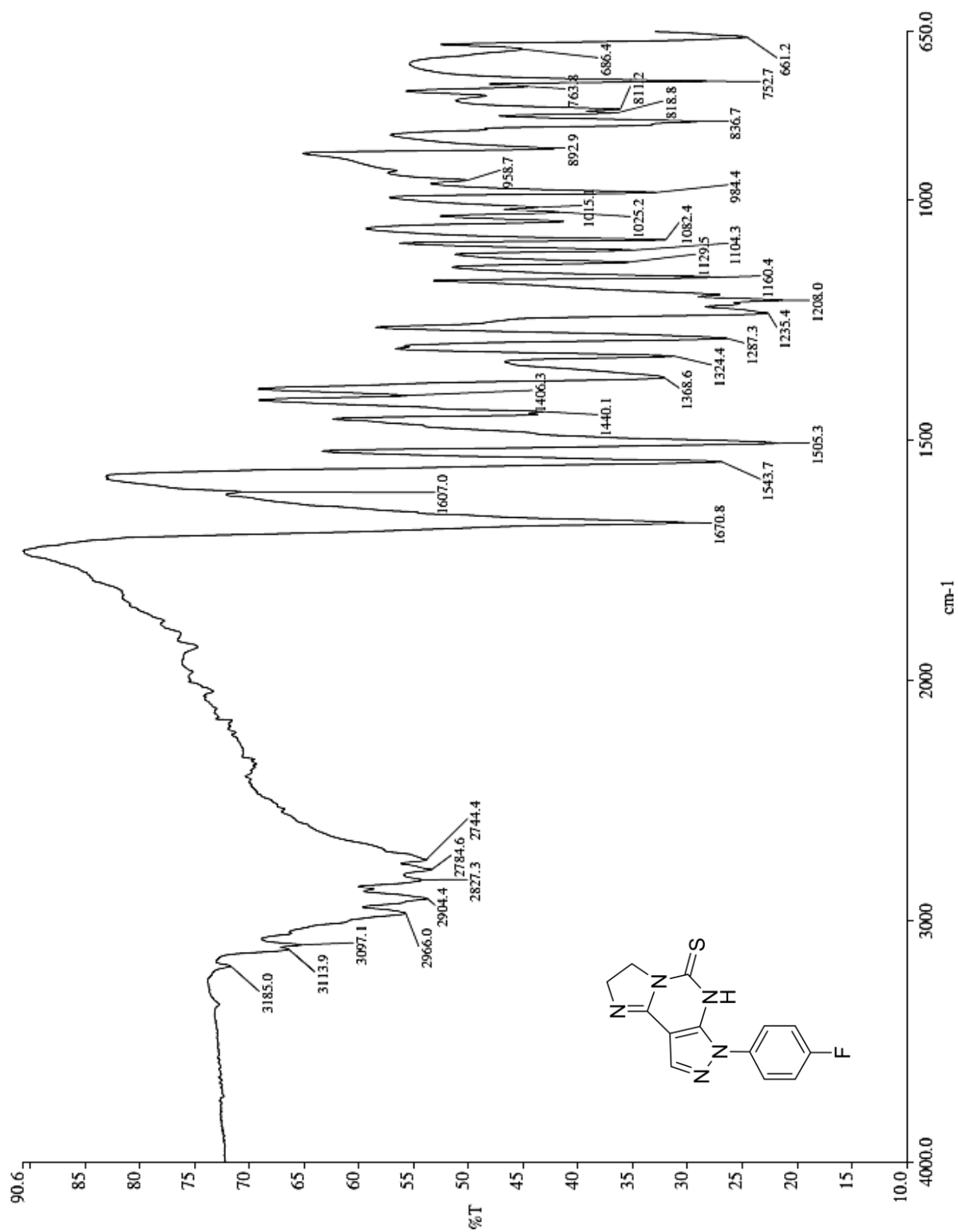
**Espectro 14.** Espectro de absorção na região do Infravermelho do intermediário-chave **2g**.

## **Anexo C - Espectros de absorção na região do infravermelho dos produtos finais 1(a-g)**

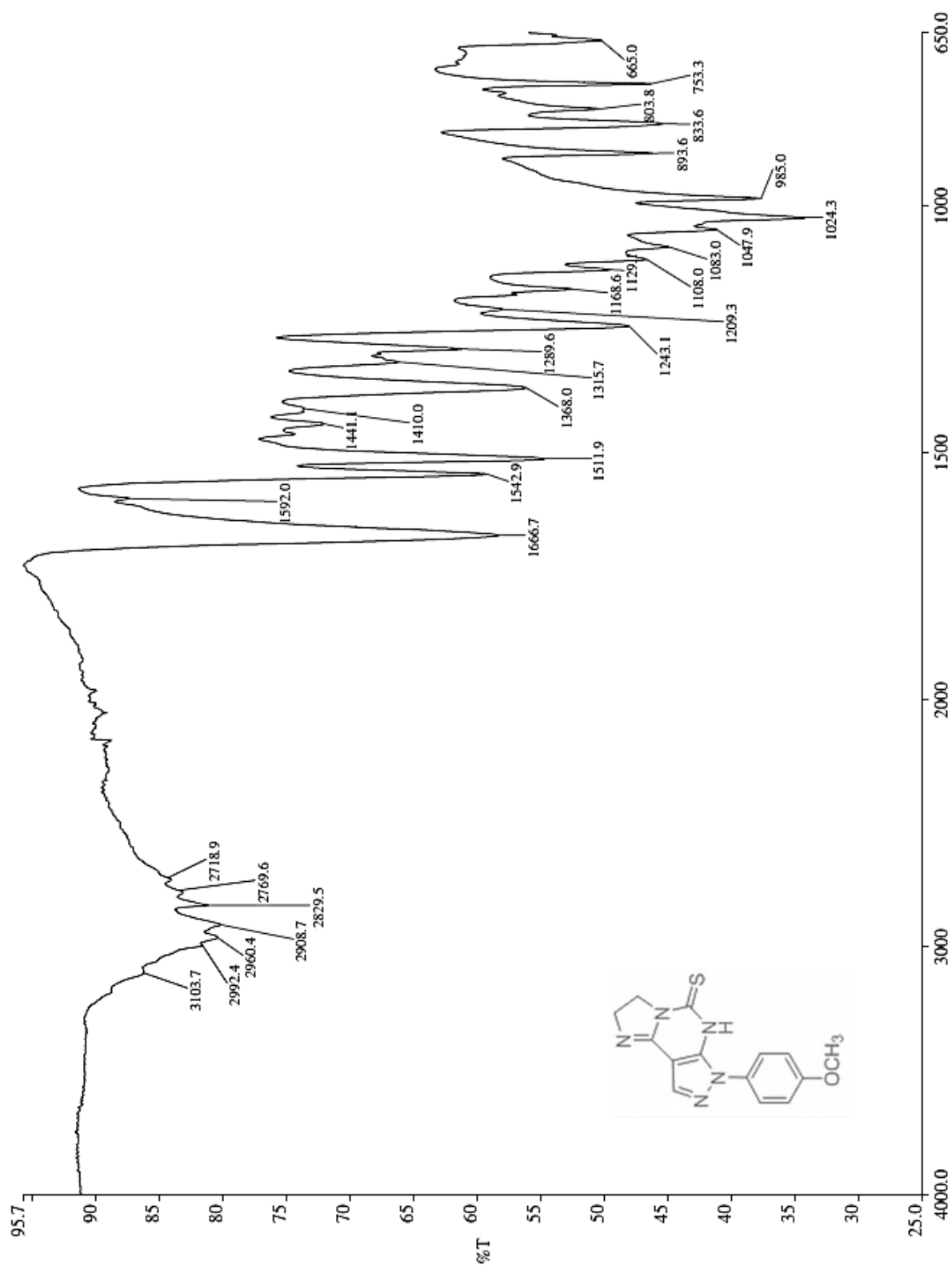
**Espectro 15.** Espectro de absorção na região do infravermelho do produto final **1a**.



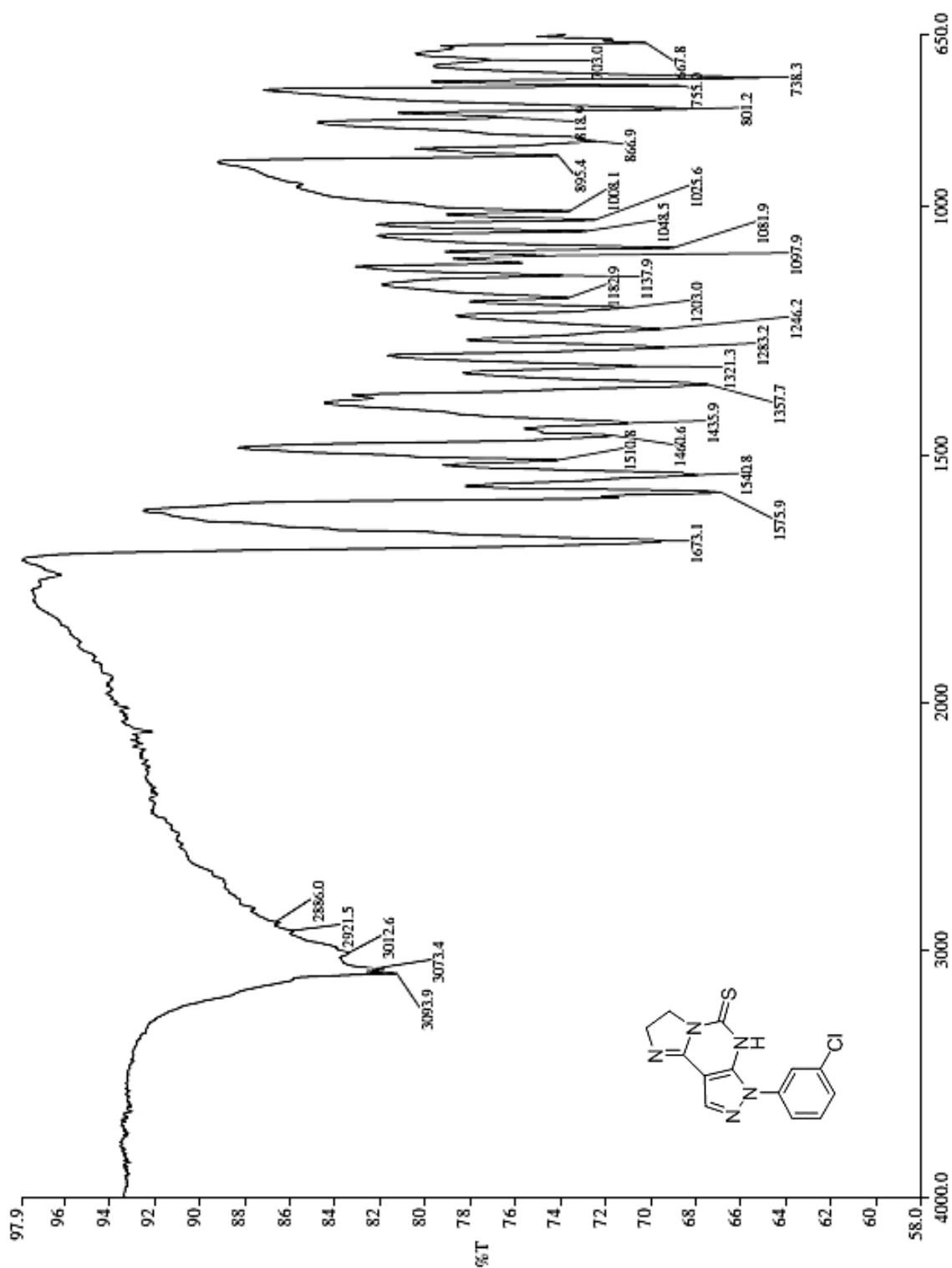
**Espectro 16.** Espectro de absorção na região do infravermelho do produto final **1b**.

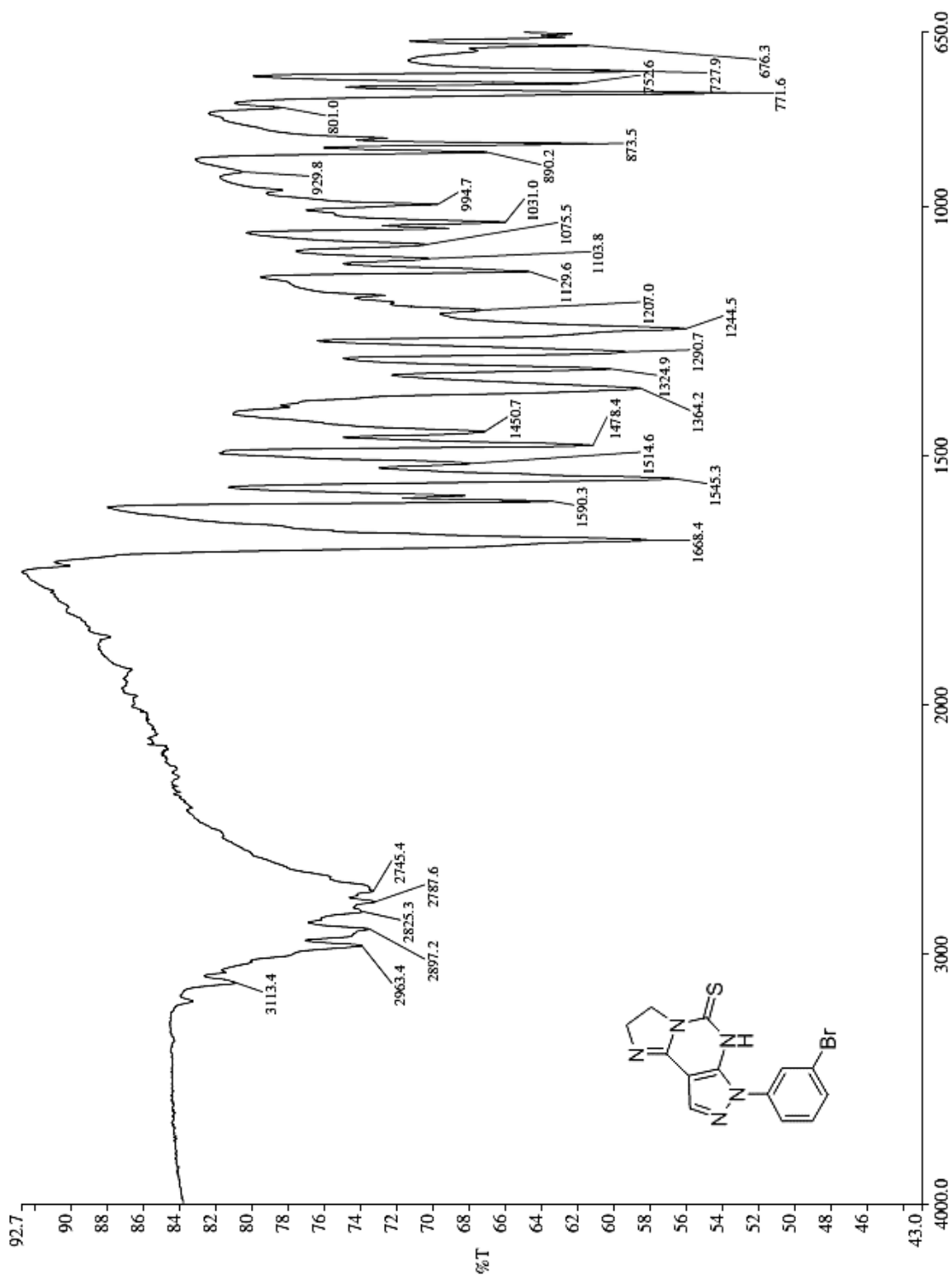


**Espectro 17.** Espectro de absorção na região do infravermelho do produto final **1c**.

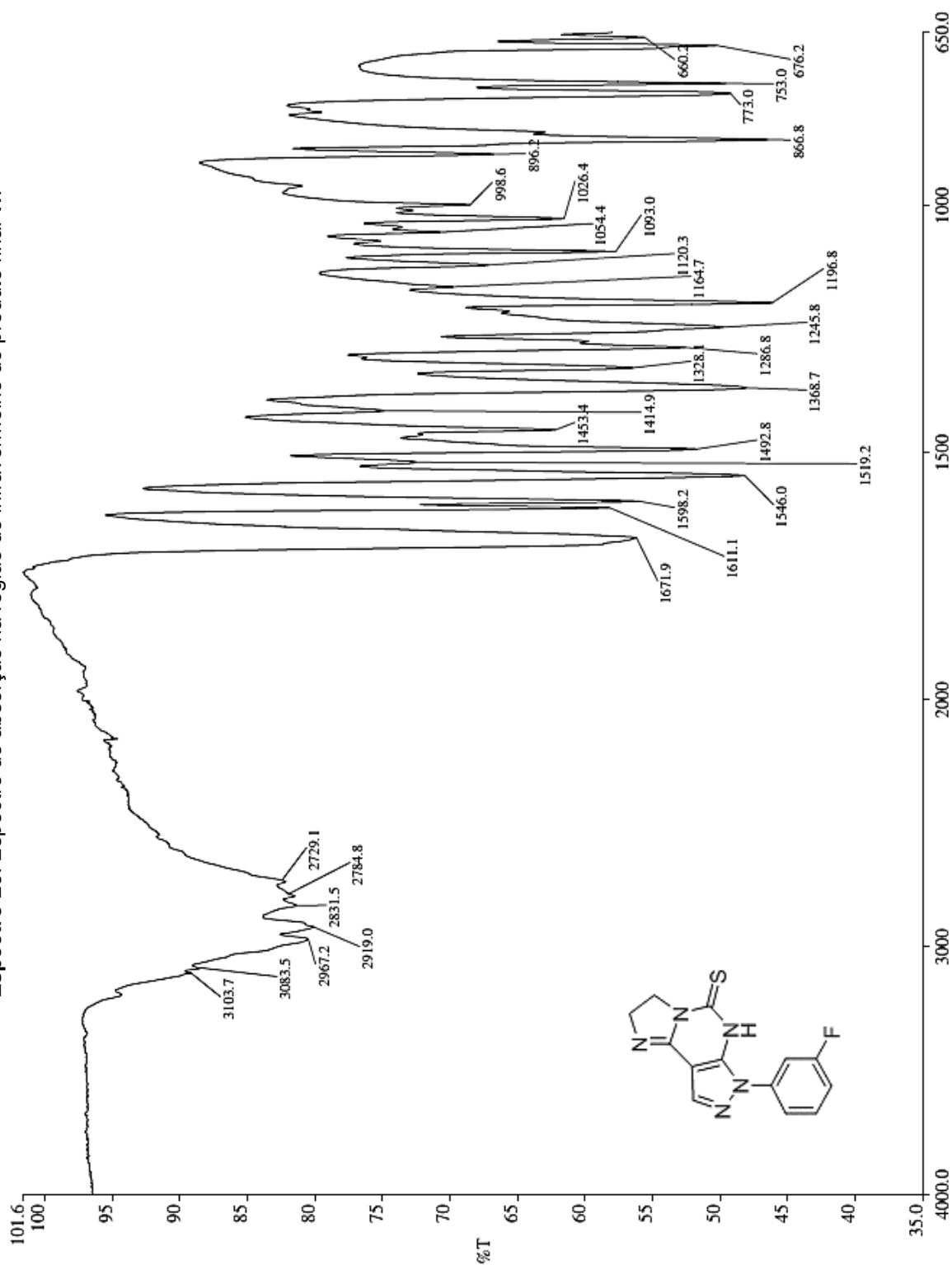


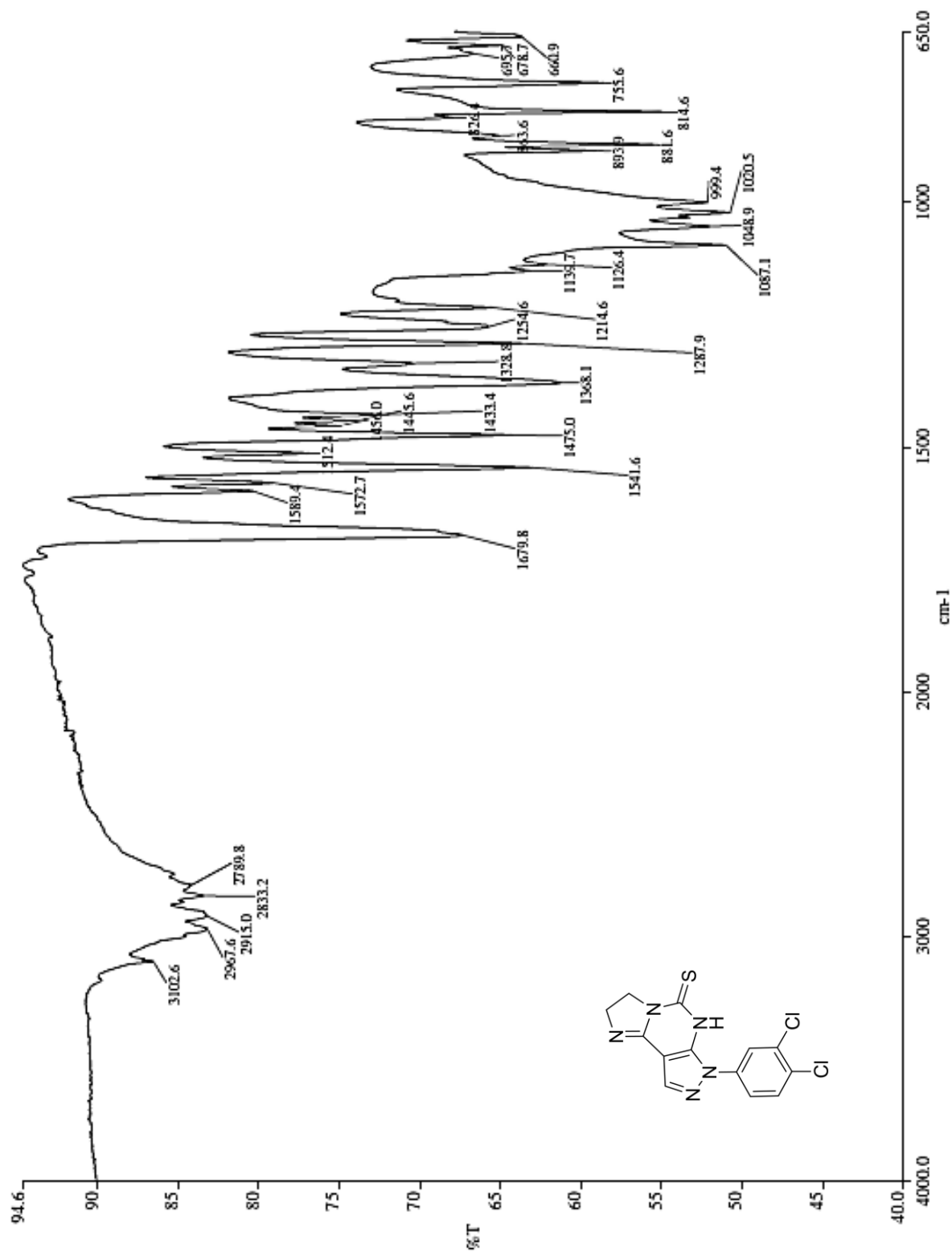
**Espectro 18.** Espectro de absorção na região do infravermelho do produto final **1d**.



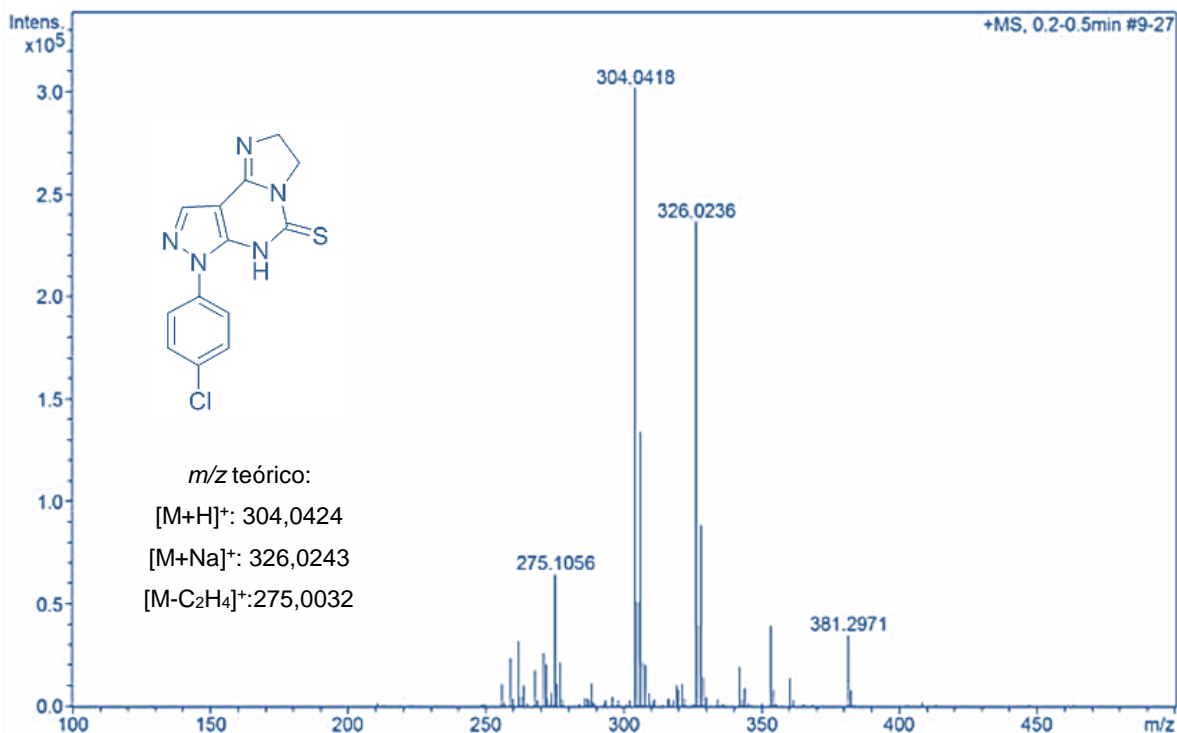
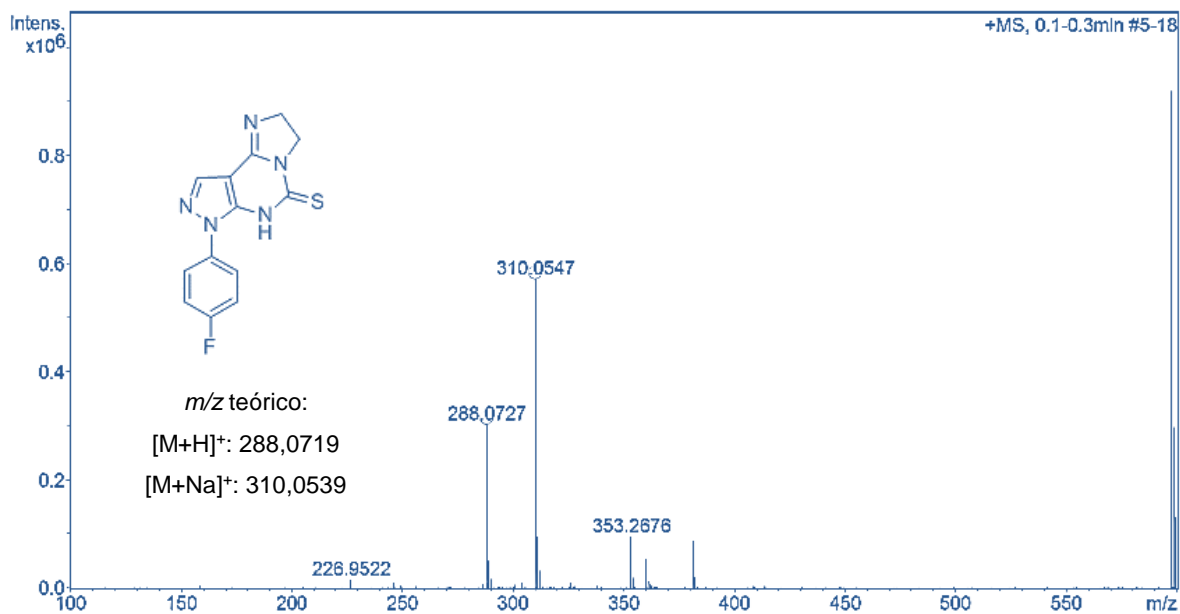
**Espectro 19.** Espectro de absorção na região do infravermelho do produto final **1e**.

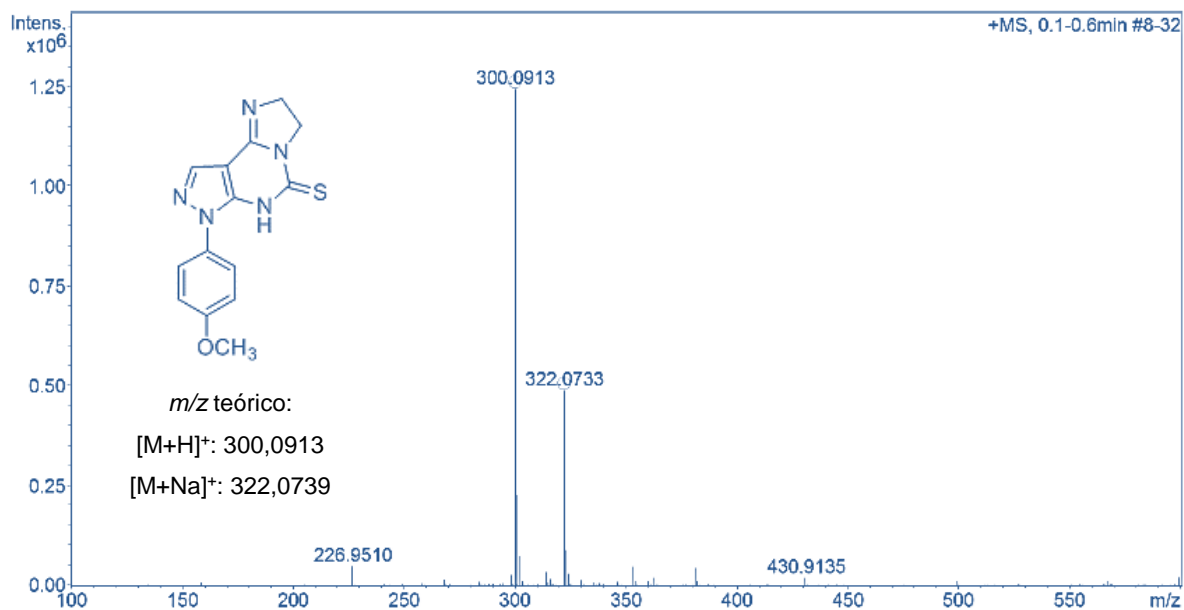
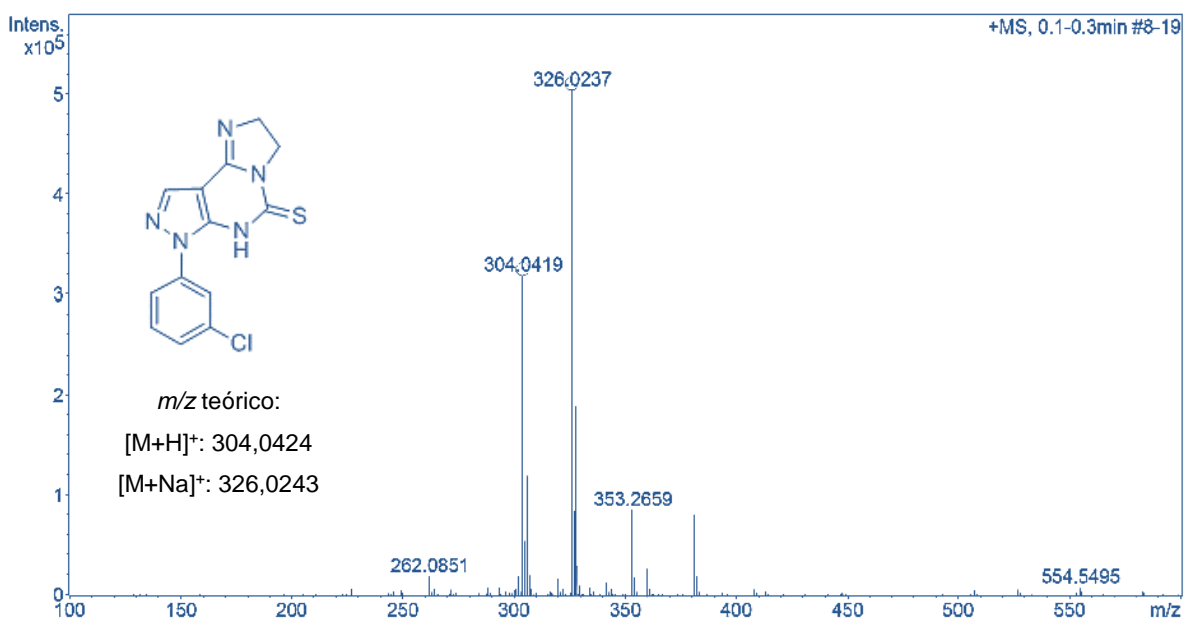
Espectro 20. Espectro de absorção na região do infravermelho do produto final **1f**.

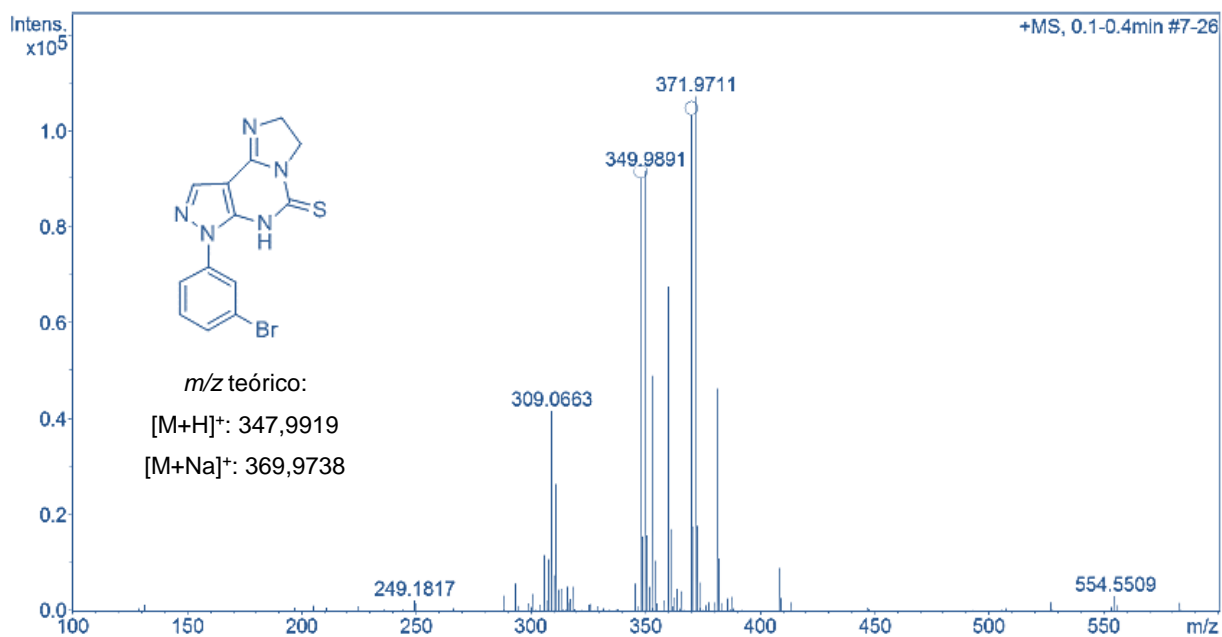
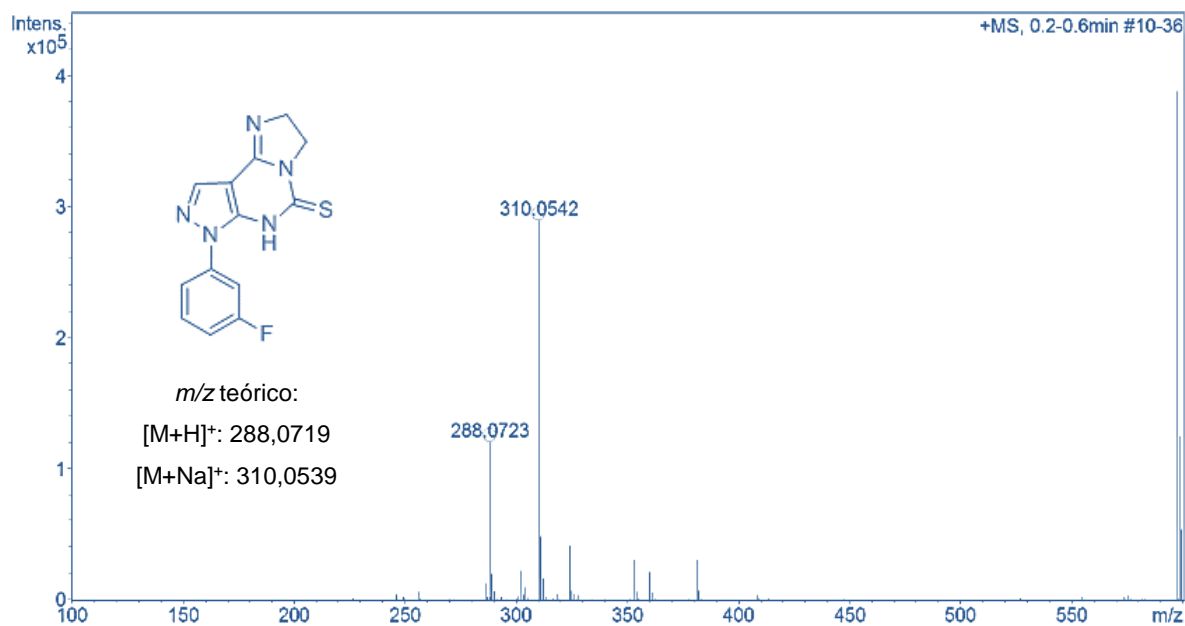


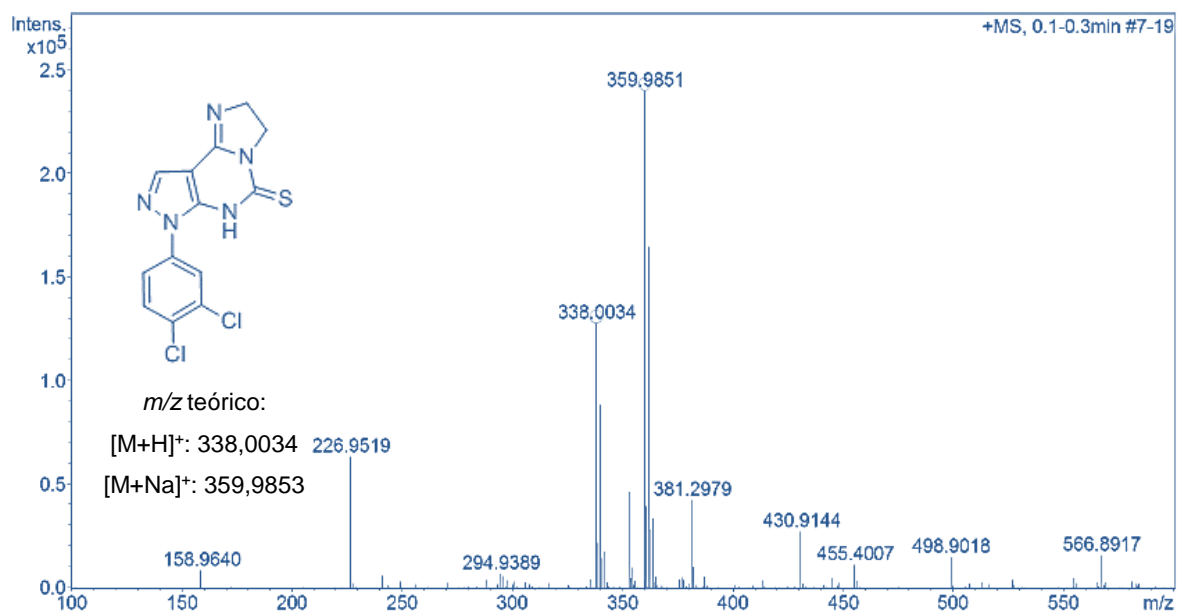
**Espectro 21.** Espectro de absorção na região do infravermelho do produto final **1g**.

**Anexo D - Espectros de Massas de Alta  
Resolução dos produtos finais 1(a-g)**

**Espectro 22.** Espectro de Massas de Alta Resolução do derivado **1a**.**Espectro 23.** Espectro de Massas de Alta Resolução do derivado **1b**.

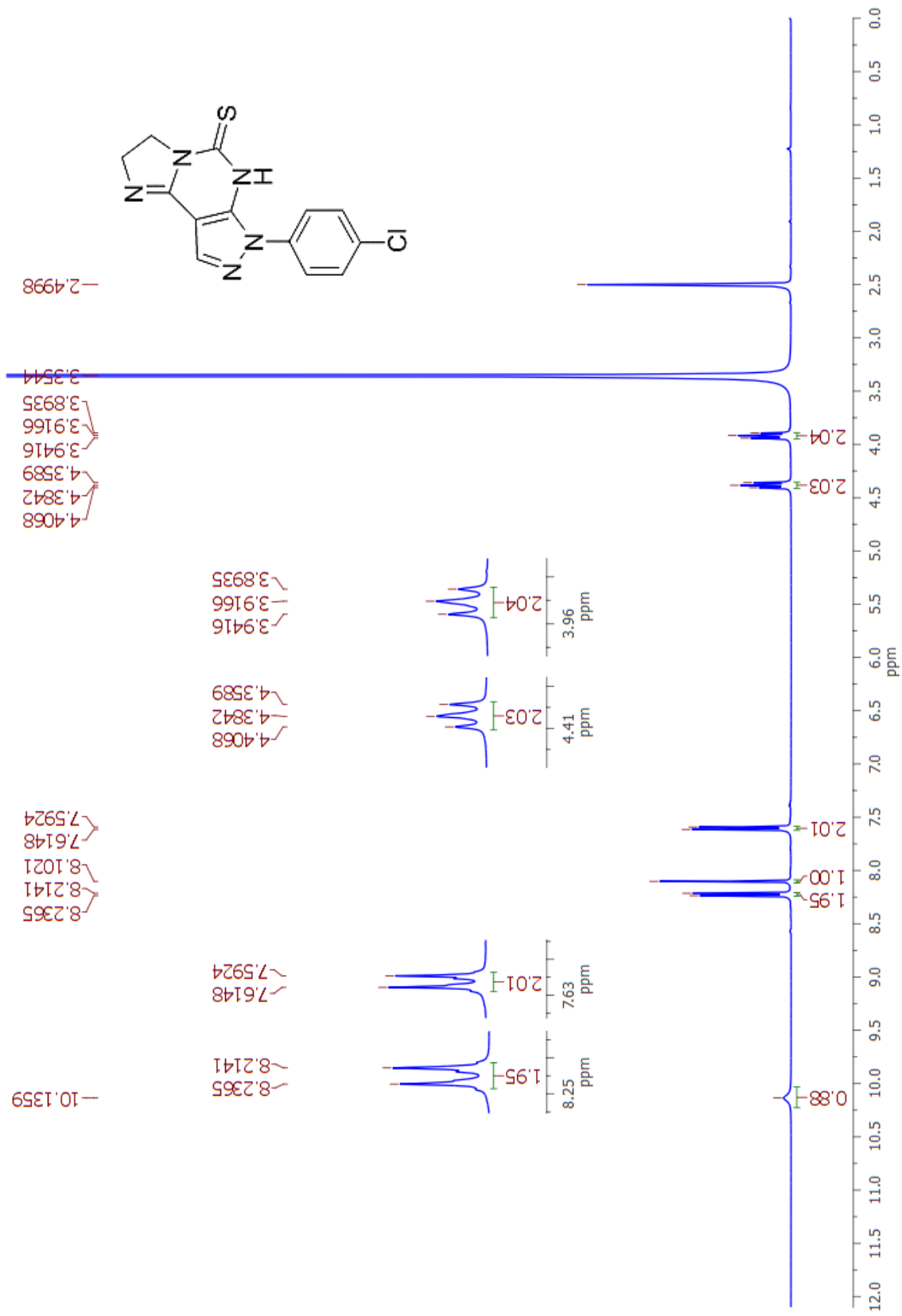
**Espectro 24.** Espectro de Massas de Alta Resolução do derivado **1c**.**Espectro 25.** Espectro de Massas de Alta Resolução do derivado **1d**.

**Espectro 26.** Espectro de Massas de Alta Resolução do derivado **1e**.**Espectro 27.** Espectro de Massas de Alta Resolução do derivado **1f**.

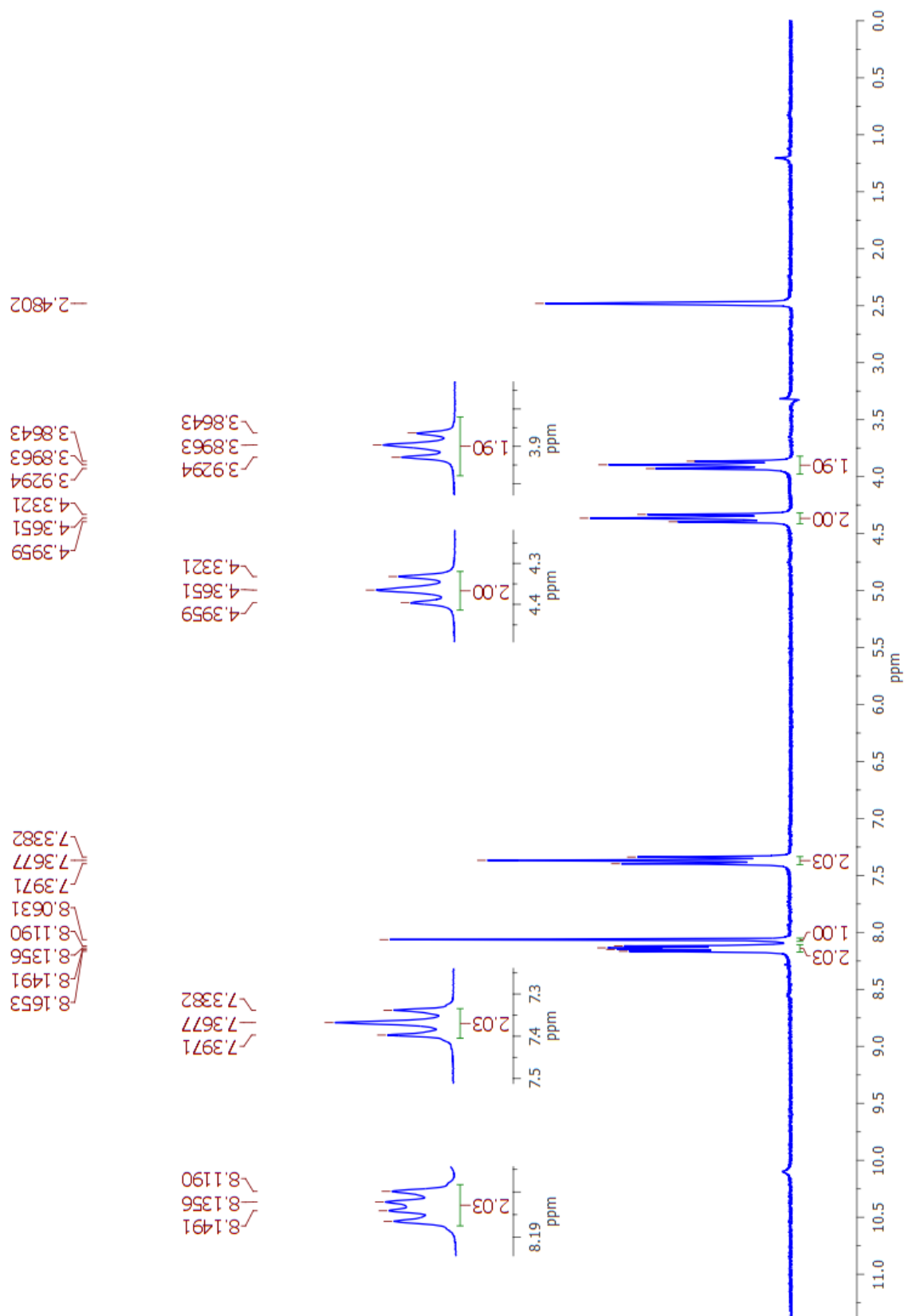
**Espectro 28.** Espectro de Massas de Alta Resolução do derivado **1g**.

**Anexo E - Espectros de  $^1\text{H}$ -RMN dos produtos finais 1(a-g)**

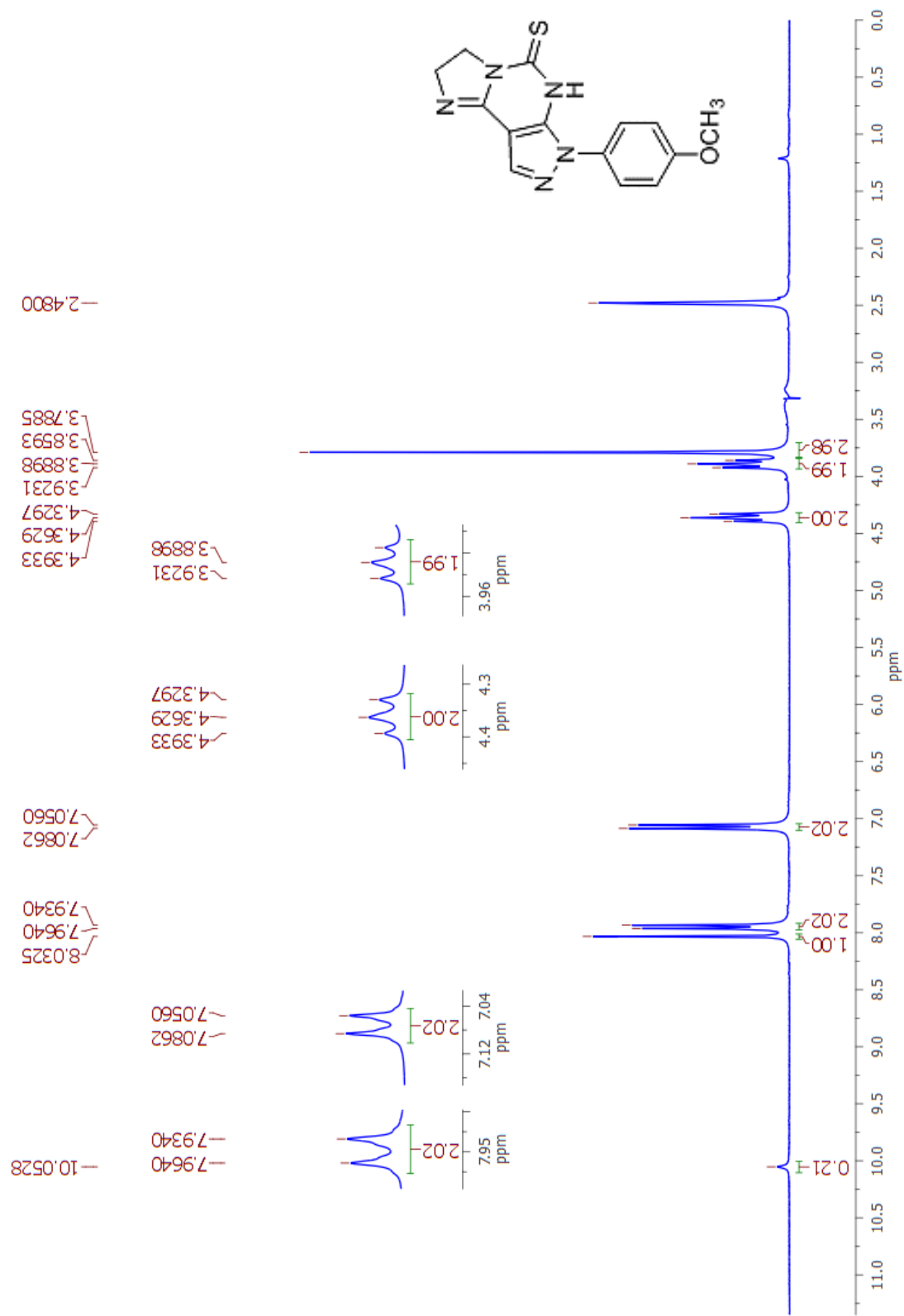
**Espectro 29.** Espectro de Ressonância Magnética Nuclear –  $^1\text{H}$  (400 MHz) do produto final **1a**.



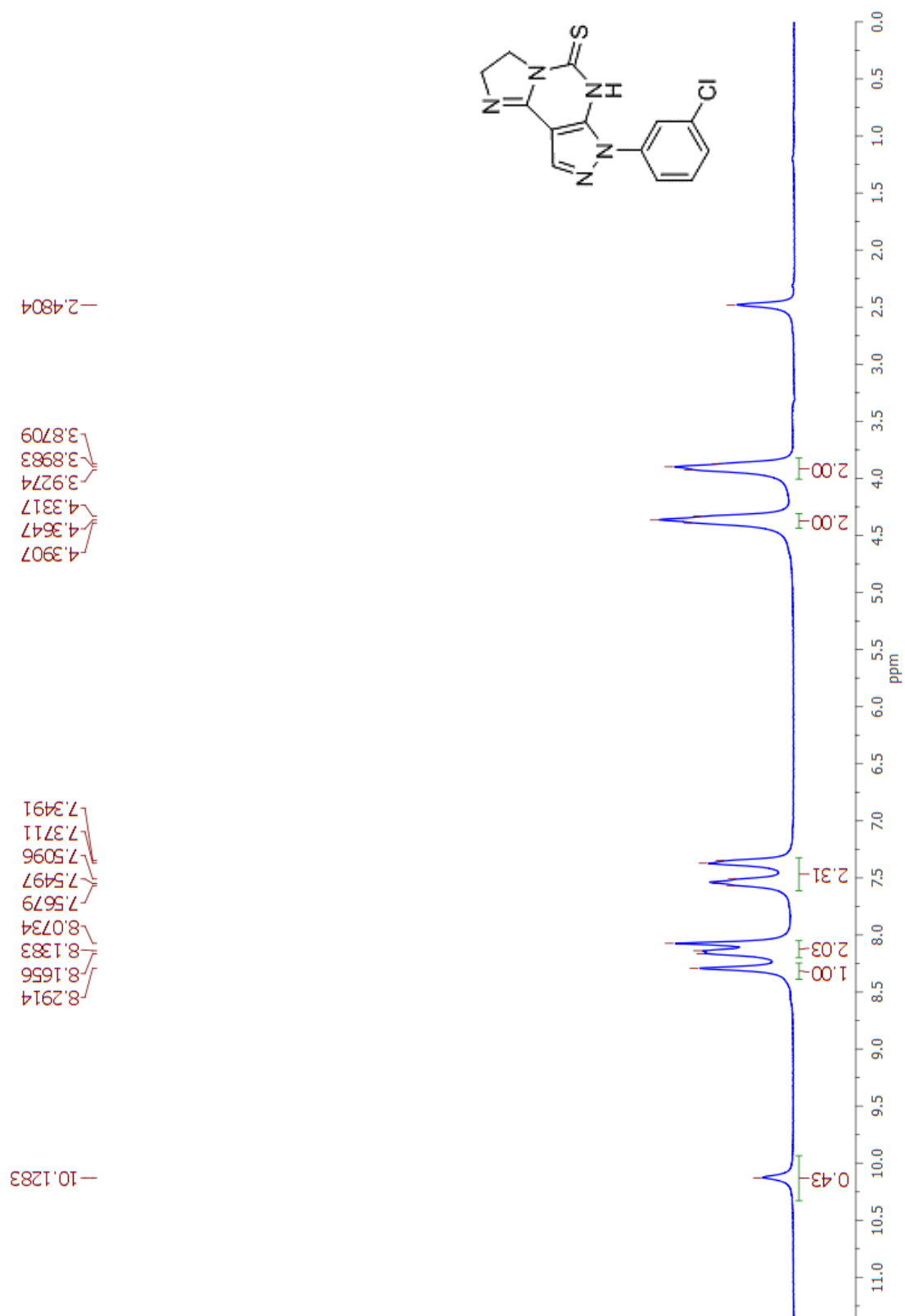
**Espectro 30.** Espectro de Ressonância Magnética Nuclear –  $^1\text{H}$  (300 MHz) do produto final **1b**.



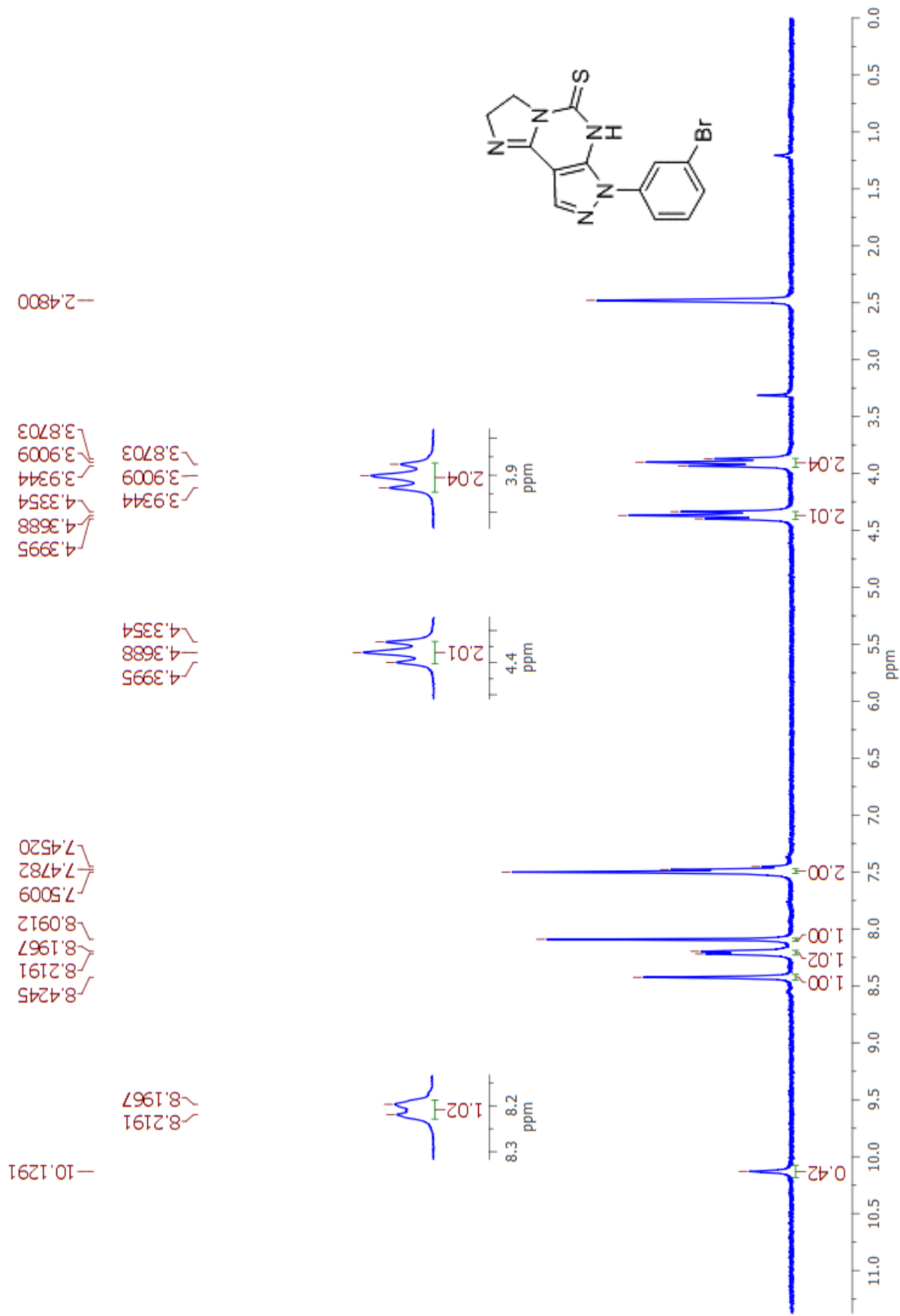
**Espectro 31.** Espectro de Ressonância Magnética Nuclear –  $^1\text{H}$  (300 MHz) do produto final **1c**.



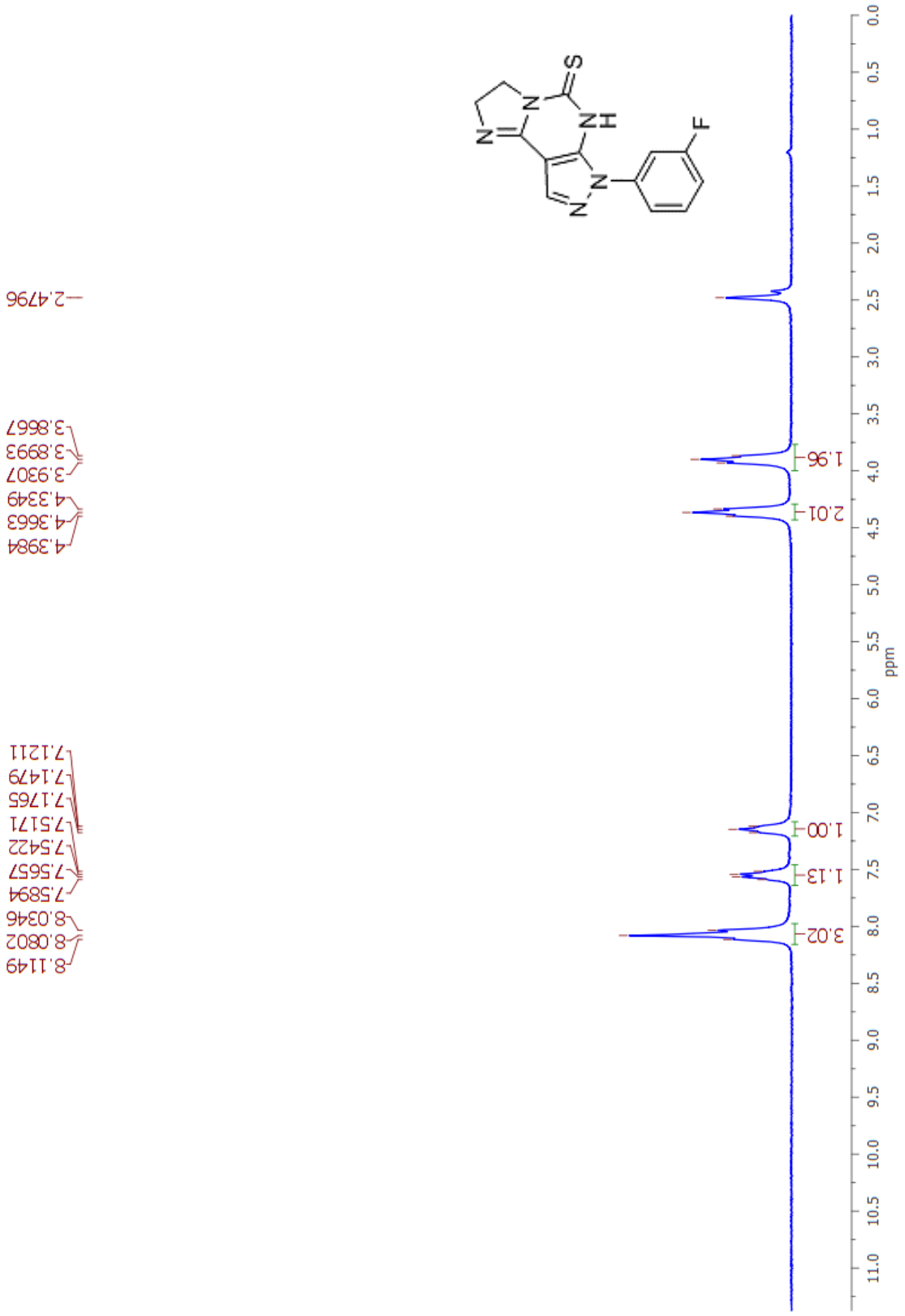
**Espectro 32.** Espectro de Ressonância Magnética Nuclear –  $^1\text{H}$  (300 MHz) do produto final **1d**.



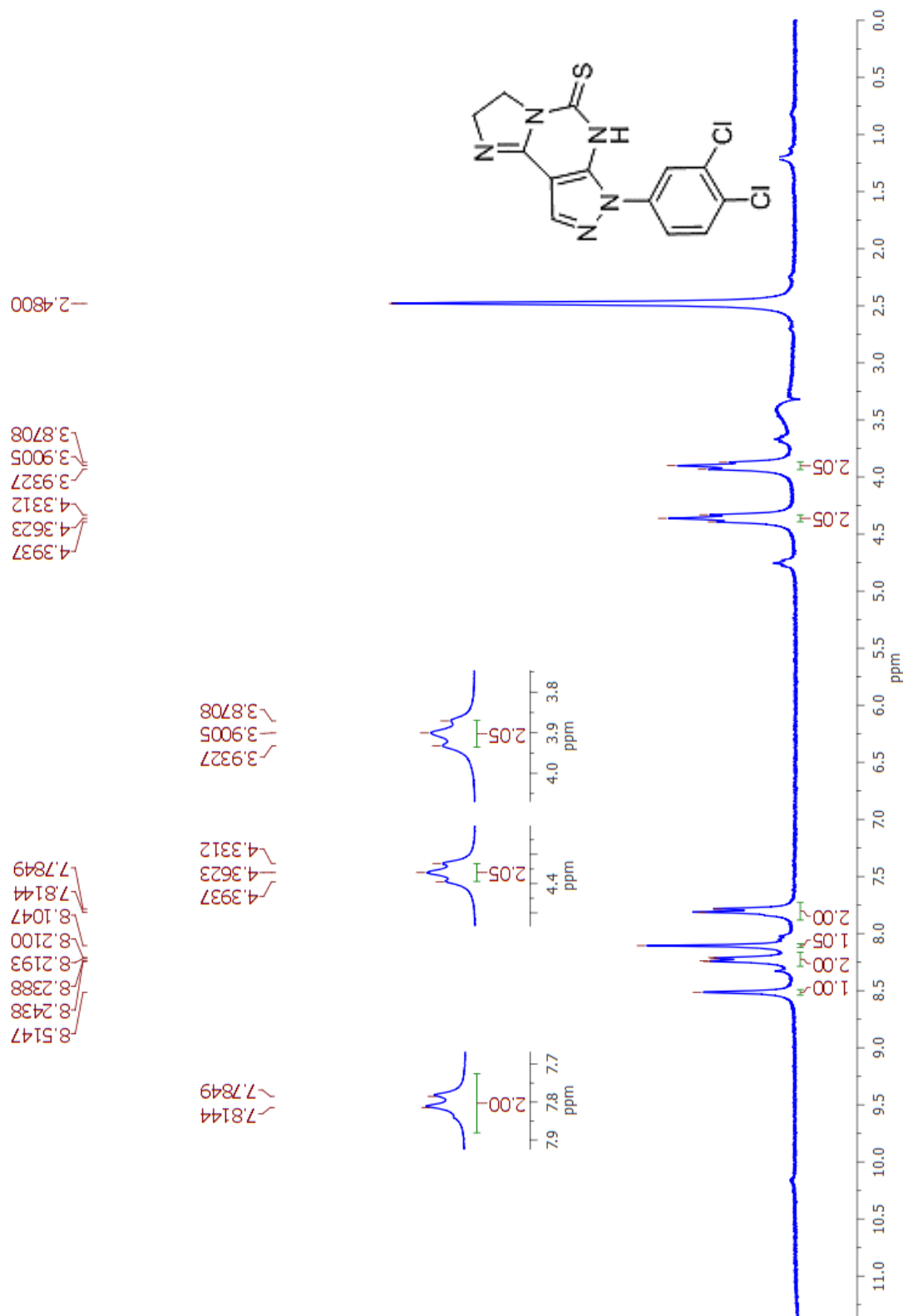
**Espectro 33.** Espectro de Ressonância Magnética Nuclear –  $^1\text{H}$  (300 MHz) do produto final **1e**.



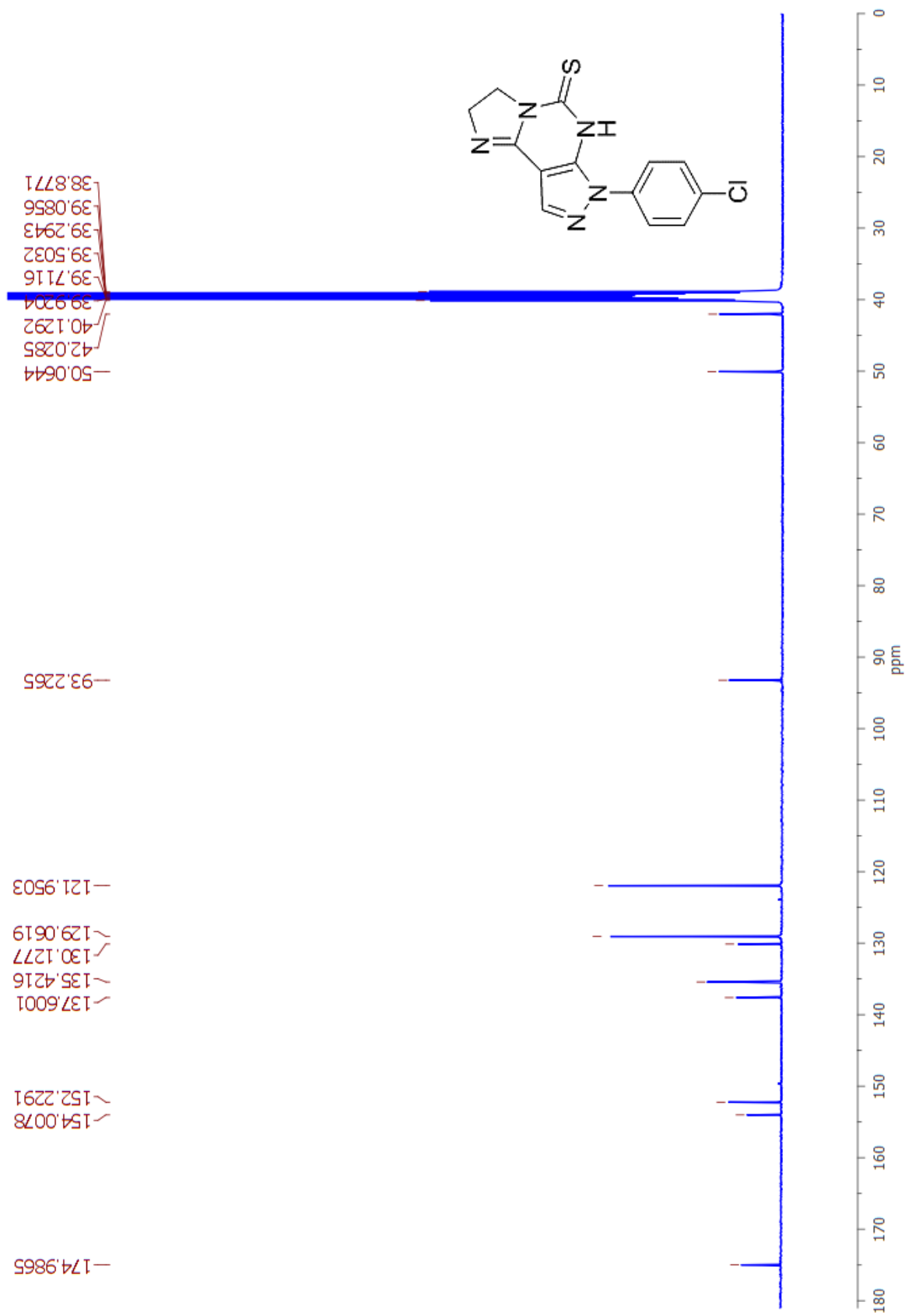
**Espectro 34.** Espectro de Ressonância Magnética Nuclear –  $^1\text{H}$  (300 MHz) do produto final **1f**.

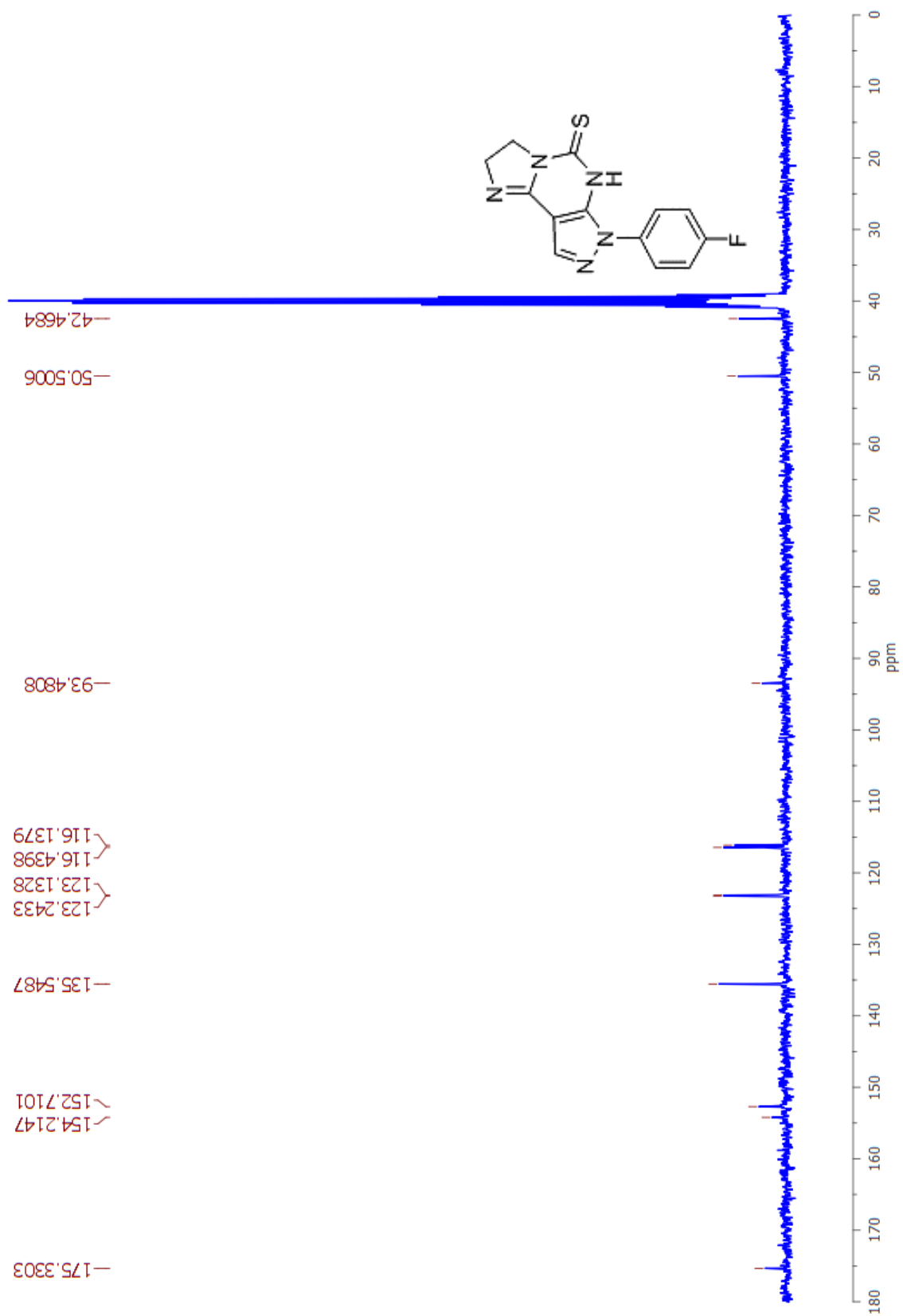


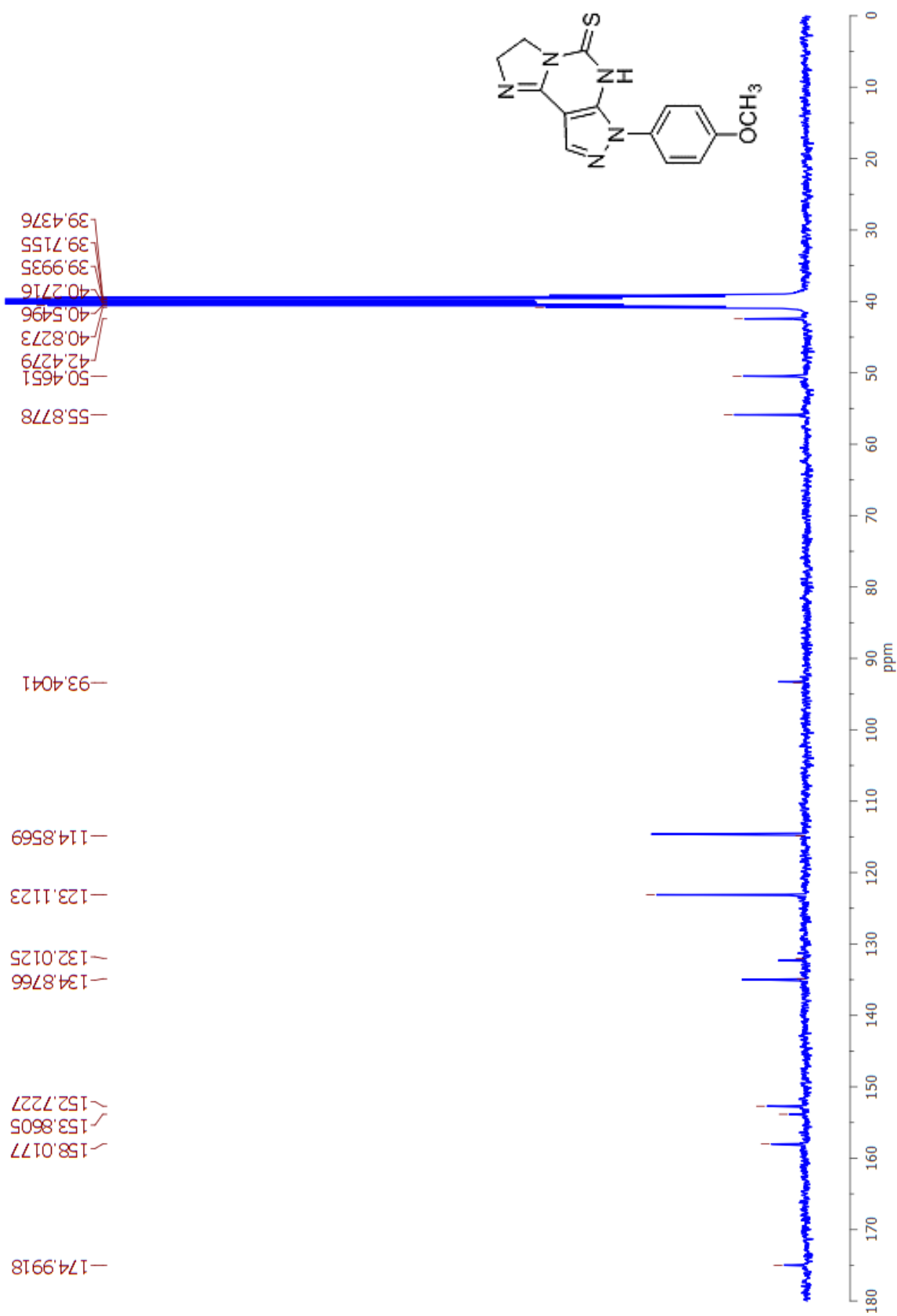
**Espectro 35.** Espectro de Ressonância Magnética Nuclear –  $^1\text{H}$  (300 MHz) do produto final **1g**.

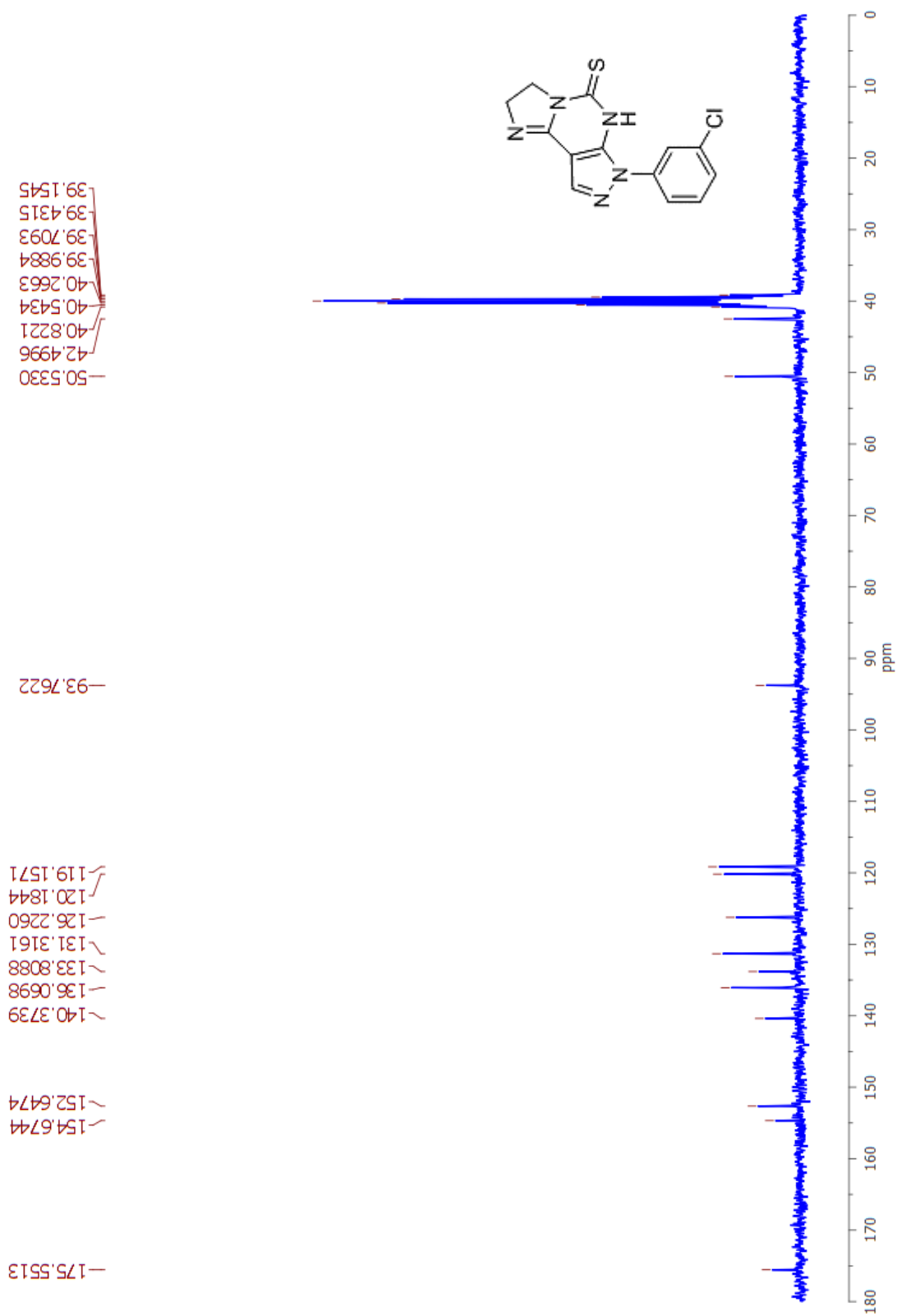


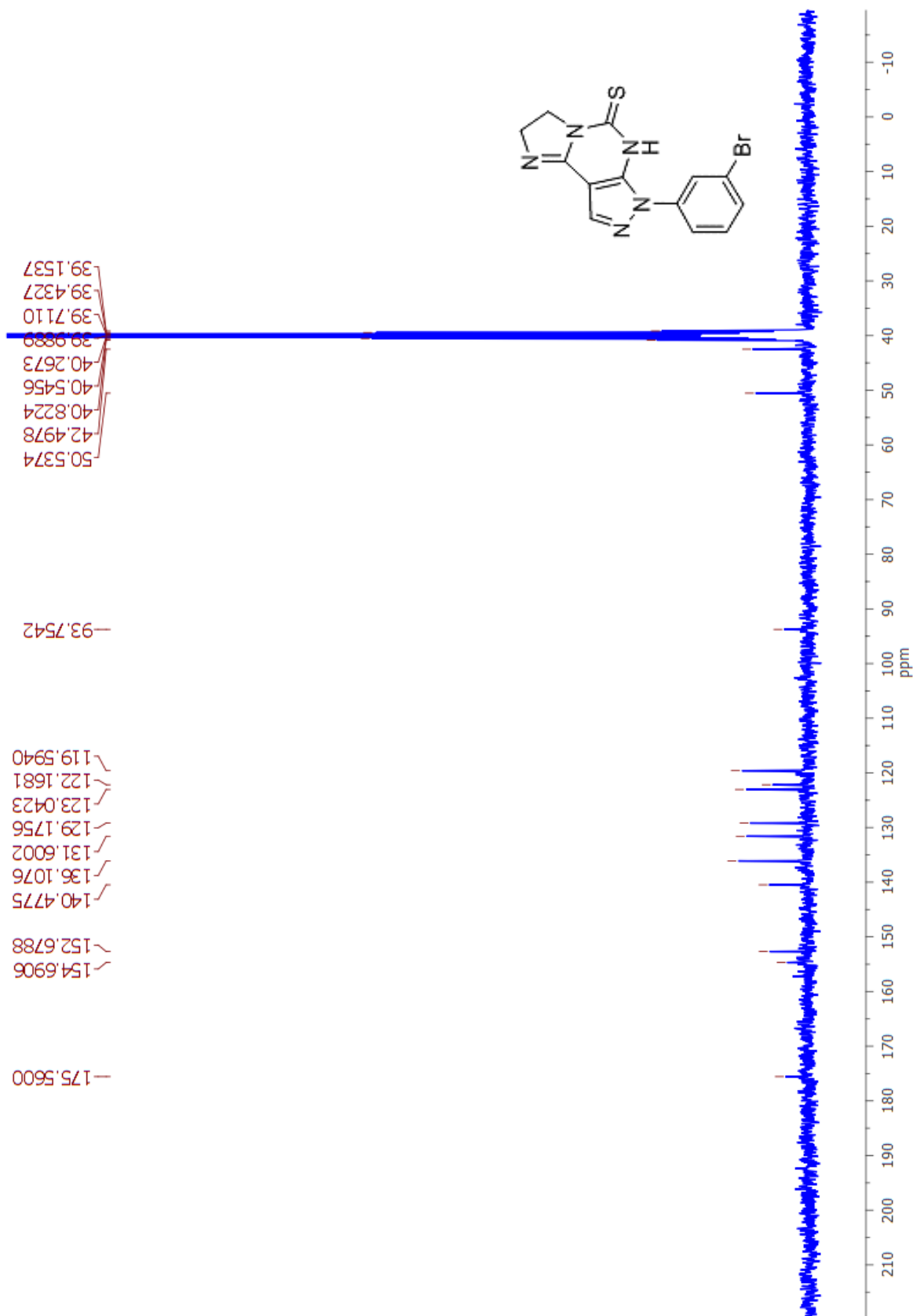
**Anexo F - Espectros de  $^{13}\text{C}$ -RMN dos produtos finais 1(a-g)**

**Espectro 36.** Espectro de Ressonância Magnética Nuclear –  $^{13}\text{C}$  (100 MHz) do produto final **1a**.

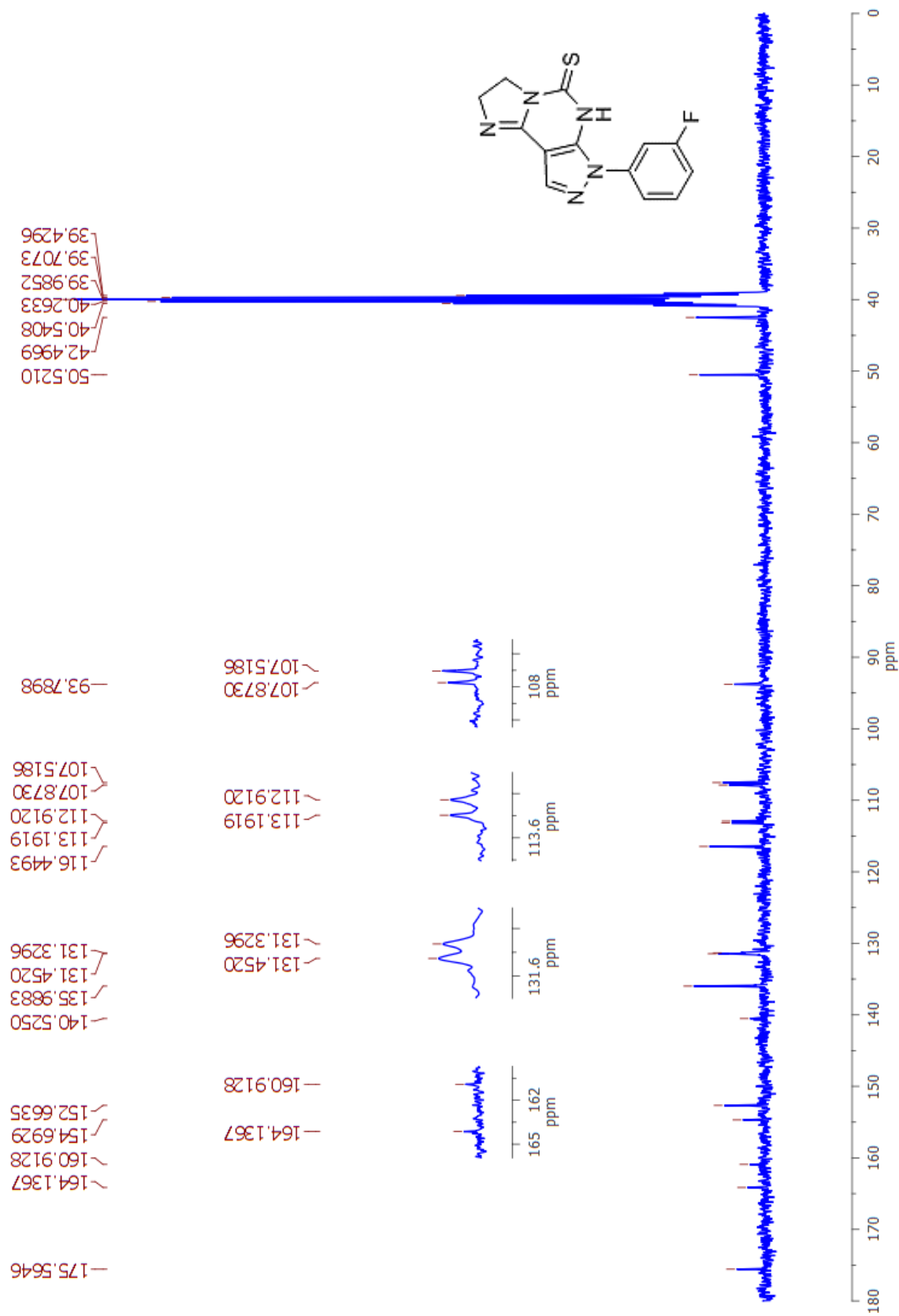
**Espectro 37.** Espectro de Ressonância Magnética Nuclear –  $^{13}\text{C}$  (75 MHz) do produto final **1b**.

**Espectro 38.** Espectro de Ressonância Magnética Nuclear –  $^{13}\text{C}$  (75 MHz) do produto final **1c**.

**Espectro 39.** Espectro de Ressonância Magnética Nuclear –  $^{13}\text{C}$  (75 MHz) do produto final **1d**.

**Espectro 40.** Espectro de Ressonância Magnética Nuclear –  $^{13}\text{C}$  (75 MHz) do produto final **1e**.

**Espectro 41.** Espectro de Ressonância Magnética Nuclear –  $^{13}\text{C}$  (75 MHz) do produto final **1f**.



**Espectro 42.** Espectro de Ressonância Magnética Nuclear –  $^{13}\text{C}$  (75 MHz) do produto final 1g.