

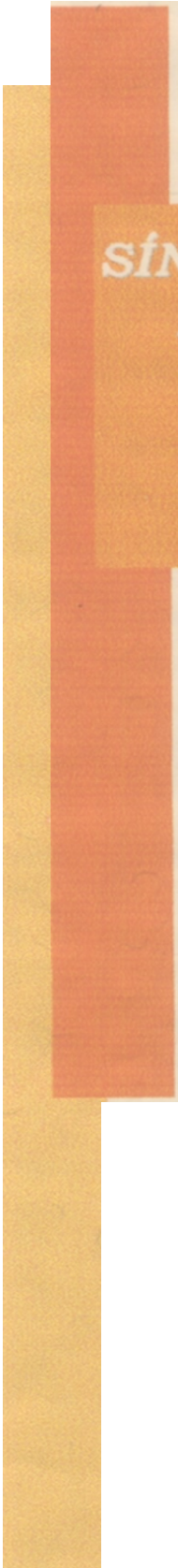
HELOISA DE MELLO

VOLUME 1

e

VOLUME 2

2000



*SÍNTESE, PARÂMETROS LIPOFÍLICOS,
ELETRÔNICOS E CORRELAÇÕES
DE ESTRUTURA X ATIVIDADE
ANTILEISHMANIA DE
1H-PIRAZOLO[3,4-b]PIRIDINAS*

HELOISA DE MELLO

VOLUME 1

2000

**SÍNTESE, PARÂMETROS LIPOFÍLICOS,
ELETRÔNICOS E CORRELAÇÕES DE
ESTRUTURA X ATIVIDADE ANTILEISHMANIA
DE 1H-PIRAZOLO[3,4-*b*]PIRIDINAS**

HELOISA DE MELLO

VOLUME 1

2000

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM QUÍMICA ORGÂNICA**

**SÍNTESE, PARÂMETROS LIPOFÍLICOS,
ELETRÔNICOS E CORRELAÇÕES DE
ESTRUTURA X ATIVIDADE ANTILEISHMANIA
DE 1H-PIRAZOLO[3,4-*b*]PIRIDINAS**

HELOISA DE MELLO

**SOB A ORIENTAÇÃO DA PROFESSORA
Dra . AUREA ECHEVARRIA**

**Tese submetida como requisito parcial
para a obtenção do grau de Doutor em
Ciências. Área de concentração
em Química Orgânica**

Seropédica, Rio de Janeiro

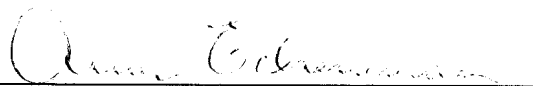
Abril, 2000

TÍTULO DA TESE

**SÍNTESE, PARÂMETROS LIPOFÍLICOS,
ELETRÔNICOS E CORRELAÇÕES DE
ESTRUTURA X ATIVIDADE ANTILEISHMANIA
DE 1H-PIRAZOLO[3,4-*b*]PIRIDINAS**

AUTORA
HELOISA DE MELLO

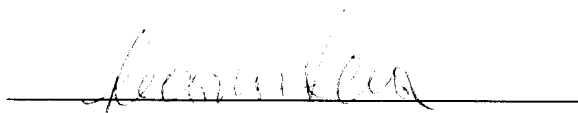
Aprovada em: 13 de Abril de 2000.



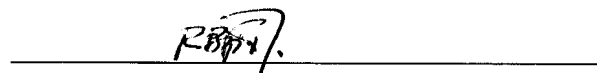
Profa. Dra. Aurea Echevarria
DQ - ICE - UFRRJ (Presidente)



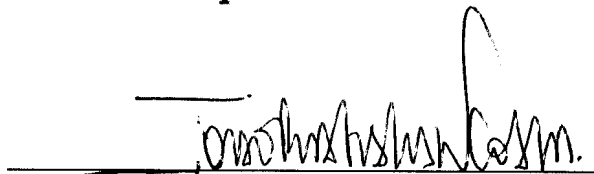
Prof. Dr. José Daniel Figueroa Villar
IME - Rio de Janeiro



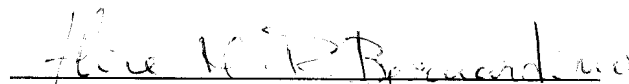
Dra. Leonor Laura Leon
LBqT - FIOCRUZ



Prof. Dr. Raimundo Braz Filho
CCT - UENF



Prof. Dr. João Batista Neves da Costa
DQ - ICE - UFRRJ



Profa. Dra. Alice Maria R. Bernardino
IQ - UFF (Suplente)

Antítese

.....Em tese, existe ainda um longo percurso
Em tese, tudo ainda está por vir
Em tese, tudo há de ser melhor
Em tese, a atitude fará a diferença
Em tese, a diferença trará a esperança
Em tese, estas irmanadas modificarão o futuro
E o futuro, em tese é hoje se renovando,
Em amanhã, em tese, transformando
Uma tese em uma ponte que une,
De certo modo, o ser humano ao divino.

Olinda M.S.

***Não temas o progresso lento,
receie apenas ficar parado.***

**Aos meus pais
Maria Beatriz Moreira e
Bernardino Ferreira de Mello (*in memoriam*)**

Agradecimentos

Ào *DPPGQO* da UFRuralRJ pela oportunidade oferecida.

À *CAPES* pelo financiamento.

À Professora Dra. *Alice Maria Rolim Bernardino* pela colaboração com as drogas usadas neste trabalho e, principalmente por sua amizade e incentivo oferecidos ao longo de todo o tempo dedicado a pesquisa científica.

Àos *professores* da pós-graduação da UFRRJ.

Ao *Laboratório de Tripanosomatídeos* da Fundação Oswaldo Cruz pela oportunidade da realização dos testes de atividade antileishmania.

À Dra. *Leonor Laura Pinto Leon* da Fundação Oswaldo Cruz, pela sua amizade, carinho e incentivo constante, pela oportunidade oferecida para a realização dos testes de atividade antileishmania.

À *Marilene Canto-Cavalheiro* que durante o verão de 1998 esteve comigo no Laboratório de Tripanosomatídeos da FIOCRUZ me ensinando sobre os experimentos com as *Leishmanias* e que sempre, muito gentilmente me ofereceu a sua amizade e apoio.

À *central de análise* do DQ – UFRRJ e UFF pelos espectros de Ressonância Magnética Nuclear e Infravermelho.

Aos *funcionários da química* pelos quebra galhos em geral.

Ao Professor Dr. *Mário Geraldo de Carvalho* pela colaboração na análise dos espectros de RMN.

Ao Professor Dr. *Carlos Maurício de Sant'anna* que sempre com muita solicitude me ensinou e ajudou na avaliação dos resultados da modelagem molecular.

À Professora Dra. *Rosane Nora Castro* pela orientação e apoio no uso do CLAE.

À Professora Dra. *Maria Aparecida Medeiros Maciel* pela revisão deste trabalho.

À todos os alunos da pós-graduação da Química Orgânica em especial a *Ana Cristina, André Gabriel, Daniela, Dari, Denise, Frances Regiane, Geizí Jane, Lucinha,, Marcia Cristina, Margareth Rôse, Rosane Alves e Tânia Maria* pela solidariedade nos momentos bons e ruins desta jornada de trabalho.

Aos rapazes do lab. 29: *Edson, João Vitor, Claudio Lourenço, Dario e Claudio Eduardo* por sua amizade e descontração.

À *Andressa Esteves de Souza*, minha cúmplice e grande companheira de laboratório pela paciência, pelo carinho enorme e tolerância nos dias de mau humor.

À *Marco Antônio (Profeta)*, pela valiosa ajuda e paciência.

À *Paulo Afonso* pela espontânea amizade, ajuda diária e valiosa colaboração.

À *Javier Rincón Velandía*, grande companheiro.

À *María Raquel García Vega*, pela presença constante desde o início de 1995 até hoje sempre me oferecendo seu apoio e amizade.

À *María Elena Bernal Gómez* que, nos meus primeiros anos de Rural, me apoiou, incentivou e ofereceu sua amizade com muito carinho e afeto.

Aos meus amigos *Claudia Bucceroni Guerra, María Inés Barreto da Costa e João Batista Lopes Martins*, que apesar da distância inevitável, sempre estiveram presentes na minha vida desde o início de tudo e que durante esses últimos anos me apoiaram e me deram aquela força.

À amiga *Ana Paula Santos da Conceição*, por todo esse tempo compartilhado e pela poesia. *É mais e mais diária – e não se perde no meio de tanta e tamanha companhia.*

Muito obrigado.

Dedico este trabalho

à Prof. Dra. *Aurea Echevarria*

com grande admiração, respeito e carinho

e

à *Camila, Beatriz, Rafael, Bruno, Tiago e Lucas,*

o futuro.

ÍNDICE

	Página
1 - INTRODUÇÃO	1
1.1- Sistema Heterocíclico 1 <i>H</i> -pirazolo[3,4- <i>b</i>]piridina	3
1.1.1 – Síntese a Partir de Piridinas Substituídas	3
1.1.2 – Síntese a Partir de Pirazóis	5
1.2. – Atividade Biológica dos Derivados Heterocíclicos do Sistema 1 <i>H</i> -pirazolo[3,4- <i>b</i>]piridina	8
1.3 - Leishmaniose	15
1.3.1 – <i>Leishmania</i>	16
1.3.2 – Quimioterapia da Leishmaniose	19
1.4 – Relação Qualitativa e Quantitativa (SAR e QSAR) Entre a Estrutura Química e a Atividade Biológica	23
1.4.1 – Parâmetros Hidrofóbicos	30
1.4.1.1 – Coeficiente de Partição	31
1.4.1.2 – Parâmetros Hidrofóbicos Utilizando Métodos Cromatográficos	35
1.4.2. – Parâmetros Eletrônicos	39
1.4.2.1 – Parâmetros Eletrônicos Empíricos	39
1.4.2.2. – Parâmetros Eletrônicos Teóricos	42
2 - OBJETIVOS	46
3 - EXPERIMENTAL	48
3.1 – Materiais e Aparelhagem	48
3.1.1 – Solventes e Reagentes	49

3.1.2- Aparelhos	49
3.2 – Síntese	51
3.2.1 – Síntese das Matérias Primas	51
3.2.1.1 - 5-amino-1,3-dimetilpirazol	51
3.2.1.2- α - carbetoxi - β (1,3 - dimetil - 5 - pirazolilamino (acrilato de etila)	52
3.2.1.3 - 5 - carbetoxi - 4 - cloro - 1,3 - dimetil - 1 <i>H</i> - pirazolo[3,4- <i>b</i>]piridina	53
3.2.1.4 - Cloridrato do 4-aminofenol	54
3.2.1.5 - Anilinas 3' e 4' substituídas	
3.2.2 – Reações de Acoplamento para Obtenção dos Derivados 4-(<i>X</i> -fenil)amino-5-carboetoxi-1,3- dimetil-1 <i>H</i> -pirazolo[3,4- <i>b</i>]piridina	55
3.2.2.1 – Obtenção dos Derivados onde $X=H, 4'-NO_2, 4'-OCH_3, 4'-CH_3, 3'-NO_2$ e $3'-OCH_3$	56
3.2.2.2 - Obtenção dos Derivados onde $X= 4'-Br, 4'-F$ e $3'-CH_3$	60
3.2.2.3 - Obtenção dos Derivados onde $X=4'-Cl, 3'-Cl$	62
3.2.2.4 - Obtenção do Derivado onde $X=4'-OH$	64
3.2.2.5 - Obtenção do Derivado onde $X=4'-OAc$	66
3.3 – Determinação dos Valores de pK_a(s)	67
3.4 – Determinação dos Parâmetros Hidrofóbicos	70
3.4.1- Coeficiente de Partição (P) - Método “Shake Flask”	70
3.4.2- Parâmetros Cromatográficos	74
3.4.2.1 - Valores de R_M Determinados por Cromatografia em Camada Fina em Fase Reversa	74

3.4.2.2 - Valores de Fator Capacidade (k') Determinados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	77
3.5 – Parâmetros Eletrônicos Teóricos	79
3.5.1 – Derivados da Série 4-(<i>X</i> -fenil)amino-5-carboetoxi-1,3- dimetil-1 <i>H</i> -pirazolo[3,4- <i>b</i>]piridinas	79
3.5.2 – Derivados das Séries 4-(4'-hidroxifenil)amino-5- carboetoxi-1,3-dimetil-1 <i>H</i> -pirazolo[3,4- <i>b</i>]piridinas, 4-(4'- hidroxi-3'-etilaminometilfenil)amino-5-carboetoxi-1,3- dimetil-1 <i>H</i> -pirazolo[3,4- <i>b</i>]piridinas	80
3.6 – Avaliação da Atividade Antileishmania	81
4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	85
4.1 – Síntese	85
4.1.1- Obtenção dos derivados Intermediários	87
4.1.2 - Obtenção das 4-(<i>X</i> -fenil)amino-5-carboetoxi-1,3- dimetil-1 <i>H</i> -pirazolo[3,4- <i>b</i>]piridinas	90
4.2 – Determinação Estrutural	93
4.2.1 - Derivados Intermediários	93
4.2.2 - Derivados 4-(<i>X</i> -fenil)amino-5-carboetoxi-1,3-dimetil- 1 <i>H</i> -pirazolo[3,4- <i>b</i>]piridinas	101
4.3 – Atividade Antileishmania	112
4.4 – Estudo Sobre os Parâmetros Hidrofóbicos.	122
4.5 – Estudo de Modelagem Molecular	137
4.5.1 – Parâmetros Eletrônicos Teóricos da Série 4-(<i>X</i> -fenil)amino-5-carboetoxi-1,3-dimetil-1 <i>H</i> - pirazolo[3,4- <i>b</i>]piridinas	137

4.5.2 – Estudo Conformacional Comparativo dos Derivados <i>1,3-dimetil, 1,3-difenil e 1-fenil-3-metil-1H-pirazolo</i> [3,4-b]piridina e da Amodiaquina	139
4.6 - Correlações Quantitativas Entre a Estrutura Química e a Atividade Biológica	148
5- CONCLUSÃO	156
6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	158

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ε	absortividade molar
r	coeficiente de correlação
r²	coeficiente de correlação global
$\lambda_{\text{máx}}$	comprimento de onda máximo
J	constante de acoplamento
COSY	correlated spectroscopy
D	debye
v	deformação axial
δ	deslocamento químico
dp	desvio padrão
DEPT	distortionless enhancement by polarization transfer
2D	duas dimensões
d	dubleto
R_f	fator de referência em CCF
Hz	hertz
IV	infravermelho
Lit.	literatura
R_M	medida de referência
MHz	megahertz
nm	nanômetro
nM	nanomolar
ppm	partes por milhão
PVP	polivinil pirrolidona
P.F.	ponto de fusão
%inib.	porcentagem de inibição

q	quarteto
RMN de ¹³C	ressonância magnética nuclear de carbono 13
RMN de ¹H	ressonância magnética nuclear de hidrogênio
F	significância da análise global
s	singleto
sl	singleto largo
TMS	tetrametilsilano
t	triplete
UV/VIS	ultra violeta/visível
1D	uma dimensão
Vol.	volume
v/v	volume por volume

LISTA DE FIGURAS

	Página
1- Exemplos de análogos estruturais do sistema heterocíclico pirazolopiridina.	1
2- Estruturas isôméricas do sistema heterocíclico pirazolopiridina.	2
3- Obtenção de derivados 1 <i>H</i> -pirazolo[3,4- <i>b</i>]piridinas a partir de piridinas substituídas.	4
4- Obtenção de derivados 1 <i>H</i> -pirazolo[3,4- <i>b</i>]piridinas a partir de piridonas substituídas.	4
5- Obtenção de 1 <i>H</i> -pirazolo[3,4- <i>b</i>]piridinas utilizando o método de Combes.	5
6- Obtenção de 1 <i>H</i> -pirazolo[3,4- <i>b</i>]piridin-4-ona pelo método de Gould-Jacobs.	6
7- Obtenção de 4-cloro-1 <i>H</i> -pirazolo[3,4- <i>b</i>]piridinas utilizando o método de Gould-Jacobs modificado.	6
8- Obtenção de derivados pirazolo[3,4- <i>b</i>]piridinas reduzidas a partir de 5-aminopirazóis.	7
9- Alopurinol e derivados 1 <i>H</i> -pirazolo[3,4- <i>b</i>]piridinas testados como inibidores da enzima xantina oxidase.	8
10- Derivados 1 <i>H</i> -pirazolo[3,4- <i>b</i>]piridinas avaliados com relação a atividade ansiolítica.	9
11- Derivados 5-acil-aril-hirazona-1 <i>H</i> -pirazolo[3,4- <i>b</i>]piridina avaliados com relação ao efeito antinociceptivo.	10
12- Derivados 1 <i>H</i> -pirazolo[3,4- <i>b</i>]piridinas avaliados quanto a atividade polimerásica das enzimas transcriptase reversa (RT) do vírus HIV e das DNA-polimerases humanas.	11
13- Drogas utilizadas no tratamento da malária.	12

14- Derivados heterocíclicos do sistema 1 <i>H</i> -pirazolo[3,4- <i>b</i>]piridina obtidos por Mello.	13
15- Derivados quinolínicos 2-substituídos testados contra a <i>L. amazonensis</i> e <i>L. venezuelensis</i> .	14
16- Representação esquemática da ultra estrutura das diferentes fases evolutivas de uma espécie do gênero <i>Leishmania</i> : A = amastigota e B = promastigota.	17
17- Inseto vetor transmissor das leishmanioses.	17
18- Ciclo evolutivo das espécies do gênero <i>Leishmania</i> .	18
19- Drogas de primeira escolha para o tratamento da leishmaniose.	19
20- Drogas de segunda escolha para o tratamento da leishmaniose.	20
21- Drogas alternativas que vem sendo estudadas quanto a sua atividade antileishmania.	21
22- Derivados sintéticos (amidínicos) e naturais testados contra a <i>L. amazonensis</i> .	22
23- Principais etapas no estudo de QSAR.	24
24- 9-anilinoacridinas ativas contra a <i>Leishmania major</i> ⁶ .	25
25- Derivados heterocíclicos 3-aryl-4,5,6,7-tetrahidro-1 <i>H</i> -pirazolo [4,3- <i>c</i>]piridinas.	26
26- Determinação dos valores de R_f .	75
27- Obtenção dos derivados 1 <i>H</i> -pirazolo[3,4- <i>b</i>]piridina.	86
28- Obtenção do 5-amino-1,3-dimetilpirazol.	87
29- Obtenção do α -carboetoxi- β -(1,3-dimetil-5-pirazolilamino)acrilato de etila.	87
30- Obtenção do derivado 5-carboetoxi-4-cloro-1,3-dimetil-1 <i>H</i> -pirazolo[3,4- <i>b</i>]piridina.	88
31- Obtenção dos derivados 4-(<i>X</i> -fenil)amino-5-carbetoxi-1,3-dimetil-1 <i>H</i> -pirazolo[3,4- <i>b</i>]piridina.	90

- 32-** Valores dos deslocamentos químicos dos carbonos para o heterociclo 1,3-dimetil-1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridina. 98
- 33-** Formação da ligação do tipo ponte de hidrogênio interna. 101
- 34-** Gráfico e equação para determinação da DL50 do derivado X=4'-*CH*₃. 114
- 35-** Gráfico e equação para determinação da DL90 do derivado *FFOH*. 115
- 36-** Comparação dos valores de DL50 obtidos para a série 4-(*X*-*fenil*)amino-5-carboetoxi-1,3-dimetil-1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridina. 119
- 37-** Comparação dos valores de DL90 obtidos para a os derivados *FFOH*, *MFOH*, 4'-*OH*, *FFOHdi* e *MFOHdi*. 121
- 38-** Correlação entre o R_{Mw}^{corr} e logP. 134
- 39-** Correlação entre o $logk_w^{corr}$ e logP. 135
- 40-** Correlação entre o R_{Mw}^{corr} e $logk_w^{corr}$. 136
- 41-** Conformações preferenciais obtidas para as pirazolopiridinas *MFOHdi*, *FFOHdi* e a *Amodiaquina*. 140
- 42-** Conformações preferenciais obtidas para as pirazolopiridinas *MFOH*, *FFOH* e X=4'-*OH*. 141
- 43-** Sobreposição da *Amodiaquina* com as pirazolopiridinas *MFOHdi* (I) e *FFOHdi* (II). 142
- 44-** Sobreposição da *Amodiaquina* com as pirazolopiridinas *MFOH* (II)=, *FFOH* (III) e X=4'*OH* (IV). 143

LISTA DE TABELAS

	Página
1- Rendimentos e pontos de fusão para os derivados, onde X=H, 4'-NO ₂ , 4'-OCH ₃ , 4'-CH ₃ , 3'-NO ₂ e 3'-OCH ₃ .	57
2- Dados espectrocópicos obtidos na região do UV/VIS em 1,4-dioxano como solvente, para os derivados onde X=H, 4'-NO ₂ , 4'-OCH ₃ , 4'-CH ₃ , 3'-NO ₂ e 3'-OCH ₃ .	58
3- Rendimentos e pontos de fusão para os derivados, onde X= 4'-Br, 4'-F, 3'-CH ₃ .	60
4- Dados espectrocópicos obtidos na região do UV/VIS em 1,4-dioxano como solvente, para os derivados onde X= 4'-Br, 4'-F e 3'-CH ₃ .	61
5- Dados de rendimentos e pontos de fusão dos derivados 4'-Cl e 3'-Cl.	63
6- Dados espectrocópicos obtidos na região do UV/VIS em 1,4-dioxano como solvente, para os derivados onde X=4'-Cl e 3'-Cl.	63
7- Rendimento e ponto de fusão do derivado 4'-OH obtidos em etanol e etilenoglicol.	65
8- Valores dos pK _a (s) das pirazolopiridinas determinados potenciométricamente.	69
9- Valores de λ _{máx} , absorvância na fase orgânica e equação das curvas de calibração para os derivados onde X=3'-Cl, 4'-Cl, 3'-CH ₃ , H, 4'-F, 4'-OH.	71
10- Valores médios de R _f determinados em triplicata para os derivados 1,3-dimetilpirazolopiridina.	76
11- Valores de tempo de retenção (t _R) das pirazolopiridinas variando de 35 a 60% (v/v) de tampão fosfato em acetonitrila.	78

- 12-** Dados experimentais do ensaio *in vitro* com as promastigotas de *Leishmania amazonensis* para determinação da DL50 das drogas onde X = 4'-Br, 3'-Cl, 4'-Cl, 3'-CH₃, 4'-CH₃, 3'-OCH₃, 4'-OCH₃ e H. 82
- 13-** Dados experimentais do ensaio *in vitro* com as promastigotas de *Leishmania amazonensis* para determinação da DL50 das drogas onde X = 4'-F, 3'-NO₂ e 4'-NO₂, 4'-OH, 4'-OAc. 83
- 14-** Dados experimentais do ensaio *in vitro* com as promastigotas de *Leishmania amazonensis* para determinação da DL50 ou DL90 das drogas FFOH, MFOH, FFOHdi, MFOHdi e Amodiaquina. 84
- 15-** Rendimentos e pontos de fusão dos derivados intermediários. 89
- 16-** Rendimentos e pontos de fusão dos derivados acoplados 4-(X-fenil)amino-5-carboetoxi-1,3-dimetil-1H-pirazolo[3,4-b]piridina. 92
- 17-** Dados de RMN de ¹H e de ¹³C (em CDCl₃) do 5-amino-1,3-dimetilpirazol. 95
- 18-** Dados de RMN de ¹H e de ¹³C (em CDCl₃) do α-carboetoxi-β-(1,3-dimetil-5-pirazolilamino)acrilato de etila. 97
- 19-** Dados de RMN de ¹H e de ¹³C (em CDCl₃) e correlações bidimensionais heteronucleares através de duas (²J_{CH}) e três (³J_{CH}) ligações observadas para o 5-carboetoxi-4-cloro-1,3-dimetil-1H-pirazolo[3,4-b]piridina. 100
- 20-** Dados de RMN de ¹H dos derivados 4'-F, 4'-Cl, 4'-Br 4'-OCH₃, 4'-NO₂ e 4'-OAc em CDCl₃ e 4'-OH e 4'-CH₃ em DMSO-d₆. 103
- 21-** Dados de RMN de ¹H dos derivados H, 3'-NO₂, 3'-OCH₃ em CDCl₃ e 3'-Cl e 3'-CH₃ em DMSO-d₆. 104

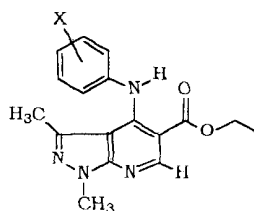
- 22-** Correlações espectroscópicas heteronucleares de hidrogênio e carbono-13 ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - COSY) através de duas ($^2\text{J}_{\text{CH}}$) e três ($^3\text{J}_{\text{CH}}$) ligações, observadas para os derivados 4'-F, 4'-Cl, 4'-Br, 4'-OCH₃ e 4'-NO₂ em CDCl₃ e 4'-OH e 4'-OAc em DMSO-d₆. 106
- 23-** Correlações espectroscópicas bidimensionais heteronucleares de hidrogênio e carbono-13 ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - COSY) através de duas ($^2\text{J}_{\text{CH}}$) e três ($^3\text{J}_{\text{CH}}$) ligações, observadas para os derivados 4'-CH₃, 3'-Cl e 3'-CH₃ em DMSO-d₆ e H, 3'-NO₂ e 3'-OCH₃ em CDCl₃. 107
- 24-** Dados de RMN de ^{13}C (δ^a em ppm) dos derivados 4'-F, 4'-Cl, 4'-Br, 4'-OCH₃, 4'-NO₂ e 4'-OAc em CDCl₃ e 4'-OH, e 4'-CH₃ em DMSO-d₆. 109
- 25-** Dados de RMN ^{13}C (δ^a em ppm) dos derivados H, 3'-NO₂ e 3'-OCH₃ em CDCl₃ e 3'-Cl e 3'-CH₃ em DMSO-d₆. 111
- 26-** Valores da DL50 determinados para as 4-(X-fenil)amino-5-carboetoxi-1,3-dimetil-1H-pirazolo[3,4-b]piridina. 118
- 27-** Valores da DL90 determinados para as 1,3-difenil e 1-metil-3-fenil-pirazolo[3,4-b]piridinas substituídas. 120
- 28-** Valores dos Coeficientes de Partição (P) e logP obtidos experimentalmente e calculados através dos valores de π para as 4-(X-fenil)amino-1,3-dimetil-1H-pirazolo[3,4-b]piridinas. 123
- 29-** Valores de R_M^{corr} determinados para os derivados 1,3-dimetilpirazolopiridina variando a mistura de eluentes de 30 a 60% (v/v) de tampão fosfato. 125
- 30-** Valores de R_{Mw}^{corr} determinados para os derivados 1,3-dimetilpirazolopiridina. 126
- 31-** Valores de $\log k'^{\text{corr}}$ determinados por CLAE variando a fase móvel de 35 a 60% (v/v) de tampão fosfato. 130

- 32-** Valores de $\log k_w^{corr}$ determinados para 1,3-dimetilpirazolopiridina. 131
- 33-** Valores dos parâmetros eletrônicos teóricos para as 1,3-dimetilpirazolopiridinas, obtidos por cálculos teóricos das moléculas otimizadas. 138
- 34-** Dados de DL90 e logP teóricos das 1,3-difenil, 1-fenil-3-metilpirazolopiridinas e da *Amodiaquina*. 146
- 35-** Variáveis envolvidas nas melhores correlações da análise de regressão múltipla com $\log 1/DL50$. 148
- 36-** Variáveis envolvidas nas melhores correlações da análise de regressão múltipla com DL50. 149
- 37-** Variáveis envolvidas nas melhores correlações da análise de regressão múltipla com $\log 1/DL50$. 150
- 38-** Variáveis envolvidas nas melhores correlações da análise de regressão múltipla para as 1,3-dimetilpirazolopiridinas 4'-substituídas. 152
- 39-** Valores preditos de DL50 para as *4-(X-fenil)amino-1,3-dimetil-1H-pirazolo[3,4-b]piridinas* através da Equação 84. 153

RESUMO

Neste trabalho é descrita a síntese de treze novos derivados da série *4-(X-fenilamino)-1,3-dimetil-1H-pirazolo[3,4-b]piridinas*, onde X= 4'-Br, 4'-Cl, 4'-CH₃, 4'-OCH₃, 4'-NO₂, 4'-OH, 4'-OAc, 4'-F, H, 3'-Cl, 3'-CH₃, 3'-OCH₃ e 3'-NO₂. Para a obtenção destas substâncias, a rota escolhida envolveu a preparação do intermediário chave 4-cloro-1,3-dimetilpirazolopiridina que após tratamento com diferentes anilinas substituídas forneceu as 1,3-dimetilpirazolopiridinas.

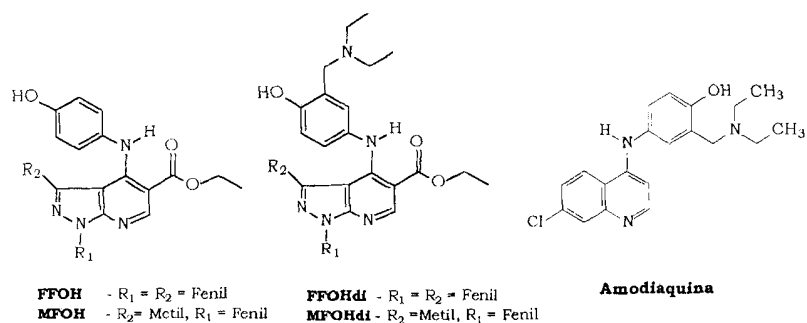
Na elucidação estrutural dos derivados pirazolopiridinas foram utilizadas principalmente técnicas de RMN de ¹H e ¹³C envolvendo experimentos uni e bidimensionais de correlação homonucleares (¹H x ¹H-COSY) e heteronucleares (¹H x ¹³C-ⁿJ_{CH} n=1, 2 ou 3).



X = H, 4'-CH₃, 3'-CH₃, 4'-OCH₃, 3'-OCH₃,
4'-NO₂, 3'-NO₂, 4'-F, 4'-Br, 4'-Cl, 3'-Cl,
4'-OH, 4'-OAc

A avaliação da atividade antileishmania (em valores de DL50 ou DL90) foi realizada para os derivados das séries: *4-(X-fenil)amino-1,3-dimetil-1H-pirazolo[3,4-b]piridinas*; *4-(4'-hidroxifenil)amino-5-carbetoxi-1-R₁,3-R₂-1H-pirazolo[3,4-b]piridina*, onde R₁ = R₂ = Fenil (FFOH) e R₂ = Metil e R₁ = Fenil (MFOH), *4-(4'-hidroxi-3'-dietilaminometilfenil)amino-5-carbetoxi-1-R₁,3-R₂-1H-pirazolo[3,4-b]piridina*, onde R₁ = R₂ = Fenil (FFOHdi) e R₂ = Metil e R₁ = Fenil (MFOHdi) e a *Amodiaquina*. Os resultados indicaram

atividade antileishmania significativa para todos os derivados ensaiados, com exceção do 4'-NO₂ substituído que foi considerado inativo.



O estudo da relação entre as conformações mais estáveis, obtidas por modelagem molecular, dos derivados *FFOH*, *MFOH*, *FFOHdi*, *MFOHdi* com a *Amodiaquina*, permitiu observar que as pirazolopiridinas que apresentaram maior sobreposição foram as que mostraram maiores valores de DL90.

Os parâmetros hidrofóbicos logP, obtidos pelo tradicional método “shake flask”, e os cromatográficos, *R_{MW}* e *logk_w* foram determinados para as 1,3-dimetilpirazolopiridinas. As análises de correlação linear entre os parâmetros cromatográficos e o logP indicaram valores significativos.

As melhores correlações entre a atividade antileishmania das 1,3-dimetilpirazolopiridinas e seus parâmetros físico-químicos hidrofóbicos, eletrônicos teóricos (calculados e tabelados) e estéricos, foram verificadas. Neste estudo, foi possível observar que parâmetros estéricos e hidrofóbicos são os principais fatores que contribuem para atividade antileishmania, sendo as equações obtidas através da regressão múltipla importantes na predição de novos derivados deste sistema.



INTRODUÇÃO

1 - INTRODUÇÃO

Derivados contendo o sistema heterocíclico pirazolopiridina, constituem um grupo importante de substâncias químicas, pois possuem analogia estrutural com as purinas, indóis e azaindóis, que estão envolvidos em funções biológicas vitais (Figura 1) e em várias aplicações farmacológicas¹⁻³. As bases purínicas, adenina e guanina estão presentes no DNA enquanto o derivado indólico triptofano é um aminoácido essencial (Figura 1)⁴.

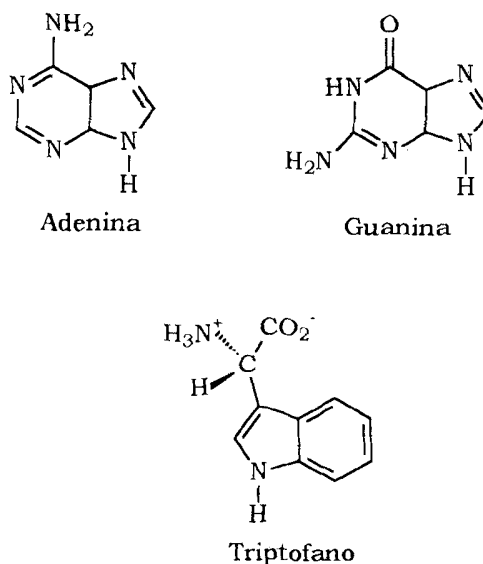


Figura 1: Exemplos de análogos estruturais do sistema heterocíclico pirazolopiridina⁴.

Na tentativa de se obter novas drogas contendo o sistema pirazolopiridina e que sejam potencialmente ativas, estudos sobre métodos alternativos de síntese, reatividade bem como a avaliação biológica tem sido muito investigados nos últimos anos.

O sistema pirazolopiridina possui cinco isômeros apresentando em sua estrutura um anel pirazólico condensado a uma piridina. As primeiras sínteses dos isômeros [3,4-*b*] e [4,3-*c*] foram registradas em 1906, enquanto que os sistemas [3,4-*c*], [4,3-*b*] e o [1,5-*a*] foram descritos pela primeira vez em 1934, 1958 e em 1957, respectivamente (Figura 2)³.

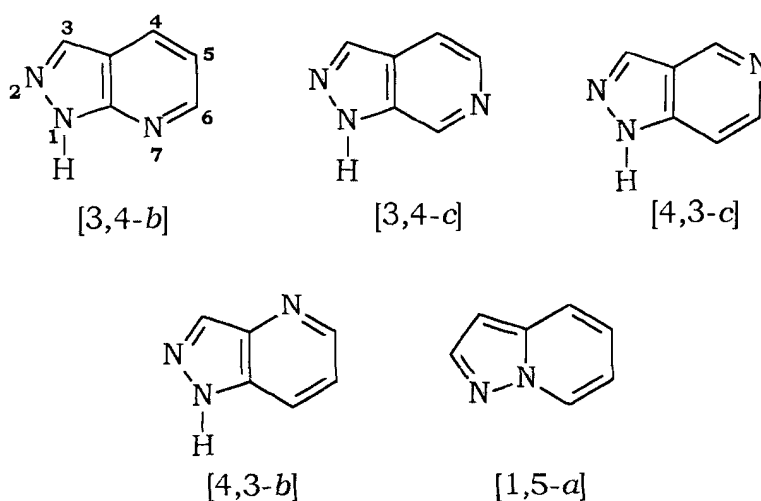


Figura 2: Estruturas isoméricas do sistema heterocíclico pirazolopiridina³.

As possíveis reações envolvendo o anel pirazolopiridina demonstram alguma similaridade para os cinco isômeros. Cálculos teóricos demonstraram que os derivados [3,4-*b*] e [1,5-*a*] apresentam, no carbono 3 do anel pirazólico, uma alta densidade de elétrons π o que torna esta posição favorável para reações de substituição eletrofílica. A presença dos grupos substituintes cloro e etoxi no anel do sistema pirazolopiridina tem levado a reações de substituição nucleofílica³.

1.1 - Sistema Heterocíclico 1*H*-Pirazolo[3,4-*b*]piridina

As sínteses de derivados contendo o sistema 1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridina podem ser realizadas principalmente através da utilização de piridinas substituídas ou a partir de aminopirazóis. A seguir serão descritas algumas destas metodologias.

1.1.1 - Síntese a Partir de Piridinas Substituídas

Piridinas 3-substituídas são N-oxidadas e tratadas com oxiclreto de fósforo, ocorrendo simultaneamente a desoxigenação da função N-óxido e cloração do anel piridínico^{3,5}.

A clorodesoxigenação resulta exclusivamente na formação de 2-cloro-piridinas substituídas na posição 3. Estas reagem com hidrazinas apropriadas, obtendo-se as pirazolopiridinas desejadas (Figura 3)^{3,5}.

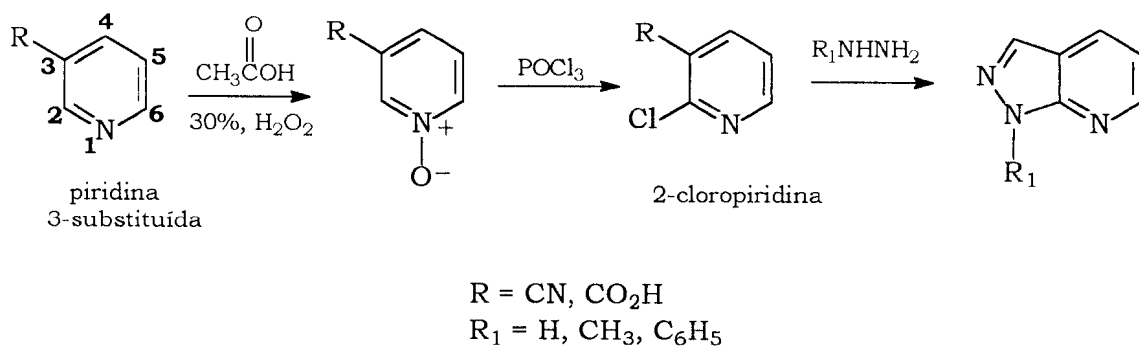


Figura 3: Obtenção de derivados 1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridinas a partir de piridinas substituídas^{3,5}.

Uma outra metodologia sintética para obtenção de pirazolo[3,4-*b*]piridinas, a partir de piridinas substituídas, envolve a condensação de piridonas com hidrazinas substituídas^{3,6}, como ilustrado na Figura 4.

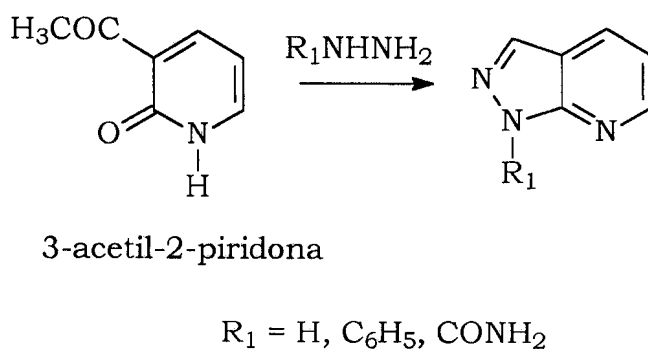
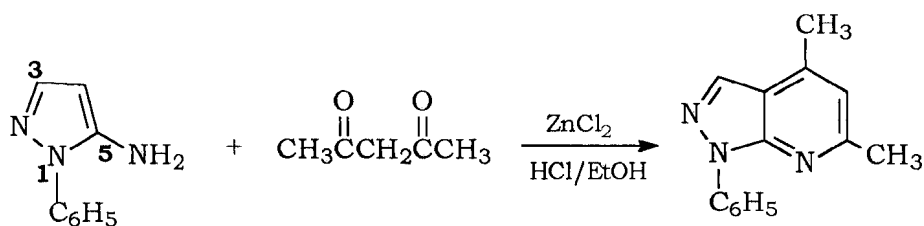


Figura 4: Obtenção de derivados 1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridinas a partir de piridonas substituídas^{3,6}.

1.1.2 – Síntese a Partir de Pirazóis

Os derivados do sistema heterocíclico 5-aminopirazol, são extensamente usados na preparação do sistema heterocíclico 1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridina⁷.

Em reações do tipo Combes⁸ os pirazóis são muito reativos através de substituição eletrofílica, especialmente na posição 4 do anel. Este método baseia-se na condensação com substâncias 1,3-dicarbonílicas e simultânea ciclização (Figura 5).



5-aminopirazol

Figura 5: Obtenção de 1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridinas utilizando o método de Combes⁸.

Reações do tipo Gould-Jacobs⁹ envolvem a condensação de 5-aminopirazóis com derivados etoximetilênicos. Em seguida o produto condensado é ciclizado termicamente em Dowtherm A (mistura de difenila e difenil-éter), obtendo-se então, as pirazolo[3,4-*b*]piridin-4-onas (Figura 6).

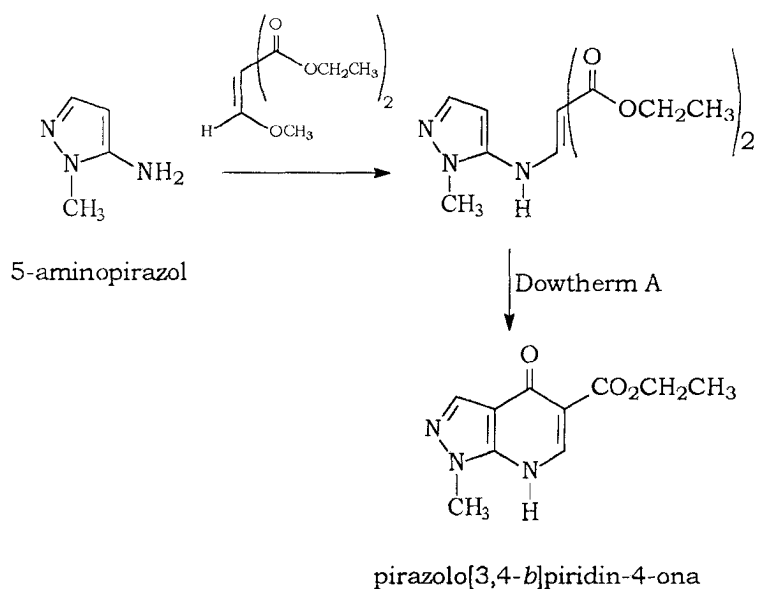


Figura 6: Obtenção de 1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridin-4-ona pelo método de Gould-Jacobs⁹.

O método de Gould-Jacobs modificado^{9,10} consiste na ciclização e cloração simultânea do produto condensado intermediário usando oxicloreto de fósforo, Figura 7.

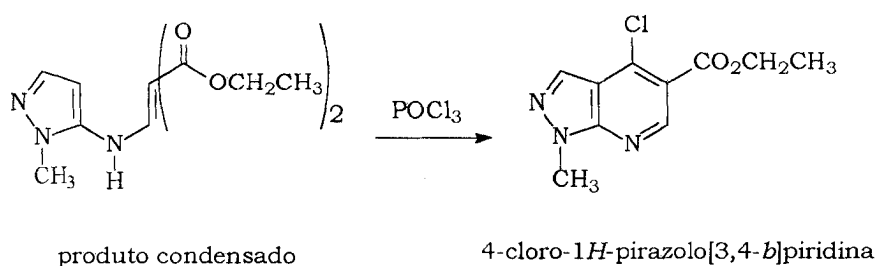


Figura 7: Obtenção de 4-cloro-1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridinas utilizando o método de Gould-Jacobs modificado^{9,10}.

As pirazolopiridinas reduzidas também podem ser obtidas a partir de reações de condensação de 5-amino-1-aryl-3-metilpirazóis com β -dimetilaminopropiofenonas em piridina¹¹. Os intermediários obtidos tratados com N-bromosuccinimida (NBS), levam a 1H-pirazolo[3,4-b]piridina com ótimos rendimentos (Figura 8).

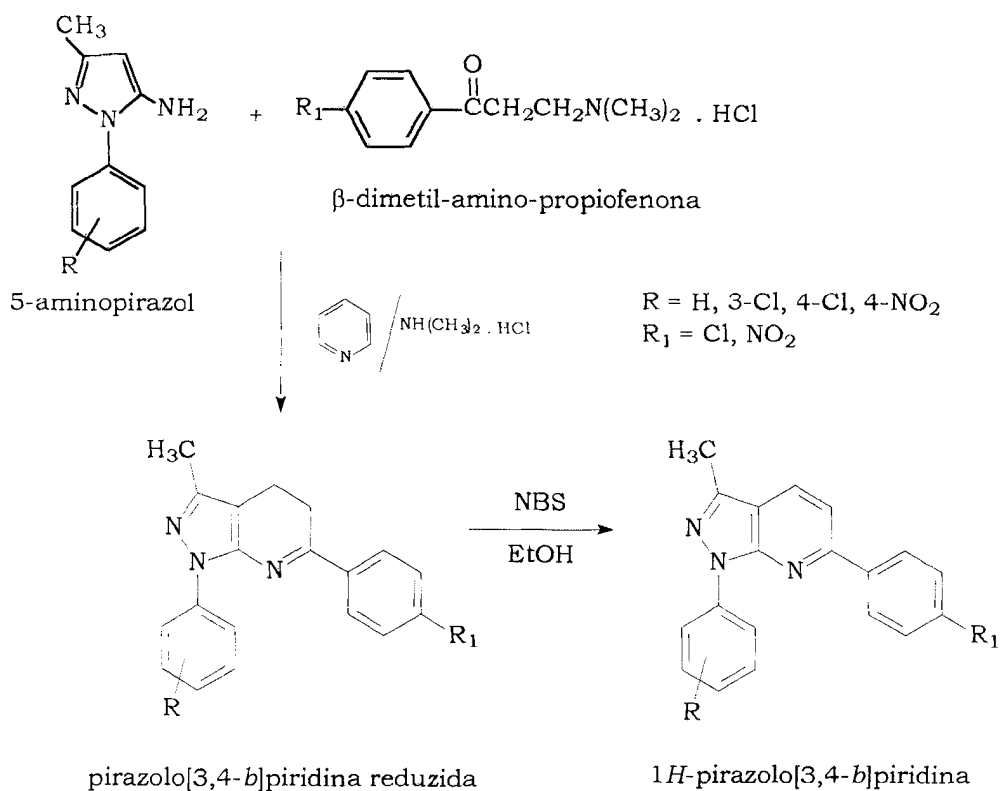


Figura 8: Obtenção de derivados pirazolo[3,4-*b*]piridinas reduzidas a partir de 5-aminopirazóis¹¹.

1.2 - Atividade Biológica dos Derivados Heterocíclicos do Sistema 1*H*-Pirazolo[3,4-*b*]piridina

A avaliação biológica de derivados do sistema heterocíclico 1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridinas, tem sido alvo de diversos relatos na literatura. Geralmente estas substâncias apresentam-se como bons agentes vasodilatadores, anti-hipertensivos, hipoglicêmicos, antiinflamatórios, analgésicos e antipiréticos¹².

O derivado pirimidínico alopurinol é um efetivo inibidor da enzima xantina oxidase, com $CI_{50} = 1,3\mu M$ (concentração que inibe 50% a atividade da enzima), sendo usado clinicamente no tratamento da “gota” e na quimioterapia de alguns tumores¹². Derivados pirazolo[3,4-*b*]pirimidínicos e 1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridínicos, análogos do alopurinol, foram sintetizados e tiveram sua ação inibitória também avaliada. Destes, os mais ativos foram as pirazolopiridinas onde o ácido 5-carboxílico-*p*-clorofenil-4-oxo-pirazolo[3,4-*b*]piridina apresentou $CI_{50} = 7,3\mu M$ ¹³ (Figura 9).

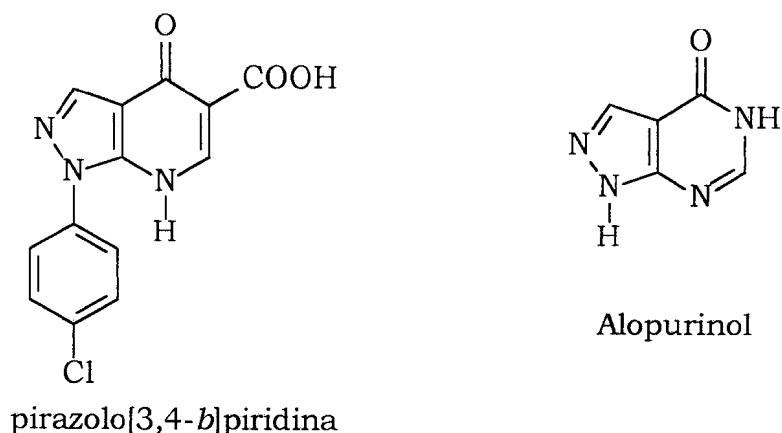


Figura 9: Alopurinol e derivado 1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridina testado como inibidor da enzima xantina oxidase¹³.

Os derivados benzodiazepínicos são freqüentemente os agentes de escolha no tratamento da ansiedade¹⁴. Entretanto, seus efeitos colaterais indesejáveis, levaram a busca de novas drogas mais ativas e menos tóxicas. Em estudos preliminares, com relação a atividade ansiolítica, os derivados pirazolo[3,4-*b*]piridinas etazolato, tracazolato e cartazolato, apresentaram-se promissores em testes que avaliam o tratamento da ansiedade¹⁵ (Figura 10).

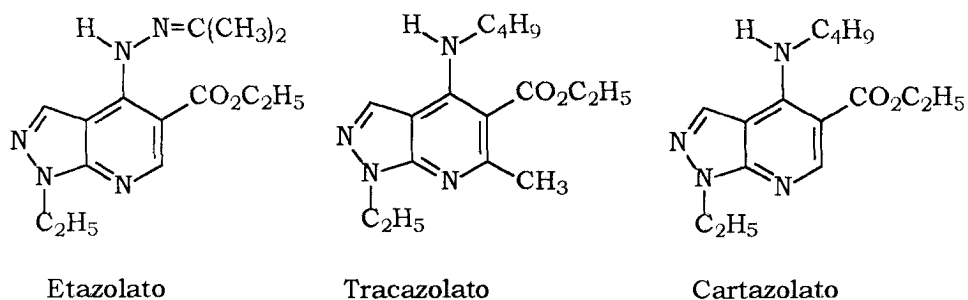


Figura 10: Derivados 1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridinas avaliados com relação a atividade ansiolítica^{14,15}.

A busca de novas substâncias que atuem nos níveis enzimáticos da cascata do ácido araquidônico, levou a síntese e a avaliação farmacológica de uma série de derivados 5-acil-aril-hidrazona-1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridinas. O efeito antinociceptivo destes derivados foi avaliado e os resultados preliminares indicaram-se bons¹⁶ (Figura 11).

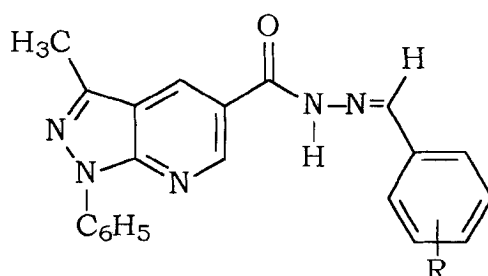
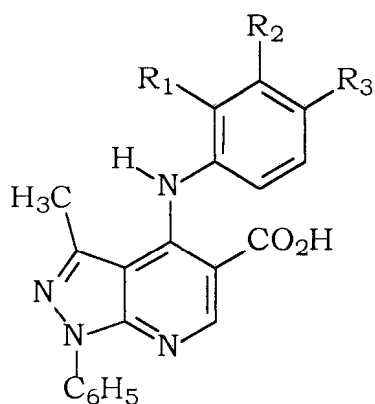
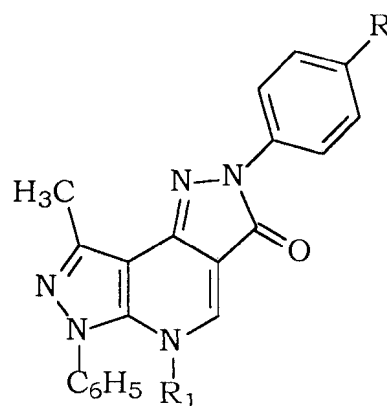


Figura 11: Derivados 5-acil-aril-hidrazona-1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridina avaliados com relação ao perfil antinociceptivo¹⁶.

Derivados do sistema 1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridina **1-11** (Figura 12), foram preparados e avaliados quanto à atividade polimerásica frente às enzimas transcriptase reversa (RT) do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) e das DNA-polimerases humanas¹⁷⁻¹⁹. Os resultados indicaram que quantidades crescentes em concentrações micromolares dos ácidos 4-CH₃ e 4-NO₂-substituídos inibiram gradualmente a atividade polimerásica da enzima RT. Resultado similar foi observado para os derivados tricíclicos **10** e **11**. Entretanto, as mesmas substâncias não foram capazes de inibir a atividade polimerásica das enzimas DNA-polimerases humanas α e β . Estes resultados, mostraram-se promissores para o desenvolvimento de novas drogas potencialmente antivirais¹⁷⁻¹⁹ (Figura 12).



- 1** - $R_1 = R_2 = R_3 = H$
2 - $R_1 = CH_3; R_2 = R_3 = H$
3 - $R_1 = R_2 = H; R_3 = CH_3$
4 - $R_1 = Cl; R_2 = R_3 = H$
5 - $R_1 = R_2 = H; R_3 = NO_2$



- 6** - $R = H; R_1 = Ri$
7 - $R = NO_2; R_1 = Ri$
8 - $R = H; R_1 = Ri'$
9 - $R = NO_2; R_1 = Ri'$
10 - $R = H; R_1 = H$
11 - $R = NO_2; R_1 = H$

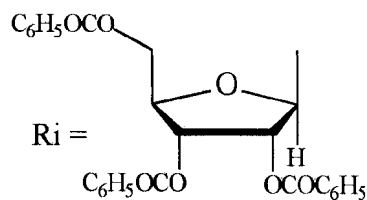
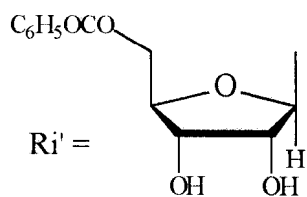


Figura 12: Derivados 1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridinas avaliados quanto a atividade polimerásica das enzimas transcriptase reversa (RT) do vírus HIV e das DNA-polimerases humanas¹⁷⁻¹⁹.

As doenças parasitárias constituem um dos principais problemas de saúde no mundo. A literatura relata que muitos derivados heterocíclicos naturais e sintéticos têm sido utilizados no tratamento deste tipo de infecção^{20,21}. Como exemplos, podemos citar as quinolinas utilizadas no tratamento da malária, Quinina (isolada das cascas da *Cinchona succirubra*) e a Amodiaquina (derivado sintético), além de acridinas como a Mepacrina ^{20,21}(Figura 13).

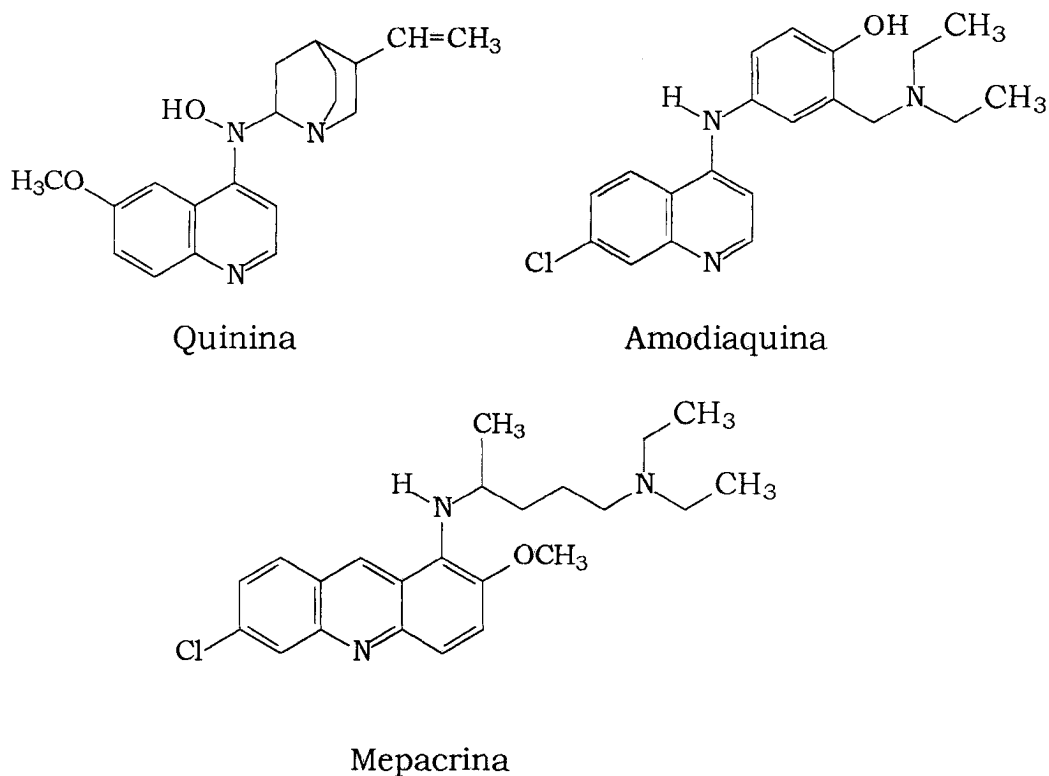


Figura 13: Drogas utilizadas no tratamento da malária^{20,21}.

A importância da síntese de bases de Mannich do tipo **12** e **13** obtidas a partir de pirazolopiridinas (Figura 14), tem sido relatada na literatura devido a sua analogia estrutural com a amodiaquina (Figura 13), um antimalarial com atividade já comprovada, possibilitando potencial atividade antiparasitária^{22,23}.

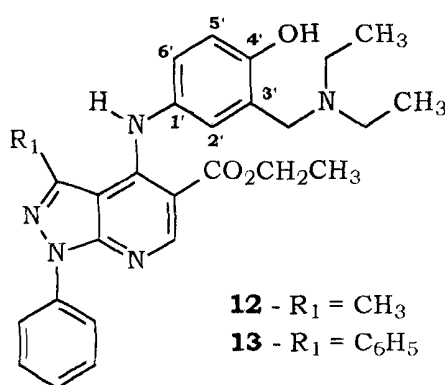


Figura 14: Derivados heterocíclicos do sistema 1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridina obtidos por Mello^{22,23}.

A leishmaniose é uma doença parasitária endêmica que ocorre em vários estados do Brasil. Esta enfermidade tem sido alvo crescente na busca de novas drogas que sejam potentes, menos tóxicas, mais seletivas e que possam ser usadas clinicamente²⁴. Alguns derivados heterocíclicos têm sido testados contra as diferentes formas infectantes desta doença e os resultados mostraram-se promissores²⁵.

Quinolinas 2-substituídas naturais e sintéticas (Figura 15) foram testadas contra a *Leishmania amazonensis* e a *L. venezuelensis* apresentando eficácia *in vivo* através da administração oral e intralesional²⁶.

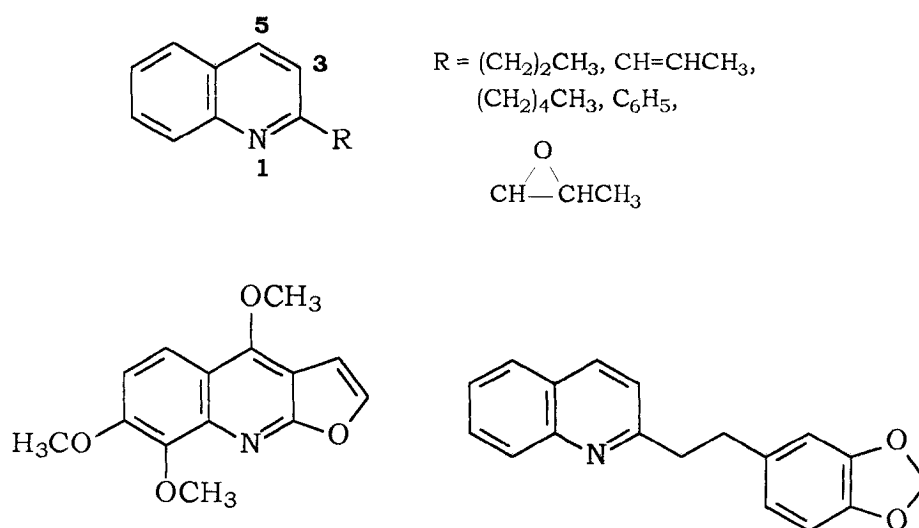


Figura 15: Derivados quinolínicos 2-substituídos testados contra a *L. amazonensis* e *L. venezuelensis*²⁶.

Devido ao interesse do nosso grupo de pesquisa na busca de novos agentes quimioterápicos contra doenças parasitárias^{22,23}, tornou-se pertinente o estudo e a avaliação da atividade antileishmania de novos derivados heterocíclicos do sistema 1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridina.

1.3 - Leishmaniose

A leishmaniose é uma doença endêmica causada por diferentes espécies morfológicamente semelhantes de protozoários do gênero *Leishmania*. Essa enfermidade ocorre em diversas regiões do Velho e do Novo Mundo tendo maior incidência na África, Ásia e América Latina²⁴. A organização Mundial da Saúde estima que 12 milhões de pessoas sofram dessa doença, sendo que a cada ano há 400 mil novos casos e cerca de 100 mil mortes²⁷.

No Novo Mundo diversos mamíferos (reservatórios naturais) e várias espécies de flebotomíneos (vetores) estão envolvidos na transmissão da leishmaniose. A maioria dos casos de infecções humanas está relacionada com hábitos, atividades primárias ou secundárias de indivíduos que exploram ou habitam as florestas²⁴.

A leishmaniose é considerada um grande problema para a saúde pública, já que sua incidência tem crescido de maneira progressiva nos últimos anos. Recentemente, tem ocorrido um aumento significativo nos casos de leishmanioses nas áreas peri-urbanas das grandes cidades^{28,29}. Vários casos de leishmaniose visceral em pessoas infectadas com o vírus HIV também têm sido relatados^{28,29}.

O combate à leishmaniose é bastante complicado devido aos seguintes fatores: dificuldade de se controlar os vetores e os reservatórios, uma vez que há uma variedade de “habitat” das espécies animais; a quimioterapia ainda é ineficiente (ver página 19) e não existem vacinas adequadas; e há uma variedade de diferentes espécies do parasita com ampla diversidade de manifestações clínicas²⁴.

1.3.1 - Leishmania

A leishmaniose é causada por protozoários do gênero *Leishmania*, pertencente a família Trypanosomatidae, ordem Kinetoplastida. Esse gênero é constituído de um grupo bastante complexo de parasitas biologicamente distintos, sendo classificados em várias espécies²⁸. Essas diferentes espécies do gênero *Leishmania* produzem uma grande variedade de manifestações clínicas. No Novo Mundo podem ser grupadas em duas amplas categorias clínicas: leishmaniose visceral americana e leishmaniose tegumentar americana²⁸. As espécies *L. amazonensis*, *L. mexicana*, *L. peruviana*, *L. guyanensis*, *L. panamensis* e *L. braziliensis* são as causadoras da leishmaniose cutânea e muco-cutânea no Novo Mundo²⁴. Entretanto à *L. amazonensis* já foram associados outras formas clínicas da doença^{30,31}.

Os parasitas do gênero *Leishmania* apresentam em seu ciclo de vida apenas duas formas evolutivas: a forma promastigota, que é flagelada e extracelular, encontra-se no trato digestivo do inseto vetor, e a forma amastigota, sem flagelo aparente que é intracelular e sem movimentos encontrada em células do hospedeiro vertebrado (Figura 16)²⁴.

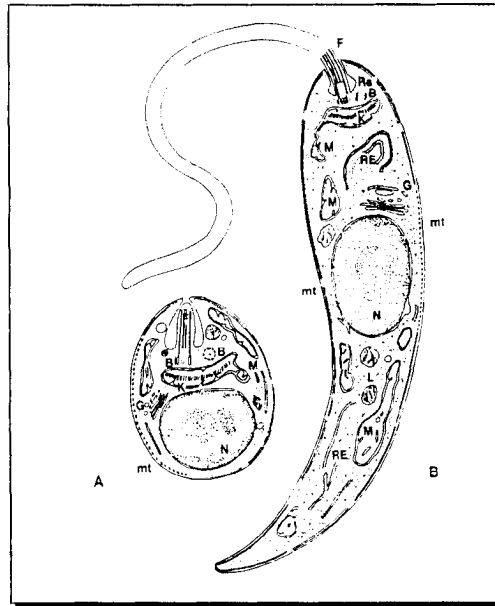


Figura 16: Representação esquemática da ultra estrutura das diferentes fases evolutivas de uma espécie do gênero *Leishmania*: A=amastigota e B=promastigota²⁴.

A leishmaniose é transmitida ao homem pela fêmea infectada dos insetos hematófagos, pertencentes ao gênero *Phlebotomus* (Velho Mundo) e *Lutzomyia* (Novo Mundo) (Figura 17)²⁴.

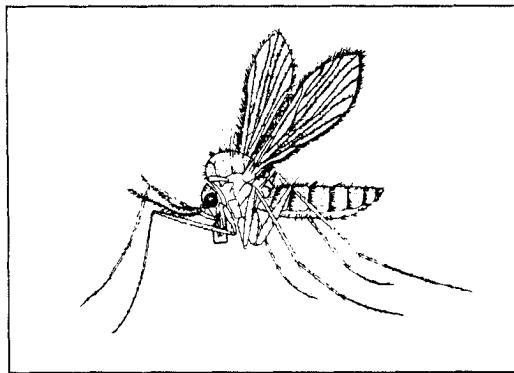


Figura 17: Inseto vetor transmissor das leishmanioses²⁴.

Quando o flebótomo pica um indivíduo infectado ou um hospedeiro reservatório (Figura 18), ele aspira as amastigotas livres no sangue (7), que se transformam em promastigotas ao atingirem o intestino médio do inseto. Estas formas flageladas após rápida multiplicação, se convertem nas promastigotas infectantes e quando o inseto for se alimentar novamente, irá inoculá-los em um novo hospedeiro vertebrado²⁴. No momento em que o inseto vetor inocula as formas promastigotas no hospedeiro vertebrado (1), estas são fagocitadas pelos macrófagos (2), se transformando no interior dessas células em amastigotas (3) ocorrendo então uma intensa multiplicação das mesmas (4). A manutenção da infecção ocorre em consequência da ruptura de células altamente infectadas (5), quando as amastigotas são fagocitadas por outros macrófagos (6)²⁴ (Figura 18).

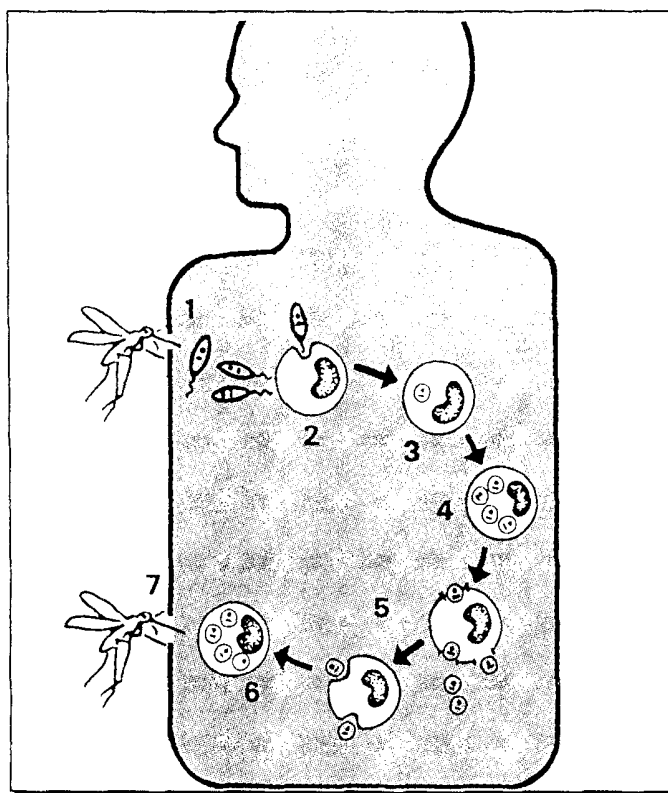


Figura 18: Ciclo evolutivo das espécies do gênero *Leishmania*²⁴.

1.3.2 - Quimioterapia da Leishmaniose

Apesar de se apresentar como uma doença de importância mundial, poucos avanços foram obtidos no tratamento das leishmanioses. Gaspar Viana, em 1912, descobriu a ação curativa do târtaro emético (tartarato de potássio e antimônio trivalente), sendo que até hoje a base deste medicamento é utilizada no tratamento das leishmanioses. No mesmo ano, na Índia, pesquisadores introduziram os antimoniais trivalentes no tratamento da leishmaniose visceral^{24,25}.

Os antimoniais pentavalentes, como o estibogluconato de sódio (Pentostam) e o antimoniato de N-metil-glucamina (Glucantime) (Figura 19), foram introduzidos como quimioterápicos na década de 40, sendo atualmente as principais drogas utilizadas no tratamento das leishmanioses. Entretanto, o uso desses medicamentos na quimioterapia apresenta vários inconvenientes, tais como: regimes de tratamento muito prolongados e que nem sempre são efetivos, alta hepatotoxicidade e cardiotoxicidade^{25,27}.

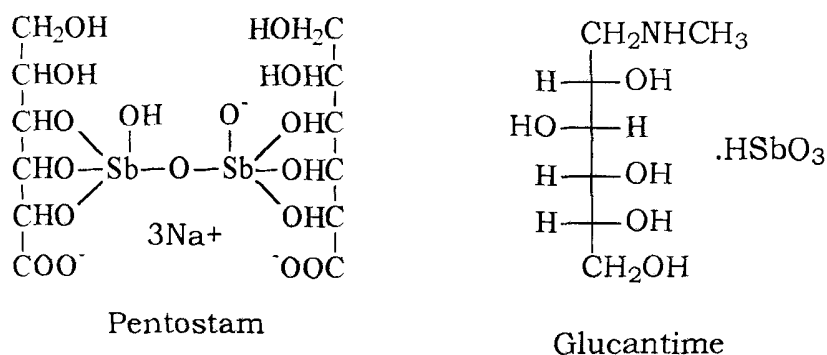


Figura 19: Drogas de primeira escolha para o tratamento da leishmaniose^{24,25}.

Atualmente, as drogas empregadas como segunda escolha no tratamento de leishmanioses são a diamidina aromática Pentamidina e o antibiótico poliênico Anfotericina B (Figura 20)^{24,25,33}.

A Pentamidina (4,4'-diaminodifenoxipentano) vem sendo usada no tratamento das leishmanioses cutâneas e viscerais. Apesar de sua alta toxicidade, o uso clínico desta droga ainda é freqüente devido a sua alta estabilidade relativa e também por ser de fácil administração. A anfotericina B tem utilidade terapêutica no tratamento de infecções micóticas causadas por fungos. É também utilizada no tratamento de leishmanioses mucocutâneas no Brasil, embora apresente muitas reações adversas, incluindo febre, dores de cabeça e convulsões²⁵ (Figura 20).

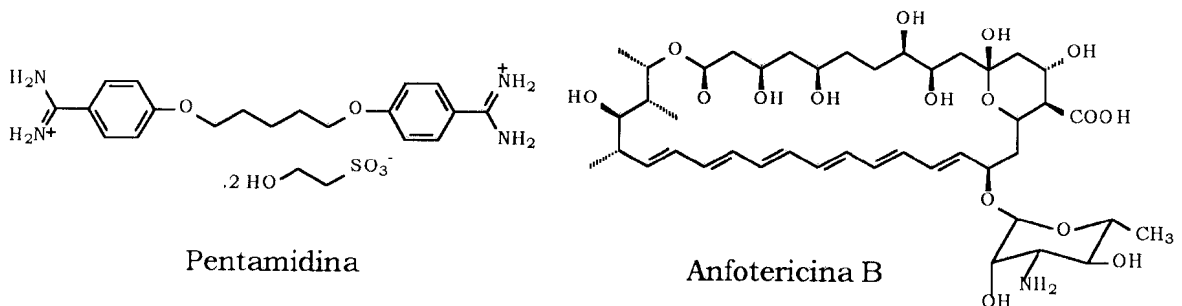


Figura 20: Drogas de segunda escolha para o tratamento da leishmaniose^{24,25}.

Alguns derivados azólicos também vêm sendo usados contra leishmanioses, dentre eles o cetoconazol, ilustrado na Figura 21, apresenta potente ação antifúngica. Os derivados heterocíclicos metotrexato, droga utilizada no tratamento do câncer, e a pirimetamina, que apresenta ação antimalárica, também têm sido testados²⁵. Entretanto, nenhuma dessas

substâncias têm apresentado índices terapêuticos significativos e baixas toxicidades.

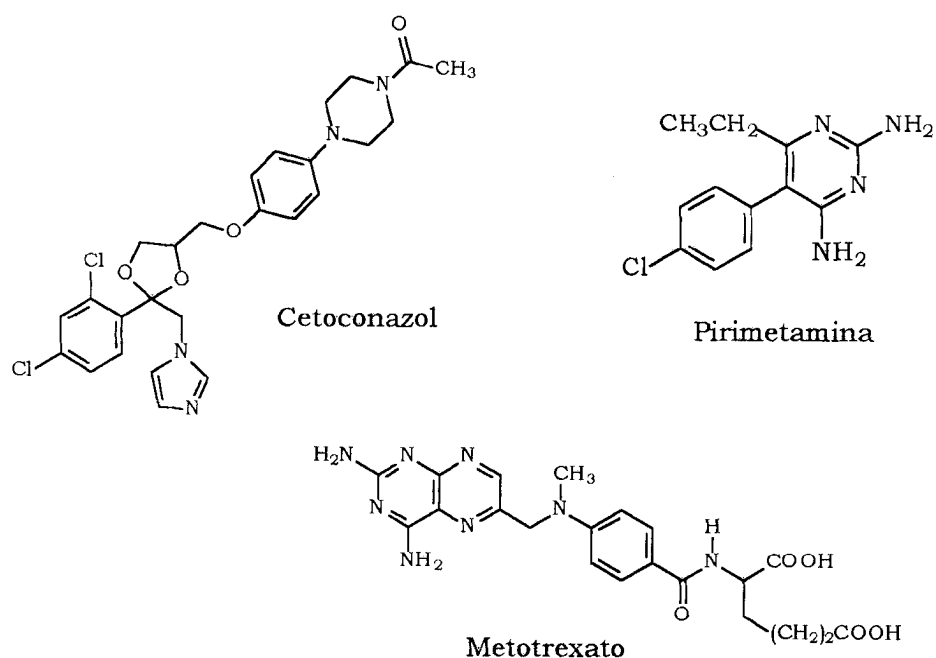


Figura 21: Drogas alternativas que vêm sendo estudadas quanto a sua atividade antileishmania^{2,5}.

Na tentativa de se obter novos quimioterápicos úteis no tratamento de pessoas infectadas, nos últimos anos novas classes de substâncias potencialmente ativas contra o agente causador das leishmanioses têm sido investigadas³⁴⁻³⁸.

Várias substâncias sintéticas e isoladas de fontes naturais têm sido avaliadas em testes preliminares *in vitro* contra a *L. amazonensis*. A Figura 22 ilustra alguns destes derivados que apresentam-se como drogas promissoras no tratamento desta doença.

As amidinas metoxi e bromo-substituídas (derivados sintéticos) foram as substâncias mais ativas da série ilustrada, apresentando a dose que inibe em 50% o crescimento celular (DL50) igual a 20 e 22 μM , respectivamente³⁴. A isoflavona e os diarilheptanóides isolados da planta *Centrolobium sclerophyllum* (Piperaceae), apresentaram significante atividade contra as promastigotas extracelulares da *L. amazonensis*, com a DL50 igual a 140, 77 e 86 μM ³⁷, respectivamente.

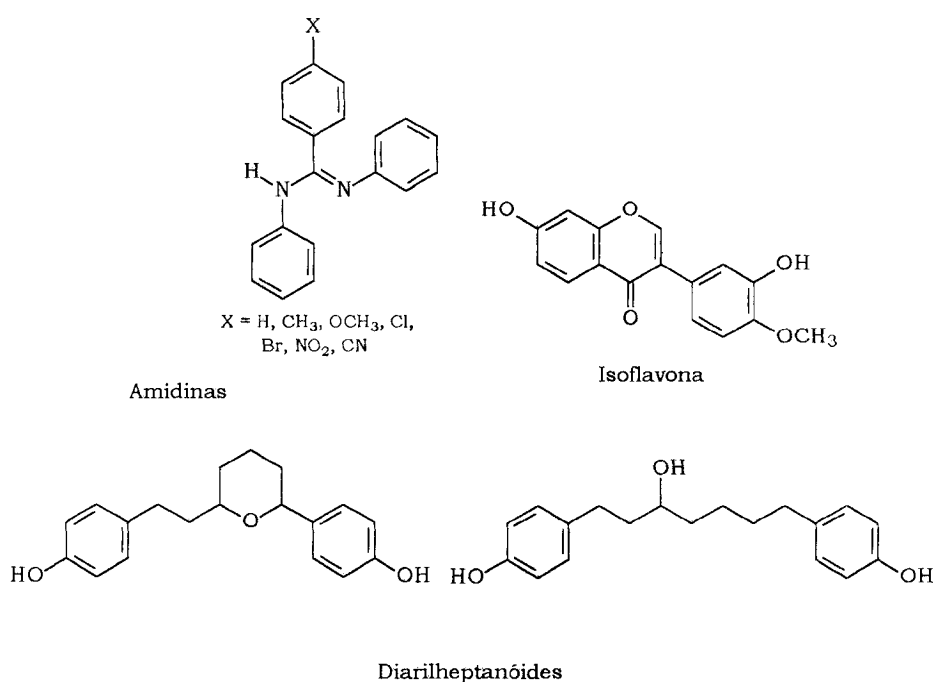


Figura 22: Derivados sintéticos (amidínicos) e naturais testados contra a *L. amazonensis*^{34,37}.

1.4 – Relação Qualitativa e Quantitativa (SAR e QSAR) Entre a Estrutura Química e Atividade Biológica

As correlações qualitativa (SAR - *Structure Activity Relationship*) e quantitativa (QSAR - *Quantitative Activity Relationship*) entre a estrutura química e a atividade biológica, tornou-se uma das metodologias mais eficientes no estudo do desenvolvimento de novas drogas^{39,40}.

A utilização de métodos racionais no planejamento da obtenção de substâncias potencialmente ativas, tem-se mostrado muito vantajosa^{4,39}. Quando a estrutura química de uma substância com atividade biológica é conhecida, pode-se propor um estudo de SAR na tentativa de se determinar qual parte da molécula é importante para referida atividade. Seleciona-se um número significativo de substâncias com pequenas variações estruturais a partir da droga original e estuda-se qual o efeito sobre a atividade biológica³⁹.

No estudo de QSAR pretende-se identificar e quantificar as propriedades físico-químicas de um grupo de substâncias homólogas verificando o efeito destas sobre a resposta biológica. A correlação entre estas propriedades é obtida empregando-se procedimentos matemáticos e estatísticos que irão permitir o estabelecimento de equações ou outros modelos que poderão ser utilizados no planejamento sobre novas sínteses e em testes biológicos de substâncias mais promissoras que as originalmente estudadas. A Figura 23 resume as principais etapas no estudo de QSAR⁴¹.

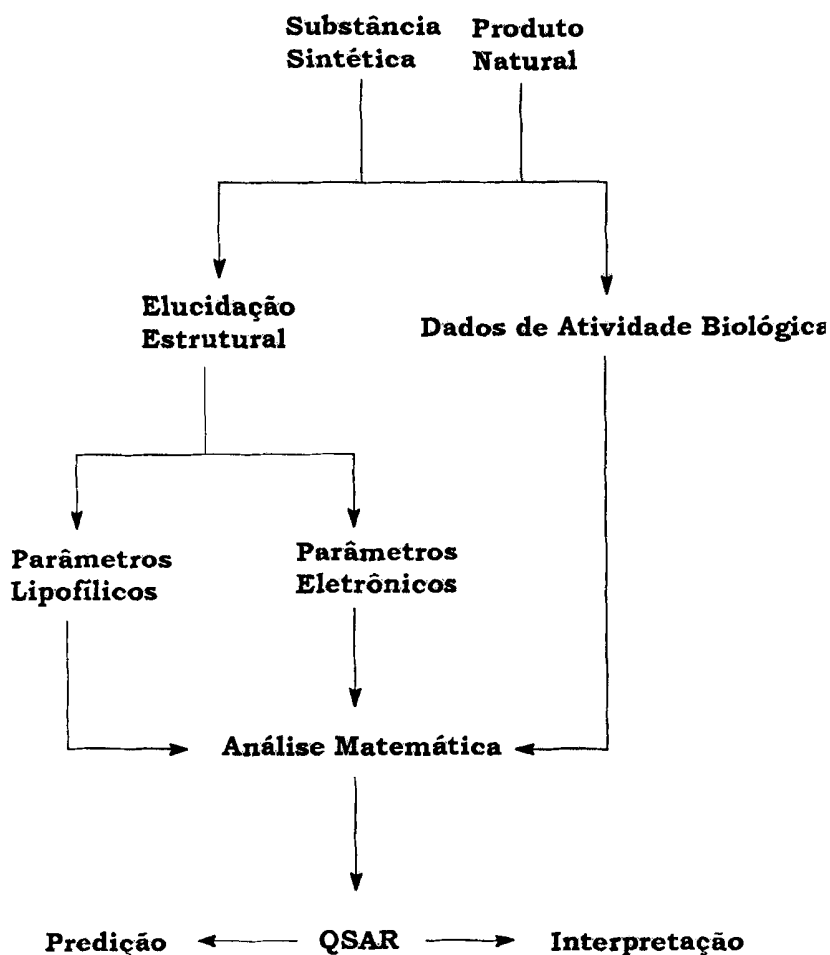


Figura 23: Principais etapas no estudo de QSAR⁴¹.

Inúmeros trabalhos de SAR e QSAR são relatados empregando-se parâmetros físico-químicos empíricos e parâmetros teóricos, obtidos a partir das constantes dos substituintes ou de subunidades estruturais. São citados estudos aplicados a drogas com atividade antiparasitária (malária⁴², leishmaniose e doença de chagas⁴³), antitumorais⁴⁴, herbicidas⁴⁵, fungicidas⁴⁶, entre outros.

No estudo de SAR para a atividade antileishmania e antitripanosoma de 9-anilinoacridinas⁴³, uma série de 44 derivados heterocíclicos (Figura 24) foram testados *in vitro* contra a *Leishmania major*, *Leishmania donovani*, *Tripanosoma cruzi* e *Tripanosoma brucei*.

Os resultados confirmaram dados anteriores, onde a presença de substituintes na posição 1' do anel anilínico contribui para a atividade contra a *L. major*. O aumento do caráter lipofílico deste substituinte também afetou significativamente a atividade observada. Entretanto, para os outros parasitas citados, não foi possível estabelecer um estudo de SAR consistente⁴³.

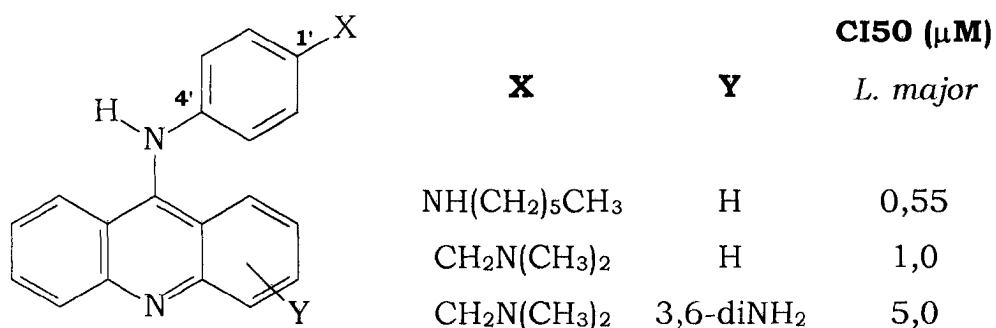
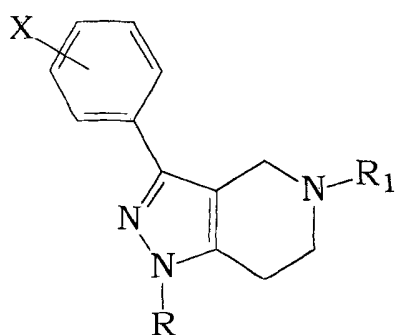


Figura 24: 9-Anilinoacridinas ativas contra a *Leishmania major*⁴³.

A literatura registra o estudo de QSAR para 51 derivados heterocíclicos da série 3-aryl-4,5,6,7-tetrahidro-1H-pirazolo[4,3-c]piridinas, pertencentes a classe de agentes anti-hipertensivos⁴⁷. Os parâmetros físico-químicos, lipofílico (π), eletrônico (σ), e o estrutural, volume de van der Waals (V_w) foram considerados significantes na correlação com a atividade observada, sendo possível a predição de novas substâncias mais ativas (Figura 25).



R₁= H, CH₃, CH₂CH₃, n-Bu, C-C₅H₉,
CH₂-Ph, i-Pr

R= H, CH₃, CH₂CH₃, n-Bu, C-C₅H₉,
CH₂-Ph, i-Pr, n-Pr, n-Pent, n-Hex,
(CH₂)₂-Ph, (CH₂)₃-Ph, (CH₃)CH-Ph,
4-F-Ph

X= H, 2-F, 3-F, 4-F, 3-Cl, 4-Cl, 4-CH₃,
4-OCH₃, 4-NO₂, 4-CN, 3,4-(OCH₃)₂

Figura 25: Derivados heterocíclicos 3-aryl-4,5,6,7-tetraidro-1H-pirazolo[4,3-c]piridinas⁴⁷.

O primeiro trabalho na área das relações entre estrutura química e atividade biológica data de 1868 por Crum-Brown e Fraser^{48,49}. Nesta publicação, os autores propuseram que a resposta biológica, ϕ , era uma função da estrutura química (C), como mostra a Equação 1.

$$\boxed{\phi = f(C)} \quad (1)$$

Os autores afirmaram que seria possível desenvolver um cálculo para relações entre estrutura – atividade (SAR) através de pequenas mudanças na estrutura química e relacioná-las com a resposta biológica. Entretanto, apenas em 1964 quando Hansh e Fujita⁵⁰, baseados na formulação das constantes numéricas dos efeitos eletrônicos de Hammett^{51,52} e estéricos de Taft⁵³, foi obtido um avanço significativo nos estudos de QSAR. Naquele ano surgiram os principais modelos clássicos para o estudo das relações estrutura-atividade. Uma abordagem resumida sobre estes principais modelos será descrita a seguir.

a) *Modelo de Free-Wilson*

O modelo clássico de Free e Wilson⁵⁴ baseia-se na hipótese de que, em uma série de substâncias que diferem entre si pela posição do substituinte na estrutura molecular, a contribuição dos substituintes para a atividade biológica é aditiva e depende somente do tipo e da posição que o substituinte ocupa. Este modelo, pode ser expresso pela Equação 2 em que AB_i é a atividade biológica do i -ésimo derivado, e a_{jk} é a contribuição para a atividade biológica do substituinte X_k , em cada posição j . O termo X_{jk} possui valor igual a 1 se o substituinte X_k esta presente na posição j , caso contrário terá valor igual a zero.

$$\log AB_i = \sum a_{jk} X_{jk} + \mu \quad (2)$$

O termo μ representa a média de todos os valores da atividade biológica sendo definido pela Equação 3, onde n é o número de derivados. O termo definido pela Equação 4, fornece as equações de simetria que representam a soma das contribuições em cada posição de substituição, sendo a ele atribuído arbitrariamente o valor zero⁵⁵.

$$\mu = 1/n \sum \log AB_i \quad (3)$$

$$\sum_j a_{jk} X_{jk} = 0 \quad (4)$$

Apesar do modelo de Free-Wilson apresentar problemas matemáticos que limitam sua aplicação, ele é uma ferramenta simples e eficaz quando utilizado no estágio inicial do processo de otimização estrutural. O modelo usa o conceito intuitivo de que cada substituinte acrescentado a estrutura química base, contribui para a atividade biológica global com uma fração que é característica do próprio substituinte⁵⁶. Este método é numérico e relaciona diretamente mudanças estruturais com propriedades biológicas ao contrário da análise de Hansh onde as propriedades fisico-químicas das drogas são correlacionadas à atividade biológica⁵⁵.

Uma outra limitação deste modelo, é a sua incapacidade de permitir previsões com relação a atividade biológica de derivados que não estejam incluídos na série inicial⁵⁵.

b) Modelo de Fujita-Ban

O modelo de Fujita-Ban⁵⁷ propõe uma modificação do modelo de Free-Wilson na tentativa de simplificá-lo. Fujita e Ban interpretaram os valores de μ como sendo o calculado para a atividade biológica do derivado não substituído, onde μ_H relaciona todas as contribuições grupais ao hidrogênio, na mesma posição de substituição. Isso eliminou a necessidade das equações de simetria e simplificou o processo de cálculo. A equação modificada passou a ser representada pela Equação 5 em que b_{jk} é a contribuição para a atividade biológica do substituinte X_k na posição j , tomada em relação ao hidrogênio, e μ_H é o valor calculado da atividade biológica para o derivado não substituído⁵⁵.

$$\log AB_i = \sum b_{jk} X_{jk} + \mu_H \quad (5)$$

As relações entre as modificações de Fujita-Ban e a análise clássica de Free-Wilson é simples. A magnitude dos valores será determinada pela escolha do ponto de referência⁵⁵.

c) Modelo de Hansh-Fujita

O modelo de Hansh-Fujita⁵⁰ para o estudo das relações entre a estrutura química e a atividade biológica, é o modelo clássico mais difundido e utilizado^{4,39}. Na aproximação termodinâmica de Hansh-Fujita a variação na atividade biológica de uma série de substâncias, que possuem estruturas químicas semelhantes, diferindo entre si por um ou mais grupos substituintes em posições definidas, é explicado pela variação das propriedades físico-químicas e estruturais das moléculas. Estas propriedades físico-químicas representam as influências eletrônicas, estéricas e hidrofóbicas das moléculas sobre a interação droga-receptor. De forma simplificada, a relação entre a atividade biológica (AB), as propriedades estruturais e físico-químicas (X_i) de uma série de substâncias, pode ser escrita de acordo com a Equação 6, onde os coeficientes de regressão a , b e c , são determinados por métodos matemáticos e expressam a contribuição de cada efeito sobre a resposta biológica⁵⁸.

$$AB = aX_1 + bX_2 + cX_3 + \dots + Const.$$

(6)

O modelo de Hansh-Fujita apresenta como característica mais importante, o fato de ser baseado na suposição de que as interações que

ocorrem entre duas moléculas pequenas são semelhantes às correspondentes entre o fármaco e o receptor no sistema biológico utilizado. O coeficiente de partição no sistema 1-octanol/água, é o parâmetro capaz de simular o comportamento da molécula que atua como fármaco frente as estruturas hidrofóbicas encontradas no organismo e no meio aquoso circundante^{40,59}.

O estudo detalhado da estrutura básica das moléculas biologicamente ativas, bem como suas propriedades fisico-químicas são informações extremamente necessárias para quantificação da relação estrutura-atividade.

Uma abordagem resumida sobre alguns dos mais importantes parâmetros lipofílicos e eletrônicos considerados neste modelo, será apresentada a seguir.

1.4.1 - Parâmetros Hidrofóbicos

O caráter hidrofóbico de uma droga é fundamental para se determinar com que facilidade ela irá atravessar a membrana celular, podendo também ser importante no tipo de interação que envolve a ligação droga-receptor⁵⁸⁻⁶¹.

A mudança de substituintes em uma substância pode levar a uma variação significativa no seu caráter hidrofóbico e na sua atividade biológica. Portanto, é de extrema importância a determinação quantitativa dos parâmetros que possam expressar a hidrofobicidade de cada substância em estudo. Os principais parâmetros hidrofóbicos utilizados nos estudos de QSAR são o coeficiente de partição (P) e aqueles obtidos por métodos cromatográficos, $\log k_w$ e R_{Mw} .

1.4.1.1 - Coeficiente de Partição (P)

O coeficiente de partição (P) estudado para o sistema 1-octanol/água, foi adotado como parâmetro capaz de descrever o caráter hidrofóbico sendo o modelo empregado na racionalização do processo de transferência de drogas entre a fase aquosa e não aquosa⁵⁹.

O caráter hidrofóbico de uma substância pode ser determinado experimentalmente pelo tradicional método “Shake Flask”⁶¹. A distribuição relativa da droga, ou seja o seu coeficiente de partição (P), pode ser obtido pela Equação 7 em que C_{oct} é a concentração da droga na fase orgânica e C_{aq} é a concentração da droga na solução aquosa tamponada⁵⁹.

$$P = C_{oct.} / C_{aq.} \quad (7)$$

A razão de distribuição de uma substância entre duas fases será função de sua solubilidade diferenciada em cada fase. De um modo geral, as drogas mais hidrofóbicas terão maiores valores de P sendo portanto mais rapidamente absorvidas através da membrana celular⁵⁸⁻⁶¹.

Variando o substituinte de uma série de substâncias, obtêm-se um grupo de derivados análogos que diferem entre si no valor de P . Construindo-se um gráfico com os valores de P versus a atividade biológica destas drogas, será possível verificar se há alguma relação entre estas duas propriedades. A potencialidade biológica de uma droga, ao transpor as barreiras celulares e alcançar seu sítio ativo, é geralmente expresso como o $\log 1/C$, onde C é a concentração da droga que representa a resposta biológica^{4,59}.

Colocando-se em um gráfico os valores de $\log P$ versus $\log 1/C$ e utilizando a análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, pode ser obtida uma reta representada pela Equação 8, que mostra a correlação linear entre a hidrofobicidade e a atividade biológica, onde P é o coeficiente de partição no sistema 1-octanol/água e C é a concentração molar da droga que produz o efeito biológico. As constantes a e b são os coeficientes obtidos pela análise matemática^{4,59}.

$$\log(1/C) = a \log P + b \quad (8)$$

Modelos lineares como estes são mais adequados quando a atividade biológica é determinada utilizando ensaios *in vitro*, enquanto que a dependência não linear em relação a lipofilicidade, é observada quando se trabalha com modelos mais complexos, como por exemplo, testes *in vivo*^{4,59}.

No caso de sistemas biológicos complexos, as relações lineares entre a atividade biológica e a hidrofobicidade somente são aplicáveis quando o conjunto de drogas testadas possui uma faixa limitada de valores de $\log P$. Se a hidrofobicidade ultrapassa determinado limite, será observado um decréscimo da atividade biológica. Neste caso, obtêm-se uma curva parabólica expressa matematicamente pela Equação 9, onde P é o coeficiente de partição 1-octanol/água e a , b e c são os coeficientes obtidos pela análise matemática³⁹.

$$\log 1/C = -a(\log P)^2 + b \log P + c \quad (9)$$

Segundo Hansh-Fujita, em situações onde o coeficiente de partição não é apenas o único fator que influencia a atividade biológica, os efeitos eletrônicos e estéricos são levados em consideração. As contribuições dos efeitos separadamente são expressos por constantes de substituintes e a atividade biológica do conjunto de derivados pode ser ajustada ao modelo linear multidimensional (Equação 10), ao modelo parabólico ou quadrático (Equação 11)⁵¹, onde $\log P$ é o coeficiente de partição 1-octanol/água, σ é a constante eletrônica dos substituintes de Hammett, E_s é a constante estérica de Taft e os coeficientes a , b , c , d e e são obtidos pela análise de regressão múltipla.⁶²

$$\log(1/C) = a \log P + b\sigma + cE_s + d \quad (10)$$

$$\log(1/C) = -a(\log P)^2 + b \log P + c\sigma + dE_s + e \quad (11)$$

O coeficiente de partição (P) também pode ser calculado através das contribuições hidrofóbicas características dos substituintes presentes na molécula. Essa contribuição é conhecida como constante de Hansh ou constante hidrofóbica do substituinte (π) e representa a medida do quanto o substituinte é hidrofóbico com relação ao hidrogênio. A constante π para um substituinte X pode ser obtida através da Equação 12, onde P_H é o coeficiente de partição do derivado não substituído e P_X do derivado substituído^{59,63}.

$$\pi(X) = \log P_X - \log P_H \quad (12)$$

Os valores de π são característicos para um substituinte (valores negativos indicam que o substituinte é menos hidrofóbico, e valores positivos que o substituinte é mais hidrofóbico) e podem ser usados para calcular como o coeficiente de partição poderá ser afetado pela inclusão deste substituinte. Muitas equações no estudo de QSAR apresentam contribuições a partir do $\log P$, de π ou de ambos^{4,48}.

O coeficiente de partição $\log P$ é a medida da hidrofobicidade total da droga sendo uma medida importante na determinação da eficiência do transporte da droga até o seu sítio ativo. A constante π mede a hidrofobicidade de uma região específica da estrutura molecular da droga^{4,39,40}.

1.4.1.2 - Parâmetros Hidrofóbicos Utilizando Métodos Cromatográficos

A utilização do tradicional método “Shake Flask” no sistema 1-octanol/água para a determinação do coeficiente de partição (P), envolve metodologia trabalhosa, requerendo um tempo prolongado de análise^{64,65}.

Neste contexto, para a determinação do coeficiente de partição, tornou-se necessário o desenvolvimento de metodologias alternativas mais convenientes e capazes de apresentar resultados com maior facilidade mantendo boa correlação com o tradicional método “Shake Flask”.

A Cromatografia em Camada Fina (CCF) e a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), ambas em fase reversa, tornaram-se métodos alternativos e eficientes na determinação e avaliação da lipofilicidade utilizados em estudos de QSAR⁴⁰.

Os parâmetros provenientes da distribuição de uma substância entre uma fase estacionária apolar e uma fase móvel polar, podem ser correlacionados com o coeficiente de partição, pois a hidrofobicidade de uma droga é conhecida como a força dirigente em um processo de distribuição de substâncias apolares em um ambiente polar⁶⁶.

Desta forma, o uso da CCF em fase reversa, foi introduzido para a obtenção dos valores de R_M como parâmetro hidrofóbico⁶⁴. A mudança de substituintes em estruturas químicas análogas provoca uma variação nos valores do R_f na cromatografia. Portanto, a natureza do substituinte é um fator determinante na obtenção dos valores de R_M que através da Equação 13, podem ser calculados. O termo R_f representa a razão entre a distância percorrida pela amostra e pela mistura de eluentes a partir do ponto de aplicação da amostra.

$$R_M = \log (1/R_f - 1) \quad (13)$$

Para cada derivado existe uma relação linear entre os valores de R_M e a composição da mistura de eluentes. Construindo-se um gráfico com os valores de R_M em função da concentração da fase aquosa (%) na mistura de eluentes, obtêm-se uma reta representada pela Equação 14.

$$R_M = a (\% \text{ solv. aquoso}) + b \quad (14)$$

Esta correlação, quando extrapolada para 100% da fase aquosa, origina os valores de R_{Mw} que são aqueles propriamente utilizados nas correlações entre a estrutura e a atividade biológica.

O uso da CLAE tem sido, também, uma metodologia alternativa para a rápida determinação da hidrofobicidade de substâncias bioativas⁶⁵⁻⁶⁷. Através da Equação 15, onde k' é o fator capacidade, t_r o tempo de retenção da substância e t_o o tempo do derivado não retido, é possível mimetizar a partição de uma substância entre a fase estacionária e a fase móvel.

$$\log k' = \log [(t_r - t_o) / t_o] \quad (15)$$

O processo para determinação dos tempos de retenção usa como fase estacionária uma coluna cromatográfica quimicamente ligada a hidrocarbonetos (C8 ou C18) e, como fase móvel, uma mistura de solventes orgânicos (metanol ou acetonitrila, por exemplo) e solvente aquoso, geralmente um tampão apropriado⁶⁶.

De maneira similar aos valores de R_M , os valores de $\log k'$ quando colocados em um gráfico em função da concentração da fase aquosa (%) na mistura de eluentes, fornece uma relação linear representada pela Equação 16. A determinação do $\log k'$ em diferentes composições de eluente seguido pela extrapolação para 100% de solvente aquoso, leva a obtenção de $\log k_w$.

$$\log k' = a (\% \text{ solv. aquoso}) + b \quad (16)$$

Embora o mecanismo de partição entre a fase estacionária e a fase móvel seja complexa, extensos estudos tem sido reportados⁶⁴⁻⁶⁹ mostrando que os valores de R_{Mw} e $\log k_w$ apresentam uma ótima correlação com os valores de $\log P$ como mostram as Equações 17 e 18.

$$R_{Mw} = a \log P + b \quad (17)$$

$$\log k_w = a \log P + b \quad (18)$$

Uma atenção especial deve-se ter para substâncias ionizáveis. Os valores de R_M e $\log k'$ devem ser determinados levando-se em consideração os pKa(s) e o pH do ensaio⁶⁸. Os valores corrigidos de R_M e $\log k'$, podem ser obtidos à partir das equações matemáticas representadas pelas Equações 19 e 20, que permitem os cálculos dos valores corretos.

$$R_M^{corr.} = R^{ap.} + \log (10^{pH-pKa} + 1) \quad (19)$$

$$\log k'^{corr.} = \log k'^{ap.} + \log (10^{pH-pKa} + 1) \quad (20)$$

A determinação da natureza hidrofóbica de derivados bioativos através dos processos cromatográficos tem se apresentado muito vantajosa quando comparada com o método “Shake Flask”, pois as análises são

rápidas, reprodutíveis, sensíveis, de elevada precisão, não requerem amostras 100% puras e, de um modo geral, apresentam uma alta correlação com o $\log P^{65,68}$.

1.4.2 – Parâmetros Eletrônicos

1.4.2.1 - Parâmetros Eletrônicos Empíricos

Em 1937/1940, Hammett^{51,52} verificou que as constantes de ionização dos ácidos benzóicos *meta* e *para* substituídos a 25°C, estavam relacionados pela Equação 21, onde ρ é constante de reação e σ_x é a constante do substituinte que expressa o efeito eletrônico sobre o processo de ionização. A constante de ionização do ácido benzóico é representada por K_H enquanto que K_X corresponde aos respectivos ácidos *meta* e/ou *para* substituídos.

$$\log K_X = \rho \sigma_x + \log K_H \quad (21)$$

O coeficiente angular da equação de Hammett, proveniente do gráfico entre $\log K$ versus σ , corresponde a constante de reação ρ que representa a sensibilidade do centro reacional aos efeitos eletrônicos exercidos pelo substituinte X. O sinal positivo de ρ indica que o centro reacional é mais susceptível a grupos retiradores de elétrons e, o sinal negativo a grupos doadores de elétrons⁷⁰.

Enquanto ρ é um termo característico da reação e independente do substituinte, a constante σ reflete a natureza eletrônica do substituinte considerando a contribuição dos efeitos indutivo e de ressonância sendo independente da reação. Valores positivos para σ indicam a presença de substituintes que diminuem a densidade eletrônica do anel enquanto que valores negativos, a presença de grupos de substituintes doadores de elétrons do anel. A presença de mais de um grupo substituinte em uma molécula torna o valor resultante de σ igual a soma algébrica dos respectivos grupos⁷⁰.

A partir da não linearidade da equação de Hammett, observada para reações envolvendo determinadas substâncias aromáticas, outras equações foram propostas e os valores de σ devidamente ajustados. Considerando-se a natureza eletrônica específica de alguns sistemas, novos conjuntos de valores de σ foram propostos. O parâmetro σ^+ foi introduzido para grupos substituintes fortemente doadores e σ^- para grupos fortemente retiradores⁷¹.

Com o reconhecimento da necessidade de encontrar um modelo que tratasse separadamente as contribuições dos efeitos indutivo e de ressonância, foi proposta a expansão da equação de Hammett, representada pela Equação 22, que permite calcular a susceptibilidade da reação em relação a estes efeitos separadamente. As constantes σ_I e σ_R são os parâmetros duais dos substituintes que refletem a sensibilidade do centro reacional ao efeito indutivo e de ressonância, respectivamente⁷².

$$\log K_X = \rho_I \sigma_I + \rho_R \sigma_R + \log K_H \quad (22)$$

Entretanto, Swain e Lupton⁷³ a partir das constantes de dissociação dos ácidos biciclo-[2,2,2]-octano-1-carboxílicos 4-substituídos, mostraram que os valores de σ podem apresentar-se como uma combinação da contribuição do efeito indutivo, **F**, com o efeito de ressonância, **R**, através da Equação 23, onde f e r são fatores que quantificam sua contribuição.

$$\sigma = f F + r R \quad (23)$$

A partir dos estudos de Hammett, muitas outras propriedades estruturais foram descritas em termos de constantes do substituinte. Na tentativa de quantificar as propriedades estéricas dos substituintes próximas ao centro de reação, Taft⁵³ definiu a constante estérica (E_s) baseado na hidrólise ácida de ésteres alifáticos. A constante de Taft (E_s) foi definida pela Equação 24 onde k_H e k_X correspondem as constantes de velocidade da hidrólise do derivado não substituído e do substituído, respectivamente.

$$E_s = \log(k_X / k_H) \quad (24)$$

O parâmetro conhecido como refratividade molar (RM)^{4,40} é uma outra medida para fator estérico. A RM é a medida do volume ocupado por um átomo ou grupo de átomos, podendo ser determinado através da Equação 25 onde n é o índice de refração, PM o peso molecular e d a densidade do derivado.

$$MR = (n_2 - 1 / n_2 + 2) (PM / d)$$

(25)

O termo PM/d define o volume, enquanto o termo $(n^2 - 1)/(n^2 + 2)$ fornece o fator de correção, indicando a facilidade com que o substituinte pode ser polarizado. Isso é particularmente significativo quando o substituinte possui elétrons π ou par de elétrons não ligantes. A RM é usada como parâmetro estérico, mas como tem relação com a polarizabilidade molecular, também pode expressar efeitos eletrônicos, como por exemplo, interações dipolo-dipolo presentes no centro ativo.

Uma outra aproximação para determinação de interações estéricas envolve um programa computacional chamado STERIMOL que foi desenvolvido por Verloop e colaboradores^{4,74}. Este programa permite calcular parâmetros estéricos de substituintes, a partir dos valores de ângulo de ligação, raio de van der Waals, comprimento de ligação e conformações possíveis para os substituintes. O primeiro parâmetro determinado foi **L** que representa o comprimento do substituinte ao longo do eixo de ligação comparado ao não substituído. Perpendicularmente a este eixo de ligação, os parâmetros **B1** e **B2** foram determinados e representam as distâncias entre seus pontos máximos perpendiculares ao eixo de ligação. Assim como para Es, os parâmetros estéricos de Verloop podem ser determinados para qualquer substituinte.

1.4.2.2 – Parâmetros Eletrônicos Teóricos

Os avanços nos recursos computacionais têm possibilitado o desenvolvimento de um grande número de técnicas denominadas de métodos de modelagem molecular, capazes de simular as várias etapas que envolvem a interação droga-receptor, além de fornecer informações valiosas para a compreensão dos mecanismos de ação de uma determinada droga⁷⁴⁻⁷⁷.

A modelagem molecular consiste em um conjunto de ferramentas para a construção, edição e visualização, análise e armazenamento de sistemas moleculares complexos. Estas ferramentas podem ser aplicadas em estratégias de modelagem direta ou indireta de novas drogas. Na primeira aproximação faz-se o ajuste da droga a uma estrutura de receptor conhecida, por exemplo através de dados de cristalografia de raios-X ou de ressonância magnética nuclear (RMN). Na segunda aproximação, faz-se a análise comparativa das estruturas das substâncias ativas e de moléculas inativas ao nível de um determinado receptor biológico⁷⁶.

A modelagem molecular pode ser realizada através de dois métodos de cálculo, o de mecânica molecular e o de mecânica quântica⁷⁴.

No método que utiliza a mecânica molecular pode-se gerar, manipular e representar estruturas tridimensionais de uma substância e determinar suas energias relativas no estado gasoso. A possibilidade do estudo das conformações e propriedades de um molécula isolada, simulando o estado gasoso, ou da molécula solvatada, ainda que por um número pequeno de moléculas de solvente, permite prever as conformações preferenciais em cada caso particular. A principal vantagem deste método é a rapidez na avaliação de sistemas moleculares complexos⁷⁴.

Os pacotes de programa de mecânica molecular utilizam funções de energia potencial para representar a energia interna das moléculas. O PCMODEL-MMX é exemplo de um dos programa mais utilizados^{74,76}.

Os métodos mecânico quânticos tem maior destaque pois permitem a determinação de um maior número de propriedades moleculares, com maior precisão nos resultados.

Os pacotes de programas dos métodos quânticos são os *ab initio* e os semi-empíricos. Os métodos *ab initio*, são eficientes com relação aos resultados obtidos, mas computacionalmente mais lentos e aplicáveis à moléculas menores. Os métodos semi-empíricos fornecem todas as propriedades possíveis de se obterem com os métodos *ab initio*, entretanto parte dos seus parâmetros são ajustados a dados experimentais⁷⁶ e podem ser utilizados para moléculas com até 150 átomos.

Nas aproximações dos métodos semi-empíricos os núcleos dos átomos são assumidos em sucessivas posições estacionárias, sobre as quais a distribuição espacial ótima dos elétrons é calculada pela resolução da equação de Schrödinger (Equação 26) na qual a função de onda ψ é uma função das coordenadas dos núcleos R e dos elétrons r . O autovalor correspondente a energia do sistema no estado considerado é dado por E , e H é o hamiltoniano, um operador diferencial, que representa a energia cinética e potencial das partículas do sistema. O processo é repetido até que a energia não mais varie dentro de um limite escolhido, ou seja, até se alcançar um ponto estacionário da superfície de energia.

$$H \Psi(R, r) = E \Psi(R, r)$$

(26)

Os métodos semi-empíricos AM1 (Austin Model 1) e PM3 (Parametric Method 3) são os últimos de uma série de métodos desenvolvidos, e são parte do pacote geral denominado MOPAC. O método PM3 apresenta as mesmas aproximações e equações que o método AM1. A diferença básica entre os dois está no procedimento de parametrização. Os dois métodos fornecem resultados muito similares, diferindo basicamente no cálculo de propriedades de substâncias hipervalentes ou contendo halogênios^{78,79}.

Os parâmetros teóricos obtidos por mecânica quântica permitem que se obtenha informações conformacionais energéticas e uma série de dados que representam as propriedades moleculares. Neste modelo, busca-se a nível eletrônico, estérico e de transporte, a explicação das interações dos fármacos com seus respectivos receptores quantificando seus diferentes tipos, ou seja, intra e intermoleculares envolvidos nas interações biológicas^{41,76}.

Propriedades moleculares estéricas, eletrônicas e de transporte podem ser investigadas a partir de dados teóricos obtidos por cálculo de mecânica quântica. Estes dados podem ser calores de formação, energias eletrônicas, energias de HOMO (orbital molecular ocupado de mais alta energia) e LUMO (orbital molecular desocupado de mais baixa energia), energias de ionização, densidades eletrônicas atômicas, momentos de dipolo, ordens de ligação, densidades eletrônicas dos orbitais de fronteira HOMO e LUMO, entre outras^{41,76}.

Através da distribuição de cargas em uma molécula pode-se estimar a força de uma interação eletrostática de um átomo com um centro de carga oposta no receptor. Por intermédio das energias do HOMO e do LUMO ou da diferença (ΔE) entre eles, pode-se estimar uma interação por transferência de carga entre o HOMO do composto e LUMO do receptor ou vice-versa. O momento de dipolo, representa o potencial eletrostático e a polarizabilidade molecular, que indica a maior ou menor facilidade de



OBJETIVOS

2 - OBJETIVOS

Este trabalho tem como principais objetivos:

↳ Sintetizar uma série de treze derivados heterocíclicos do sistema *4-(X-fenil)amino-5-carbetoxi-1,3-dimetil-1H-pirazolo[3,4-b]piridina* onde X = H, 4'-NO₂, 4'-OCH₃, 4'-CH₃, 3'-NO₂, 3'-OCH₃, 4'-Br, 4'-F, 3'-CH₃, 4'-Cl, 3'-Cl, 4'-OH e 4'-OAc.

↳ Elucidar as estruturas das *1,3-dimetilpirazolopiridinas* utilizando principalmente experimentos de RMN com técnicas uni e bidimensionais.

↳ Determinar os valores que expressam a atividade antileishmania, DL50 da série *4-(X-fenil)amino-5-carbetoxi-1,3-dimetil-1H-pirazolo [3,4-b]piridina* e DL90 para as *4-(4'-hidroxifenil)amino-5-carbetoxi-1-R₁,3-R₂-1H-pirazolo[3,4-b]piridina*, *4-(4'-hidroxi-3'-dietilaminometilfenil)amino-5-carbetoxi-1-R₁,3-R₂-1H-pirazolo[3,4-b]piridina*, onde R₁ = R₂ = Fenil e R₂ = Metil e R₁ = Fenil e da Amodiaquina.

↳ Determinar experimentalmente os parâmetros hidrofóbicos (coeficiente de partição logP e os cromatográficos R_{Mw}, logk_w e o pK_a) e

eletrônicos teóricos (HOMO, LUMO, momento dipolar e calor de formação) das 1,3-dimetilpirazolopiridinas.

↳ Estudar a relação entre as conformações mais estáveis dos derivados *4-(4'-hidroxifenil)amino-5-carbetoxi-1-R₁,3-R₂-1H-pirazolo[3,4-b]piridina*, *4-(4'-hidroxi-3'-dietilaminometilfenil)amino-5-carbetoxi-1-R₁,3-R₂-1H-pirazolo[3,4-b]piridina*, onde R₁ = R₂ = Fenil e R₂ = Metil e R₁ = Fenil e da Amodiaquina, através da modelagem molecular.

↳ Avaliar as melhores correlações entre a atividade antileishmania das 1,3-dimetilpirazolopiridinas e seus parâmetros físico químicos: hidrofóbicos (logP, π , logk_w e R_{Mw}), eletrônicos teóricos calculados (HOMO, LUMO, momento dipolar e calor de formação), eletrônicos empíricos tabelados (σ , σ_I , σ_R , **F** e **R**) e estéricos (Es, MR, L, B1, B2), utilizando modelo teórico adequado.



EXPERIMENTAL

3 - EXPERIMENTAL

3.1 - Materiais e Aparelhagem

3.1.1 - Solventes e Reagentes

> As anilinas utilizadas neste trabalho bem como os reagentes específicos usados para obtenção dos derivados intermediários, foram adquiridos da Aldrich, Merck ou Sigma e, quando necessário, foram purificados ou tratados convenientemente segundo métodos descritos na literatura⁸⁰⁻⁸².

> Os solventes usados nas sínteses, recristalizações, cromatografia em camada fina e de coluna filtrante, foram todos de grau P. A. da Vetec ou Grupo Química, sendo eles: clorofórmio, acetona, etanol, metanol e acetato de etila.

Na espectrofotometria de ultravioleta e na Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), os solventes utilizados foram acetonitrila, metanol e 1,4-dioxano grau espectroscópico. Para determinação dos $R_f(s)$, foi usado acetona previamente tratada de acordo com dados da literatura⁸⁰⁻⁸¹.

➤ O 1-octanol da marca Grupo Química, utilizado para determinação do coeficiente de partição, foi devidamente seco em carbonato de sódio, seguido de destilação fracionada.

➤ Nas análises por cromatografia em camada fina, foram utilizadas cromatofolhas de sílica gel em alumínio com indicador para UV (254nm), marca SIGMA. As placas de cromatografia em camada fina de fase reversa, foram da marca Uniplate Analtec, RPS-F, 250 microns e a sílica gel utilizado na cromatografia em coluna filtrante foi o da marca VETEC 35-70 e 230-400 mesh.

➤ Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foram obtidos utilizando-se CDCl_3 ou DMSO-d_6 como solventes. Os deslocamentos químicos (δ) estão em partes por milhão (ppm) em relação ao tetrametilsilano (TMS), utilizado como padrão interno. Pastilhas de KBr foram utilizadas para obtenção dos espectros de infravermelho.

➤ Todas as soluções usadas na Cromatografia Líquida de Alta Eficiência foram devidamente filtradas em filtro de membrana e preparadas utilizando-se água destilada e deionizada no sistema "Millipore-Q".

3.1.2 - Aparelhos

➤ Os dados espectrais foram obtidos em espectrofotômetro de infravermelho marca Perkin Elmer 1605 com transformada de Fourier e em espectrofotômetro de ultravioleta marca Varian, modelo DMS-80 utilizando células de quartzo de caminho ótico de 1,0cm. Os espectros de

RMN foram obtidos em espectrômetro Brüker modelo AC200 (200MHz, ^1H e 50,3 MHz, ^{13}C) e espectrômetro da Varian modelo Unity plus-300 (299,95 MHz, ^1H e 75,42 MHz, ^{13}C).

> Os pontos de fusão foram determinados utilizando-se o aparelho MELTEMP II e não foram corrigidos.

> Os cálculos de modelagem molecular, semi-empíricos e de mecânica molecular, foram realizados em microcomputador 486, 100MHz.

> Os pKa(s) foram determinados utilizando-se o potenciômetro da Metrohm Herisau, modelo E 539 acoplado a uma bureta automática, Dosimat modelo 665 com agitador magnético E 549. Foi utilizado o eletrodo de vidro combinado, CH 9100 da marca Metrohm Herisau.

> Os tempos de retenção foram determinados em Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE) da marca Shimadzu SPD - 10A equipado com um detector de absorção no ultravioleta e visível. Os dados foram transferidos para um registrador Shimadzu Cromatopac CR6A. A fase estacionária utilizada, foi uma coluna Supelco LC-8 (25,0cm x 4,6m).

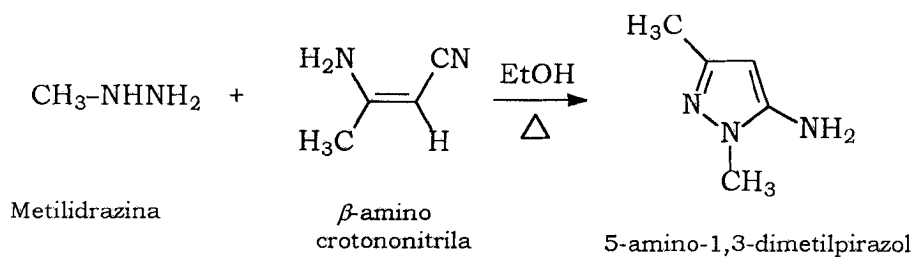
> Os pH(s) das soluções tampão foram determinados utilizando-se um pHmetro da Metronal, modelo E 120.

> As correlações lineares de energia livre e os gráficos correspondentes foram obtidos utilizando-se o programa estatístico Origin 4.1 para microcomputador Celeron 400MHz.

3.2 - Síntese

3.2.1 - Síntese das Matérias Primas

3.2.1.1 - 5-amino-1,3-dimetilpirazol^{83,84}



O derivado 5-amino-1,3-dimetilpirazol foi obtido segundo métodos descritos na literatura, reagindo-se a β -aminocrotononitrila (0,20mol) e metilidrazina (0,26mol) em 50mL de etanol absoluto.

Rendimento: 66% (Lit.: 75%)⁸³

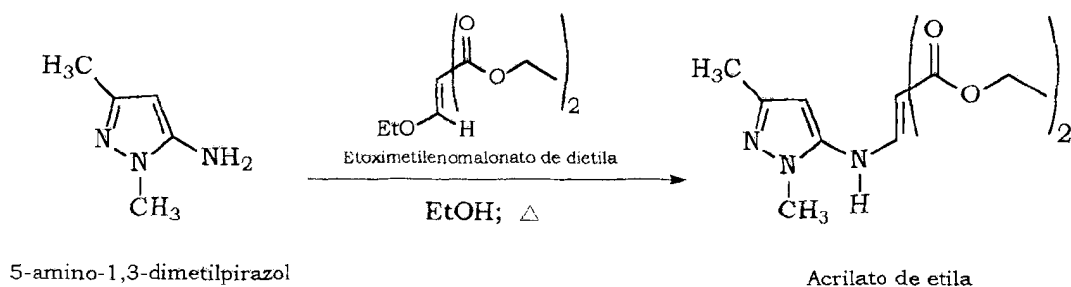
Ponto de fusão: 67-69°C (Lit.: 80-81°C)⁸³

IV (cm^{-1}): ν_{NH} 2923; $\nu_{\text{C=N}}$ 1643, 1561 (Figura 1, Vol. 2)

RMN de ^1H : (Figura 2, Vol. 2)

RMN de ^{13}C : (Figura 3, Vol. 2)

3.2.1.2 - α -carboetoxi- β -(1,3-dimetil-5-pirazolilamino) acrilato de etila⁸⁵



Em balão de fundo redondo foram adicionadas quantidades equimolares de 1,3-dimetil-aminopirazol e de etoximetilenomalonato de dietila em etanol. A mistura reacional foi mantida em refluxo por 2 horas e após resfriamento, vertida em gelo picado. Obteve-se, após recristalização em etanol, o produto sob a forma de um sólido branco.

Rendimento: 71% (Lit.: 78%)⁸⁵

Ponto de fusão: 87-88°C (Lit.: 90-91°C)⁸⁵

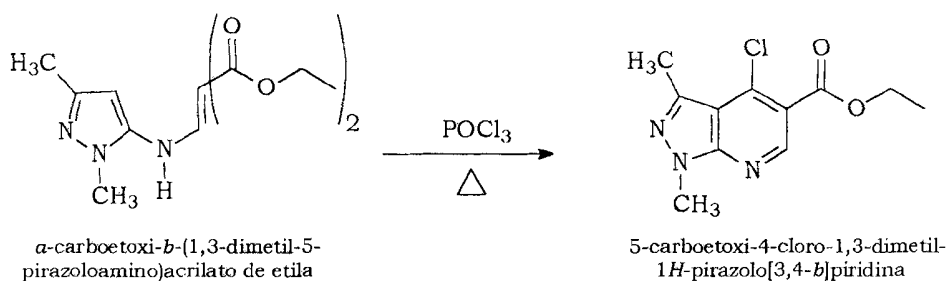
IV (cm⁻¹): ν_{NH} 2983; $\nu_{\text{C=O}}$ 1716, 1660; $\nu_{\text{C-O}}$ 1298, 1224 (Figura 4, Vol. 2)

RMN de ¹H: (Figura 5, Vol. 2)

RMN de ¹³C: (Figura 6, Vol. 2)

RMN (2D) ¹H x ¹³C – COSY – ¹J_{CH}: (Figura 7, Vol. 2)

3.2.1.3 - 5-carboetoxi-4-cloro-1,3-dimetil-1H-pirazolo[3,4-b]piridina⁸⁶



Em balão de fundo redondo, adaptado a condensador de refluxo, munido de tubo de secagem com cloreto de cálcio anidro, foram dissolvidas 2,5g (0,01mol) do derivado acrilato, em excesso de POCl_3 (15mL). A mistura reacional ficou em refluxo por 8 horas e o excesso de POCl_3 foi destilado ao término da reação. Após resfriamento a mistura foi vertida em gelo picado. O produto precipitado foi isolado, sendo cristalizado em etanol, fornecendo um sólido branco.

Rendimento: 95% (Lit.: 89%)⁸⁶

Ponto de fusão: 89-90°C (Lit.: 93-94°C)⁸⁶

IV (cm^{-1}): $\nu_{\text{C=O}}$ 1695; $\nu_{\text{C-O}}$ 1239, 1199 (Figura 8, Vol. 2)

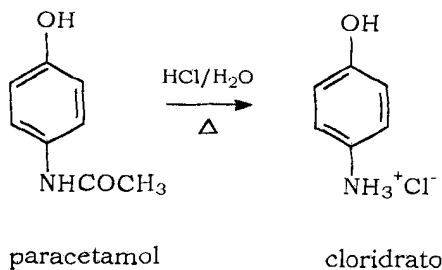
RMN de ^1H : (Figura 9, Vol. 2)

RMN de ^{13}C – DEPT: (Figura 10, Vol. 2)

RMN (2D) ^1H x ^{13}C – COSY – $^1J_{\text{CH}}$: (Figura 11, Vol. 2)

RMN (2D) ^1H x ^{13}C – COSY – $^nJ_{\text{CH}}$: (Figura 12, Vol. 2)

3.2.1.4 - Cloridrato de 4-aminofenol⁸¹

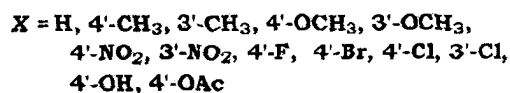
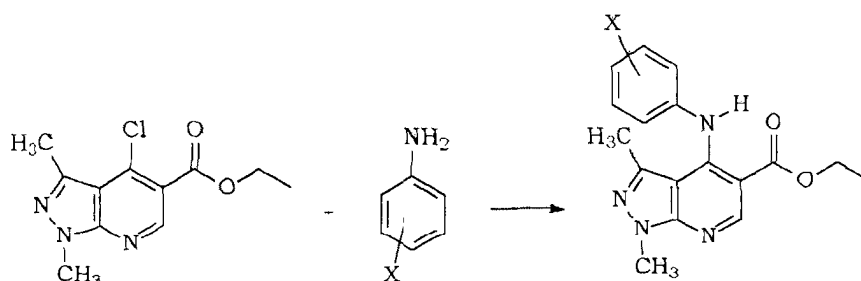


O cloridrato do 4-aminofenol foi obtido de acordo com o método descrito na literatura, reagindo-se o paracetamol (0,02mol) com 10mL de uma solução de ácido clorídrico 25%.

Rendimento: 65%

Ponto de fusão: 305°C (Lit.: 306°C com decomposição)⁸¹

3.2.2 - Reações de Acoplamento para Obtenção dos Derivados 4-(X-fenil)amino-5-carboetoxi-1,3-dimetil-1H-pirazolo[3,4-b]piridina



MÉTODO GERAL

Em balão de fundo redondo munido de condensador de refluxo, contendo o solvente adequado, foram adicionados o 5-carboetoxi-4-cloro-1,3-dimetil-1H-pirazolo[3,4-b]piridina e a anilina desejada. A mistura resultante permaneceu em refluxo pelo tempo discriminado em cada caso, e a reação foi acompanhada por cromatografia em camada fina. Após o final da reação e tratamento adequado, o sólido obtido foi submetido a purificação⁸⁸.

3.2.2.1 – Obtenção dos Derivados Onde

X=H, 4'-NO₂, 4'-OCH₃, 4'-CH₃, 3'-NO₂ e 3'-OCH₃

Os produtos onde X= H, 4'-NO₂, 4'-OCH₃, 4'-CH₃, 3'-NO₂ e 3'-OCH₃ foram obtidos anteriormente por Bernardino⁸⁷, utilizando-se quantidades equimolares do 5-carbetoxi-4-cloro-1,3-dimetil-1*H*-pirazolo[3,4-*b*] piridina e da anilina correspondente. A mistura foi aquecida em banho de glicerina por 2 horas. Após resfriamento, a mistura reacional foi neutralizada com solução de bicarbonato de sódio 5% ou solução de hidróxido de sódio 5%. O produto foi extraído com diclorometano e após a evaporação do solvente, os derivados X=H, 4'-NO₂, 4'-OCH₃, 3'-NO₂ e 3'-OCH₃ foram recristalizados em etanol e o X= 4'-CH₃ em tolueno⁸⁸.

O derivado onde X= 4'-CH₃ foi também obtido utilizando-se 0,30g (0,0011mol) do intermediário clorado e 0,24g (0,0022 mol) da *para*-toluidina em 2,0mL de etilenoglicol. Após 2 horas de reação a mistura reacional foi resfriada, vertida em gelo picado e o meio neutralizado com solução diluída de NH₄OH. O produto precipitado foi então isolado e depois de seco, recristalizado em etanol. O produto foi obtido sob forma de um sólido de cor marrom.

A Tabela 1 mostra rendimentos e pontos de fusão e, a Tabela 2, os dados espectroscópicos na região do UV/Vis, para os derivados obtidos.

Tabela 1: Rendimentos e pontos de fusão para os derivados, onde $X=H, 4'-NO_2, 4'-OCH_3, 4'-CH_3, 3'-NO_2$ e $3'-OCH_3$.

X	Rendimento (%)	P.F. (°C)
H	80	137-40
4'-NO₂	88	168-70
4'-OCH₃	86	175-78
4'-CH₃	30 ^a	175-77
	35 ^b	106-07
3'-NO₂	65	168-70
3'-OCH₃	30	123-24

^aReação feita sem solvente. ^bReação utilizando etilenoglicol.

Tabela 2: Dados espectrocópicos obtidos na região do UV/VIS em 1,4-dioxano como solvente, para os derivados onde $X=H, 4'-NO_2, 4'-OCH_3, 4'-CH_3, 3'-NO_2$ e $3'-OCH_3$.

X	$\lambda_{m\acute{a}x}$ (nm)	ϵ ($cm^{-1}M^{-1}$)	$C \times 10^5$ (M)
H	323	13405	6,49
4'-NO ₂	352	17372	2,36
4'-OCH ₃	322	8510	2,82
4'-CH ₃	322	13261	7,39
3'-NO ₂	324	44230	1,36
3'-OCH ₃	323	7722	12,69

IV (cm^{-1})

H: ν_{NH} 3235; ν_{CH} 2982, 2931; $\nu_{C=C}$ 1590, 1565; $\nu_{C=O}$ 1669; ν_{C-O} 1266 (Figura 13, Vol. 2).

4'-NO₂: ν_{NH} 3252; ν_{CH} 2983, 2936; $\nu_{C=C}$ 1559, 1601; $\nu_{C=O}$ 1681; ν_{C-O} 1269; $\nu_{N=O}$ 1501, 1334 (Figura 19, Vol. 2).

4'-OCH₃: ν_{NH} 3242; ν_{CH} 2926, 2851; $\nu_{C=C}$ 1592, 1565; $\nu_{C=O}$ 1669; ν_{C-O} 1265 (Figura 25, Vol. 2).

4'-CH₃: ν_{NH} 3201; ν_{CH} 2984, 2933; $\nu_{C=C}$ 1567; $\nu_{C=O}$ 1666; ν_{C-O} 1266 (Figura 31, Vol. 2).

3'-NO₂: ν_{NH} 3208; ν_{CH} 2982; $\nu_{\text{C=C}}$ 1562, 1597; $\nu_{\text{C=O}}$ 1673; $\nu_{\text{C-O}}$ 1271; $\nu_{\text{N=O}}$ 1526, 1348 (Figura 38, Vol. 2).

3'-OCH₃: ν_{NH} 3242; ν_{CH} 2926; $\nu_{\text{C=C}}$ 1592, 1565; $\nu_{\text{C=O}}$ 1669; $\nu_{\text{C-O}}$ 1265 (Figura 44, Vol. 2).

RMN de ¹H:

H (Figura 14, Vol. 2)

4'-NO₂ (Figura 20, Vol. 2)

4'-OCH₃ (Figura 26, Vol. 2)

4'-CH₃ (Figura 32, Vol. 2)

3'-NO₂ (Figura 39, Vol. 2)

3'-OCH₃ (Figura 45, Vol. 2)

RMN de ¹³C – DEPT:

H (Figura 15, Vol. 2)

4'-NO₂ (Figura 21, Vol. 2)

4'-OCH₃ (Figura 27, Vol. 2)

4'-CH₃ (Figura 33, Vol. 2)

3'-NO₂ (Figura 40, Vol. 2)

3'-OCH₃ (Figura 46, Vol. 2)

RMN (2D) ¹H x ¹H – COSY:

H (Figura 16, Vol. 2)

4'-NO₂ (Figura 22, Vol. 2)

4'-OCH₃ (Figura 28, Vol. 2)

3'-NO₂ (Figura 41, Vol. 2)

3'-OCH₃ (Figura 47, Vol. 2)

RMN (2D) ¹H x ¹³C – COSY – ¹J_{CH}:

H (Figura 17, Vol. 2)

4'-NO₂ (Figura 23, Vol. 2)

4'-OCH₃ (Figura 29, Vol. 2)

4'-CH₃ (Figura 34 e 35, Vol. 2)

3'-NO₂ (Figura 42, Vol. 2)

3'-OCH₃ (Figura 48, Vol. 2)

RMN (2D) ¹H x ¹³C – COSY – ⁿJ_{CH},

n=2 ou 3:

H (Figura 18, Vol. 2)

4'-NO₂ (Figura 24, Vol. 2)

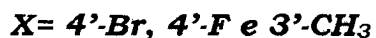
4'-OCH₃ (Figura 30, Vol. 2)

4'-CH₃ (Figura 36 e 37, Vol. 2)

3'-NO₂ (Figura 43, Vol. 2)

3'-OCH₃ (Figura 49, Vol. 2)

3.2.2.2 - Obtenção dos Derivados Onde



Os produtos onde $X = 4'\text{-Br}, 4'\text{-F}, 3'\text{-CH}_3$ foram obtidos utilizando-se quantidades equimolares do intermediário clorado e da anilina correspondente. A mistura foi aquecida em banho de glicerina por aproximadamente 1 hora e meia. Após resfriamento, a mistura reacional foi neutralizada com solução diluída de NH_4OH . Os produtos precipitados, após secos, foram recristalizados em etanol⁸⁸.

A Tabela 3 mostra os rendimentos, pontos de fusão e coloração dos cristais, e a Tabela 4 os dados espectroscópicos na região do UV/Vis, para os derivados obtidos.

Tabela 3: Rendimentos e pontos de fusão para os derivados, onde $X = 4'\text{-Br}, 4'\text{-F e } 3'\text{-CH}_3$.

X	Rendimento (%)	P.F. (°C)	Coloração dos Cristais
4'-Br	50	110-12	marrom
4'-F	60	104-06	amarelo
3'-CH₃	40	130-33	branco

Tabela 4: Dados espectrocópicos obtidos na região do UV/VIS em 1,4-dioxano como solvente, para os derivados onde X= 4'-Br, 4'-F e 3'-CH₃.

X	$\lambda_{m\acute{a}x}$ (nm)	ϵ (cm ⁻¹ M ⁻¹)	C x 10⁻⁵ (M)
4'-Br	327	28363	6,17
4'-F	320	12769	6,03
3'-CH₃	323	13577	5,59

IV (cm⁻¹)

4'-Br: ν_{NH} 3182; ν_{CH} 2989, 2934; $\nu_{C=C}$ 1591, 1564 $\nu_{C=O}$ 1673; ν_{C-O} 1264 (Figura 50, Vol. 2).

4'-F: ν_{NH} 3222; ν_{CH} 2978, 2927; $\nu_{C=C}$ 1595, 1569; $\nu_{C=O}$ 1669; ν_{C-O} 1269 (Figura 56, Vol. 2).

3'-CH₃: ν_{NH} 3237; ν_{CH} 2982, 2931; $\nu_{C=C}$ 1591, 1564; $\nu_{C=O}$ 1670; ν_{C-O} 1265 (Figura 62, Vol. 2).

RMN de ^1H :

$4'$ -Br (Figura 51, Vol. 2)

$4'$ -F (Figura 57, Vol. 2)

$3'$ -CH₃ (Figura 63, Vol. 2)

RMN de ^{13}C – DEPT:

$4'$ -Br (Figura 52, Vol. 2)

$4'$ -F (Figura 58, Vol. 2)

$3'$ -CH₃ (Figura 64, Vol. 2)

RMN (2D) ^1H x ^1H :

$4'$ -Br (Figura 53, Vol. 2)

$4'$ -F (Figura 59, Vol. 2)

RMN (2D) ^1H x ^{13}C – COSY – $^1J_{\text{CH}}$:

$4'$ -Br (Figura 54, Vol. 2)

$4'$ -F (Figura 60, Vol. 2)

RMN (2D) ^1H x ^{13}C – COSY – $^nJ_{\text{CH}}$,

$n=2$ ou 3 :

$4'$ -Br (Figura 55, Vol. 2)

$4'$ -F (Figura 61, Vol. 2)

3.2.2.3 - Obtenção dos Derivados Onde

$X = 4'\text{-Cl}$ e $3'\text{-Cl}$

Para a obtenção dos derivados onde $X=4'\text{-Cl}$ e $3'\text{-Cl}$ utilizou-se 0,30g (0,0011mol) do derivado clorado e 0,0022mol da anilina correspondente (0,20g da $4'\text{-Cl}$ e 0,25mL da $3'\text{-Cl}$) em 3,0mL de etilenoglicol. Após 2 horas de reação, a mistura reacional foi resfriada e vertida em gelo picado. O produto foi isolado, tendo sido purificado em cromatografia de coluna filtrante, utilizando como fase móvel clorofórmio e acetato de etila (9:1). Obteve-se os produtos em forma sólida com coloração marrom claro.

Tabela 5: Dados de rendimentos e pontos de fusão dos derivados 4'-Cl e 3'-Cl.

X	Rendimento (%)	P.F. (°C)
4'-Cl	65	100-01
3'-Cl	35	155-57

Tabela 6: Dados espectrocópicos obtidos na região do UV/VIS em 1,4-dioxano como solvente, para os derivados onde X=4'-Cl e 3'-Cl.

X	$\lambda_{\text{máx}}$	ϵ ($\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$)	$C \times 10^{-5}$ (M)
4'-Cl	325	14150	7,42
3'-Cl	325	12806	5,31

IV (cm^{-1})

4'-Cl ν_{NH} 3216; ν_{CH} 2985, 2933; $\nu_{\text{C=C}}$ 1593, 1580 $\nu_{\text{C=O}}$ 1673; $\nu_{\text{C-O}}$ 1267 (Figura 65, Vol. 2).

3'-Cl ν_{NH} 3220; ν_{CH} 2982, 2928; $\nu_{\text{C=C}}$ 1594, 1565 $\nu_{\text{C=O}}$ 1673; $\nu_{\text{C-O}}$ 1268 (Figura 70, Vol. 2).

RMN de ^1H :

$4'$ -Cl (Figura 66, Vol. 2)

$3'$ -Cl (Figura 71, Vol. 2)

RMN de ^{13}C – DEPT:

$4'$ -Cl (Figura 67, Vol. 2)

RMN (2D) ^1H x ^{13}C - COSY – $^1\text{J}_{\text{CH}}$:

$4'$ -Cl (Figura 68, Vol. 2)

$3'$ -Cl (Figura 73, Vol. 2)

RMN de ^{13}C :

$3'$ -Cl (Figura 72, Vol. 2)

RMN (2D) ^1H x ^{13}C - COSY – $^n\text{J}_{\text{CH}}$,

$n=2$ ou 3 :

$4'$ -Cl (Figura 69, Vol. 2)

$3'$ -Cl (Figura 74, Vol. 2)

3.2.2.4 - Obtenção do Derivado Onde

$X=4'$ -OH

Para a síntese do produto onde $X=4'$ -OH, foi preparada inicialmente uma solução contendo 0,32g (0,0022mol) do cloridrato do 4-aminofenol e 6,0ml de etanol⁸. A esta solução foram adicionados 0,30g (0,0011mol) do derivado clorado. Após 48 horas de reação, o produto bruto obtido foi recristalizado em etanol obtendo-se o derivado $X=4'$ -OH como um sólido branco¹⁰.

A obtenção do derivado onde $X=4'$ -OH também foi realizada utilizando 3,0mL de etileno glicol como solvente. Após 3 horas de reação a mistura reacional foi resfriada e vertida em gelo picado, sendo o meio neutralizado com solução de NH_4OH . O produto precipitado foi então

isolado e depois de seco recristalizado em etanol. Obteve-se o produto como um sólido levemente amarelado.

Tabela 7: Rendimentos e pontos de fusão do derivado 4'-OH obtidos em etanol e etilenoglicol.

X	Rendimento (%)	P.F. (°C)	Solvente
4'-OH	35	274-76	Etanol
	55	275-77	Etilenoglicol

UV: $\lambda_{\text{máx.}}$, 319nm ϵ , 14235 (concentração $5,69 \times 10^{-5} \text{M}$ em 1,4-dioxano)

IV (cm^{-1}): ν_{NH} 3130; ν_{CH} 2999; 2934 $\nu_{\text{C=C}}$ 1590, 1574; $\nu_{\text{C=O}}$ 1681; $\nu_{\text{C-O}}$ 1269; ν_{OH} 3500-3000 (Figura 77, Vol. 2).

RMN de ^1H : (Figura 76, Vol. 2)

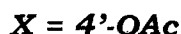
RMN de ^{13}C – DEPT: (Figura 77, Vol. 2)

RMN (2D) $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ – COSY: (Figura 78, Vol. 2)

RMN (2D) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – COSY – $^1J_{\text{CH}}$: (Figura 79, Vol. 2)

RMN (2D) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – COSY – $^nJ_{\text{CH}}$, $n=2$ ou 3 : (Figura 80, Vol. 2)

3.2.2.5 - Obtenção do Derivado onde



O derivado onde $X=4'\text{-OAc}$ foi obtido através da reação de acetilação⁹⁰ do produto onde $X=4'\text{-OH}$. Inicialmente, foram dissolvidos 0,20g do $4'\text{-OH}$ (0,00061 mol) em 2,0mL de piridina anidra. Em seguida, à essa mistura, adicionou-se 1ml (0,01058 mol) de anidrido acético. Após 5 minutos de agitação, a mistura reacional foi vertida em gelo picado. O derivado foi isolado sendo purificado por recristalização em etanol. Obteve-se o produto como sólido branco.

Rendimento: 60%

Ponto de fusão: 127-30°C

UV: $\lambda_{\text{máx}}$, 323nm ϵ , 45675(concentração $1,48 \times 10^{-5}$ M em 1,4-dioxano)

IV (cm^{-1}): ν_{NH} 3051; ν_{CH} 2981, 2933 $\nu_{\text{C=C}}$ 1596, 1581; $\nu_{\text{C=O}}$ 1759, 1662; $\nu_{\text{C-O}}$ 1266, 1224 (Figura 81, Vol. 2).

RMN de ^1H : (Figura 82, Vol. 2)

RMN de ^{13}C : (Figura 83, Vol. 2)

RMN (2D) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – COSY – $^1J_{\text{CH}}$: (Figura 84, Vol. 2)

RMN (2D) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – COSY – $^nJ_{\text{CH}}$, $n=2$ ou 3 : (Figura 85, Vol. 2)

3.3 - Determinação dos valores de $pK_a(s)$ ^{91,92}

Os $pK_a(s)$ dos derivados pirazolopiridinas foram determinados através do método potenciométrico. As soluções contendo os derivados, foram tituladas potenciometricamente utilizando-se como titulante uma solução padronizada de HCl 0,01N.

Soluções

As soluções estoques das amostras foram preparadas em 1,4-dioxano grau espectroscópico, na concentração de $9,4 \times 10^{-3}$ N utilizando-se balões volumétricos de 5mL.

A solução de HCl, utilizada como titulante foi padronizada potenciometricamente com tetraborato de sódio decahidratado ($Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$), como padrão primário. A normalidade do HCl obtida foi de $(0,00945 \pm 0,00009)N$ ⁹³.

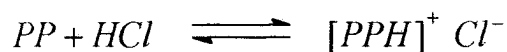
Procedimento:

Foram pipetados 1mL da solução estoque dos derivados e transferidos para os respectivos becheres aos quais foram adicionados mais 20mL de 1,4-dioxano e 10mL de H₂O destilada (utilizando-se pipetas graduadas).

As soluções resultantes foram tituladas potenciometricamente com HCl em temperatura controlada e as respectivas curvas registradas pelo potenciôgrafo. Este procedimento foi realizado em triplicata para cada derivado pirazolopiridina.

Através dos gráficos foram obtidos os valores dos pH(s) e lidos os volumes de HCl gastos no ponto de equivalência para cada solução da droga. Com esses valores, foram então calculados os valores dos $pK_a(s)$.(Tabela 8).

Considerando-se a equação geral para a reação de neutralização:



No ponto de equivalência teremos:

$$[PP] = [PPH]^+ \quad \text{onde,}$$

$[PP]$ = concentração da pirazolopiridina livre

$[PPH]^+$ = concentração da pirazolopiridina protonada

A concentração da pirazolopiridina protonada será:

$$[PPH]^+ = [PP]_o / V_t \quad \text{onde,}$$

$$V_t = V_i + V_{HCl}$$

$[PP]_o$ = concentração da pirazolopiridina inicial

V_t = volume total

V_i = Volume inicial

V_{HCl} = volume gasto de HCl no ponto de equivalência.

O cálculo do pK_a é dado pelas Equações 27 e 28.

$$\boxed{1/2 pK_b = 7 - pH - 1/2 \log[PPH]^+} \quad (27)$$

$$\boxed{pK_a = 14 - pK_b} \quad (28)$$

Tabela 8: Valores dos $pK_a(s)$ das pirazolopiridinas determinados potenciométricamente.

X	$V_{HCl} \pm dp$ (mL)^a	$pH \pm dp$^b	pK_a	pK_b
4'-Br	0,20±0,13	5,56±0,21	11,05	2,94
3'-Cl	0,35±0,07	5,93±0,15	11,27	2,72
4'-Cl	0,34±0,06	5,33 ±0,03	10,23	3,76
3'-CH₃	0,32±0,03	4,97±0,07	9,36	4,63
4'-CH₃	0,64±0,06	6,46±0,09	12,39	1,61
3'-OCH₃	0,32±0,02	5,18±0,09	9,93	4,06
4'-OCH₃	0,30±0,02	5,40±0,18	10,37	3,62
H	0,31±0,03	5,48±0,08	10,53	3,48
4'-F	0,27±0,03	5,43±0,27	9,35	4,64
3'-NO₂	0,37±0,02	5,55±0,23	10,67	3,32
4'-NO₂	0,30±0,08	5,28±0,15	10,11	3,88
4'-OH	0,65±0,05	6,40±0,10	12,27	1,72
4'-OAc	0,58±0,03	6,28±0,03	12,02	1,97

^a Volume médio do ácido clorídrico titulante \pm desvio padrão. ^b Valor médio do pH no ponto de equivalência \pm desvio padrão.

3.4 1 - Coeficiente de Partição (P) - Método “Shake Flask”

Os coeficientes de partição (P) dos derivados X = H, 3'-CH₃, 3'-Cl, 4'-F, 4'-OH e 4'-Cl, foram determinados utilizando o método clássico do “Shake Flask” de Hansh⁶¹.

Inicialmente, foi construída uma curva de calibração para cada pirazolopiridina que consistiu na determinação da absorvância na região do UV de uma faixa de concentração de droga no seu comprimento de onda máximo ($\lambda_{\text{máx}}$), em 1,4-dioxano. A faixa de concentração escolhida foi adequada à concentração da droga utilizada no experimento. A Tabela 9 mostra as equações obtidas para as curvas de calibração.

Tabela 9: Valores de $\lambda_{\text{máx}}$, absorvância na fase orgânica e equação das curvas de calibração para os derivados onde X=3'-Cl, 4'-Cl, 3'-CH₃, H, 4'-F e 4'-OH.

X	$\lambda_{\text{máx}}^{\text{a}}$	Abs. ^b	Equação da Ret ^c	r
3'-Cl	325	0,68	$y=0,667(\pm 0,047) + 10830,412 (\pm 464,739) x$	0,99
4'-Cl	325	1,05	$y=0,005(\pm 0,003) + 140086,061 (\pm 85,885) x$	0,99
3'-CH₃	23	0,75	$y=0,127(\pm 0,077) + 10585,358 (\pm 698,244) x$	0,99
H	323	0,54	$y=0,026(\pm 0,023) + 12383,819 (\pm 289,741) x$	0,99
4'-F	320	0,77	$y=0,009(\pm 0,008) + 12542,904 (\pm 141,626) x$	0,99
4'-OH	319	0,81	$y=0,015(\pm 0,007) + 13787,348 (\pm 134,075) x$	0,99

^a Comprimento de onda máximo. ^b Absorvância. ^c Os valores de y correspondem a absorvância e x à concentração em M, respectivamente.

O solvente utilizado no preparo das soluções para a construção da curva de calibração e das amostras, foi 1,4-dioxano grau espectroscópico.

Foi preparada uma solução em balão volumétrico contendo aproximadamente 6,0mg de amostra em 50mL de solução. Em seguida, foram feitas cerca de 9 diluições sucessivas cuja concentração variou de $45,11 \times 10^{-5}$ a $0,50 \times 10^{-5}$ g/L. A absorvância de cada uma das diluições, determinada no $\lambda_{\text{máx}}$, ficou na faixa de 1,75 a 0,24 e o $\lambda_{\text{máx}}$ entre 315 e 352 nm. A curva de calibração de cada amostra, foi obtida colocando-se em um gráfico a absorvância versus a concentração do derivado nas respectivas diluições. A equação da reta foi obtida por regressão linear.

As soluções das amostras foram preparadas em balão volumétrico contendo cerca de 30mg da pirazolopiridina em 25 mL de solução. A concentração final das soluções variou de 0,36 a 0,43nM.

Para a etapa de saturação das fases orgânica e aquosa, foram utilizados o octanol devidamente tratado, e uma solução tampão em $\text{pH} \cong 7,4$, respectivamente.

A solução tampão foi preparada a partir de soluções 0,2M de fosfato de sódio dibásico heptaidratado e 0,1M de ácido cítrico. Em seguida, foram misturados 434,7mL da solução de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,2M) e 65,2mL da solução de ácido cítrico (0,1M) obtendo-se então 500 mL da solução tampão desejada.

Saturação

A saturação mútua de uma mistura em proporções equivalentes de octanol e solução tampão recém preparada, foi feita em agitação magnética lenta por período de 4 horas. Após repouso de 4 horas, as fases saturadas foram separadas em funil de decantação e utilizadas para determinação do coeficiente de partição.

Partição

Em erlenmeyer de 500mL contendo 100mL de octanol saturado, foram adicionados 5,0mL de solução da droga. Em seguida, adicionou-se lentamente, 200mL de solução tampão saturada. A mistura foi agitada magneticamente (Shake Flask) por 1 hora. Ao término da agitação, a mistura ficou em repouso por 30 minutos. Em seguida, uma alíquota de 10mL da fase orgânica foi transferida para um tubo de centrífuga e centrifugada a 300 rpm por 15 minutos a 25°C. Para cada amostra o mesmo procedimento descrito foi realizado em triplicata.

A concentração da droga na fase orgânica foi determinada através da medida da absorvância no UV e posteriormente calculada utilizando a equação da curva de calibração.

A concentração da droga na fase aquosa foi obtida por diferença utilizando a Equação 29, onde C_{oct} é a concentração da droga na fase orgânica, $C_{aq.}$ é a concentração da droga na fase aquosa e C_i é a concentração inicial da droga adicionada na mistura 1-octanol/tampão saturados.

$$C_{oct.} = C_{aq.} - C_i \quad (29)$$

O coeficiente de partição (P) foi calculado pela Equação 7. A Tabela 26 (resultados e discussão) lista os valores obtidos.

3.4.2 – Parâmetros Cromatográficos

3.4.2.1 - Valores de R_M Determinados por Cromatografia em Camada Fina em Fase Reversa⁶⁸

Os valores de R_f (razão entre a distância percorrida pela amostra a partir do ponto de aplicação até o meio da mancha, e a distância percorrida pela mistura de eluentes a partir do ponto de aplicação da amostra, Figura 26) foram determinados utilizando-se placas de cromatografia em camada fina em fase reversa. A fase móvel utilizada foi uma mistura de acetona e solução tampão fosfato (0,01M; pH \cong 7,4) em cinco concentrações diferentes que variaram de 40 a 70% v/v de solvente orgânico.

Foram preparadas soluções utilizando-se 15 mg de cada amostra 5mL de acetona P.A.. A concentração final de cada solução ficou em 0,15mg/mL. A solução tampão utilizada foi preparada a partir de soluções 0,1M de fosfato de sódio monobásico monoidratado e fosfato de sódio dibásico heptaidratado. Em balão volumétrico de 1000mL, foram adicionados 19,4mL da solução de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,1M, 30,6mL da solução de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1M e o volume completado com água destilada. O pH da solução final foi determinado.

Procedimento

Em placas de CCF em fase reversa (20 x 20cm) foram aplicados 5 μ l de cada uma das soluções das amostras. A aplicação foi a 2 cm de altura da base da placa e o máximo de migração sobre a mesma foi fixado em 15 cm. Após evaporação dos eluentes os derivados foram detectados através da lâmpada mineralight na região do ultravioleta.

A partir da determinação dos R_f (s) (Tabela 10) das amostras, os valores de R_M puderam ser calculados através da Equação 30, (Tabela 27, resultados e discussão).

$$R_M = \log(1/R_f - 1) \quad (13)$$

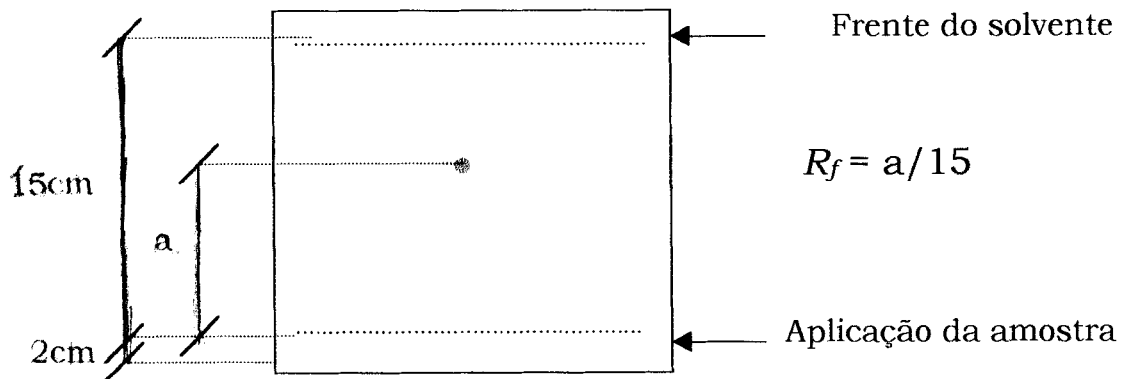


Figura 26: Determinação dos valores de R_f .

Tabela 10: Valores médios de R_f determinados em triplicata para os derivados 1,3-dimetilpirazolopiridina.

R_f						
<i>Derivado</i>	<i>% tampão fosfato : acetona</i>					
<i>X</i>	<i>30:70</i>	<i>40:60</i>	<i>45:55</i>	<i>50:50</i>	<i>55:45</i>	<i>60:40</i>
4'-Br	0,820	0,813	0,493	0,440	0,247	0,213
3'-Cl	0,820	0,820	0,513	0,453	0,267	0,233
4'-Cl	0,847	0,840	0,527	0,467	0,253	0,247
3'-CH₃	0,813	0,813	0,547	0,487	0,3	0,273
4'-CH₃	0,827	0,820	0,553	0,480	0,313	0,273
3'-OCH₃	0,887	0,860	0,680	0,573	0,440	0,413
4'-OCH₃	0,9	0,867	0,707	0,607	0,473	0,427
H	0,860	0,84	0,647	0,560	0,413	0,373
4'-F	0,867	0,847	0,640	0,547	0,387	0,353
3'-NO₂	0,867	0,860	0,653	0,573	0,427	0,4
4'-NO₂	0,873	0,860	0,660	0,593	0,427	0,406
4'-OH	0,893	0,880	0,820	0,760	0,673	0,660
4'-OAc	0,88	0,873	0,747	0,753	0,540	0,513

3.4.2.2 - Valores do Fator Capacidade (k') Determinados por CLAE⁹⁴

Os tempos de retenção (t_R) dos derivados pirazolopiridinas foram determinados utilizando-se um cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) equipado com um detetor de absorção no UV/Vis e os dados transferidos para um registrador.

A fase estacionária utilizada foi uma coluna C-8 e a fase móvel uma mistura de acetonitrila e solução tampão fosfato (0,01M; $\text{pH} \approx 7,4$) em sistema isocrático. A velocidade do fluxo foi de 1,5mL/min à temperatura de 25°C. O volume de injeção das amostras variou de 20-10 μ l na medida em que era aumentada a proporção de solvente orgânico na mistura da fase móvel.

As soluções das amostras foram preparadas em metanol em concentrações adequadas para a análise. Todas as soluções foram devidamente filtradas. A solução tampão foi preparada utilizando soluções 0,1M de fosfato de sódio monobásico monoidratado e fosfato de sódio dibásico heptaidratado. Em um balão de 500mL foram adicionados 19,4mL da solução de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,1M, 30,6mL da solução de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1M e o volume completado com água. O pH da solução final foi então determinado.

Análise por CLAE

As amostras foram injetadas no sistema composto de acetonitrila e solução tampão fosfato em proporções de 40 a 65% de solvente orgânico (v/v) e o tempo de retenção de cada amostra foi determinado (Tabela 11).

Tabela 11: Valores de tempo de retenção (t_R) das pirazolopiridinas variando de 35 a 60% (v/v) de tampão fosfato em acetonitrila.

t_R					
<i>Derivado</i>	<i>% tampão fosfato : acetonitrila</i>				
<i>X</i>	35:65	40:60	50:50	55:45	60:40
4'-Br	5,8	7,3	13,3	20,6	35,6
3'-Cl	5,7	7,2	13,3	20,5	36,2
4'-Cl	6,1	7,8	14,6	22,9	41,7
3'-CH₃	5,7	7,2	13,2	20,5	36,3
4'-CH₃	4,0	5,7	9,4	13,6	22,2
3'-OCH₃	4,6	5,5	9,3	13,6	22,4
4'-OCH₃	4,4	5,3	8,5	12,3	19,8
H	4,6	5,5	9,1	19,3	21,6
4'-F	4,0	4,8	7,9	11,4	18,5
3'-NO₂	4,0	4,8	7,9	11,4	18,5
4'-NO₂	5,9	7,3	13,3	20,7	35,5
4'-OH	2,9	3,2	4,3	5,5	7,7
4'-OAc	3,8	4,5	7,1	10,2	16,3

3.5 –Parâmetros Eletrônicos Teóricos⁷⁴

3.5.1 – Derivados da Série *4-(X-fenil)amino-5-carboetoxi-1,3-dimetil-1H-pirazolo[3,4-b]piridinas*

Os parâmetros eletrônicos teóricos como energias dos orbitais de fronteira HOMO e LUMO, calor de formação, momento dipolar e densidade eletrônica foram determinados para todas as *4-(X-fenil)amino-5-carboetoxi-1,3-dimetil-1H-pirazolo[3,4-b]piridinas*. Para tanto, utilizou-se o método semi-empírico de mecânica quântica AM1, através do programa MOPAC 6.0 partindo-se das geometrias moleculares otimizadas através de cálculos de mecânica molecular.

As palavras chaves utilizadas na matriz inicial para cada molécula foram:

AM1 que define o hamiltoniano

GRAD para que todos os gradientes sejam listados

PRECISE que endossa os critérios de otimização da geometria

À matriz obtida a partir dos dados iniciais foram acrescentados as palavras chaves:

EF HESS=1 que abaixa o gradiente de otimização da geometria

VECTORS que fornece os coeficientes dos orbitais

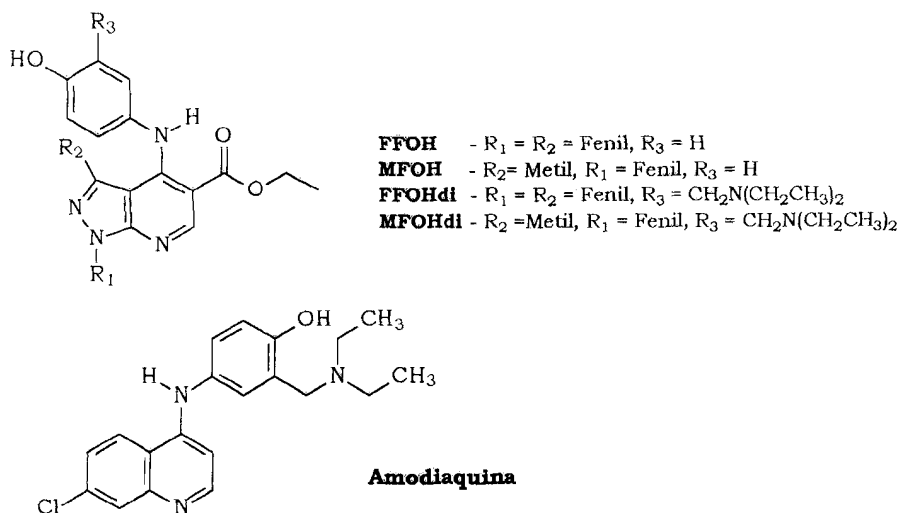
BONDS que calcula as ordens da ligação entre todos os pares de átomos

XYZ que converte a geometria em coordenadas cartesianas

DUMP=1800 que grava o arquivo de recuperação a cada tempo estipulado

O gradiente de normalização que define o critério de terminação da otimização da geometria alcançou valores mínimos que ficaram na faixa entre 0,009889 até 0,005923.

3.5.2 - Derivados da Série 4-(4'-hidroxifenil)amino-5-carboe-
toxi-1H-pirazolo[3,4-b]piridina, 4-(4'-hidroxi-3'-dietilaminometilfe-
nil)amino-5-carboe-1H-pirazolo[3,4-b]piridina e Amodiaquina



As pirazolopiridinas *FFOH*, *MFOH*, *FFOHdi*, *MFOHdi* e a *Amodiaquina* tiveram a geometria de sua estrutura otimizada, utilizando o programa MOPAC 6.0. Na matriz inicial, para cada estrutura, foram utilizadas as mesmas palavras-chaves no cálculo feito para as 4-(*X*-fenil)amino-5-carbetoxi-1,3-dimetil-1H-pirazolo[3,4-b]piridinas. O gradiente de normalização alcançou valores mínimos que ficaram na faixa entre 0,009998 e 0,006868.

Através dos dados da modelagem molecular foi feita uma análise conformacional das *FFOH*, *MFOH*, *FFOHdi* e *MFOHdi* e posteriormente comparou-se com a *Amodiaquina*.

3.6 - Avaliação da Atividade Antileishmania³⁴

Cultura e manutenção dos parasitas

As promastigotas de *Leishmania amazonensis*, cepa MHOM/BR/77/LTB0016, foram mantidas a 25°C em meio Schneider's suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino, pH=7,2. As células foram lavadas no início da fase de crescimento, contadas em câmara de Neubauer e ajustadas a uma concentração de 4×10^6 parasitas/mL.

Ensaio da droga "in vitro"

As promastigotas de *Leishmania amazonensis*, foram adicionadas em cada poço da placa de cultivo que continha um gradiente de concentração da droga que variou de 160-5µg/mL. Para os derivados mais ativos 4'-Br, 4'-Cl, 3'-CH₃, 3'-OCH₃, 4'-F, 3'-NO₂, 4'-OH e 4'-OAc, a faixa de concentração variou entre 40,0 e 0,31µg/mL. A faixa inicial de concentração das pirazolopiridinas FFOH, MFOH, FFOHdi, MFOHdi e da Amodiaquina variou entre 3,75 e 0,117µg/mL.

A solução estoque da droga foi obtida utilizando 10mg/mL de amostra e 20 mg/mL de PVP (polivinil pirrolidona como agente de dissolução), em DMSO (concentração máxima no ensaio 1,6% v/v) como solvente.

Após 24 horas de incubação os parasitas foram contados em câmara de Neubauer e o resultado foi comparado com o controle, onde só havia DMSO e PVP. Todos os testes foram feitos em triplicata (Tabelas 12-14).

A concentração que inibe em 50% o crescimento celular em mg/mL (DL50) foi calculada através da equação da reta obtida por regressão linear dos valores do Log da concentração da droga versus o percentual de parasitas vivos em cada faixa de concentração.

Tabela 12: Dados experimentais do ensaio *in vitro* com as promastigotas de *Leishmania amazonensis* para determinação da DL50 das drogas onde X = 4'-Br, 3'-Cl, 4'-Cl, 3'-CH₃, 4'-CH₃, 3'-OCH₃, 4'-OCH₃ e H.

4'-Br		3'-Cl		4'-Cl		3'-CH₃	
C^a	% Inib.^b	C	% Inib.	C	% Inib.	C	% Inib.
40,0	100	80,0	100	40	100	40,0	100
20,0	84,4	40,0	88,2	20,0	90,7	20,0	82,4
10,0	68,0	20,0	75,3	10,0	76,6	10,0	41,2
				5,0	71,0	2,5	11,8
				2,5	57,9		
				1,25	50,0		
4'-CH₃		3'-OCH₃		4'-OCH₃		H	
C	% Inib.	C	% Inib.	C	% Inib.	C	% Inib.
40,0	100	40,0	100	40,0	100	160	100
30,0	88,7	20,0	90,7	30,0	90,5	80,0	94,8
20,0	79,2	10,0	75,7	20,0	82,9	40,0	51,3
10,0	40,0	5,0	29,9	15,0	67,6	20,0	23,1
7,5	38,1	2,5	6,5	7,5	29,7	10,0	14,5
5,0	25,0					5,0	0

^a Concentração da droga em (µg/mL) ^b Porcentagem de inibição

Tabela 13: Dados experimentais do ensaio *in vitro* com as promastigotas de *Leishmania amazonensis* para determinação da DL50 das drogas onde X = 4'-F, 3'-NO₂ e 4'-NO₂, 4'-OH, 4'-OAc.


4'-F		3'-NO₂		4'-NO₂	
C ^a	% Inib. ^b	C	% Inib.	C	% Inib.
20,0	60,6	80,0	100	160,0	62,0
10,0	44,5	20,0	73,7	40,0	12,0
5,0	30,3	10,0	53,7	20,0	4,0
2,5	6,1	5,0	50,0		
1,25	0				
4'-OH		4'-OAc			
C	% Inib.	C	% Inib.		
2,5	100	1,25	100		
1,25	28,4	0,63	63,9		
0,62	1,4	0,31	31,9		
		0,16	2,8		

^a Concentração da droga em (µg/mL) ^b Porcentagem de inibição

Tabela 14: Dados experimentais do ensaio *in vitro* com as promastigotas de *Leishmania amazonensis* para determinação da DL50 ou DL90 das drogas FFOH, MFOH, FFOHdi, MFOHdi e Amodiaquina.

FFOH		MFOH		FFOHdi	
C^a	% Inib.^b	C	% Inib.	C	% Inib.
1,25	99,2	0,63	98,5	0,94	100
0,94	98,4	0,47	92,4	0,63	97,6
0,63	80,8	0,31	78,9	0,47	85,4
0,47	48,7	0,23	48,8	0,31	86,1
0,23	34,1	0,12	18,7	0,23	79,9
0,16	32,1			0,12	57,5
0,12	0,73				
MFOHdi		Amodiaquina			
C	% Inib.	C	% Inib.		
0,63	99,6	1,25	94,6		
0,47	98,1	0,94	87,6		
0,31	94,8	0,63	80,9		
0,23	90,6	0,47	67,6		
0,16	36,5	0,31	48,5		
0,12	24,0	0,23	29,2		

^a Concentração da droga em ($\mu\text{g}/\text{mL}$) ^b Porcentagem de inibição



***RESULTADOS E
DISCUSSÃO***

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - Síntese

A síntese dos derivados 1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridinas deste trabalho foi realizada em duas etapas como mostrado na Figura 27.

Na primeira etapa utilizou-se o método de Gould-Jacobs modificado^{9,10}, para a obtenção dos intermediários 5-amino-1,3-dimetilpirazol, α -carboetoxi- β -(1,3-dimetil-5-aminopirazolilamino) acrilato de etila e da 5-carboetoxi-4-cloro-1,3-dimetil-1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridina.

Através da reação de condensação do 5-aminopirazol e do etoximetilenomalonato de dietila, foi obtido o intermediário acrilato de etila. Este, ao reagir com oxicloreto de fósforo, levou ao 4-cloro-1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridina, intermediário principal na etapa final de obtenção das 4-(*X*-fenil)amino-1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridinas.

Na segunda, etapa foram feitas reações de substituição nucleofílica aromática no derivado clorado com diferentes anilinas substituídas. Para estas reações, a metodologia utilizada baseou-se em técnicas descritas para sistemas quinolínicos e posteriores adaptações^{89,95}.

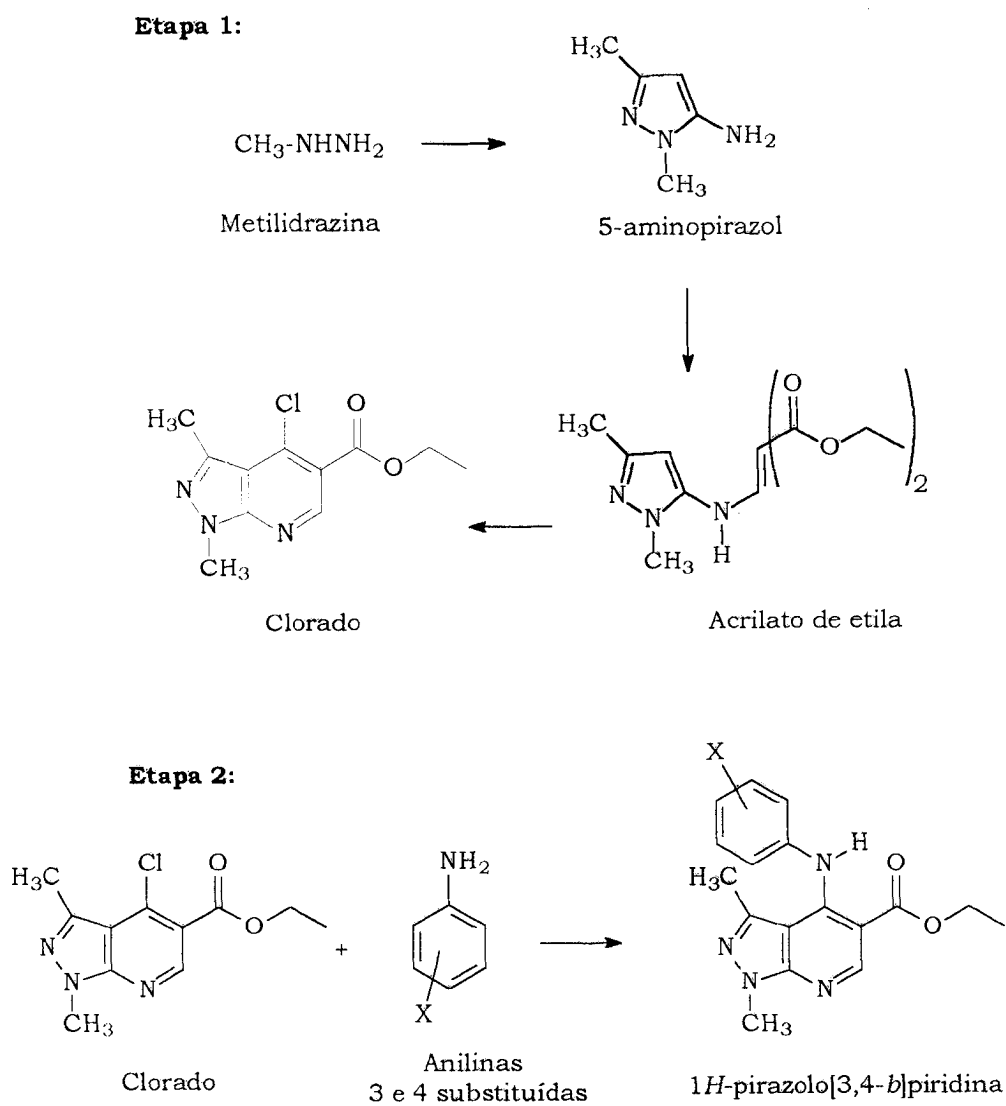


Figura 27: Obtenção dos derivados 1H-pirazolo[3,4-*b*]piridina.

4.1.1 – Obtenção dos Derivados Intermediários

Inicialmente obteve-se o 5-amino-1,3-dimetilpirazol. De acordo com a literatura⁸³, para a síntese deste produto, manteve-se sob refluxo a mistura reacional contendo metil-hidrazina e a β -aminocrotononitrila em etanol absoluto, Figura 28.

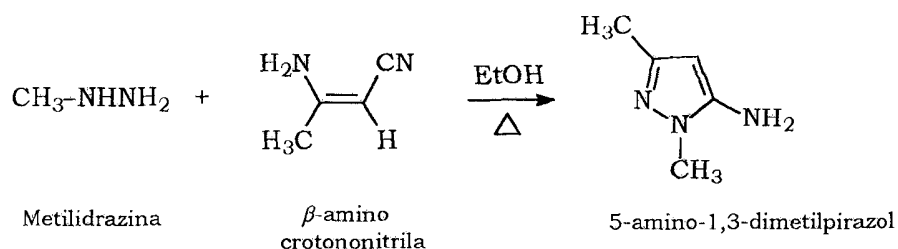


Figura 28: Obtenção do 5-amino-1,3-dimetilpirazol.

Uma vez obtido o 5-amino-1,3-dimetilpirazol, este foi reagido com etoximetilenomalonato de etila em etanol, sob refluxo, chegando-se então ao produto α -carboetoxi- β -(1,3-dimetil-5-pirazolilamino)acrilato de etila (Figura 29).

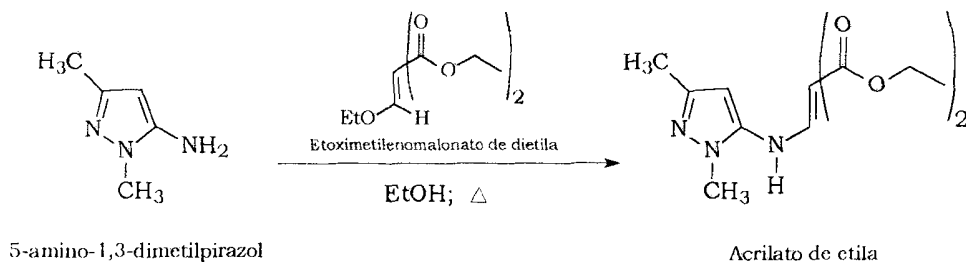


Figura 29: Obtenção do α -carboetoxi- β -(1,3-dimetil-5-pirazolilamino)acrilato de etila.

O produto 5-carboetoxi-4-cloro-1,3-dimetil-1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridina foi obtido através de refluxo em oxicloreto de fósforo com o α -carboetoxi- β -(1,3-dimetil-5-pirazolilamino)acrilato de etila, Figura 30.

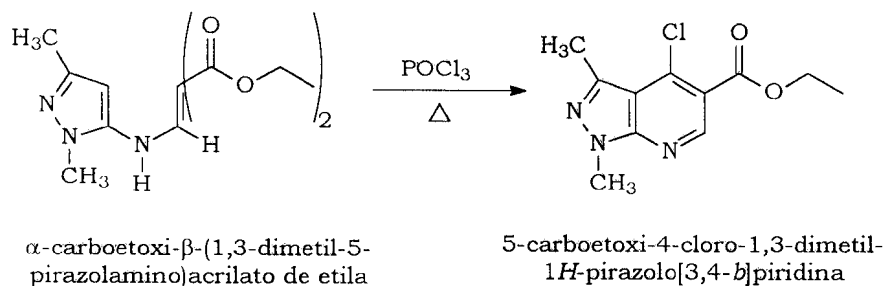
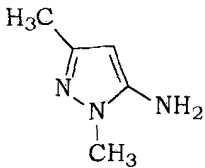
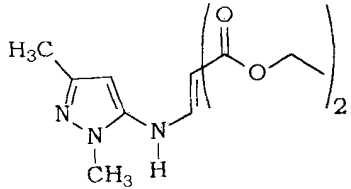
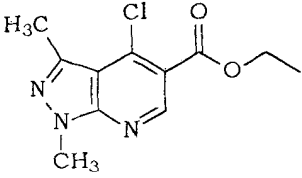


Figura 30: Obtenção do derivado 5-carboetoxi-4-cloro-1,3-dimetil-1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridina.

Os rendimentos das reações de obtenção dos intermediários, assim como seus respectivos pontos de fusão, e os correspondentes relatados na literatura, estão listados na Tabela 15.

Podemos observar que o intermediário clorado foi obtido neste trabalho com melhor rendimento, enquanto que os demais apresentaram rendimentos ligeiramente inferiores aos citados na literatura.

Tabela 15: Rendimentos e pontos de fusão obtidos para os derivados intermediários.

Substância	Rendimento (%)		P.F. (°C)	
	Exp.	Lit.	Exp.	Lit.
	66	75	67-69	80-81 ⁸³
	71	78	87-88	90-91 ⁸⁵
	95	89	89-90	93-94 ⁸⁶

4.1.2 - Obtenção das 4-(X-fenil)amino-5-carboetoxi-1,3-dimetil-1H-pirazolo[3,4-b]piridinas

Uma vez sintetizado, o derivado 5-carboetoxi-4-cloro-1,3-dimetil-1H-pirazolo[3,4-b]piridina o trabalho prosseguiu com as reações de acoplamento, utilizando anilinas aromáticas substituídas (Figura 31), obtendo-se treze derivados da série 4-(X-fenil)amino-5-carboetoxi-1,3-dimetil-1H-pirazolo[3,4-b]piridina, onde X= H, 4'-CH₃, 3'-CH₃, 4'-OCH₃, 3'-OCH₃, 4'-NO₂, 3'-NO₂, 4'-F, 4'-Br, 4'-Cl, 3'-Cl, 4'-OH e 4'-OAc.

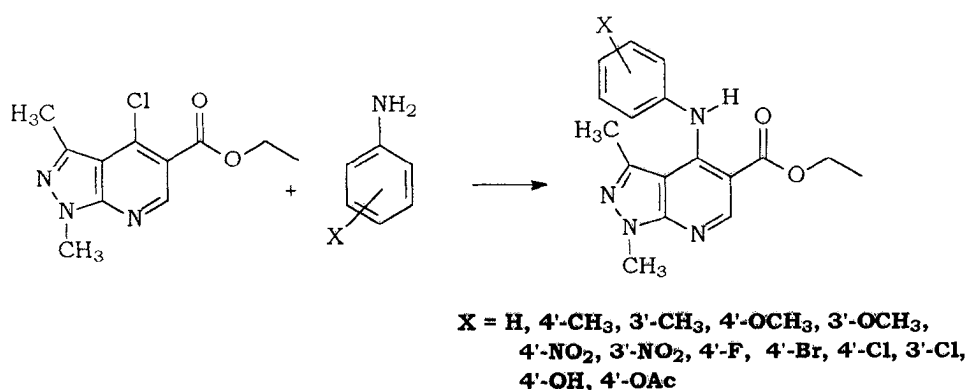


Figura 31: Obtenção dos derivados 4-(X-fenil)amino-5-carboetoxi-1,3-dimetil-1H-pirazolo[3,4-b]piridinas.

Os produtos onde X = H, 4'-NO₂, 3'-NO₂, 4'-OCH₃, 3'-OCH₃, e 4'-CH₃ já haviam sido obtidos anteriormente e citados por Bernardino⁸⁷. A mistura do derivado clorado e da anilina correspondente, foi aquecida até a fusão, no caso das anilinas sólidas, e a refluxo, para as líquidas. Após o término da reação, a mistura reacional foi neutralizada com NH₄OH e o produto extraído com diclorometano. O solvente foi evaporado e o produto final obtido após recristalização em etanol. Apenas o derivado onde X=4'-CH₃ foi recristalizado em tolueno.

Na tentativa de aumentar os rendimentos e facilitar a metodologia de isolamento do produto final, a síntese do derivado onde $X=4'-CH_3$ foi realizada mediante utilização do etilenoglicol como solvente. O resultado em termos de rendimento não se alterou, entretanto esta metodologia facilitou o isolamento do produto final.

Os demais derivados, onde $X=4'-Br$, $4'-F$, $3'-CH_3$, $4'-Cl$ e $3'-Cl$, $4'-OH$ e $4'-OAc$, foram sintetizados pela primeira vez neste trabalho.

Para a síntese dos derivados onde $X = 4'-Br$, $4'-F$ e $3'-CH_3$, foi utilizada em parte a metodologia descrita por Bernardino, sendo que a modificação, envolveu o aquecimento de uma mistura do derivado clorado com a 4-bromoanilina, 4-fluoranilina, e a 3-toluidina, respectivamente, seguido de neutralização sem a etapa de extração por solvente. Todos os produtos foram purificados por recristalização em etanol.

Os derivados onde $X= 4'-Cl$ e $3'-Cl$ foram obtidos mediante refluxo do clorado com a 4-cloroanilina e a 3-cloroanilina, respectivamente. Como solvente, foi utilizado o etilenoglicol e os produtos obtidos foram purificados por cromatografia em coluna filtrante.

A síntese do produto *4-(hidroxifenil)amino-5-carboetoxi-1,3-dimetil-1H-pirazolo[3,4-b]piridina* envolveu a reação do cloridrato do 4-aminofenol, que foi obtido a partir da hidrólise do paracetamol⁸¹ com o derivado clorado, em etanol. Melhores rendimentos foram obtidos quando o etilenoglicol também foi utilizado como solvente. A purificação deste produto foi realizada por recristalização em etanol.

Posteriormente, este derivado ($X=4'-OH$) sofreu reação de acetilação com anidrido acético em piridina obtendo-se o produto onde $X=4'-OAc$, que após isolamento, foi devidamente purificado por recristalização em etanol.

Os rendimentos das reações e os pontos de fusão dos derivados acoplados estão relacionados na Tabela 16.

Tabela 16 : Rendimentos e pontos de fusão dos derivados acoplados
4-(X-fenil)amino-5-carboetoxi-1,3-dimetil-1H-pirazolo[3,4-b]piridina.

X	Rendimento (%)	P.F. (°C)	X	Rendimento (%)	P.F. (°C)
4'-Br	50	110-12	4-OCH₃	86	175-78
3'-Cl	35	155-57	H	80	137-40
4'-Cl	65	100-01	4'-F	60	104-06
3'-CH₃	40	130-33	3'-NO₂	65	168-70
4'-CH₃	30 ^a	105-07	4'-NO₂	80	168-70
	35 ^b	106-07	4'-OH	35 ^c	274-76
3'-OCH₃	30	123-24		55 ^b	275-77
			4'-OAc	60	127-30

^a Reação sem solvente. ^b Reação em etilenoglicol. ^c Reação em etanol.

4.2 - Determinação Estrutural

4.2.1 - Derivados Intermediários

A análise dos espectros na região do infravermelho (IV) foi realizada para todas as substâncias intermediárias. Os principais dados relacionados a este tipo de análise encontram-se discriminados a seguir.

O espectro de IV do derivado pirazólico, mostrou o aparecimento de absorções em 3319 e 3174 cm^{-1} referentes ao grupo NH_2 e em 2923 cm^{-1} e referente ao estiramento C-H das metilas.

Para o derivado acrilato foram observadas as absorções de estiramento das carbonilas (C=O) em 1716 e 1660 cm^{-1} . O estiramento da ligação N-H apresentou absorção em 2983 cm^{-1} .

As absorções no espectro de IV do produto clorado indicaram a presença do grupo carbonila em 1695 cm^{-1} . Também foi observado o desaparecimento da absorção na região de 2900 cm^{-1} característica do estiramento da ligação do grupo N-H.

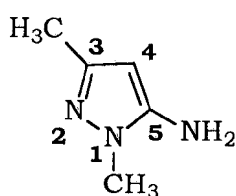
Os principais dados relacionados aos espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e de Carbono 13 (RMN de ^1H e de ^{13}C), com experimentos uni e bidimensionais para os derivados intermediários deste trabalho, encontram-se discriminados a seguir.

Os assinalamentos dos hidrogênios do 5-amino-1,3-dimetilpirazol foram efetuados com base nos deslocamentos químicos, na multiplicidade e integração dos sinais e ainda por comparação com os assinalamentos efetuados para os derivados análogos 1,3-difenil e 1-metil-3-fenil substituídos^{22,96}.

As absorções dos hidrogênios referentes as metilas ligadas a C3 e a N1 foram observadas em δ 2,2 e 3,7, respectivamente. O hidrogênio H4 apresentou-se como um singlete em δ 5,3 sendo mais blindado do que o correspondente no 1-metil-3-fenilpirazol²², cujo deslocamento foi de δ 5,9. Os hidrogênios referentes ao grupo NH₂ apresentaram-se em δ 3,5 como um sinal largo, característico para este grupamento.

Através do espectro de RMN de ¹³C verificou-se, por analogia com os pirazóis citados anteriormente²², quais sinais correspondiam aos carbonos quaternários C3 e C5. A estes carbonos foram atribuídos as absorções em δ 147,0 e 145,3, respectivamente. As demais absorções foram relacionadas à C4 em δ 90,4 e às metila C3-CH₃ e N1-CH₃ em δ 13,6 e 33,6, respectivamente. A Tabela 17 lista os dados de RMN de ¹H e de ¹³C para o 5-amino-1,3-dimetilpirazol.

Tabela 17: Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C (em CDCl_3) do 5-amino-1,3-dimetilpirazol.



<i>C/H</i>	δ_c	δ_H
3	147,0	-
4	90,4	5,3(s) ^a
5	145,3	-
N1-CH₃	33,6	3,7(s)
C3-CH₃	13,6	2,2(s)
NH₂	-	3,5(sl)

^a multiplicidade do sinal.

O espectro de RMN de ^1H do derivado acrilato revelou um singlete referente ao hidrogênio H4 do anel pirazólico em $\delta 5,8$ e quarteto e tripleto em $\delta 4,1$ e $1,2$ correspondentes aos hidrogênios metilênicos ($\text{O}-\text{CH}_2$) e metílicos (CH_2-CH_3) do grupo éster da molécula.

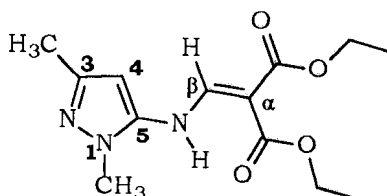
Baseados na analogia com os derivados acrilatos 1,3-difenil e 1-fenil-3-metil substituídos^{22,96}, foi possível identificar os sinais em $\delta 10,9$ e $8,0$ como relativos aos hidrogênios do grupo NH e olefínico H β . Os sinais em $\delta 2,1$ e $3,6$, foram atribuídos aos hidrogênios das metilas ligadas ao C3 e N1, respectivamente.

Como esperado, o espectro de RMN de ^{13}C revelou a existência de dois sinais correspondentes as carbonilas e aos carbonos do grupamento etoxi uma vez que a carbonila *cis* em relação ao grupo NH deve revelar menor δ_c devido ao efeito gama (γ) de proteção exercido pelo nirogênio, mesmo ocorrendo a formação ligação hidrogênio intramolecular entre o hidrogênio NH e o oxigênio da carbonila.

As atribuições dos deslocamentos químicos dos demais átomos de carbono, C3, C4 e C5 do derivado acrilato, foram definidas também por analogia com deslocamentos relatados anteriormente^{22,96} e encontram-se listados na Tabela 18.

Pelo espectro bidimensional de correlação heteronuclear a uma ligação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -COSY- $^1\text{J}_{\text{CH}}$, foi possível definir o assinalamento da metila C3- CH_3 em $\delta 13,5$ e para as metilas dos grupamentos ésteres em $\delta 14,0$ e $13,9$.

Tabela 18: Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C (em CDCl_3) do α -carboetoxi- β -(1,3-dimetil-5-pirazolilamino) acrilato de etila.



C/H	δ_{C}	δ_{H}
3	147,6	-
4	92,8	5,7 (s) ^a
5	139,8	-
α	94,8	-
β	152,1	8,0 (d; 12,8) ^{a,b}
C3-CH₃	13,5	2,1 (d; 12,8)
N1-CH₃	34,6	3,6 (s)
NH	-	10,9 (d; 12,6)
C=O	<i>cis</i> 164,6	-
	<i>trans</i> 168,8	
O-CH₂	<i>cis</i> 60,2	4,1 (m)
	<i>trans</i> 60,6	
CH₂-CH₃	<i>cis</i> 13,9	1,2 (m)
	<i>trans</i> 14,0	

^a multiplicidade do sinal. ^b constante de acoplamento (J) em Hz.

Os assinalamentos dos hidrogênios e carbonos nos espectros de RMN do intermediário 5-carboetoxi-4-cloro-1,3-dimetil-1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridina, puderam ser confirmados através da comparação com dados obtidos na literatura⁷ para a molécula 1,3-dimetil-1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridina, Figura 32.

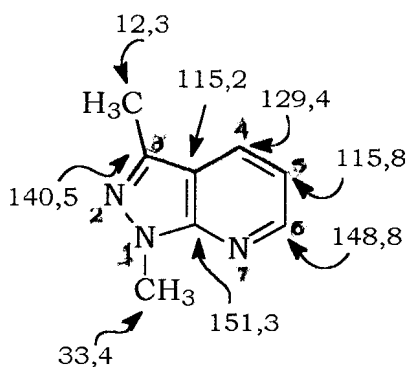


Figura 32: Valores dos deslocamentos químicos dos carbonos para o heterociclo 1,3-dimetil-1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridina.

O espectro de RMN de ¹H da 4-cloro-1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridina apresentou um singleto em δ8,9 referente ao hidrogênio H6 do anel piridínico. Ainda neste espectro, foi possível observar o quarteto e o tripleto em δ4,4 e 1,4, respectivamente, referentes aos hidrogênios O-CH₂ e CH₂-CH₃ do grupo etoxi da molécula. Os singletos em δ4,0 e 2,7 foram atribuídos aos hidrogênios das metilas N1-CH₃ e C3-CH₃, respectivamente.

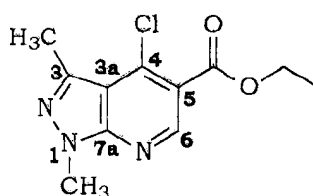
No espectro de RMN de ¹³C - PND foi possível identificar o sinal relativo ao carbono da carbonila em δ164,4. As informações obtidas através do espectro DEPT juntamente com as análises bidimensionais a longa distância, permitiram distinguir os carbonos quaternários.

A análise bidimensional $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -COSY- $^1J_{\text{CH}}$, possibilitou o assinalamento do carbono metilênico O-CH₂ em δ 61,15 e os carbonos metílicos C3-CH₃, CH₂-CH₃ e N1-CH₃ em δ 14,9, 14,2 e 33,8, respectivamente.

As correlações a longa distância $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -COSY- $^nJ_{\text{CH}}$, $n=2$ ou 3 do hidrogênio H6 [$^2J_{\text{CH}}=\text{C5}$ (H6); $^3J_{\text{CH}}=\text{C7a}$ (H6); C4 (H6)] e dos hidrogênios da metila C3-CH₃ [$^2J_{\text{CH}}=\text{C3}$ (C3-CH₃); $^3J_{\text{CH}}=\text{C3a}$ (C3-CH₃)], permitiram o assinalamento de C3, C3a e C6 em δ 142,6, 113,5 e 151,4, respectivamente, restando a C7a, C4 e C5 os sinais em δ 151,6, 141,0 ou 117,8. Com base nos assinalamentos efetuados para derivados análogos^{22,96} atribuiu-se a C7a o sinal mais desblindado δ 151,6, a C4 o sinal em δ 141,0 e a C5 o sinal em δ 117,8.

A Tabela 19 lista os valores para os deslocamentos químicos de RMN de ^1H e de ^{13}C para o derivado clorado.

Tabela 19: Dados de RMN de ^1H de ^{13}C (em CDCl_3) e correlações bidimensionais heteronucleares através de duas ($^2\text{J}_{\text{CH}}$) e três ($^3\text{J}_{\text{CH}}$) ligações observadas para o 5-carboetoxi-4-cloro-1,3-dimetil-1H-pirazolo[3,4-b]piridina.



C/H	δ_{C}	δ_{H}	$^1\text{H}\times^{13}\text{C}$ -COSY	
			$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$
3	142,6	-	-	-
3a	113,5	-	-	-
4	141,0	-	-	-
5	117,8	-	-	-
6	151,4	8,9 (s) ^a	C5	C7a, C4
7a	151,6	-	-	-
C3-CH₃	14,9	2,7 (s)	C3	C3a
N1-CH₃	33,8	4,0 (s)	-	-
O-CH₂	61,5	4,4 (q; 7,0) ^{a,b}	CH ₂ -CH ₃	C=O
CH₂-CH₃	14,2	1,4 (t; 7,0)	-	-
C=O	164,4	-	-	CH ₂ O

^a multiplicidade do sinal. ^b constante de acoplamento (J) em Hz.

4.2.2 - Derivados 4-(X-fenil)amino-5-carboetoxi-1,3-dimetil-1H-pirazolo[3,4-b]piridina

Os espectros na região do infravermelho dos derivados acoplados mostraram absorções entre 3100 - 3250 cm^{-1} referentes ao estiramento da ligação do grupo -NH. Para o produto onde X = 4'-OH foi observada, também, a absorção entre 3500 e 3000 cm^{-1} referente ao grupo -OH. Estas últimas absorções não estiveram presentes no espectro do derivado acetilado confirmando, portanto, a reação de acetilação. Duas bandas de absorção foram observada em 1224 e 1759 cm^{-1} referentes ao estiramento da ligação C-O e da carbonila, respectivamente pertencentes ao grupo acetila .

A banda de absorção correspondente ao estiramento do grupo carbonila do grupo éster ligado a C5, ocorreu na faixa de 1640-1660 cm^{-1} , para todos os derivados acoplados. A formação de ligação-hidrogênio intramolecular e o efeito de ressonância são responsáveis pela diminuição da frequência de absorção deste estiramento (Figura 33).

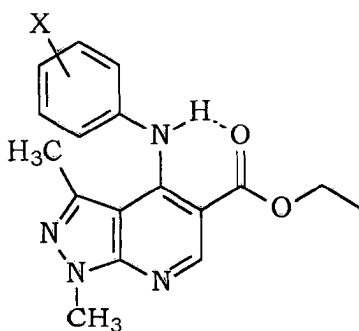


Figura 33: Formação da ligação-hidrogênio interna.

Os espectros de RMN de ^1H dos derivados acoplados (Figura 33) revelaram a absorção dos hidrogênios piridínicos H-6 e do grupamento -NH nas faixas de $\delta 7,9 - 9,0$ e $\delta 9,3 - 10,4$, respectivamente. Para os derivados $4'\text{-OH}$, $3'\text{-OCH}_3$, $4'\text{-OCH}_3$, $4'\text{-OAc}$, $4'\text{-CH}_3$ e $3'\text{-CH}_3$ foram observados ainda singletos em $\delta 8,7$; $3,7$; $3,8$ e $2,7$; $2,3$ e $2,5$ referentes aos hidrogênios presentes nos grupos substituintes, respectivamente.

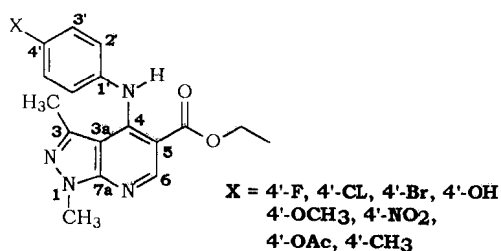
Estes espectros mostraram também singletos intensos em $\delta 1,6$ e $4,0$ ($4'\text{-F}$); $1,7$ e $4,0$ ($4'\text{-Cl}$); $1,7$ e $4,0$ ($4'\text{-Br}$); $1,6$ e $4,0$ ($4'\text{-OH}$); $1,6$ e $4,0$ (H); $1,7$ e $4,0$ ($3'\text{-NO}_2$), $1,7$ e $4,0$ ($3'\text{-OCH}_3$); $1,7$ e $4,0$ ($4'\text{-OAc}$); $1,6$ e $3,9$ ($4'\text{-OCH}_3$); $1,9$ e $4,0$ ($4'\text{-NO}_2$); $1,8$ e $4,0$ ($3'\text{-Cl}$); $1,6$ e $3,9$ ($3'\text{-CH}_3$) e $1,5$ e $3,9$ ($4'\text{-CH}_3$) referentes aos hidrogênios das metilas C3- CH_3 e N1- CH_3 , respectivamente (Tabelas 20 e 21).

Experiências bidimensionais de correlação homonuclear ($^1\text{H} \times ^1\text{H}$ - COSY) mostraram as correlações já esperadas entre o tripleto e o quarteto [$\delta 1,4$ (t, $J=7,0$ Hz) e $4,4$ (q, $J=7,0$ Hz) ($4'\text{-F}$); $\delta 1,4$ (t, $J=7,1$ Hz) e $4,4$ (q, $J=7,1$ Hz), ($4'\text{-Br}$); $\delta 0,4$ (t, $J=7,0$ Hz) e $3,4$ (q, $J=7,0$ Hz) ($4'\text{-OH}$); $\delta 1,4$ (t, $J=7,0$ Hz) e $4,3$ (q, $J=7,0$ Hz) (H); $\delta 1,4$ (t, $J=7,0$ Hz) e $4,4$ (q, $J=7,0$ Hz) ($3'\text{-NO}_2$); $\delta 1,4$ (t, $J=6,8$ Hz) e $4,4$ (q, $J=6,8$ Hz) ($3'\text{-OCH}_3$); $\delta 1,4$ (t, $J=7,0$ Hz) e $4,3$ (q, $J=7,0$ Hz) ($4'\text{-OCH}_3$); $\delta 1,4$ (t, $J=7,1$ Hz) e $4,4$ (q, $J=7,1$ Hz) ($4'\text{-NO}_2$)], referentes aos hidrogênios do grupo etoxi das moléculas. Nestas experiências, as demais correlações dos sinais na região de prótons aromáticos associadas às suas multiplicidades e respectivas integrações, foram utilizadas em conjunto com as análises bidimensionais a longa distância, possibilitando os assinalamentos dos hidrogênios aromáticos do grupo fenila. Os dubletos em $\delta 7,1$ (d, $J=8,5$ Hz) e $7,3$ (d, $J=8,5$ Hz) ($4'\text{-Cl}$); $\delta 7,0$ (d, $J=8,7$ Hz) e $7,4$ (d, $J=8,7$ Hz) ($4'\text{-F}$); $\delta 6,9$ (d, $J=8,6$ Hz) e $7,2$ (d, $J=8,6$ Hz) ($4'\text{-OH}$); $\delta 6,8$ (d, $J=8,4$ Hz) e $7,1$ (d, $J=8,4$ Hz) ($4'\text{-OCH}_3$); $\delta 7,1$ (d, $J=9,0$ Hz) e $8,2$ (d, $J=9,0$ Hz) ($4'\text{-NO}_2$), $\delta 7,07$ (d, $J=8,1$ Hz) e $7,9$ (d, $J=8,1$

Hz) ($4'$ -CH₃), se relacionaram então, aos prótons H-2'6' e H-3'5', respectivamente e, os sinais em δ 7,1 (m) e 7,3 (m) aos prótons H-2'4'6' e H-3'5' (H), respectivamente.

Os derivados onde X = $4'$ -OAc, $3'$ -Cl, $3'$ -CH₃ e $4'$ -CH₃ tiveram seus hidrogênios aromáticos atribuídos por analogia. As Tabelas 20 e 21 listam os dados de RMN de ^1H para os derivados 4- e 3-pirazolopiridina substituídos, respectivamente.

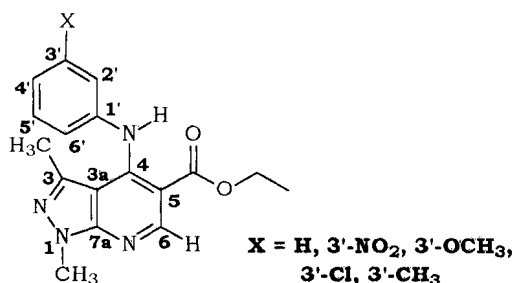
Tabela 20: Dados de RMN de ^1H dos derivados $4'$ -F, $4'$ -Cl, $4'$ -Br $4'$ -OCH₃, $4'$ -NO₂ e $4'$ -OAc em CDCl₃ e $4'$ -OH e $4'$ -CH₃ em DMSO-d₆.



H	δ_{H}								
	$4'$ -F	$4'$ -Cl	$4'$ -Br	$4'$ -OH	$4'$ -OCH ₃	$4'$ -NO ₂	$4'$ -OAc	$4'$ -CH ₃	
6	8,9(s) ^a	9,0(s)	9,0(s)	8,9(s)	8,9(s)	9,0(s)	8,9(s)	8,8(s)	
2', 6'	7,1(d)	7,1(d;8,5)	7,0(d;8,7)	6,9(d;8,6)	7,1(d;8,4)	7,1(d;8,9)	7,1(d;8,2)	7,1(d;8,1)	
3', 5'	7,0(d)	7,3(d;8,5)	7,4(d;8,7)	7,2(d;8,6)	6,8(d;8,4)	8,2(d;8,9)	7,0(d;8,2)	7,9(d;8,1)	
C3-CH₃	1,6(s)	1,7(s)	1,7(s)	1,6(s)	1,6(s)	1,9(s)	1,7(s)	1,5(s)	
N1-CH₃	3,9(s)	4,0(s)	4,0(s)	4,0(s)	3,9(s)	4,0(s)	4,0(s)	3,9(s)	
O-CH₂	4,4(q;7,0) ^{a,b}	4,4(q;7,1)	4,4(q;7,1)	4,4(q;7,0)	4,3(q;7,0)	4,5(q;7,1)	4,4(q;6,9)	4,3(q;7,1)	
CH₂-CH₃	1,4(t;7,0)	1,4(t;7,1)	1,4(t;7,1)	1,4(t;7,0)	1,4(t;7,0)	1,4(t;7,1)	1,4(t;6,9)	1,3(t;7,1)	
N-H	10,4(s)	10,3(s)	10,3(s)	10,3(s)	10,4(s)	10,3(s)	10,4(s)	10,1(s)	
O-H	-	-	-	8,7(s)	-	-	-	-	
C4'-OCH₃	-	-	-	-	3,8(s)	-	-	-	
CH₃-CO	-	-	-	-	-	-	2,3(s)	-	
C4'-CH₃	-	-	-	-	-	-	-	2,3(s)	

^a multiplicidade do sinal. ^b constante de acoplamento (J) em Hz.

Tabela 21: Dados de RMN de ^1H dos derivados H , $3'\text{-NO}_2$, $3'\text{-OCH}_3$ em CDCl_3 e $3'\text{-Cl}$ e $3'\text{-CH}_3$ em DMSO-d_6 .



H	δ_{H}				
	H	3'-NO ₂	3'-OCH ₃	3'-Cl	3'-CH ₃
6	8,9 (s) ^a	9,0 (s)	9,0 (s)	9,0 (s)	8,8 (s)
2'	7,1 (m)	7,9 (sl)	6,7 (sl)	c	d
3'	7,3 (m)	-	-	-	-
4'	7,1 (m)	7,9 (sl)	6,7 (sl)	c	d
5'	7,3 (m)	7,4 (m)	7,2 (m)	c	d
6'	7,1 (m)	7,4 (m)	6,7 (sl)	c	d
C3-CH₃	1,6 (s)	1,7 (s)	1,7 (s)	1,8 (s)	1,6 (s)
N1-CH₃	4,0 (s)	4,0 (s)	4,0 (s)	4,0 (s)	3,9 (s)
O-CH₂	4,3(q; 7,0) ^{a,b}	4,4(q; 7,0)	4,4(q; 6,8)	4,4(q; 8,0)	4,3(q; 7,1)
CH₂-CH₃	1,4 (t; 7,0)	1,4 (t; 7,0)	1,4 (t; 6,8)	1,0 (t; 8,0)	1,3 (t; 7,1)
N-H	10,4 (s)	10,4 (s)	10,4 (s)	10,1 (s)	10,1 (s)
C3'-OCH₃	-	-	3,7 (s)	-	-
C3'-CH₃	-	-	-	-	2,5(s)

^a multiplicidade do sinal. ^b constante de acoplamento (J) em Hz. ^c 7,22-7,53 (m). ^d 7,19-7,23 (m)

Os espectros de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ e os espectros com seqüências de pulsos DEPT [$\theta = 90^\circ$, sinais de CH e $\theta = 135^\circ$, sinais de CH_2 e CH_3 em fase oposta a CH_2] permitiram distinguir os sinais correspondentes aos carbonos metílicos, metilênicos e metínicos.

As análises dos espectros bidimensionais de correlações heteronucleares spin-spin (acoplamento escalar) a uma ligação ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - COSY - $^1\text{J}_{\text{CH}}$) associadas às informações acima citadas, permitiram a distinção entre os sinais dos carbonos CH-6, O- CH_2 , CH_2 - $\underline{\text{C}}\text{H}_3$ e N1- CH_3 (Tabelas 22 e 23).

Utilizando as correlações a longa distância ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - COSY - $^n\text{J}_{\text{CH}}$, $n = 2$ ou 3) dos hidrogênios das metilas menos protegidas com os carbonos distantes a 2 e 3 ligações [$^2\text{J}_{\text{CH}} = \text{C-3}$ (C3- CH_3), C-5 (H-6); $^3\text{J}_{\text{CH}} = \text{C-3a}$ (C3- CH_3 , NH), C-4 (H-6), C-5 (NH), C-7a (H-6, N1- CH_3)], assim como pela avaliação dos parâmetros de deslocamentos químicos correspondentes aos grupos substituintes efetuados para outras moléculas contendo o sistema *1H*-pirazolo[3,4-*b*]piridina^{22,96} e, também com o auxílio da regra da aditividade⁹⁷, foi possível atribuir inequivocamente as absorções dos carbonos quaternários destas moléculas. Ainda nestes espectros pôde-se observar para os compostos *4'*-Cl e *4'*-Br, as correlações do hidrogênio do grupo $\underline{\text{N}}\text{H}$ com CH-2'6' ($^3\text{J}_{\text{CH}}$) que permitiram os assinalamentos dos carbonos CH-2'6' em δ 123,8 (*4'*-Cl) e 124,1 (*4'*-Br) e, conseqüentemente identificar, sem margem de erro, os carbonos CH-3'5' em δ 129,6 (*4'*-Cl) e 132,6 (*4'*-Br). Através da correlação dos hidrogênios da metila em C4'- CH_3 para *4'*- CH_3 foi possível o assinalamento de CH-2'6' e CH-3'5' em δ 122,8 e 130,1, respectivamente. Através destes dados e por comparação com valores de deslocamentos químicos de outras moléculas contendo o mesmo sistema heterocíclico^{22,96}, estes mesmos carbonos (CH-2'6' e CH-3'5') puderam ser assinalados em *4'*-OH (δ 116,2 e 125,5), *4'*-OCH₃ (δ 114,8 e 125,2), *4'*-NO₂ (δ 119,5 e 125,5) e *4'*-OAc (δ 123,5 e 122,8).

Tabela 22. Correlações espectroscópicas heteronucleares de hidrogênio e carbono-13 ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - COSY) através de duas ($^2\text{J}_{\text{CH}}$) e três ($^3\text{J}_{\text{CH}}$) ligações, observadas para os derivados 4'-F, 4'-Cl, 4'-Br, 4'-OCH₃ e 4'-NO₂ em CDCl₃ e 4'-OH e 4'-OAc em DMSO-d₆.

C / H	4'-F		4'-Cl		4'-Br		4'-OH		4'-OCH ₃		4'-NO ₂		4'-OAc	
	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$
3	C3-CH ₃		C3-CH ₃		C3-CH ₃		C3-CH ₃		C3-CH ₃		C3-CH ₃			
3a		C3-CH ₃		C3-CH ₃ ; N-H		C3-CH ₃ ; N-H		C3-CH ₃ ; N-H		C3-CH ₃ ; N-H		C3-CH ₃ ; N-H		C3-CH ₃ ; N-H
4		H-6		H-6		H-6		H-6		H-6		H-6		H-6
5	H-6	N-H	H-6		H-6		H-6		H-6		H-6		H-6	
6														
7a	N1-CH ₃			H-6		H-6		H-6		H-6		H-6		H-6
1'				H-3'5'		H-3'5'		H-3'5'		H-3'5'		H-3'5'		
2',6'		N-H		N-H		N-H		N-H		N-H		N-H		
3',5'			H-2'6'		H-2'6'		H-2'6'		H-2'6'		H-2'6'		H-2'6'	
4'			H-3'5'	H-2'6'	H-3'5'	H-2'6'	H-3'5'	H-2'6'	H-3'5'	H-2'6'	H-3'5'	H-2'6'	H-3'5'	
O-CH₂													O-CH ₂	
CH₂-CH₃													O-CH ₂	
C=O				O-CH ₂ H-6		O-CH ₂							O-CH ₂	

Tabela 23. Correlações espectroscópicas bidimensionais heteronucleares de hidrogênio e carbono-13 ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - COSY) através de duas ($^2\text{J}_{\text{CH}}$) e três ($^3\text{J}_{\text{CH}}$) ligações, observadas para os derivados $4'\text{-CH}_3$, $3'\text{-Cl}$ e $3'\text{-CH}_3$ em DMSO- d_6 e H , $3'\text{-NO}_2$ e $3'\text{-OCH}_3$ em CDCl_3 .

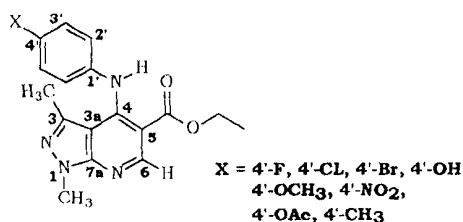
C/H	$4'\text{-CH}_3$		H		$3'\text{-NO}_2$		$3'\text{-OCH}_3$		$3'\text{-Cl}$	
	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$
3			C3-CH ₃		C3-CH ₃		C3-CH ₃		C3-CH ₃	
3a		N-H		C3-CH ₃ N-H		C3-CH ₃ N-H		C3-CH ₃ N-H		C3-CH ₃
4				H-6		H-6		H-6		
5	H-6		H-6		H-6		H-6		H-6	
6		C7a								
7a				H-6		H-6		H-6		
1'		H-3'5'		H-5'	H-6'	H-5'		H-5'		
2'						H-4'		H-4'6'		
3'		C4'-CH ₃				H-5'		O-CH ₃ ; H-5'		
4'		H-2'6'				H-2'		H-6'		
5'		C4'-CH ₃								
6'						H-2'4'		H-4'6'		
O-CH₂										
CH₂-CH₃							O-CH ₃			
C=O				O-CH ₂				O-CH ₂		

Para a molécula não-substituída, $X = H$, a correlação bidimensional heteronuclear ($^1J_{CH}$) entre o sinal em $\delta 122,9$ e o multiplete em $\delta 7,1$, confirmou o assinalamento dos CH-2'6', de acordo com a atribuição anterior dos H-2'6' e 4'. O sinal em $\delta 125,0$ foi atribuído para o C-4, pois mostrou-se correlacionado ($^1J_{CH}$) também com o multiplete em $\delta 7,12$. Finalmente, os carbonos CH-3'5', por mostrarem uma correlação $^1J_{CH}$ com H-3'5', foram assinalados em $\delta 129,5$. Estas atribuições para o anel fenila estão de acordo com o esperado, segundo o efeito de ressonância (+R) de proteção do grupo NHR.

A Tabela 24 lista os valores dos deslocamentos químicos dos carbonos para a série de derivados pirazolopiridinas 4-substituídos.

No caso das moléculas *meta*-substituídas, $3'-NO_2$ e $3'-OCH_3$, os carbonos CH-2' e CH-4', foram tidos como os mais blindados quando comparados aos CH-5' e CH-6', devido ao efeito de proteção gama (γ) exercido pelos átomos de oxigênio do grupo NO_2 e pelo átomo de carbono do grupo OCH_3 , sendo que o CH-2' [$\delta 116,2$ ($3'-NO_2$) e $108,6$ ($3'-OCH_3$)] é o de menor deslocamento químico em função do efeito mesomérico de proteção do NHR e, o CH-5' mais desprotegido [$\delta 130,3$ ($3'-NO_2$) e $130,2$ ($3'-OCH_3$)], por não sofrer nenhum efeito de proteção significativo (Tabela 25). Essas atribuições tiveram sua confirmação nos espectros bidimensionais ($^nJ_{CH}$, $n = 1$ e 3 , Tabela 23).

Tabela 24: Dados de RMN de ^{13}C (δ em ppm)^a dos derivados 4'-F, 4'-Cl, 4'-Br, 4'-OCH₃, 4'-NO₂ e 4'-OAc em CDCl₃ e 4'-OH, e 4'-CH₃ em DMSO-d₆.



C	δ_c							
	4'-F	4'-Cl	4'-Br	4'-OH	4'-OCH ₃	4'-NO ₂	4'-OAc	4'-CH ₃
3	141,9	141,8	141,8	141,0	142,0	141,2	142,0	140,9
3a	104,0	104,9	105,0	103,3	104,1	106,5	104,7	104,2
4	151,6	150,9	150,7	151,7	c	148,1	151,3	150,6
5	103,3	103,8	104,0	101,9	102,6	105,9	103,5	103,1
6	152,4	152,3	152,4	151,9	152,7	151,9	152,5	151,4
7a	152,6	152,4	152,5	153,7	c	152,2	152,3	152,2
1'	139,1	141,6	142,3	133,8	135,9	149,2	140,6	140,2
2', 6'	124,9 ^b	123,8	124,1	125,5	125,2	119,5	123,5	122,8
3', 5'	116,4 ^b	129,6	132,6	116,2	114,8	125,5	122,8	130,1
4'	162,6	129,9	117,5	155,5	157,4	143,0	147,7	134,4
C3-CH ₃	15,7	15,8	15,9	15,2	15,7	15,7	15,7	15,2
N1-CH ₃	33,6	33,6	33,6	33,3	33,5	33,6	33,5	33,3
O-CH ₂	60,9	60,9	61,0	60,6	60,7	61,3	60,8	60,7
CH ₂ -CH ₃	14,3	14,2	14,2	14,1	14,3	14,1	14,2	14,1
C=O	168,9	168,7	168,8	168,4	169,0	168,1	168,7	168,1
CH ₃ C=O	-	-	-	-	-	-	169,3	-
C4'-OCH ₃	-	-	-	-	55,5	-	-	-
CH ₃ -CO	-	-	-	-	-	-	21,0	-
C4'-CH ₃	-	-	-	-	-	-	-	20,5

^a Valores obtidos das correlações espectroscópicas heteronucleares bidimensionais através de uma ligação ($^1J_{\text{CH}}$). ^b Sinais observados como dubletos devido aos acoplamentos $^1J_{\text{CF}} = 245,2$; $^2J_{\text{CF}} = 22,6$ e $^3J_{\text{CF}} = 7,0$ Hz. ^c 152,3 ou 152,5.

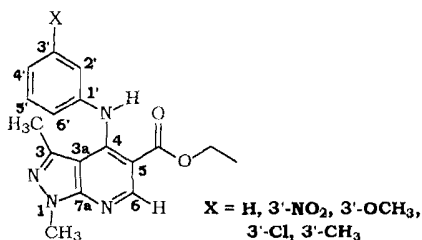
Restaram assim, as atribuições dos carbonos quaternários C-1', C-4' para os derivados 4'-substituídos, que mostraram correlações nos espectros bidimensionais a longa distância com sinais em δ 129,9 e 141,6 (4'-Cl); δ 117,5 e 142,3 (4'-Br); δ 133,8 e 155,5 (4'-OH). Por analogia com o derivado 4'-OH, aos carbonos C-1', C-4' de 4'-OCH₃ e de 4'-OAc foram atribuídos os sinais em δ 135,9 e 157,4 e δ 140,6 e 147,7, respectivamente. Os carbonos quaternários C-1' e C-3' dos derivados 3'-substituídos apresentaram correlações a longa distância com os sinais em δ 144,6 e 149,2 (3'-NO₂) e δ 144,0 e 160,7 (3'-OCH₃).

Para a molécula 4'-F, foram observados sinais desdobrados de carbonos metínicos em δ 124,9 e 116,4 que se mostraram correlacionados com os sinais dos hidrogênios em δ 7,1 e 7,0, respectivamente.

Baseando-nos em assinalamentos efetuados para derivados aromáticos p-fluorsubstituídos⁹⁷ e através da comparação dos valores das constantes de acoplamento ¹³C - ¹⁹F a uma ligação (¹J_{CF} = 158 - 400 Hz), duas ligações (²J_{CF} = 15 - 25 Hz), três ligações (³J_{CF} = 0 - 15 Hz) e quatro ligações (⁴J_{CF} = 2 - 3 Hz), pôde-se atribuir a CH-2'6' o sinal em δ 124,9 (³J_{CF} = 7,9 Hz) e a CH-3'5' o sinal em δ 116,6 (²J_{CF} = 22,6 Hz). Assim os sinais em δ 7,1 e 7,0 se relacionaram aos hidrogênio H-2'6' e H-3'5', respectivamente. Foi observado também, o desdobramento do sinal de carbono quaternário em δ 162,6 (¹J_{CF} = 242,2 Hz) atribuído a C-4', restando ao valor δ 139,1 ser relacionado ao carbono C-1'.

Este estudo realizado para elucidação estrutural envolvendo principalmente técnicas de RMN de ¹H e de ¹³C uni e bidimensionais para os derivados 4'-Cl, 4'-Br, 4'-OH, 4'-F, H, 3'-NO₂ e 3'-OCH₃, foi relatado na literatura em 1999⁹⁸.

Tabela 25: Dados de RMN de ^{13}C (δ em ppm)^a dos derivados *H*, 3'-NO₂ e 3'-OCH₃ em CDCl₃ e 3'-Cl e 3'-CH₃ em DMSO-d₆.



C	δ_{C}				
	H	3-NO ₂	3-OCH ₃	3'-Cl	3'-CH ₃
3	142,1	141,1	142,3	140,7	140,9
3a	104,7	105,5	105,0	105,1	105,0
4	151,3	149,6	151,1	149,0	147,3
5	103,4	104,9	103,6	104,5	104,0
6	152,4	152,3	152,2	151,4	151,5
7a	154,0	152,4	152,4	152,2	152,5
1'	142,9	144,6	144,0	147,0	142,6
2'	122,9	116,2	108,6	121,3	122,9
3'	129,5	149,2	160,7	131,1	139,2
4'	125,0	118,9	110,5	123,6	125,5
5'	129,5	130,3	130,2	129,5	129,5
6'	122,9	127,1	115,0	119,9	119,4
C3-CH₃	15,5	15,9	15,5	15,0	15,2
N1-CH₃	33,5	33,6	33,5	33,1	33,3
O-CH₂	60,7	61,2	60,8	60,8	60,8
CH₂-CH₃	14,2	14,2	14,2	13,8	14,1
C=O	168,8	168,5	168,7	167,8	168,0
O-CH₃	-	-	55,2	-	-
C3'-CH₃	-	-	-	-	20,7

^a Valores obtidos das correlações heteronucleares bidimensionais através de uma ligação ($^1J_{\text{CH}}$) e pelos espectros de RMN de ^{13}C - DEPT.

4.3 – Atividade Antileishmania

A leishmaniose, conforme citado na introdução deste trabalho de tese, representa um importante problema de saúde pública, principalmente nas regiões tropicais e sub tropicais do mundo e, particularmente em nosso país.

A avaliação da atividade antileishmania de derivados do sistema heterocíclico *4-(X-fenil)amino-5-carboetoxi-1,3-dimetil-1H-pirazolo[3,4-b]piridina*, foi realizada visando a obtenção de novas substâncias com potencial utilização contra as leishmanioses. Também foram testados dois derivados da série *4-(4'-hidroxifenil)amino-5-carbetoxi-1-R₁,3-R₂-1H-pirazolo[3,4-b]piridina*, onde $R_1 = R_2 = \text{Fenil (FFOH)}$ e $R_2 = \text{Metil e } R_1 = \text{Fenil (MFOH)}$ ²².

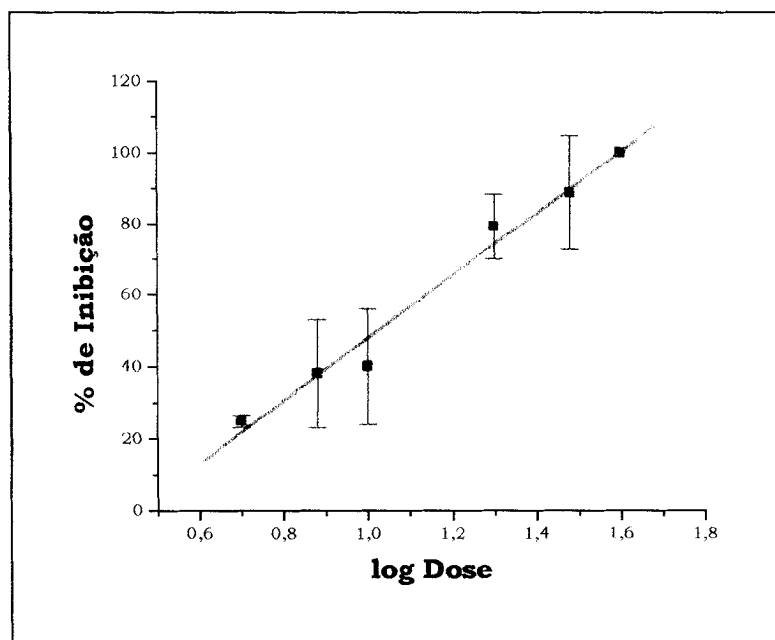
A Amodiaquina é uma substância com atividade antimalarial já reconhecida. Os derivados *4-(4'-hidroxi-3'-dietilaminometilfenil)amino-5-carbetoxi-1-R₁,3-R₂-1H-pirazolo[3,4-b]piridina*, onde $R_1 = R_2 = \text{Fenil (FFOHd\grave{i})}$ e $R_2 = \text{Metil e } R_1 = \text{Fenil (MFOHd\grave{i})}$ foram sintetizados anteriormente²² como análogos estruturais da Amodiaquina e, no presente trabalho, além desta última, foram avaliados quanto a sua atividade antileishmania.

O ensaio geral para a avaliação da atividade antileishmania das pirazolopiridinas, foi realizado no Laboratório de Bioquímica de Trypanosomatídeos da Fundação Oswaldo Cruz – Rio de Janeiro, sob a orientação da Dr^a. Leonor Leon e o procedimento experimental utilizado baseou-se em trabalhos desenvolvidos por Leon e colaboradores³⁴.

Os ensaios foram realizados *in vitro* contra as promastigotas da *Leishmania amazonensis*. Após 24 horas de incubação com as drogas, os parasitas vivos foram contados em câmara de Neubauer e o resultado

comparado com o controle (Tabelas 12-14 da parte experimental) a fim de prosseguir com o tratamento estatístico.

A DL50 ou a DL90 (dose que inibe em 50% ou 90% do crescimento celular) de cada pirazolopiridina (Tabelas 26 e 27) foi obtida através da equação da reta que melhor se ajustou aos dados experimentais nos gráficos (% de inibição) x (log dose). As Figuras 34 e 35 mostram os gráficos e as correspondentes equações obtidas, para os derivados 4^{a}-CH_3 da série 1,3-dimetilpirazolopiridina e *FFOH* da série 1,3-difenilpirazolopiridina, respectivamente, ilustrando as determinações das DL50 e DL90. As Equações 30-47 foram obtidas para as pirazolopiridinas restantes.



$$\% \text{Inib.} = -39,07(\pm 7,62) + 86,98 (\pm 6,33) \log \text{dose} \quad (30)$$

4'-CH₃ coeficiente de correlação: $r = 0,99$

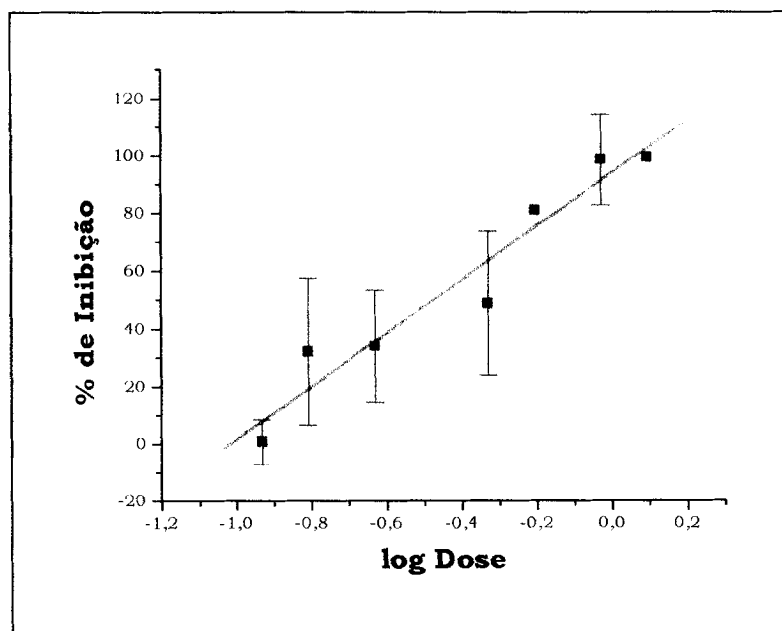
desvio padrão da regressão: $dp=5,03$

variância: $p=0,00016$

número de pontos: $n=6$

$$\mathbf{DL50 = 32,59\mu M}$$

Figura 34: Gráfico e equação para determinação da DL50 do derivado X=4'-CH₃.



$$\%Inib. = 93,59 (\pm 5,81) + 92,16 (\pm 10,66) \log \text{dose} \quad (31)$$

FFOH

$$r = 0,97 \quad dp=10,29 \quad p=0,007 \quad n=7$$

$$\mathbf{DL90 = 2,0\mu M}$$

Figura 35: Gráfico e equação para determinação da DL90 do derivado *FFOH*.

- 4'-Br** %Inib. = 14,8 (\pm 1,02) + 53,33 (\pm 0,77) log dose **(32)**
 $r = 0,99$ $dp=0,33$ $p=0,0092$ $n=3$
- 3'-Cl** %Inib. = 21,97 (\pm 1,71) + 41,17 (\pm 1,06) log dose **(33)**
 $r = 0,99$ $dp=0,45$ $p=0,0164$ $n=3$
- 4'-Cl** %Inib. = 45,77 (\pm 1,53) + 33,66 (\pm 1,54) log dose **(34)**
 $r = 0,99$ $dp=1,94$ $p=0,00003$ $n=6$
- 3'-CH₃** %Inib. = -23,03 (\pm 13,24) + 76,17 (\pm 11,38) log dose **(35)**
 $r = 0,99$ $dp=10,10$ $p=0,0216$ $n=4$
- 3'-OCH₃** %Inib. = -22,04(\pm 13,42) + 82,60 (\pm 12,40) log dose **(36)**
 $r = 0,97$ $dp=11,76$ $p=0,0069$ $n=5$
- 4'-OCH₃** %Inib. = -50,14 (\pm 14,92) + 96,49 (\pm 11,37) log dose **(37)**
 $r = 0,98$ $dp=6,36$ $p=0,00344$ $n=5$
- H** %Inib. = -58,93(\pm 13,67) + 73,25 (\pm 8,89) log dose **(38)**
 $r = 0,97$ $dp=11,16$ $p=0,001$ $n=6$
- 4'-F** %Inib. = -8,79(\pm 3,72) + 53,06 (\pm 4,55) log dose **(39)**
 $r = 0,99$ $dp=4,32$ $p=0,00135$ $n=5$
- 3'-NO₂** %Inib. = 15,38 (\pm 7,28) + 44,06(\pm 5,58) log dose **(40)**
 $r = 0,98$ $dp=4,96$ $p=0,016$ $n=4$

- 4'-NO₂** %Inib. = -88,14(±24,41) + 67,14 (±14,02) log dose **(41)**
 r = 0,98 dp=9,09 p=0,14 n=3
- 4'-OH** %Inib. = 27,72(±11,44) + 162,54 (±43,11) log dose **(42)**
 r = 0,97 dp=18,47 p=0,165 n=3
- 4'-OAc** %Inib. = 87,62 (± 1,92) + 106,74(±3,91) log dose **(43)**
 r = 0,99 dp=2,65 p=0,00134 n=4
- MFOH** %Inib. = 127,80 (± 7,75) + 115,80(±13,40) log dose **(44)**
 r = 0,98 dp=7,56 p=0,01 n=5
- MFOHdi** %Inib. = 134,10 (± 13,11) + 114,30(±21,12) log dose **(45)**
 r = 0,95 dp=13,06 p=0,012 n=5
- FFOHdi** %Inib. = 104,30 (± 3,52) + 45,41(±6,67) log dose **(46)**
 r = 0,96 dp=4,81 p=0,0000348 n=6
- Amodiaquina** %Inib. = 91,27 (± 3,47) + 87,85(±9,45) log dose **(47)**
 r = 0,98 dp=5,89 p=0,001 n=6

As Tabelas 26 e 27 listam os valores de DL50 ou DL90 para os derivados pirazolopiridinas avaliados.

Tabela 26: Valores da DL50 determinados para as 4-(*X*-fenil)amino-5-carboetoxi-1,3-dimetil-1*H*-pirazolo[3,4-*b*]piridina.

<i>X</i>	DL50 ($\mu\text{g/mL}$)	DL50 (μM)
4'-Br	4,57	11,74
3'-Cl	4,79	13,89
4'-Cl	1,34	3,89
3'-CH₃	4,82	14,86
4'-CH₃	10,57	32,59
3'-OCH₃	7,45	21,89
4'-OCH₃	10,91	32,05
H	30,69	98,89
4'-F	12,82	39,04
3'-NO₂	6,11	17,19
4'-NO₂	114,15	321,23
4'-OH	1,37	4,20
4'-OAc	0,44	1,23

A série 1,3-dimetilpirazolopiridina substituída apresentou, com exceção do derivado 4'-NO₂, boa atividade antileishmania contra as promastigotas da *Leishmania amazonensis*, sendo que as substâncias onde X = 4'-OAc, 4'-Cl e 4'-OH mostraram-se como as mais ativas com valores de DL50 na faixa de 1,23 a 4,29 μM. A Figura 36 mostra a comparação dos valores de DL50 obtidos para a referida série.

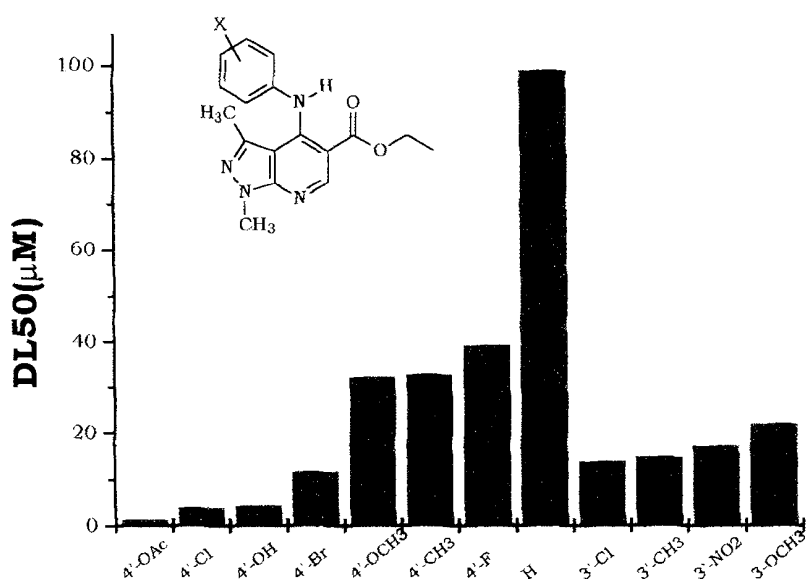


Figura 36: Comparação dos valores de DL50 obtidos para a série 4-(X-fenil)amino-5-carboetoxi-1,3-dimetil-1H-pirazolo[3,4-b]piridina.

Os análogos estruturais da Amodiaquina apresentaram-se de maneira geral mais ativos do que os derivados da série 1,3-dimetilpirazolo-substituídos (Tabela 27). Dentre esses, os derivados contendo o grupo dietilaminometileno ligado ao anel anilínico apresentaram claramente uma marcante atividade antileishmania expressa em valores de DL90 (0,87 e 0,90 μM).

Tabela 27: Valores da DL90 determinados para as 1,3-difenil e 1-fenil-3-metil-pirazolo[3,4-b]piridinas substituídas.

Derivado	DL90 ($\mu\text{g/mL}$)	DL90 (μM)
FFOH	0,91	2,0
MFOH	0,47	1,21
FFOHdi	0,48	0,90
MFOHdi	0,41	0,87
Amodiaquina	0,97	2,72

A avaliação da atividade antileishmania da *Amodiaquina* mostrou um valor de DL90 = 2,72 μM , revelando-se como uma substância com menor atividade quando comparada com seus análogos estruturais da série 1-metil-3-fenil e 1,3-difenil-substituídos, com ou sem o grupo dietilaminometilênico. Também pode-se observar que, os derivados mais ativos, 1-metil-3-fenil-substituídos, apresentaram-se 2 (*MFOH*) e 3 (*MFOHdi*) vezes mais ativos do que a *Amodiaquina*.

A Figura 37 mostra a comparação entre os valores das DL90 para os derivados listados na Tabela 27, incluindo o derivado 4'-OH da série 1,3-dimetilpirazolopiridina.

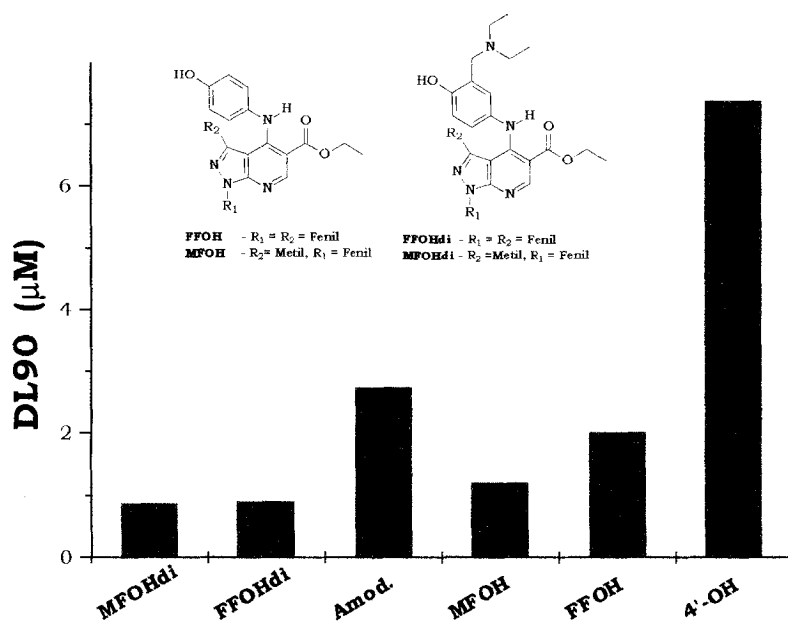


Figura 37: Comparação dos valores de DL90 obtidos para a os derivados *FFOH*, *MFOH*, *4'-OH*, *FFOHdi* e *MFOHdi*.

Ao compararmos as DL90 dos derivados 1-metil-3-fenil com as 1,3-difenil-pirazolopiridinas observou-se que a *MFOH* é 1,7 vezes mais ativa do que o *FFOH*. No entanto, quando está presente o grupo dietilaminometileno, a atividade antileishmania é praticamente a mesma. Comparando-se as atividades biológicas apresentadas pelos quatro derivados, observa-se que o *MFOHdi* e o *FFOHdi* são, respectivamente, 1,4 e 2,2 vezes mais ativos do que os correspondentes análogos.

4.4 – Estudos dos Parâmetros Hidrofóbicos

A avaliação dos efeitos hidrofóbicos de substâncias biologicamente ativas tem sido de grande importância para o entendimento das correlações entre a estrutura química e a atividade biológica, conforme citado na introdução deste trabalho. O coeficiente de partição ($\log P$) determinado no sistema 1-octanol/água, tem sido considerado o parâmetro que melhor representa o efeito hidrofóbico apresentando correlação satisfatória com diversas propriedades biológicas^{4,58-61}.

Os valores experimentais de $\log P$ foram determinados para seis derivados da série 1,3-dimetilpirazolopiridinas através do método “Shake Flask”. A Tabela 28 lista os valores experimentais obtidos para P e $\log P$ dos derivados $4'$ -Cl, $4'$ -F, $4'$ -OH, H, $3'$ -Cl e $3'$ -CH₃.

As drogas foram dissolvidas em 1,4-dioxano como solvente, na faixa de concentração que variou de 0,36-0,43mM e particionadas em 1-octanol e solução tampão pH=7,4. A determinação da concentração da droga na fase orgânica foi realizada espectrofotometricamente utilizando-se curvas de calibração apropriadas, conforme detalhado na parte experimental deste trabalho.

A metodologia para determinação do $\log P$ utilizando o método “Shake Flask” além de ser extremamente trabalhosa pode levar também a erros experimentais provenientes das diversas manipulações como diluições, pipetagens e pesagem das amostras em quantidades muito pequenas. Assim, os valores de $\log P$ para os derivados onde X= $4'$ -Br, $4'$ -NO₂, $4'$ -OCH₃, $4'$ -CH₃, $4'$ -OAc, $3'$ -OCH₃ e $3'$ -NO₂, foram determinados utilizando a constante hidrofóbica de Hansh (π) a partir do valor experimental do logaritmo do coeficiente de partição do derivado não substituído ($\log P_H$, Equação 12). O $\log P_X$ representa o coeficiente de partição do derivado substituído.

$$\pi(X) = \log P_X - \log P_H \quad (12)$$

Comparando os valores de logP experimentais e teóricos observa-se que, com exceção do derivado onde X=3'-CH₃, houve uma coêrencia dos resultados reforçando os valores experimentais obtidos (Tabela 28).

Tabela 28: Valores do Coeficiente de Partição (P) e logP obtidos experimentalmente e calculados através dos valores de π^{40} para as 4-(X-fenil)amino-1,3-dimetil-1H-pirazolo[3,4-b]piridinas.

X	P	logP experimental	π	logP calculado	X	π	logP calculado
4'-Cl	21,08	1,32	0,71	1,67	4'-Br	0,86	1,82
4'-F	5,02	0,70 ^a	0,14	1,10	4'-NO₂	-0,28	0,68
4'-OH	13,88	1,14	0,07	1,03	4'-OCH₃	-0,02	0,94
H	9,40	0,96	0,96	0,96	4'-CH₃	0,56	1,52
3'-Cl	46,80	1,67	0,71	1,67	4'-OAc	-0,64	0,32
3'-CH₃	190,00	2,27	0,56	1,52	3'-OCH₃	-0,02	0,94
					3'-NO₂	-0,28	0,68

^a Referência 97

Os parâmetros cromatográficos R_{Mw} e $\log k_w$ têm sido utilizados para expressar indiretamente o caráter hidrofóbico de derivados bioativos, sendo usados em substituição aos valores de $\log P$ nos estudos de QSAR^{40,64-67}.

Os valores de R_{Mw} foram obtidos a partir da determinação dos $R_f(s)$ dos derivados 1,3-dimetilpirazolopiridinas utilizando-se placas de cromatografia de camada fina em fase reversa (C-18). A mistura de eluentes, acetona/solução tampão fosfato pH \cong 7,4, foi usada em gradiente de concentração que variou de 30–60% (v/v) de solução tampão. A partir dos valores dos $R_f(s)$, (Tabela 10 da parte experimental) foram calculados os correspondentes $R_M(s)$ (Tabela 29) através da Equação 13.

$$R_M = \log (1/R_f - 1) \quad (13)$$

As 1,3-dimetilpirazolopiridinas em sua estrutura, apresentam diversos grupos potencialmente ionizáveis em função do pH do meio. Assim, os valores dos $pK_a(s)$ foram determinados (Tabela 8 da parte experimental), indicando o comportamento destes derivados como bases fracas e posteriormente utilizados para a correção dos $R_M(s)$ através da Equação 19.

$$R_M^{corr.} = R^{ap.} + \log (10^{pH-pK_a} + 1) \quad (19)$$

Tabela 29: Valores de $R_M^{corr.}$ determinados para os derivados 1,3-dimetilpirazolopiridina variando a mistura de eluentes de 30 a 60% (v/v) de tampão fosfato.

Derivado	$R_M^{corr.}$					
	% tampão fosfato : acetona					
X	30:70	45:55	40:60	55:45	50:50	60:40
4'-Br	-0,658	0,012	-0,638	0,484	0,105	0,568
3'-Cl	-0,658	-0,023	-0,658	0,439	0,082	0,517
4'-Cl	-0,743	-0,046	-0,720	0,471	0,058	0,485
3'-CH ₃	-0,633	-0,077	-0,633	0,373	0,027	0,430
4'-CH ₃	-0,679	-0,092	-0,659	0,341	0,035	0,425
3'-OCH ₃	-0,894	-0,326	-0,787	0,106	-0,126	0,154
4'-OCH ₃	-0,954	-0,382	-0,814	0,047	-0,188	0,128
H	-0,788	-0,263	-0,720	0,153	-0,104	0,226
4'-F	-0,809	-0,245	-0,738	0,205	-0,077	0,268
3'-NO ₂	-0,814	-0,274	-0,788	0,128	-0,127	0,176
4'-NO ₂	-0,836	-0,287	-0,788	0,129	-0,163	0,166
4'-OH	-0,921	-0,659	-0,865	-0,313	-0,501	-0,288
4'-OAc	-0,865	-0,470	-0,837	-0,07	-0,07	-0,023

Os valores de R_{Mw}^{corr} foram calculados por extrapolação para 100% da fase aquosa da mistura de eluentes, utilizando a equação da reta obtida por regressão linear do gráfico dos $R_M^{corr}(s)$ versus % de tampão na fase orgânica, Equação 48. Os valores de R_{Mw}^{corr} obtidos a partir das Equações 49-61 estão listadas na Tabela 30.

$$R_{Mw} = a (\% \text{ tampão}) + b$$

(48)

Tabela 30: Valores de R_{Mw}^{corr} determinados para os derivados 1,3-dimetilpirazolopiridinas.

X	R_{Mw}^{corr}	r^a
4'-Br	2,20	0,95
3'-Cl	2,17	0,99
4'-Cl	2,28	0,99
3'-CH₃	1,93	0,99
4'-CH₃	1,96	0,99
3'-OCH₃	1,69	0,99
4'-OCH₃	1,68	0,99
H	1,67	0,99
4'-F	1,82	0,99
3'-NO₂	1,61	0,99
4'-NO₂	1,60	0,99
4'-OH	0,64	0,98
4'-OAc	1,27	0,96

^a coeficiente de correlação linear

- 4'-Br** $R_{Mw}^{corr.} = -1,914 (\pm 0,361) + 0,041(\pm 0,003) \% \text{ tamp\~{a}o}$ **(49)**
 $r = 0,95 \quad dp=0,169 \quad p=0,0113 \quad n=6$
- 3'-Cl** $R_{Mw}^{corr.} = -1,863 (\pm 0,148) + 0,040(\pm 0,003) \% \text{ tamp\~{a}o}$ **(50)**
 $r = 0,99 \quad dp = 0,069 \quad p=0,0009 \quad n=6$
- 4'-Cl** $R_{Mw}^{corr.} = -2,015 (\pm 0,207) + 0,042(\pm 0,004) \% \text{ tamp\~{a}o}$ **(51)**
 $r = 0,99 \quad dp=0,097 \quad p=0,002 \quad n=6$
- 3'-CH₃** $R_{Mw}^{corr.} = -1,174 (\pm 0,149) + 0,037(\pm 0,003) \% \text{ tamp\~{a}o}$ **(52)**
 $r = 0,99 \quad dp = 0,070 \quad p=0,0123 \quad n=6$
- 4'-CH₃** $R_{Mw}^{corr.} = -1,810 (\pm 0,114) + 0,038(\pm 0,002) \% \text{ tamp\~{a}o}$ **(53)**
 $r = 0,99 \quad dp=0,053 \quad p=0,0005 \quad n=6$
- 3'-OCH₃** $R_{Mw}^{corr.} = -1,975 (\pm 0,122) + 0,037(\pm 0,002) \% \text{ tamp\~{a}o}$ **(54)**
 $r = 0,99 \quad dp=0,057 \quad p=0,0007 \quad n=6$
- 4'-OCH₃** $R_{Mw}^{corr.} = -2,064 (\pm 0,094) + 0,037(\pm 0,002) \% \text{ tamp\~{a}o}$ **(55)**
 $r = 0,99 \quad dp=0,044 \quad p=0,0003 \quad n=6$
- H** $R_{Mw}^{corr.} = -1,835 (\pm 0,094) + 0,035(\pm 0,002) \% \text{ tamp\~{a}o}$ **(56)**
 $r = 0,99 \quad dp=0,044 \quad p=0,0004 \quad n=6$
- 4'-F** $R_{Mw}^{corr.} = -1,924 (\pm 0,113) + 0,037(\pm 0,002) \% \text{ tamp\~{a}o}$ **(57)**
 $r = 0,99 \quad dp=0,053 \quad p=0,0005 \quad n=6$

$$\mathbf{3'-NO_2} \quad R_{Mw}^{corr.} = -1,833 (\pm 0,112) + 0,034(\pm 0,002) \% \text{ tamp\~{a}o} \quad \mathbf{(58)}$$

$$r = 0,99 \quad dp=0,169 \quad p=0,0006 \quad n=6$$

$$\mathbf{4'-NO_2} \quad R_{Mw}^{corr.} = -1,872 (\pm 0,131) + 0,035(\pm 0,003) \% \text{ tamp\~{a}o} \quad \mathbf{(59)}$$

$$r = 0,99 \quad dp=0,062 \quad p=0,0010 \quad n=6$$

$$\mathbf{4'-OH} \quad R_{Mw}^{corr.} = -1,615 (\pm 0,113) + 0,022(\pm 0,002) \% \text{ tamp\~{a}o} \quad \mathbf{(60)}$$

$$r = 0,98 \quad dp=0,053 \quad p=0,0002 \quad n=6$$

$$\mathbf{4'-OAc} \quad R_{Mw}^{corr.} = -1,755 (\pm 0,256) + 0,030(\pm 0,005) \% \text{ tamp\~{a}o} \quad \mathbf{(61)}$$

$$r = 0,96 \quad dp=0,119 \quad p=0,0101 \quad n=6$$

Os valores de $\log k_w$ foram obtidos a partir da determinação dos tempos de retenção (t_R) das 1,3-dimetilpirazolopiridinas usando a técnica de CLAE. Foi utilizada, como fase estacionária, uma coluna quimicamente ligada C-8, e como fase móvel uma mistura de acetonitrila e solução tampão fosfato pH=7,4 na proporção de 35-60% (v/v) de solvente orgânico em sistema isocrático.

Os valores de k' foram obtidos a partir dos dados de t_R da Tabela 11 (na parte experimental) utilizando a Equação 62. A Tabela 31 mostra os resultados obtidos para o $\log k'$ corrigidos considerando os valores dos pK_a(s) das 1,3-dimetilpirazolopiridinas (Equação 20).

$$\log k^{corr.} = \log k^{ap.} + \log (10^{pH-pK_a} + 1) \quad \mathbf{(20)}$$

$$k' = (t_R - t_o) / t_o$$

(62)

Os valores de $\log k_w^{corr}$ (Tabela 32) foram estimados por extrapolação para 100% da fase aquosa, utilizando a reta obtida por regressão linear do gráfico de $\log k'$ versus % tampão (v/v) na fase orgânica (Equação 63).

$$\log k_w = a(\% \text{ solv. org.}) + b$$

(63)

Tabela 31: Valores de $\log k'^{\text{corr.}}$ determinados por CLAE variando a fase móvel de 35 a 60% (v/v) de tampão fosfato.

$\log k'^{\text{corr.}}$					
<i>Derivado</i>	<i>% tampão fosfato : acetonitrila</i>				
X	35:65	40:60	50:50	55:45	60:40
4'-Br	0,248	0,407	0,751	0,974	1,254
3'-Cl	0,201	0,356	0,702	0,920	1,190
4'-Cl	0,202	0,357	0,70	0,921	1,191
3'-CH₃	0,230	0,370	0,708	0,930	1,185
4'-CH₃	0,215	0,365	0,703	0,922	1,181
3'-OCH₃	0,043	0,177	0,498	0,892	0,947
4'-OCH₃	0,0	0,150	0,457	0,662	0,904
H	0,057	0,202	0,515	0,715	0,959
4'-F	0,046	0,181	0,514	0,719	0,968
3'-NO₂	-0,086	0,072	0,414	0,621	0,870
4'-NO₂	-0,085	0,073	0,414	0,622	0,871
4'-OH	-0,495	0,347	-0,022	0,176	0,398
4'-OAc	-0,137	0,021	0,348	0,561	0,807

Tabela 32: Valores de $\log k_w^{corr}$ determinados para 1,3-dimetilpirazolopiridina.

X	$\log k_w^{corr}$	r^a
4'-Br	2,77	0,99
3'-Cl	2,69	0,99
4'-Cl	2,69	0,99
3'-CH₃	2,64	0,99
4'-CH₃	2,65	0,99
3'-OCH₃	2,57	0,99
4'-OCH₃	2,57	0,99
H	2,33	0,99
4'-F	2,38	0,99
3'-NO₂	2,33	0,99
4'-NO₂	2,33	0,99
4'-OH	1,78	0,99
4'-OAc	2,24	0,99

^a Coeficiente de correlação linear

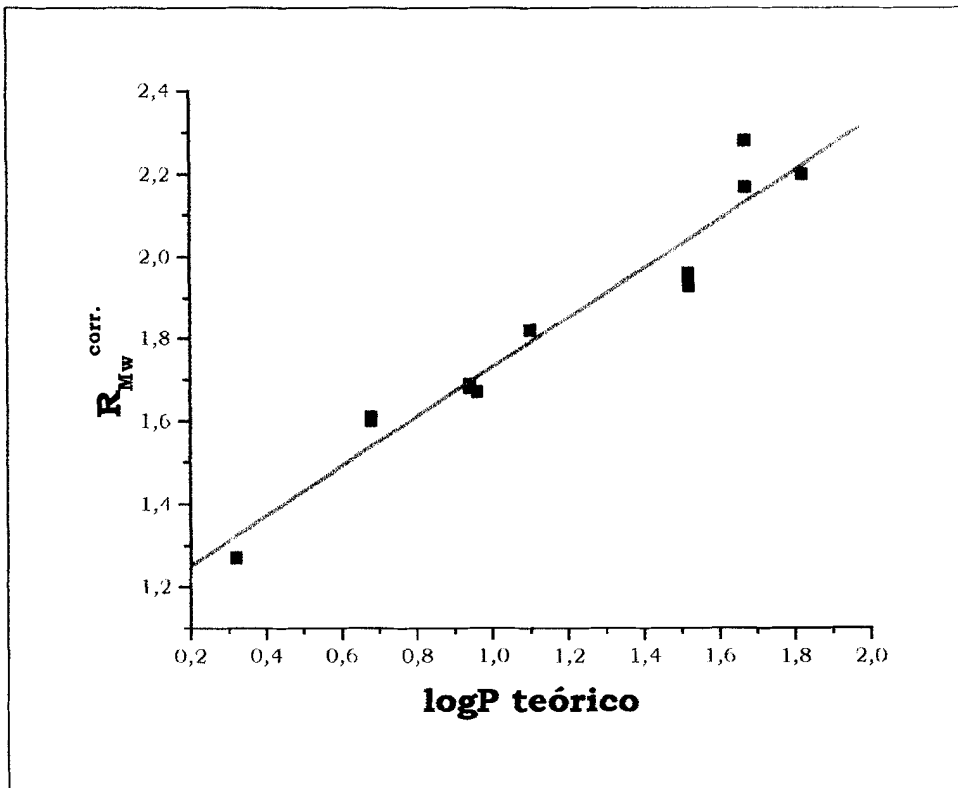
As Equações 64-76, listadas a seguir, foram obtidas para determinação dos $\log k_w^{corr.}(s)$ que expressam indiretamente o parâmetro hidrofóbico.

- 4'-Br** $\log k^{corr.} = -1,158 (\pm 0,122) + 0,039(\pm 0,003) \% \text{ tampão}$ **(64)**
 $r = 0,99 \text{ dp}=0,051 \text{ p}= 0,0005 \text{ n}=5$
- 3'-Cl** $\log k^{corr.} = -1,186 (\pm 0,111) + 0,039(\pm 0,002) \% \text{ tampão}$ **(65)**
 $r = 0,99 \text{ dp}=0,048 \text{ p}= 0,0004 \text{ n}=5$
- 4'-Cl** $\log k^{corr.} = -1,185 (\pm 0,113) + 0,039(\pm 0,002) \% \text{ tampão}$ **(66)**
 $r = 0,99 \text{ dp}=0,048 \text{ p}= 0,0005 \text{ n}=5$
- 3'-CH₃** $\log k^{corr.} = -1,123 (\pm 0,112) + 0,038(\pm 0,002) \% \text{ tampão}$ **(67)**
 $r = 0,99 \text{ dp}=0,048 \text{ p}= 0,0005 \text{ n}=5$
- 4'-CH₃** $\log k^{corr.} = -1,144 (\pm 0,108) + 0,038(\pm 0,002) \% \text{ tampão}$ **(68)**
 $r = 0,99 \text{ dp}=0,046 \text{ p}=0,0005 \text{ n}=5$
- 3'-OCH₃** $\log k^{corr.} = -1,376 (\pm 0,200) + 0,039(\pm 0,004) \% \text{ tampão}$ **(69)**
 $r = 0,99 \text{ dp}=0,085 \text{ p}=0,0024 \text{ n}=5$
- 4'-OCH₃** $\log k^{corr.} = -1,262 (\pm 0,100) + 0,035(\pm 0,002) \% \text{ tampão}$ **(70)**
 $r = 0,99 \text{ dp}=0,042 \text{ p}=0,0004 \text{ n}=5$
- H** $\log k^{corr.} = -1,206 (\pm 0,099) + 0,035(\pm 0,002) \% \text{ tampão}$ **(71)**
 $r = 0,99 \text{ dp}=0,042 \text{ p}=0,0004 \text{ n}=5$

4'-F	$\log k^{corr.} = -1,226 (\pm 0,104) + 0,036(\pm 0,002) \% \text{ tampão}$ $r = 0,99 \quad dp=0,044 \quad p=0,0004 \quad n=5$	(72)
3'-NO₂	$\log k^{corr.} = -1,425 (\pm 0,089) + 0,038(\pm 0,002) \% \text{ tampão}$ $r = 0,99 \quad dp=0,038 \quad p=0,0003 \quad n=5$	(73)
4'-NO₂	$\log k^{corr.} = -1,424 (\pm 0,089) + 0,038(\pm 0,002) \% \text{ tampão}$ $r = 0,99 \quad dp=0,038 \quad p=0,0003 \quad n=5$	(74)
4'-OH	$\log k^{corr.} = -1,752 (\pm 0,074) + 0,035(\pm 0,002) \% \text{ tampão}$ $r = 0,99 \quad dp=0,031 \quad p=0,0002 \quad n=5$	(75)
4'-OAc	$\log k^{corr.} = -1,457 (\pm 0,095) + 0,037(\pm 0,002) \% \text{ tampão}$ $r = 0,99 \quad dp=0,038 \quad p=0,0003 \quad n=5$	(76)

A análise da correlação entre os parâmetros lipofílicos cromatográficos (indiretos) $R_{Mw}^{corr.}$ e $\log k_w^{corr.}$ com $\log P$, indicou correlações significativas como pode ser observado nas Figuras 38 e 39.

Os valores de $R_{Mw}^{corr.}$ e $\log k_w^{corr.}$ também apresentaram correlação linear significativa conforme mostra a Figura 40. Estas correlações observadas indicam a confiabilidade na determinação dos parâmetros hidrofóbicos e na sua possível utilização nos estudos de QSAR.



$$R_{Mw}^{corr} = 1,133 (\pm 0,059) + 0,599(\pm 0,048) \log P \text{ teórico} \quad (77)$$

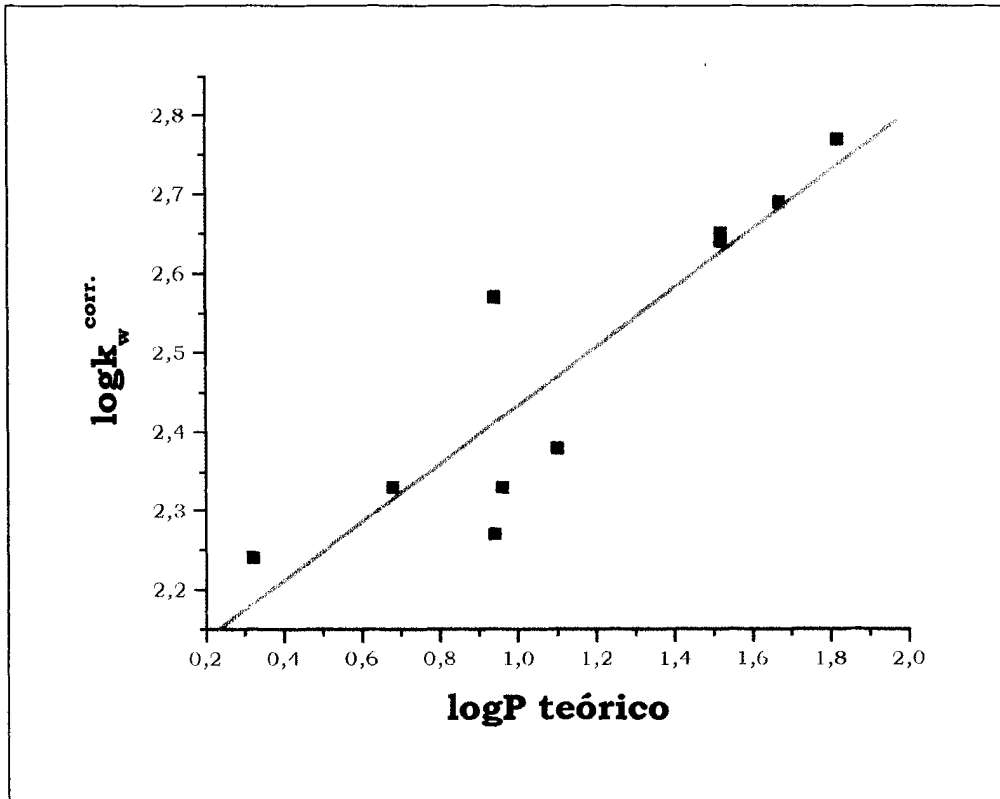
coeficiente de correlação: $r = 0,97$

desvio padrão: $dp=0,076$

variância: $p < 0,0001$

número de derivados $n=12$

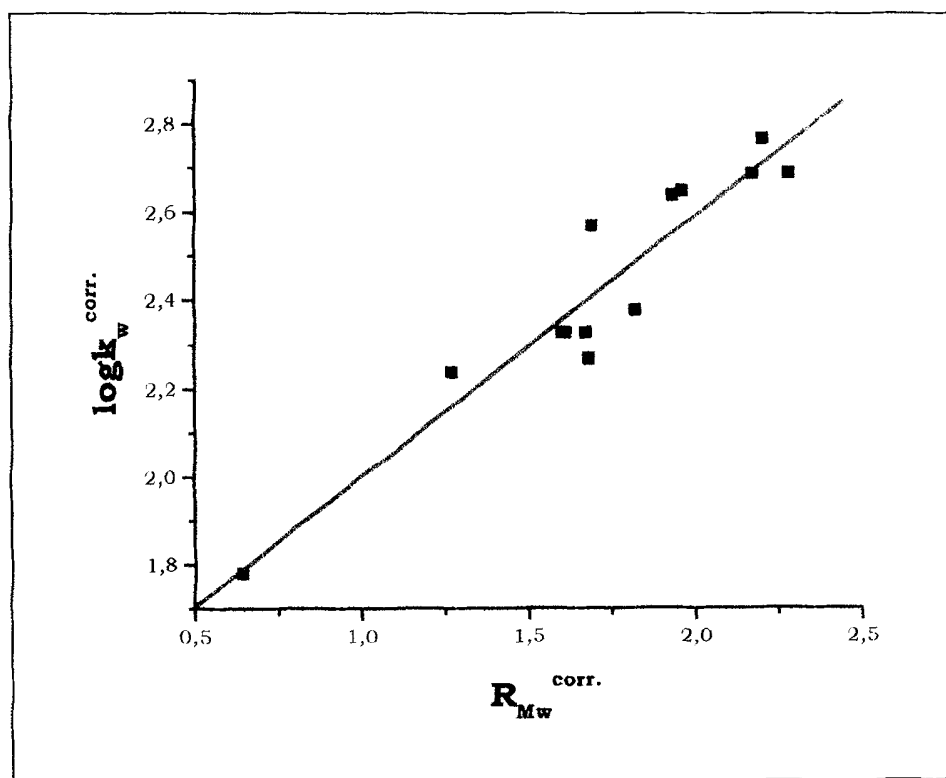
Figura 38: Correlação entre o R_{Mw}^{corr} e $\log P$.



$$\log k_{w}^{corr} = 2,064 (\pm 0,064) + 0,370 (\pm 0,052) \log P \text{ teórico} \quad (78)$$

$$r = 0,92 \quad dp = 0,082 \quad p < 0,0001 \quad n = 12$$

Figura 39: Correlação entre o $\log k_{w}^{corr}$ e $\log P$.



$$R_{Mw}^{corr} = 1,412(\pm 0,107) + 0,591(\pm 0,060) \log k_w^{corr} \quad (79)$$

$$r = 0,95 \quad dp=0,091 \quad p<0,0001 \quad n=13$$

Figura 40: Correlação entre o R_{Mw}^{corr} e $\log k_w^{corr}$

4.5- Estudo de Modelagem Molecular

4.5.1 - Parâmetros Eletrônicos Teóricos da Série *4-(X-fenil)amino-5-carboetoxi-1,3-dimetil-1H-pirazolo[3,4-b]piridina*

Os parâmetros eletrônicos teóricos foram determinados para todas as moléculas da série *4-(X-fenil)amino-5-carboetoxi-1,3-dimetil-1H-pirazolo[3,4-b]piridina*. Inicialmente, as geometrias moleculares foram otimizadas utilizando-se o programa de mecânica molecular PCWIN. A partir da geometria das conformações mais estáveis, utilizou-se o método de mecânica quântica semi-empírico AM1, através do pacote MOPAC 6.0 permitindo o cálculo das energias dos orbitais de fronteira HOMO e LUMO, calor de formação e momento dipolar (Tabela 33).

Os valores dos parâmetros eletrônicos teóricos foram posteriormente correlacionados com os valores que expressam a atividade antileishmania.

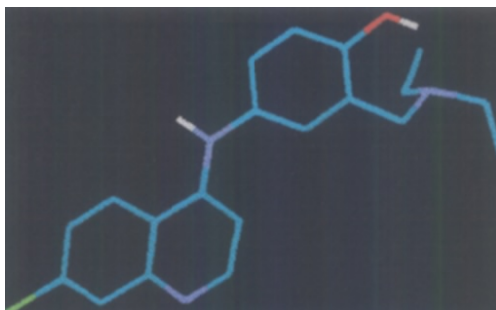
Tabela 33: Valores dos parâmetros eletrônicos teóricos para as 1,3-dimetilpirazolopiridinas, obtidas por cálculos teóricos das moléculas otimizadas.

<i>X</i>	<i>HOMO</i> ^a	<i>LUMO</i> ^a	<i>Calor de Formação</i> ^a	<i>Momento Dipolar</i> ^b
4'-Br	-8,77	-0,86	40,66	1,99
3'-Cl	-8,79	-0,72	34,22	1,71
4'-Cl	-8,70	-0,73	34,04	2,85
3'-CH₃	-8,60	-0,57	33,56	2,63
4'-CH₃	-8,56	-0,66	28,30	0,97
3'-OCH₃	-8,61	-0,63	3,40	3,18
4'-OCH₃	-8,52	-0,45	3,13	2,00
H	-8,67	-0,69	35,95	0,85
4'-F	-8,71	-0,82	-8,87	1,91
3'-NO₂	-9,17	-1,15	45,46	4,46
4'-NO₂	-9,17	-1,26	43,02	6,38
4'-OH	-8,54	-0,53	-3,19	1,95
4'-OAc	-8,78	-0,83	-33,61	4,04

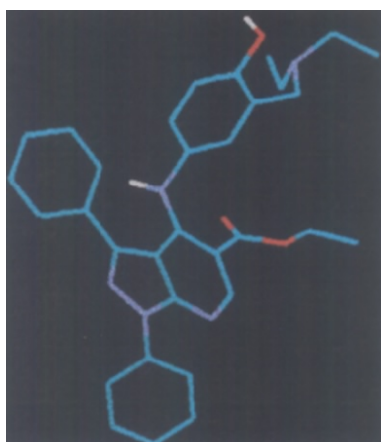
^a Kcal/mol. ^b D

4.5.2 - Estudo Conformacional Comparativo das 4-(4'-hidroxifenil)amino-5-carbetoxi-1H-pirazolo[3,4-b]piridina, 4-(4'-hidroxi-3'-dietilaminometilfenil)amino-5-carbetoxi-1H-pirazolo[3,4-b]piridina e Amodiaquina

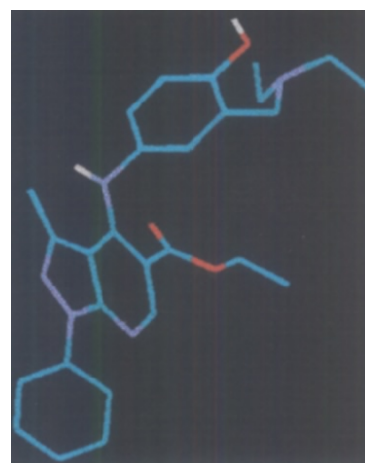
Os derivados 4-(4'-hidroxifenil)amino-5-carbetoxi-1- R_1 ,3- R_2 -1H-pirazolo[3,4-b]piridina, onde $R_1 = R_2 =$ Fenil (FFOH) e $R_2 =$ Metil e $R_1 =$ Fenil (MFOH); 4-(4'-hidroxi-3'-dietilaminometilfenil)amino-5-carbetoxi-1- R_1 ,3- R_2 -1H-pirazolo[3,4-b]piridina, onde $R_1 = R_2 =$ Fenil (FFOHdi) e $R_2 =$ Metil e $R_1 =$ Fenil (MFOHdi); 4-(X-fenil)amino-5-carboetoxi-1,3-dimetil-1H-pirazolo[3,4-b]piridina (X=4'-OH) e a Amodiaquina tiveram, inicialmente, suas estruturas modeladas utilizando o programa PCWIN e posteriormente, sua geometria molecular foi otimizada através do programa Mopac 6.0, usando o método semi-empírico AM1. As conformações mais estáveis obtidas por este método, foram posteriormente trabalhadas no PCWIN permitindo sua visualização espacial. As Figuras 41 e 42 mostram as conformações preferenciais obtidas.



Amodiaquina

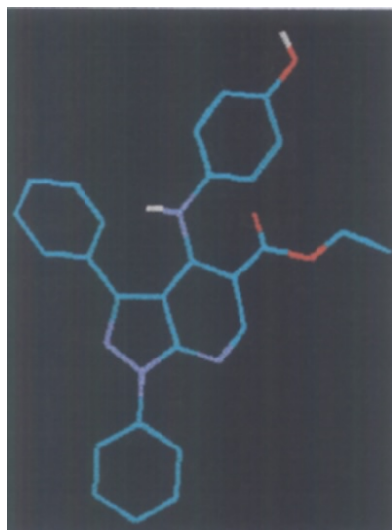
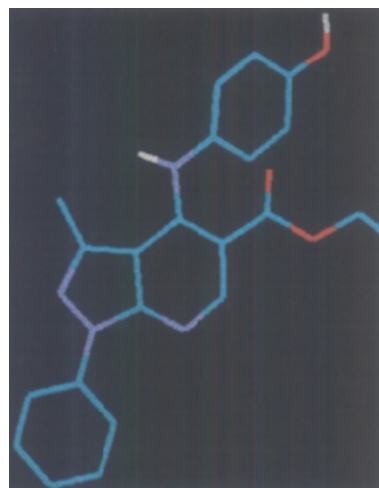
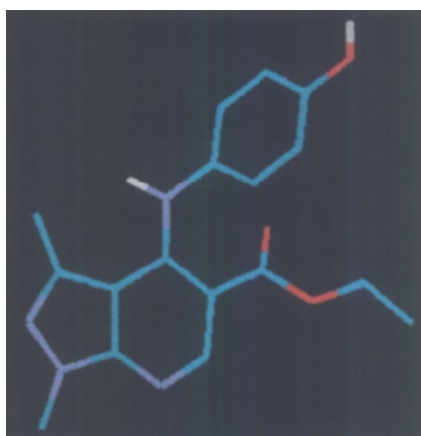


FFOHdi



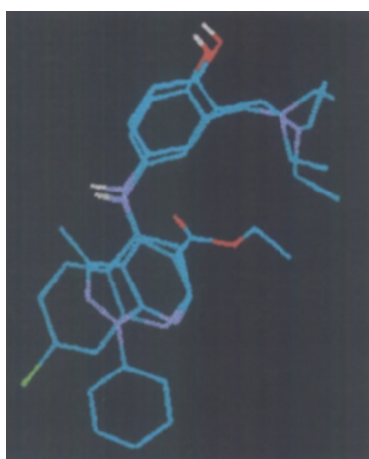
MFOHdi

Figuras 41: Conformações preferenciais obtidas para as pirazolopiridinas *MFOHdi*, *FFOHdi* e a *Amodiaquina*.

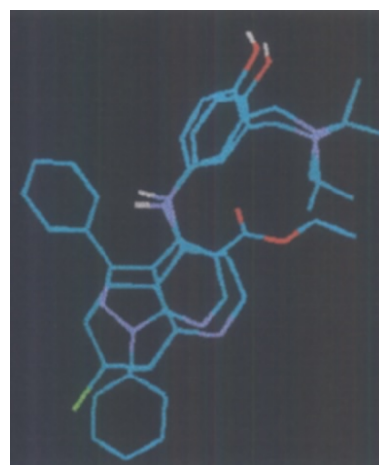
**FFOH****MFOH****X = 4'-OH**

Figuras 42: Conformações preferenciais obtidas para as pirazolopiridinas *MFOH*, *FFOH* e *X=4'-OH*.

As conformações preferenciais dos derivados pirazolopiridinas foram sobrepostas uma a uma sobre a conformação mais estável da *Amodiaquina*, Figuras 43 e 44. Observou-se que os derivados *MFOHdi* e *FFOHdi* apresentaram maior sobreposição do anel anilínico substituído com o grupo N,N-dimetilaminometilênico com a porção análoga da *Amodiaquina*.

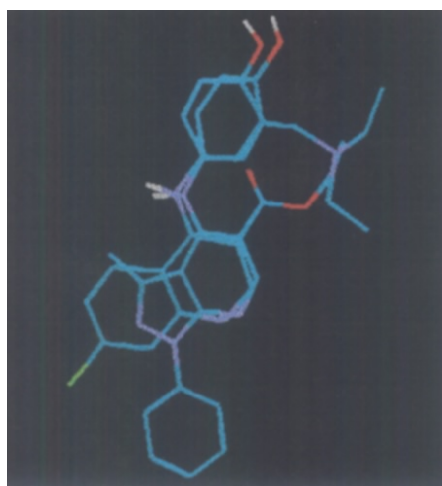


(I)

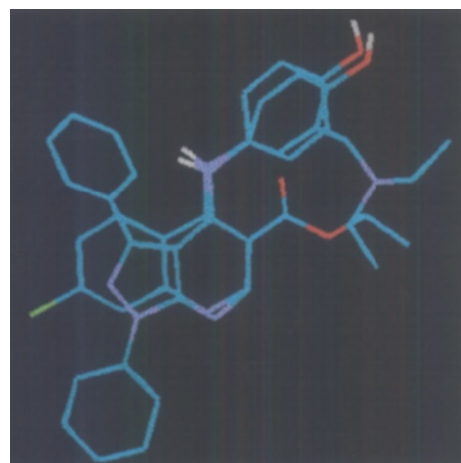


(II)

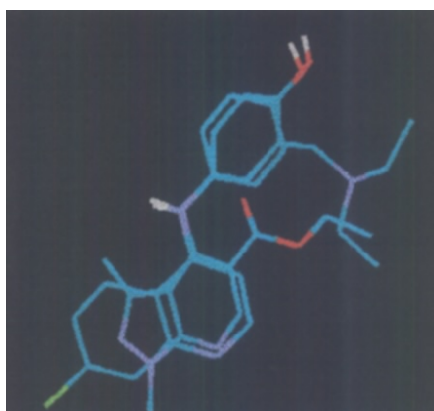
Figura 43: Sobreposição da *Amodiaquina* com as pirazolopiridinas *MFOHdi* (I) e *FFOHdi* (II).



(III)



(IV)



(V)

Figura 44: Sobreposição da *Amodiaquina* com as pirazolopiridinas *MFOH* (II)=, *FFOH* (III) e *X=4'OH* (IV).

A sobreposição do anel pirazolopiridina com o anel quinolínico da *Amodiaquina* se apresenta similar em todas as substâncias.

Este estudo permitiu observar ainda, que os derivados que apresentam melhor sobreposição à *Amodiaquina* mostraram maior atividade antileishmania destacando a importância da presença do grupo N,N-dietilaminometilênico. Além disso observou-se que a presença do grupo 5-carboetoxi ligado ao anel piridínico (não presente na *Amodiaquina*), não afeta significativamente a resposta biológica (Tabela 27).

O sistema pirazolopiridina se apresenta como grupo bioisótero do anel quinolínico e os substituintes 1,3-difenil e 1-fenil-3-metil do anel pirazólico contribuem para o aumento da hidrofobicidade quando comparados com a *Amodiaquina*. A importância desses efeitos pode ser confirmada pela menor atividade antileishmania do derivado 1,3-dimetilpirazolo substituído.

A partir do valor de logP experimental do derivado 1,3-dimetilpirazolopiridina não substituído ($X=H$), foram calculados os valores de logP dos derivados *MFOH*, *FFOH*, *MFOHdi* e *FFOHdi* através da Equação 79 que utiliza o somatório ($\sum\pi_i$) das contribuições de cada um dos diferentes grupos presentes (N,N-dietilaminometileno, OH no anel anilínico e os grupos metila ou fenila do anel pirazólico) em cada uma das estruturas⁴⁰.

$$\log P_X = \log P_H + \sum \pi_i$$

(79)

A seguir, como exemplo, é indicado o cálculo do logP para o derivado *MFOHdi*.

$$\log P_{MFOHdi} = \log P_H - \pi(CH_3) + \pi(C_6H_5) + \pi(OH) + \pi(CH_2N(CH_2CH_3)_2)$$

$$\pi(CH_3)^{40} = 0,56$$

$$\pi(C_6H_5)^{40} = 1,96$$

$$\pi(-OH)^{40} = -0,67$$

$$\pi(CH_2N(CH_2CH_3)_2)^{99} = 0,36$$

$$\log P_{MFOHdi} = 2,05$$

Aplicando-se a mesma equação para os derivados *FFOHdi*, *MFOH* e *FFOH* os valores para os logP(s) teóricos foram 3,45; 1,69 e 3,09, respectivamente. O valor de logP para a *Amodiaquina* em $pH \cong 7,4$ relatado na literatura⁹⁷ é igual a 3,01. Comparando-se este valor com os obtidos para as pirazolopiridinas acima, e considerando os valores de DL90 (Tabela 34), podemos observar que a hidrofobicidade não é o único fator significativo para a atividade antileishmania, ou seja, os derivados com maiores e menores valores de logP do que a *Amodiaquina* foram mais ativos. Além disso, pode-se sugerir os que o parâmetros estéricos também contribuem para a resposta biológica pois os derivados mais ativos, apresentaram maior sobreposição com a *Amodiaquina*.

Tabela 34: Dados de DL90 e logP teóricos das 1,3-difenil, 1-fenil-3-metilpirazolopiridinas e da *Amodiaquina*.

Derivado	DL90 (μM)	LogP calculado
FFOH	2,0	3,09
MFOH	1,21	1,69
FFOHdi	0,90	3,45
MFOHdi	0,87	2,05
Amodiaquina	2,72	3,01

4.6 – Correlações Quantitativas entre a Estrutura Química e a Atividade Biológica.

Modelos teóricos que correlacionem a estrutura química com a atividade biológica têm sido cada vez mais estudados, pois proporcionam o planejamento racional de novas drogas mais ativas, menos tóxicas e mais seletivas no combate as doenças.

Neste trabalho foram investigadas as possíveis correlações entre a estrutura das 1,3-dimetilpirazolopiridinas e a atividade antileishmania assim, as melhores correlações entre a resposta biológica e os parâmetros físico-químicos foram selecionadas. Para tanto, foram realizadas análises de regressão linear simples entre os valores da DL50, 1/DL50 e $\log 1/DL50$ e os parâmetros eletrônicos teóricos calculados (HOMO, LUMO, momento dipolar e calor de formação), eletrônicos empíricos tabelados (σ , σ_I , σ_R , **F** e **R**)⁴⁰, estéricos (Es, MR, L, B1, B2)⁴⁰ e hidrofóbicos ($\log P$, π , $\log k_w$ e R_{Mw}). Entretanto, não foi observada nenhuma correlação significativa envolvendo apenas um parâmetro (correlação não significativa com $r \leq 0,50$).

A não linearidade observada indicou a possível contribuição de mais parâmetros e portanto, a necessidade de uso de um modelo matemático mais complexo levando-nos então, para a análise de regressão múltipla.

Os valores de $\log 1/DL50$ e DL50 foram correlacionados com parâmetros físico-químicos, fixando-se um deles como hidrofóbico ($\log P$, $(\log P)^2$, π , π^2 , $R_{Mw}^{corr.}$, $(R_{Mw}^{corr.})^2$, $\log k_w$ ou $(\log k_w)^2$) e variando-se o outro entre os parâmetros estéricos e eletrônicos.

O critério adotado para a seleção das melhores correlações baseou-se nos valores de $r^2 \geq 0,5$, obtidos nas equações das correlações múltiplas. As Tabelas 35 e 36 mostram as variáveis envolvidas nas melhores correlações e as Equações 80 e 82 correspondem às mais significativas.

Tabela 35: Variáveis envolvidas nas melhores correlações da análise de regressão múltipla com $\log 1/\text{DL50}$.

Variáveis Independentes		n	r^2	F	sd
$(\log P)^2$	MR	11	0,59	5,69	0,37
π^2	MR	11	0,67	8,07	0,33
π^2	L	11	0,73	10,61	0,30

$$\log 1/\text{DL50} = 0,76(\pm 0,39) (\pi)^2 - 0,43(\pm 0,13) L - 2,90(\pm 0,44) \quad (80)$$

A análise por regressão múltipla, também foi aplicada considerando somente os parâmetros hidrofóbicos. A Equação 81 mostra a melhor correlação obtida.

$$\log 1/\text{DL50} = 2,11(\pm 0,45) (\log P)^2 - 4,88(\pm 1,02) \log P + 1,18(\pm 0,53) \quad (81)$$

$$r^2 = 0,74 \quad \text{sd} = 0,29 \quad F = 11,44 \quad n = 11$$

Tabela 36: Variáveis envolvidas nas melhores correlações da análise de regressão múltipla com DL50.

Variáveis Independentes		n	r ²	F	sd
logP	B1	12	0,67	9,02	16,84
(logP) ²	B1	11	0,64	7,09	18,06
Logk _w ^{corr.}	B1	12	0,58	6,27	18,87
Logk _w ^{corr.}	B2	12	0,60	6,74	18,47
(Logk _w ^{corr.}) ²	B1	12	0,58	6,16	8,97
(Logk _w ^{corr.}) ²	B2	12	0,58	6,13	19,00
R _{Mw} ^{corr.}	B1	12	0,69	10,13	16,19
R _{Mw} ^{corr.}	B2	12	0,59	6,53	18,65
(R _{Mw} ^{corr.}) ²	B1	12	0,69	10,11	16,20
(R _{Mw} ^{corr.}) ²	B2	12	0,53	5,08	20,01
π	B1	12	0,67	9,02	16,84
π	B2	12	0,53	5,06	20,03
π ²	MR	12	0,53	5,14	19,95
π ²	L	12	0,60	6,78	18,44
π ²	μ	12	0,52	4,83	20,28
π ²	B2	12	0,60	6,83	18,14
π ²	F	12	0,50	4,55	20,58

$$\text{DL50} = 13,33(\pm 4,71) (\text{R}_{\text{Mw}}^{\text{corr.}})^2 - 108,74(\pm 24,18) \text{ B1} + 144,75(\pm 29,18) \quad (82)$$

Na tentativa da obtenção de correlações mais significativas, foram feitas análises envolvendo três parâmetros físico químicos como variáveis independentes, fixando-se dois deles como hidrofóbicos. As correlações obtidas apresentaram-se mais significativas envolvendo o efeito estérico. A Tabela 37 lista os parâmetros utilizados nas correlações múltiplas. As melhores correlações são expressas pelas Equações 83- 85 utilizando os parâmetros hidrofóbicos $(\log P)^2$, $\log P$ e os estéricos MR, B2 e L.

Tabela 37: Variáveis envolvidas nas melhores correlações da análise de regressão múltipla com $\log 1/DL50$.

Variáveis Independentes	LogP e $(\log P)^2$			
	n	r^2	F	sd
MR	12	0,79	10,10	0,27
Es	12	0,65	4,33	0,29
σ	12	0,74	7,59	0,31
B1	12	0,75	7,82	0,31
B2	12	0,81	11,33	0,26
L	12	0,83	12,67	0,25
F	12	0,74	7,46	0,31
R	12	0,71	6,68	0,32
σ_I	12	0,72	7,05	0,32
σ_R	12	0,72	6,72	0,32
HOMO	12	0,74	7,57	0,31
LUMO	12	0,72	6,74	0,32
dipolo	12	0,72	7,00	0,32

$$\log 1/DL50 = 1,53(\pm 0,39) (\log P)^2 - 3,49(\pm 0,85) \log P + 0,05(\pm 0,03) MR + 0,15(\pm 0,48) \quad (83)$$

$$\log 1/DL50 = 1,60(\pm 0,36) (\log P)^2 - 3,77(\pm 0,76) \log P + 0,58(\pm 0,29) B2 - 0,34(\pm 0,62) \quad (84)$$

$$\log 1/DL50 = 1,52(\pm 0,35) (\log P)^2 - 3,44(\pm 0,76) \log P + 0,25(\pm 0,11) L - 0,43(\pm 0,59) \quad (85)$$

Os resultados obtidos através da análise de regressão múltipla demonstram que os efeitos mais importantes são a lipofilicidade e o estérico para a atividade biológica estudada. É interessante destacar que aplicando este tipo de análise apenas para os derivados 4'-substituídos, considerando-se os mesmos parâmetros, foram obtidos melhores coeficientes de correlação reforçando a importância do efeito estérico. A Tabela 38 indica as correlações observadas e a Equação 86 a melhor delas.

Tabela 38: Variáveis envolvidas nas melhores correlações da análise de regressão múltipla para as 1,3-dimetilpirazolopiridinas 4'-substituídas.

Variáveis Independentes	logP		(logP) ²	
	n	r ²	F	sd
MR	8	0,80	5,40	0,38
Es	8	0,70	2,37	0,41
σ	8	0,80	5,50	0,37
B1	8	0,83	6,61	0,35
B2	8	0,81	5,73	0,37
L	8	0,85	7,31	0,33
F	8	0,82	5,90	0,36
R	8	0,75	3,92	0,43
σ _I	8	0,78	4,87	0,39
σ _R	8	0,75	3,99	0,42
HOMO	8	0,76	4,34	0,411
LUMO	8	0,85	7,53	0,33
dipolo	8	0,80	5,45	0,38

$$\log 1/DL50 = 1,54(\pm 0,541) (\log P)^2 - 3,50(\pm 0,15) \log P + 0,259(\pm 0,16) L - 0,45(\pm 0,87) \quad (86)$$

As equações obtidas para as melhores correlações mostraram claramente a maior contribuição do efeito hidrofóbico, expresso através dos respectivos coeficientes de susceptibilidade e da mesma forma menor contribuição do efeito estérico.

Usando as equações obtidas para as melhores correlações (Equações 83-85), foi possível determinar os valores preditos de DL50 para as 1,3-dimetilpirazolopiridinas (Tabela 39), sendo que a Equação 84 apresentou, em geral, melhores resultados.

Tabela 39: Valores preditos de DL50 para as 4-(X-fenil)amino-1,3-dimetil-1H-pirazolo[3,4-b]piridinas através da Equação 84.

X	DL50(μM) Experimental	DL50(μM) Predito
4'-Br	11,74	5,05
3'-Cl	13,89	11,51
4'-CH₃	14,86	25,25
3'-OCH₃	21,89	21,76
H	98,89	66,51
4'-F	39,04	52,45
3'-NO₂	17,19	16,51
4'-OH	4,20	48,27
4'-OAc	1,23	1,49

Os resultados mostrados na Tabela 39 indicam que o modelo matemático usado, envolvendo os parâmetros lipofílicos ($\log P$ e $(\log P)^2$) e o estérico B2 apresentaram-se satisfatórios e importantes para a predição da atividade antileishmania. Estes resultados, permitem que, dentro de um limite de confiança, projete-se racionalmente novos derivados candidatos à síntese e a avaliação antileishmania.



CONCLUSÃO

5 - CONCLUSÃO

↳ O método de síntese utilizado para as *4-(X-fenil)amino-1,3-dimetil-1H-pirazolo[3,4-b]piridinas* mostrou-se satisfatório fornecendo produtos relativamente puros e com rendimentos que variaram de 30 a 85%.

↳ As análises dos espectros decorrentes dos experimentos de RMN de ^1H e de ^{13}C uni e bidimensionais, permitiram os assinalamentos de hidrogênios e carbonos de todas as 1,3-dimetilpirazolopiridinas que correspondem as estruturas propostas.

↳ Os resultados de atividade antileishmania das 1,3-dimetilpirazolopiridina foram determinados em valores de DL50 e mostraram-se interessantes, com exceção do derivado $4'\text{-NO}_2$ que foi considerado inativo. Melhores atividades foram observadas para os derivados das séries 1,3-difenil e 1-fenil-3-metilpirazolopiridinas e a *Amodiaquina* cujos valores foram determinados em DL90.

↳ No estudo das sobreposições das conformações mais estáveis dos derivados *4-(4'-hidroxifenil)amino-5-carbetoxi-1-R₁,3-R₂-1H-pirazolo[3,4-b]piridina*, *4-(4'-hidroxi-3'-dietilaminometilfenil)amino-5-carbetoxi-1-R₁,3-R₂-1H-pirazolo[3,4-b]piridina*, onde $R_1 = R_2 = \text{Fenil}$ e $R_2 = \text{Metil}$ e $R_1 = \text{Fenil}$

com a *Amodiaquina*, através de modelagem molecular, indicaram que a presença do grupo N,N-dietilaminometilênico e o menor paralelismo dos anéis pirazolopiridina e quinolínico, no caso dos derivados 1-fenil-3-metil-substituídos, levaram à substâncias mais ativas.

↳ As melhores correlações entre as DL50 das 1,3-pirazolopiridinas e os parâmetros hidrofóbicos, eletrônicos teóricos calculados e eletrônicos empíricos tabelados, foram obtidas por regressão linear múltipla indicando os parâmetros hidrofóbicos $\log P$, $(\log P)^2$ e os estéricos MR, B2 e L, como mais significativos para a atividade antileishmania.

↳ A utilização das melhores equações obtidas no estudo de QSAR levou a predição de valores de DL50, de modo geral, coerentes com os experimentais permitindo assim, no futuro, a síntese de novos derivados mais ativos.



***REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS***

6 -REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1 - KATRITZKY, A.; Rees, C.W. *Comprehensive Heterocyclic Chemistry – The Structure, Reactions, Synthesis and Uses of Heterocyclic Compounds*, Ed. Pergamon Press, Vols. 1 e 3, Oxford, **1984**.

2 - DAVIES, D.T, *Aromatic Heterocyclic Chemistry*, Oxford Science Publications, nº 2, United States, **1997**.

3 - HARDY, C.R. *Adv. Heterocycl. Chem.*, 36, 343, **1984**.

4 - PATRICK, G.L. *An Introduction to Medicinal Chemistry*, Oxford University Press, USA, Cap.9, **1998**.

5 - HATT, T.L.P.; Vass, J.D.R. *J. C. S. Chem. Comm.* 293, **1966**.

6 - ABDALLA, M.; Essawy, A.; Deeb, A. *Indian J. Chem. Sect B*, 16B, 332, **1978**

7 - LYNCH, B.M.; Khan, M.A.; Teo, H.C.; Pedrotti, F. *Can. J. Chem.* 66, 420, **1988**.

- 8 – KHAN, M.A.; Lynch, B.M. *J. Heterocycl. Chem.* 7, 247, **1970**.
- 9 – GOULD, R.G.; Jacobs, W.A. *J. Am. Chem. Soc.* 61, 2890, **1939**.
- 10 – HOHN, H.; Deuzel, T. Jansen, W. *J. Heteocycl. Chem.* 9, 235, **1972**.
- 11 - QUIROGA, J.; Insusasty, B.; Cruz, S. Hernandez, P.; Bolaños, A.; Moreno, R. *J. Heterocycl. Chem.*, 35, 333, **1998**.
- 12 – AHLUWALIA, V.K.; Goyal, B. *Synthetic Comm.* 26(7), 1341, **1996**.
- 13 - LYNCH, M.B.; Chu, I. *J. Med. Chem.* 18(2), 161, **1975**.
- 14 - BARE, T.M.; Mclaren, D.; Campbell, J.B.; Firor, J.W.; Resch, J.F.; Walters, C.P.; Salama, A.I.; Meiners, B.A.; Patel, J.B. *J. Med. Chem.* 32(12), 2561, **1989**.
- 15 – DALY, J.W.; Hong, D.; Padgett, W.L.; Shamim, M.T.; Jacobson, K.A.; Ukeda, D. *Biochem. Pharm.* 37(4), 655, **1988**.
- 16 – CARVALHO, A.S.; Fraga, C.A.M.; Barreiro, E.J. *J. Heterocycl. Chem.* 33, 309, **1996**.
- 17 - BERNARDINO, A.M.R.; Nogueira, C.M.; Lepesch, C.M.O.; Gomes, C.R.B.; Schmitz, F.J.; Romeiro, G.A.;Pereira, H.S.; Frugulhetti, I.C.P.P.; Oliveira, M.R.P.; Souza, M.C.B.V.; Lee, M.Y.W.T.; Chaves, S.A.; Ferreira, V.F *Heterocycl. Commun.* 3(6), 527, **1997**.

18 - BERNARDINO, A.M.R.; Romeiro, G.A.; Frugulhetti, I.C.P.P.; Souza, M.C.B.V.; Lee, M.Y.W.T.; Sá, P.M.; Ferreira, V.F.; Fontoura, G.A.T. *J. Braz. Chem. Soc.* 7(5), 273, **1996**.

19 - BERNARDINO, A.M.R.; Nogueira, C.M.; Gomes, C.R.B.; Romeiro, G.A.; Frugulhetti, I.C.P.P.; Souza, M.C.B.V.; Chaves, S.A.; Ferreira, V.F.; Caetano, M.V.; Moussatché. N. *J. Bras. Doenças Sex. Trans.* 8(4), 14, **1996**.

20 - FERREIRA, E.I. *Malária – Aspectos Gerais e Quimioterapia*, Ed. Atheneu, São Paulo, **1982**.

21 - KOROLKOVAS, A.; Burckhalter, J.H. *Química Farmacêutica*, Ed. Guanabara dois, Rio de Janeiro, **1982**.

22 - MELLO, H. *Síntese de Novos Derivados Heterocíclicos do Sistema 1H-pirazolo[3,4-*b*]piridina – Análogos da Amodiaquina*, Tese de Mestrado, UFF, Niterói, Rio de Janeiro, **1995**.

23 - BERNARDINO, A.M.R.; Romeiro, G.A.; Souza, M.C.B.V.; Ferreira, V.F.; Mello, H. *Heterocy. Comm.* 12(5), 415, **1996**.

24 - PESSÔA, S.B.; Martins, A.V. *Parasitologia Médica*, 10^a ed., Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, **1977**.

25 - GOODMAN, L.S.; Gilman, A.G. *As bases Farmacológicas da Terapêutica* 8^a ed., Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, **1990**.

26 - FOURNET, A.; Ferreira, M.E.; Arias, A.R.; Ortiz, S.T.; Fuentes, S.; Nakayama, H.; Shinini, A.; Hocquemiller, R. *Antimicrobial Agents. Chemotherapy* 40(11), 2447, **1996**.

27 - NIELSEN, S.F.; Christensen, S.B.; Cruciani, G. Kharazmi, A.; Liljefors, T. *J. Med. Chem.* 41, 4819, **1998**.

28 - GRIMALDI JR., G.; Tesh, R.B. *Clinical Microbiology Reviews* 6(3), 230, **1993**.

29 - BERMAN, J. *Current Opinion in Infectious Diseases* 11, 707, **1998**.

30 - BARRAL A.; Pedral-Sampaio, D.; Grimaldi Jr, G.; Momen, H.; McMahon-Pratt, D.; Ribeiro de Jesus, A.; Almeida, R.; Badaro, R.; Neto, M.B.; Carvalho, E.M.; Johndon Jr, W.D. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 44, 536, **1991**.

31 - LEON, L.L.; Machado, G.M.C.; Paes, L.E.C.; Grimaldi Jr, G. *Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.*, 84, 678, **1990**.

32 - LEON, L.L.; Machado, G.M.C.; Paes, L.E.C.; Grimaldi Jr, G.; Barral, A. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 87(2), 229, **1992**.

33 - ROBBERS, J.E.; Speedie; M.K.; Tyler, V.E. *Farmacognosia Biotecnologia*, Ed Premier, São Paulo, **1997**.

34 - CANTO-CAVALHEIRO, M.M.; Echevarria, A.; Araújo, C.A.C.; Bravo, M.F.; Santos, L.H.S.; Jansen, A.M.; Leon, L.L. *Microbios*, 90, 51, **1997**.

- 35 - TORRES-SANTOS, E.C.; Moreira, D.L.; Kaplan, M.A.C.; Meirelles, M.M.; Bergmann, B.R. *Antimicrobial Agents in Chemotherapy*, 43(5), 1234, **1999**.
- 36 - FOURNET, A.; Ferreira, M.E.; Arias, A.R.; Fuentes, S.; Torres, S.; Inchausti, A.; Yaluff, G.; Nakayama, H.; Mahiou, V.; Hocquemiller, R.; Cavé, A. *Phytomedicine* 3(3), 271, **1996**.
- 37 - ARAÚJO, C.A.C.; Alegrio, L.V.; Leon, L.L. *Phytochemistry* 49(3), 751, **1998**.
- 38 - FOURNET, A.; Ferreira, M.E.; Arias, A.R.; Ortiz, S.T.; Inchausti, A.; Yaluff, G.; Quilhot, W.; Fernandez, E.; Hidalgo, M.E. *Comp. Biochem. Physiol.*, 116(1), 51, **1997**.
- 39 - HANSH, C.; Sammeres, P.G.; Taylor, J.B. Hydrofobic Properties of drugs, In *Comprehensive Medicinal Chemistry. The Rational Design, Mechanistic Study and Therapeutic Application of Chemical Compounds*, Eds. Pergamon, New York, Vol. 4, p.241, **1990**.
- 40 - MARTIN, Y.C. *Quantitative Drug Design: A Critical Introduction*, Marcel Dekker, New York, **1978**.
- 41 - RAINER, F. *Theoretical Drug Design Methods*, V.7, Alkademie-Verlag, Berlin, **1984**.
- 42 - GRIGOROROV, M.; Weber, J.; Tronchet, J.M.J.; Jefford, C.W.; Milhous, W.K.; Maric, D.; *J. Chem. Inf. Comput. Sci* 37, 124, **1997**.

43 – GAMAGE, S.A; Figgitt, D.P.; Wojcik, S.J.; Ralph, R.K.; Ransijn, A; Mauel, J.; Yardley, V.; Snowdon, V.Croft, S.L.; Denny, W.A *J. Med. Chem.* 40, 2634, **1997**.

44 – ARNAT, L.; Robert, D.; Besalu, E.; Carbo-Dorca, R. *J. Chem. Inf. Comput. Sci* 38(4), 624, **1998**.

45 – TEODORIDIS, G. *Pestic. Sci* 50(4), 283, **1997**.

46 – NISHIMURA, K.; Yamanaka, Y. Moritomo, M.; Fuji, K.; Tanaka, T.; Fukuda, Y. *Pestic. Sci* 55(9), 896, **1999**.

47 – SIGH, P.; Shama, R.C. *Quant. Struct.-Act. Relat.* 9, 29, **1990**.

48- REKKER, R.F. *Quant. Struct.-Act. Relat.* 11, 195, **1992**.

49 – VAN DER WATERBEEMD, H. *Quant. Struct.-Act. Relat.* 11, 200, **1992**.

50 – HANSH, C.; Fujita, T. *J. Am. Chem. Soc.* 86, 1616, **1964**.

51 – HAMMETT, L.P. *J. Am. Chem. Soc.* 59, 96, **1937**.

52 - HAMMETT, L.P. *Physical Organic Chemistry*; Mc Hill, New York, **1940**.

53 - TAFT JR., R.W. *J. Phys. Chem.* 64(12), 1805, **1960**.

54 – FREE, S.M.JR; Wilson, J.W.J. *J. Med. Chem.* 7, 395, **1964**.

- 55 - KUBINYI, H. *Quant. Struct.-Act. Relat.* 7, 121, **1988**.
- 56 - GAUDIO, A.C. *Química Nova*, 19(3), **1996**.
- 57 - FUJITA, T.; Ban, T. *J. Med. Chem.* 14, 148, **1971**.
- 58 - FUJITA, T. *Drug Design: Fact or Fantasy*, Vol.2, Academic Press, London, **1984**.
- 59 - LEO, A.; Hansh, C.; Elkins, D. *Chemical Reviews* 71(6), 525, **1971**.
- 60 - MANNHOLD, R.; Dross, K.P.; Rekker, R.F. *Quant. Struct.-Act. Relat.* 9, 21, **1990**.
- 61 - HERSEY, A.; Hill, A.P.; Hyde, R.M.; Livingstone, J. *Quant. Struct.-Act. Relat.* 8, 828, **1989**.
- 62 - HANSH, C.; Dunn, W.J.; *J. Pharm. Sci.* 61, 1, **1972**.
- 63 - FUJITA, T.; Isawa, J.; Hansh, C. *J. Am. Chem. Soc.* 86, 5175, **1964**.
- 64 - TOMLINSON, E. *J. Chromat.* 113, 1, **1975**.
- 65 - REYMOND, D.; Chung, G.N.; Mayer, J.M.; Testa, B. *J. Chromatogr.* 391, 97, **1987**.
- 66 - BRAUMANN, T. *J. Chromatogr.* 373, 191, **1986**.
- 67 - KIM, K.H. *Quant. Struct.-Act. Relat.* 14, 8, **1995**.

- 68 - PAGOU, M.; Koutselinis, A. *Chem. Pharm. Bull.* 41(2), 319, **1993**.
- 69 - YAMAGAMI, C.; Kawase, K.; Fujita, T. *Quant. Struct.-Act. Relat.* 18, 26, **1999**.
- 70 - ISAACS, N.S. *Physical Organic Chemistry*, 3rd edition, John Wiley e Sons, New York, **1985**
- 71 - BROWN, H.C.; Okamoto, Y. *J. Am. Chem. Soc.* 95, 1589, **1972**.
- 72 - TAFT, R.W.; Lewis, J. *J. Am. Chem. Soc.* 80, 2436, **1958**.
- 73- SWAIN, C.G.; Lupton Jr., E.C. *J. Am. Chem. Soc.* 90(16), 432, **1968**.
- 74- CLARK, T. *A Handbook of Computational Chemistry*, Wiley-Interscience, New York, **1985**.
- 75 - PULLMAN, B. *Molecular Orbital Studies in Chemical Pharmacology*, Springer-Verlag, Berlin, **1970**.
- 76 - BARREIRO, E.J., Rodrigues, C.R.; Albuquerque, M.G.; Sant'Anna, C.M.; Alencastro, R.B. *Química Nova* 20(3), 300, **1997**.
- 77 - LIPKOWITZ, K.B.; Boyd, D.B. *Reviews in Computational Chemistry*, Vol.1 e 2, VCH Publishes, New York, **1990**.
- 78 - STEWART, J.J.P. *J. Comp. Chem*, 10(2), 209, **1989**.

79 - DEWAR, M.J.S.; Zuebisch, E.G.; Healey, E.F.; Stewart, J.J.P. *J. Am. Chem. Soc.* 107, 3902, **1985**.

80- VOGEL, A.I. Química Orgânica vol. 1, 2 e 3, 3ª edição, Ed. Ao livro Técnico S. A.; Rio de Janeiro, **1971**

81 - THE MERK INDEX; MERK e CO, Inc; Rahway, N.J., USA, 11ª edição., **1989**

82 - MORITA, T.; Assumpção, R.M.V. Manual de Soluções, Reagente e Solventes. Padronização, Preparação e Purificação; 2ª edição, Ed. Edgar Blucher Ltda; São Paulo - SP, **1972**.

83 - TAYLOR, E.C.; Harthe, K. *J. Am. Chem. Soc.*, 81, 2456, **1959**;

84 - GRANDBERG, I.I.; Ting, W.; Kostg, A.N. *Zh. Obshch. Khim.* 21, 2311, **1961**.

85 - HÖHN, H.; Denzel, Th.; Janssen, W. *Journal Heterocyclic Chemistry*, 9, 235, **1972**.

86- LYNCH, B.M.; Khan, M.A.; Teo, H.C.; Pedrotti, F. *Can. J. Chem.*, 66, 420, **1988**.

87 - CASAIS, E. B.; Castro, G.; Bernardino, A.M.R. Terceiro Seminário UFF de Iniciação Científica; 3º Colocação no Prêmio Vasconcellos Torres; Niterói - Rio de Janeiro; Janeiro de **1989**.

88 - BURCKHALTER, J.H.; Dewald, H.A; Tendick F.H. *J. Am. Chem. Soc.*, 72, 1024, **1950**.

89 - BURCKHALTER, J.H.; Tendick, F.H.; Jones, E.M; Jones, P.A.; Holcomb, W.F; Rawlins, A.L. *J. Am. Chem. Soc.*, 70, 13663, **1948**.

91 - OHLWEILER, O.A. Química Analítica Quantitativa; 2ª edição, Ao livro Técnico SA, Rio de Janeiro, 2, 465, **1976**.

92 - LOMBARDINO, J.G.; Otterness, L.G.; Wiseman, E.H. *Drug Res.* 25(10), 1629, **1975**.

93 - RACZYNSKA, E.D.; Laurence, C.; Nicolet, P. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II* 8, 491, **1988**.

94 - YAMAGAMI, C.; Takao, N. *Chem. Pharm. Bull.* 41(4), 694, **1993**.

95 - HANIFIN, J.W.; Capuzzi, R.; Cinin, E. *J. Med. Chem.* 12, 1096, **1969**.

96 - BERNARDINO, A. M. R.; Romeiro, G. A.; Mello, H. de; Souza, M. C. B. V.; Carvalho, M. G.; Ferreira, V. F.; *Mag. Resson. Chem.* 34, 730, **1996**.

97 - KALINOWSKI, H. O.; Berger, S. e Braun, S.; *Carbon-13 NMR Spectroscopy*; John Wiley & Sons Ed.; New York, **1988**.

98 - Mello, H.; Echevarria, A.; Bernardino, A.M.R; Carvalho, M.G.; Silva, E. *Química Nova* 22(1), 26, **1999**.

99 – HANSH, C.; Leo, A.; Hoekman, D. Exploring QSAR Hydrophobic, Electronic, and Steric Constants. ACS Professional reference book, Washington, **1995**.

*SÍNTESE, PARÂMETROS LIPOFÍLICOS,
ELETRÔNICOS E CORRELAÇÕES
DE ESTRUTURA X ATIVIDADE
ANTILEISHMANIA DE
1H-PIRAZOLO[3,4-b]PIRIDINAS*

HELOISA DE MELLO

*CADERNO DE ESPECTROS
VOLUME 2*

2000

**SÍNTESE, PARÂMETROS LIPOFÍLICOS,
ELETRÔNICOS E CORRELAÇÕES DE
ESTRUTURA X ATIVIDADE ANTILEISHMANIA
DE 1H-PIRAZOLO[3,4-*b*]PIRIDINAS**

HELOISA DE MELLO

CADERNO DE ESPECTROS

VOLUME 2

2000

LISTA DE FIGURAS

	Página
1- Espectro de IV do 5-amino-1,3-dimetilpirazol – Pastilha de KBr.	1
2- Espectro de RMN de ^1H do 5-amino-1,3-dimetilpirazol – Solvente CDCl_3 – 200.133MHz.	2
3- Espectro de RMN de ^{13}C do 5-amino-1,3-dimetilpirazol – Solvente CDCl_3 – 50,3MHz	3
4- Espectro de IV do Acrilato de Etila – Pastilha de KBr	4
5- Espectro de RMN de ^1H do Acrilato de Etila – Solvente CDCl_3 – 200.133MHz	5
6- Espectro de RMN de ^{13}C do Acrilato de Etila – Solvente CDCl_3 – 50,3MHz.	6
7- Espectro de RMN (2D) ^1H x ^{13}C -COSY, $^1\text{J}_{\text{CH}}$ do Acrilato de Etila – Solvente CDCl_3 .	7
8- Espectro de IV da 4-cloro-pirazolopiridina – Pastilha de KBr.	8
9- Espectro de RMN de ^1H da 4-cloro-pirazolopiridina – Solvente CDCl_3 – 200.133MHz	9
10- Espectro de RMN de ^{13}C - DEPT da 4-cloro-pirazolopiridina – Solvente CDCl_3 – 50,3MHz.	10
11- Espectro de RMN (2D) ^1H x ^{13}C -COSY, $^1\text{J}_{\text{CH}}$ da 4-cloro-pirazolopiridina – Solvente CDCl_3 .	11
12- Espectro de RMN (2D) ^1H x ^{13}C -COSY, $^n\text{J}_{\text{CH}}$, n=2 ou 3 da 4-cloro-pirazolopiridina – Solv. CDCl_3	12
13- Espectro de IV de X = H – Pastilha de KBr.	13
14- Espectro de RMN de ^1H de X = H – Solvente CDCl_3 – 200.133MHz.	14
15- Espectro de RMN de ^{13}C – DEPT de X = H – Solvente CDCl_3 – 50,3MHz.	15
16- Espectro de RMN (2D) ^1H x ^1H -COSY de X = H – Solvente CDCl_3 .	16

- 17- Espectro de RMN (2D) ^1H x ^{13}C -COSY, $^1J_{\text{CH}}$ de **X = H** - Solvente CDCl_3 . 17
- 18- Espectro de RMN (2D) ^1H x ^{13}C -COSY, $^nJ_{\text{CH}}$, n=2 ou 3 de **X = H** - Solvente CDCl_3 18
- 19- Espectro de IV de **X = NO₂** - Pastilha de KBr. 19
- 20- Espectro de RMN de ^1H de **X = NO₂** - Solvente CDCl_3 - 200.133MHz. 20
- 21- Espectro de RMN de ^{13}C - DEPT de **X = NO₂** - Solvente CDCl_3 - 50,3MHz. 21
- 22- Espectro de RMN (2D) ^1H x ^1H -COSY de **X = NO₂** - Solvente CDCl_3 . 22
- 23- Espectro de RMN (2D) ^1H x ^{13}C -COSY, $^1J_{\text{CH}}$ de **X = NO₂** - Solvente CDCl_3 . 23
- 24- Espectro de RMN (2D) ^1H x ^{13}C -COSY, $^nJ_{\text{CH}}$, n=2 ou 3 de **X = NO₂** - Solvente CDCl_3 24
- 25- Espectro de IV de **X = OCH₃** - Pastilha de KBr. 25
- 26- Espectro de RMN de ^1H de **X = OCH₃** - Solvente CDCl_3 - 200.133MHz. 26
- 27- Espectro de RMN de ^{13}C - DEPT de **X = OCH₃** - Solvente CDCl_3 - 50,3MHz 27
- 28- Espectro de RMN (2D) ^1H x ^1H -COSY de **X = OCH₃** - Solvente CDCl_3 . 28
- 29- Espectro de RMN (2D) ^1H x ^{13}C -COSY, $^1J_{\text{CH}}$ de **X = OCH₃** - Solvente CDCl_3 . 29
- 30- Espectro de RMN (2D) ^1H x ^{13}C -COSY, $^nJ_{\text{CH}}$, n=2 ou 3 de **X = OCH₃** - Solvente CDCl_3 30
- 31- Espectro de IV de **X = CH₃** - Pastilha de KBr. 31
- 32- Espectro de RMN de ^1H de **X = CH₃** - Solvente DMSO-d_6 - 200.133MHz.35 32

- 33- Espectro de RMN de ^{13}C – DEPT de $\mathbf{X} = \text{CH}_3$ – Solvente DMSO- d_6 – 50,3MHz. 33
- 34- Espectro de RMN (2D) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -COSY, $^1J_{\text{CH}}$ de $\mathbf{X} = \text{CH}_3$ - δ de 15 a 40ppm – Solvente DMSO- d_6 . 34
- 35- Espectro de RMN (2D) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -COSY, $^1J_{\text{CH}}$ de $\mathbf{X} = \text{CH}_3$ - δ de 20a 150ppm – Solvente DMSO- d_6 . 35
- 36- Espectro de RMN (2D) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -COSY, $^nJ_{\text{CH}}$, $n=2$ ou 3 de $\mathbf{X} = \text{CH}_3$ - δ de 124 a 150ppm - Solvente DMSO- d_6 . 36
- 37- Espectro de RMN (2D) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -COSY, $^nJ_{\text{CH}}$, $n=2$ ou 3 de $\mathbf{X} = \text{CH}_3$ - δ de 105 a 160ppm - Solvente DMSO- d_6 . 37
- 38- Espectro de IV de $\mathbf{X} = \text{NO}_2$ – Pastilha de KBr. 38
- 39- Espectro de RMN de ^1H de $\mathbf{X} = \text{NO}_2$ – Solvente CDCl_3 – 200.133MHz. 39
- 40- Espectro de RMN de ^{13}C – DEPT de $\mathbf{X} = \text{NO}_2$ – Solvente CDCl_3 – 50,3MHz. 40
- 41- Espectro de RMN (2D) $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ -COSY de $\mathbf{X} = \text{NO}_2$ – Solvente CDCl_3 . 41
- 42- Espectro de RMN (2D) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -COSY, $^1J_{\text{CH}}$ de $\mathbf{X} = \text{NO}_2$ – Solvente CDCl_3 . 40
- 43- Espectro de RMN (2D) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -COSY, $^nJ_{\text{CH}}$, $n=2$ ou 3 de $\mathbf{X} = \text{NO}_2$ - Solvente CDCl_3 41
- 44- Espectro de IV de $\mathbf{X} = \text{OCH}_3$ – Pastilha de KBr. 42
- 45- Espectro de RMN de ^1H de $\mathbf{X} = \text{OCH}_3$ – Solvente CDCl_3 – 200.133MHz. 43
- 46- Espectro de RMN de ^{13}C – DEPT de $\mathbf{X} = \text{OCH}_3$ – Solvente CDCl_3 – 50,3MHz. 43
- 47- Espectro de RMN (2D) $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ -COSY de $\mathbf{X} = \text{OCH}_3$ – Solvente CDCl_3 . 44

- 48- Espectro de RMN (2D) ^1H x ^{13}C -COSY, $^1J_{\text{CH}}$ de **X** = **OCH₃** – 45
Solvente CDCl_3 .
- 49- Espectro de RMN (2D) ^1H x ^{13}C -COSY, $^nJ_{\text{CH}}$ n=2 ou 3 de **X** = **OCH₃** 46
– Solvente CDCl_3 .
- 50- Espectro de IV de **X** = **Br** – Pastilha de KBr. 47
- 51- Espectro de RMN de ^1H de **X** = **Br** – Solvente CDCl_3 – 48
200.133MHz.
- 52- Espectro de RMN de ^{13}C – DEPT de **X** = **Br** – Solvente CDCl_3 – 52
50,3MHz.
- 53- Espectro de RMN (2D) ^1H x ^1H -COSY de **X** = **Br** – Solvente CDCl_3 . 53
- 54- Espectro de RMN (2D) ^1H x ^{13}C -COSY, $^1J_{\text{CH}}$ de **X** = **Br** – Solvente 54
 CDCl_3 .
- 55- Espectro de RMN (2D) ^1H x ^{13}C -COSY, $^nJ_{\text{CH}}$ n=2 ou 3 de **X** = **Br** – 55
Solvente CDCl_3 .
- 56- Espectro de IV de **X** = **F** – Pastilha de KBr. 56
- 57- Espectro de RMN de ^1H de **X** = **F** – Solvente CDCl_3 – 200.133MHz. 57
- 58- Espectro de RMN de ^{13}C – DEPT de **X** = **F** – Solvente CDCl_3 – 58
50,3MHz.
- 59- Espectro de RMN (2D) ^1H x ^1H -COSY de **X** = **F** – Solvente CDCl_3 . 59
- 60- Espectro de RMN (2D) ^1H x ^{13}C -COSY, $^1J_{\text{CH}}$ de **X** = **F** – Solvente 60
 CDCl_3 – 299,95 MHz
- 61- Espectro de RMN (2D) ^1H x ^{13}C -COSY, $^nJ_{\text{CH}}$ n=2 ou 3 de **X** = **F** – 61
Solvente CDCl_3 .
- 62- Espectro de IV de **X** = **CH₃** – Pastilha de KBr. 62
- 63- Espectro de RMN de ^1H de **X** = **CH₃** – Solvente DMSO-d_6 – 63
200.133MHz.
- 64- Espectro de RMN de ^{13}C – DEPT de **X** = **CH₃** – Solvente DMSO-d_6 – 64
50,3MHz.

- 65- Espectro de IV de **X = Cl** – Pastilha de KBr. 65
- 66- Espectro de RMN de ^1H de **X = Cl** – Solvente CDCl_3 – 200.133MHz. 66
- 67- Espectro de RMN de ^{13}C – DEPT de **X = Cl** – Solvente CDCl_3 – 50,3MHz. 67
- 68- Espectro de RMN (2D) ^1H x ^{13}C -COSY, $^1\text{J}_{\text{CH}}$ de **X = Cl** – Solvente CDCl_3 . 68
- 69- Espectro de RMN (2D) ^1H x ^{13}C -COSY, $^n\text{J}_{\text{CH}}$ n =2 ou 3 de **X = Cl** – Solvente CDCl_3 . 69
- 70- Espectro de IV de **X = Cl** – Pastilha de KBr. 70
- 71- Espectro de RMN de ^1H de **X = Cl** Solvente DMSO-d_6 – 299.95 MHz. 71
- 72- Espectro de RMN de ^{13}C de **X = Cl** – Solvente DMSO-d_6 – 50,3MHz. 72
- 73- Espectro de RMN (2D) ^1H x ^{13}C -COSY, $^1\text{J}_{\text{CH}}$ de **X = Cl** – Solvente DMSO-d_6 . 73
- 74- Espectro de RMN (2D) ^1H x ^{13}C -COSY, $^n\text{J}_{\text{CH}}$ n =2 ou 3 de **X = Cl** – Solvente DMSO-d_6 74
- 75- Espectro de IV de **X = OH** – Pastilha de KBr. 75
- 76- Espectro de RMN de ^1H de **X = OH** – Solvente DMSO-d_6 – 200.133MHz. 76
- 77- Espectro de RMN de ^{13}C – DEPT de **X = OH** – Solvente DMSO-d_6 – 50,3MHz. 77
- 78- Espectro de RMN (2D) ^1H x ^1H -COSY de **X = OH** – Solvente DMSO-d_6 . 78
- 79- Espectro de RMN (2D) ^1H x ^{13}C -COSY, $^1\text{J}_{\text{CH}}$ de **X = OH** – Solvente DMSO-d_6 . 79
- 80- Espectro de RMN (2D) ^1H x ^{13}C -COSY, $^n\text{J}_{\text{CH}}$ n =2 ou 3 de **X = OH** – Solvente DMSO-d_6 . 80

- 81-** Espectro de IV de **X = OAc** – Pastilha de KBr. 81
- 82-** Espectro de RMN de ^1H de **X = OAc** – Solvente CDCl_3 – 200.133MHz. 82
- 83-** Espectro de RMN de ^{13}C de **X = OAc** – Solvente CDCl_3 – 50,3MHz. 83
- 84-** Espectro de RMN (2D) ^1H x ^{13}C -COSY, $^1\text{J}_{\text{CH}}$ de **X = OAc** – Solvente DMSO-d_6 . 84
- 85-** Espectro de RMN (2D) ^1H x ^{13}C -COSY, $^n\text{J}_{\text{CH}}$ n =2 ou 3 de **X = OAc** – Solvente DMSO-d_6 . 85

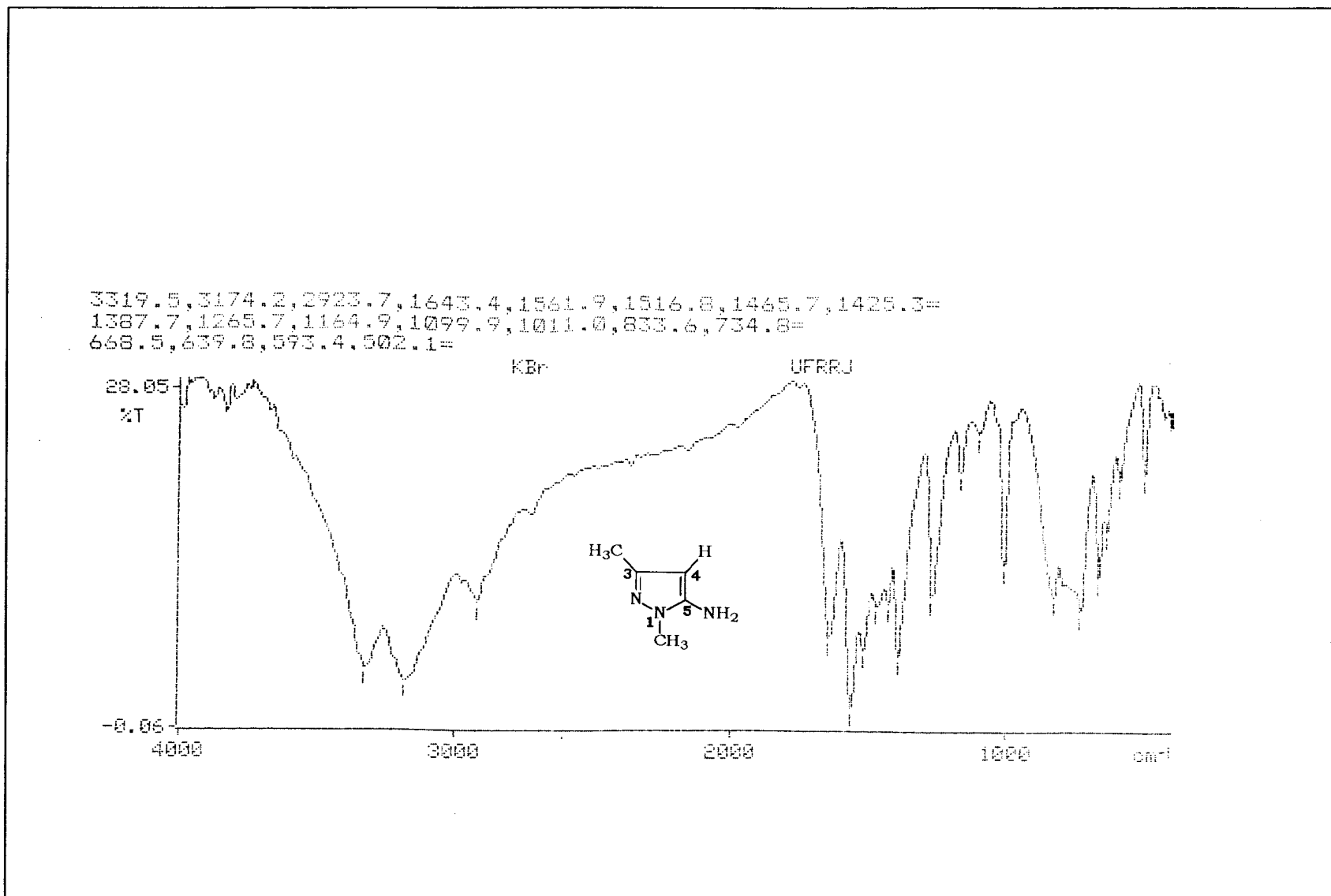


Figura 1: Espectro de IV do **5-amino-1,3-dimetilpirazol** – Pastilha de KBr.

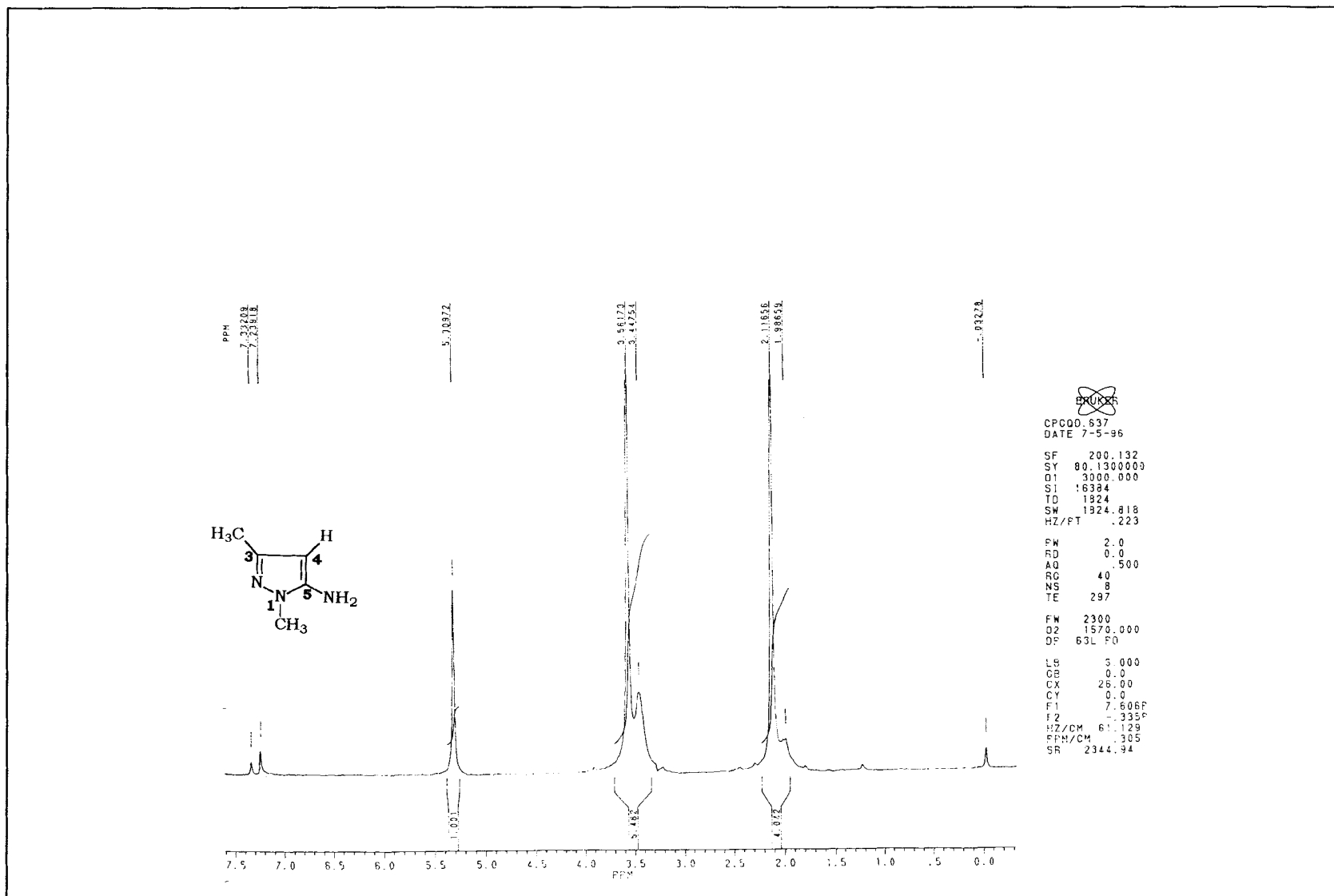


Figura 2: Espectro de RMN de ¹H do **5-amino-1,3-dimetilpirazol** – Solvente CDCl₃ – 200.133MHz.

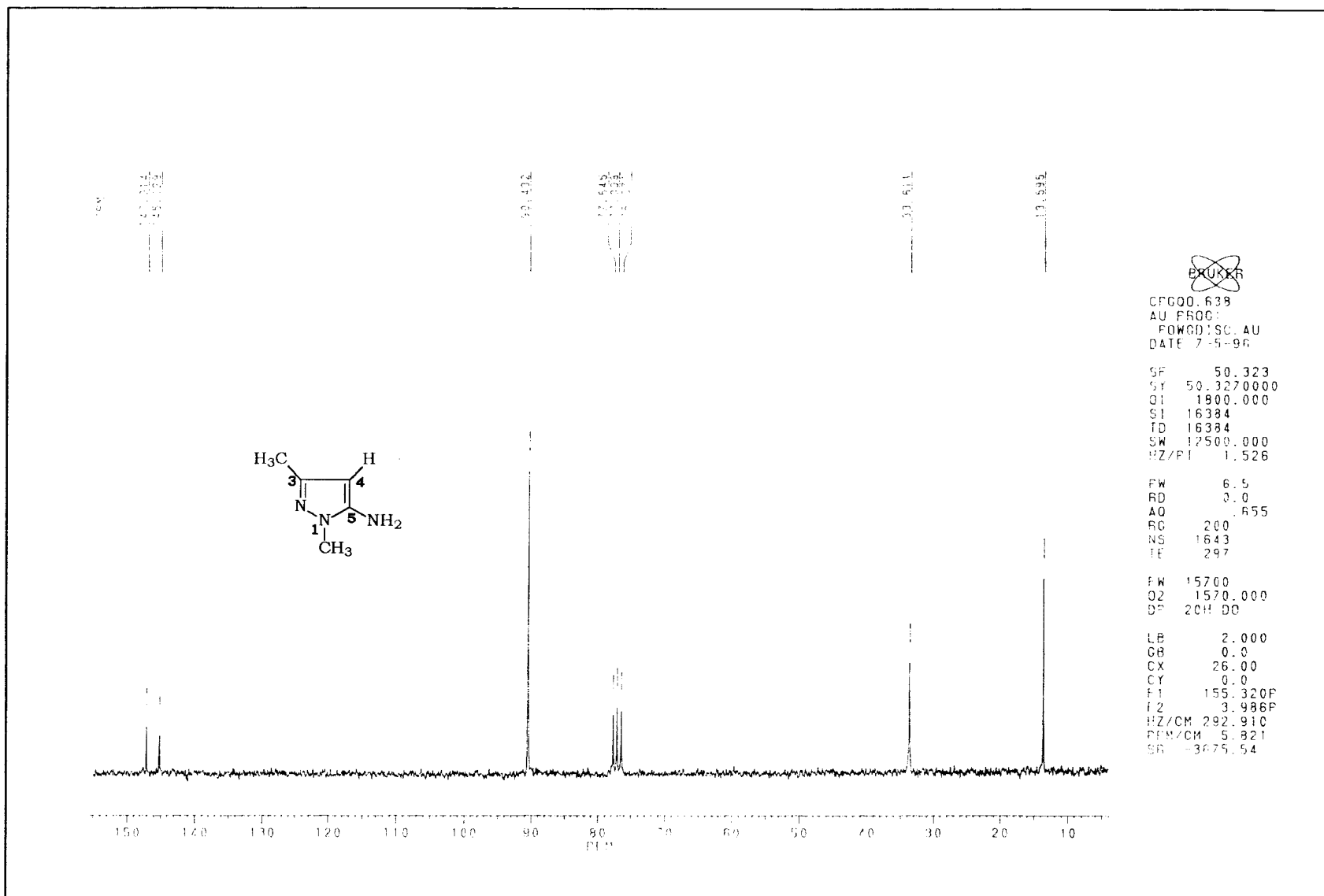


Figura 3: Espectro de RMN de ¹³C do **5-amino-1,3-dimetilpirazol** – Solvente CDCl₃ – 50,3MHz.

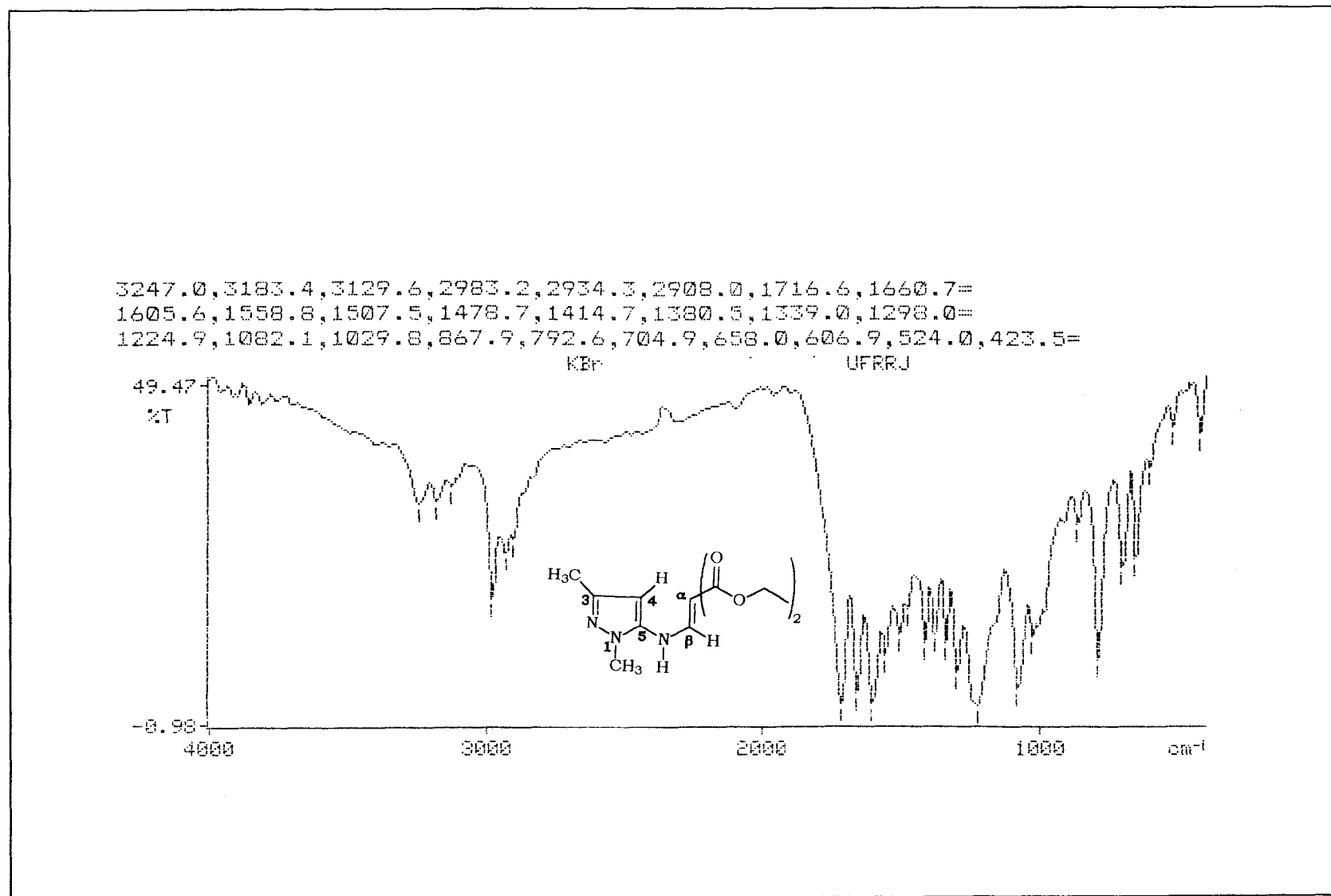


Figura 4: Espectro de IV do **Acrilato de Etila** – Pastilha de KBr.

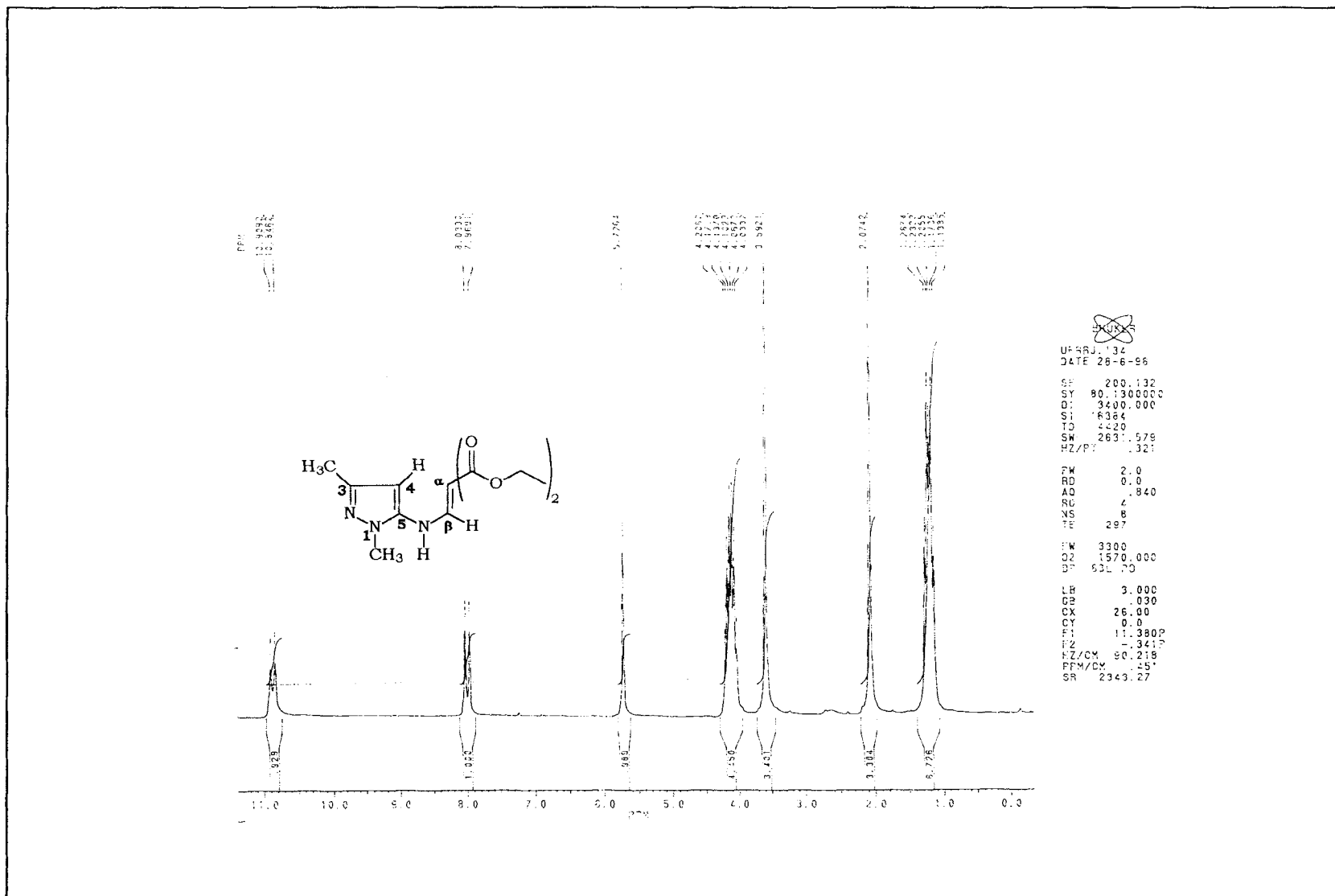


Figura 5: Espectro de RMN de ¹H do **Acrialto de Etila** – Solvente CDCl₃ – 200.133MHz.

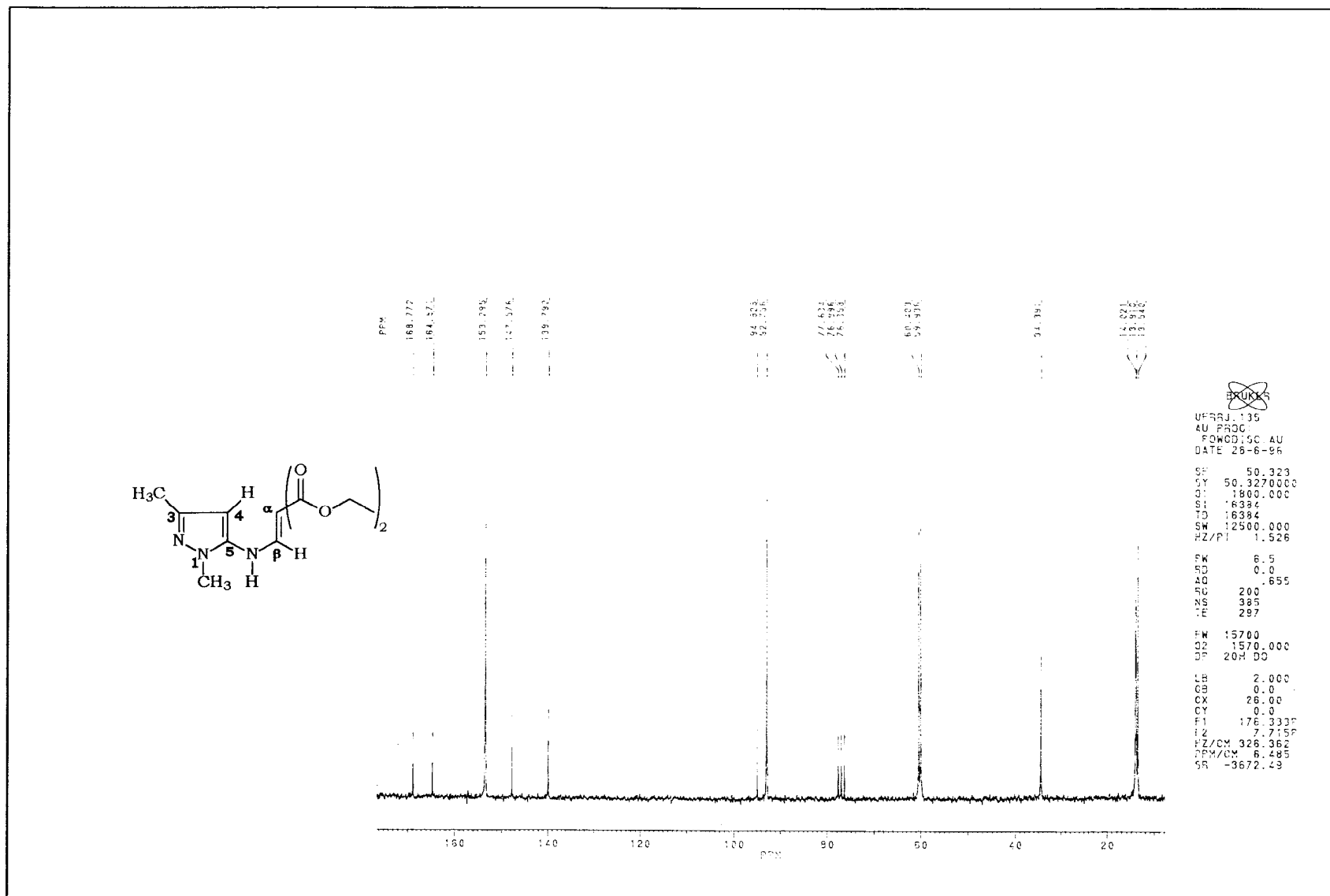


Figura 6: Espectro de RMN de ¹³C do **Acrilato de Etila** – Solvente CDCl₃ – 50,3MHz.

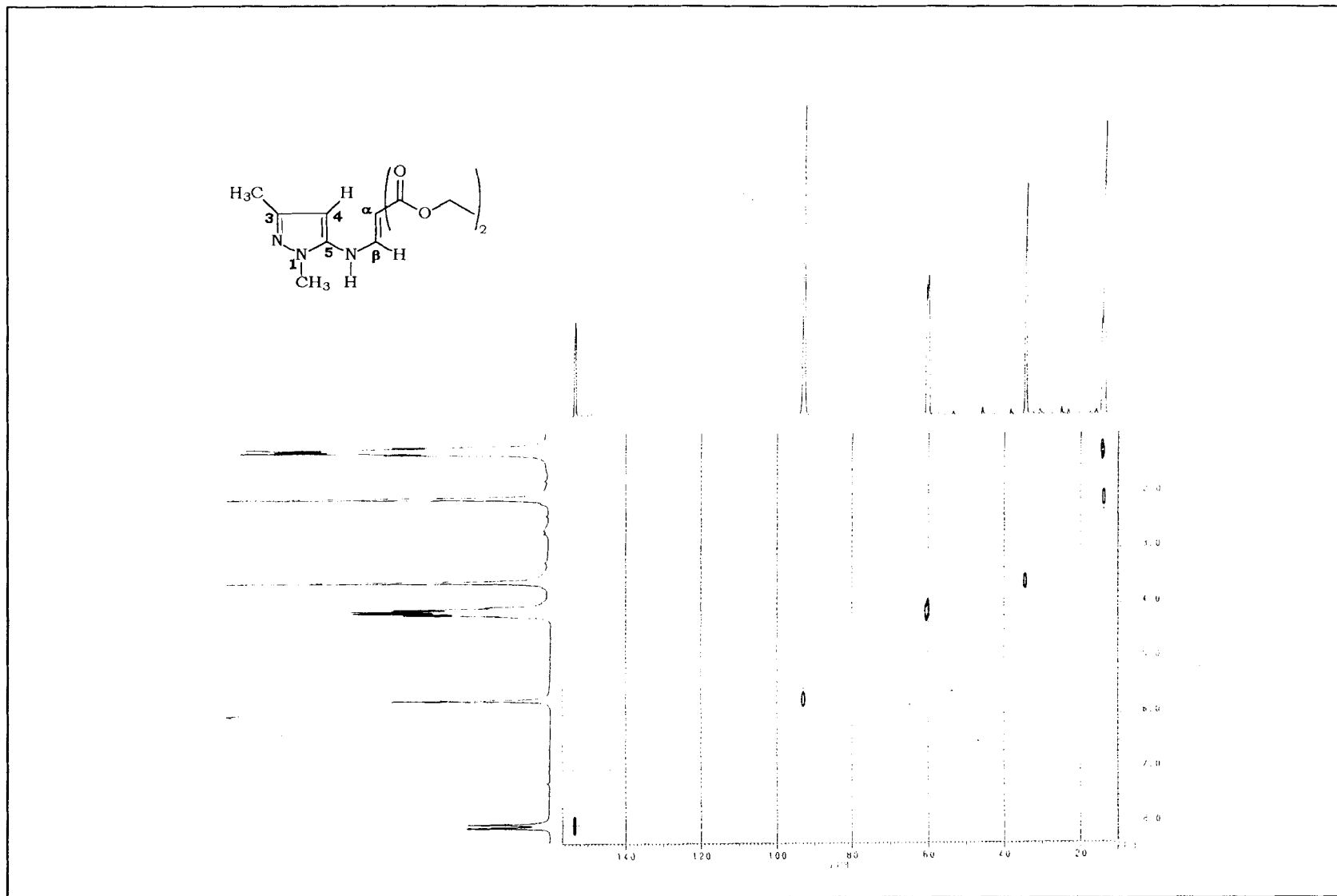


Figura 7: Espectro de RMN (2D) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -COSY, $^1\text{J}_{\text{CH}}$ do **Acrilato de Etila** – Solvente CDCl_3 .

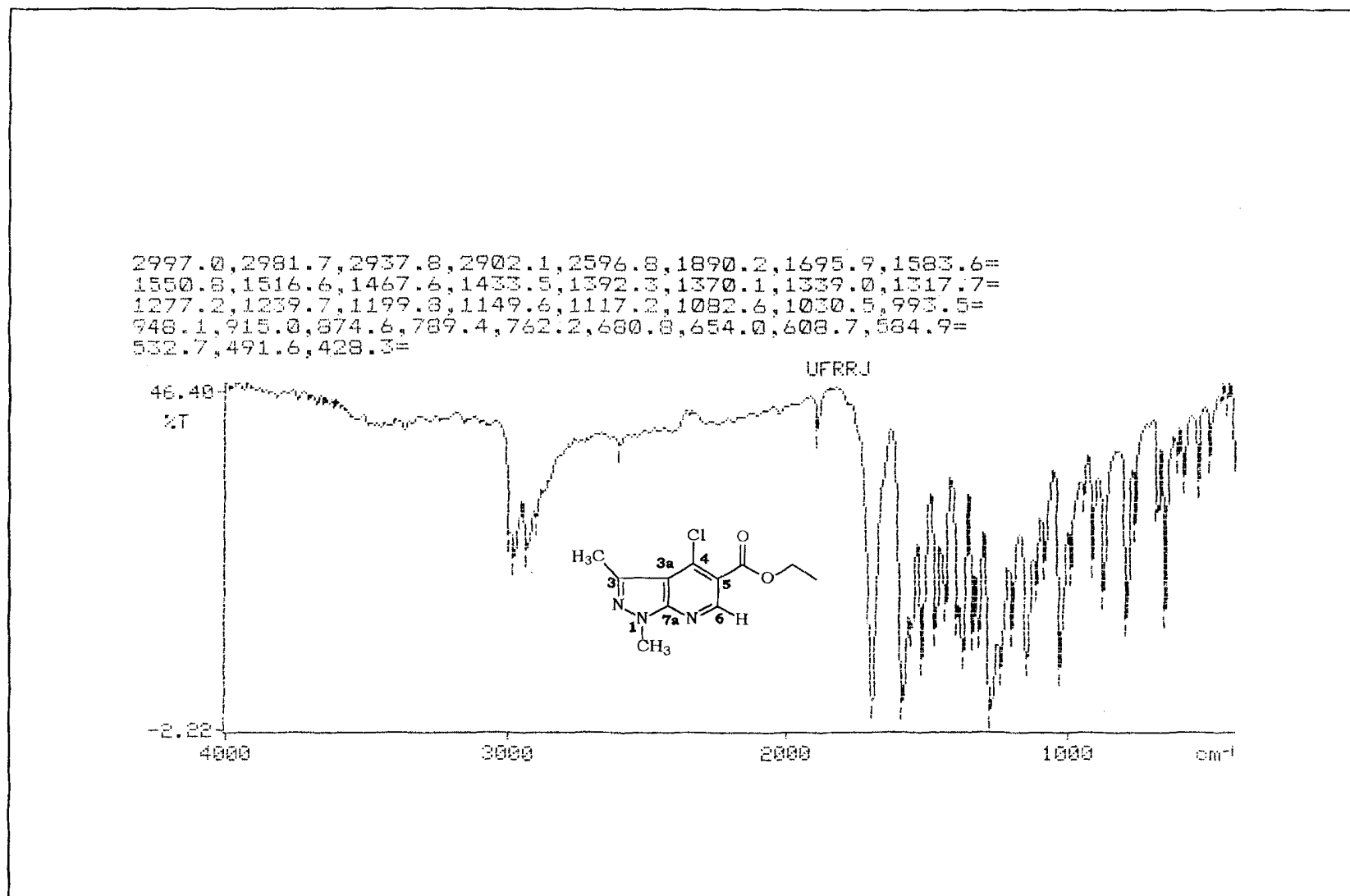


Figura 8: Espectro de IV da **4-cloro-pirazolopiridina** – Pastilha de KBr.

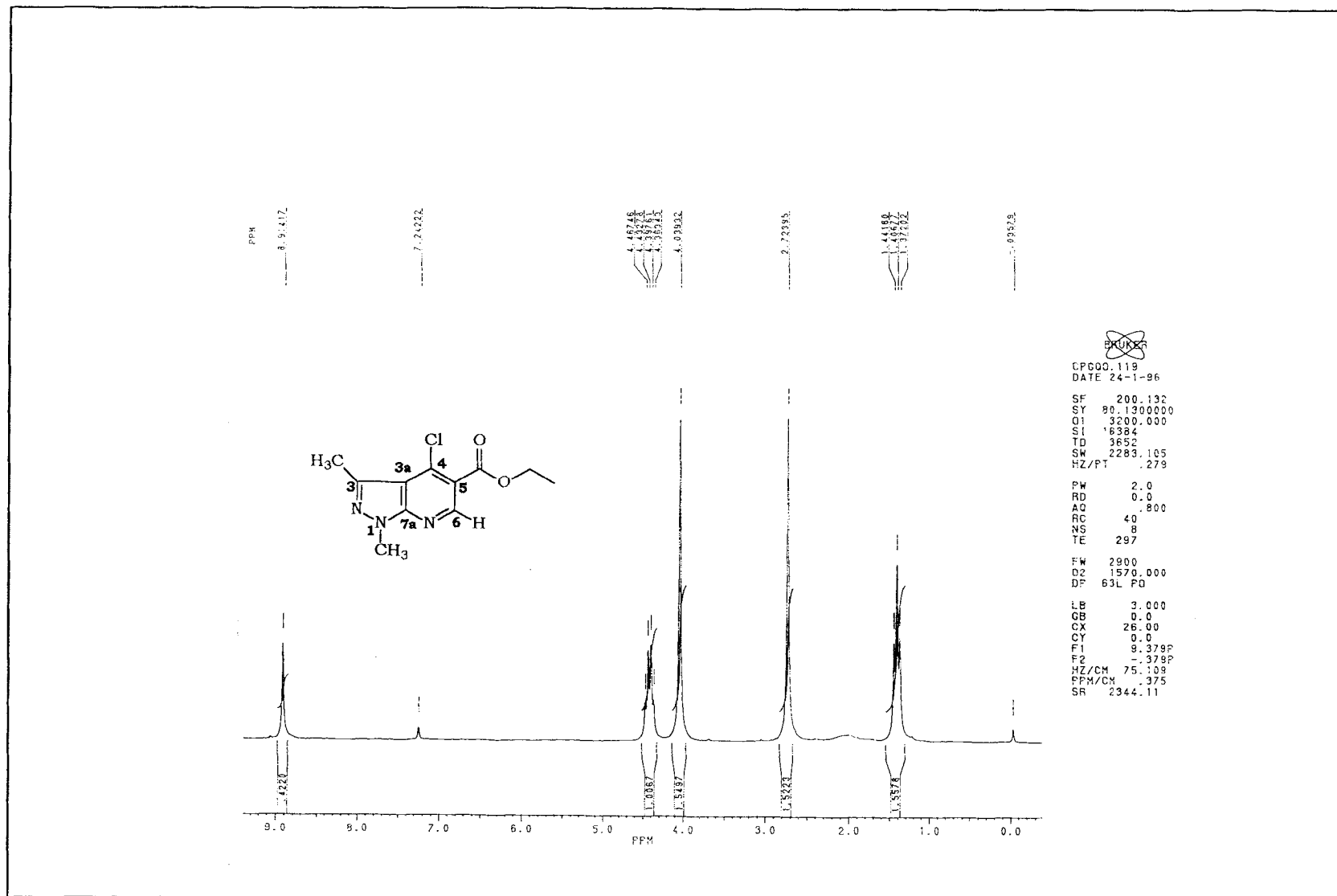


Figura 9: Espectro de RMN de ^1H da **4-cloro-pirazolopiridina** – Solvente CDCl_3 – 200.133MHz

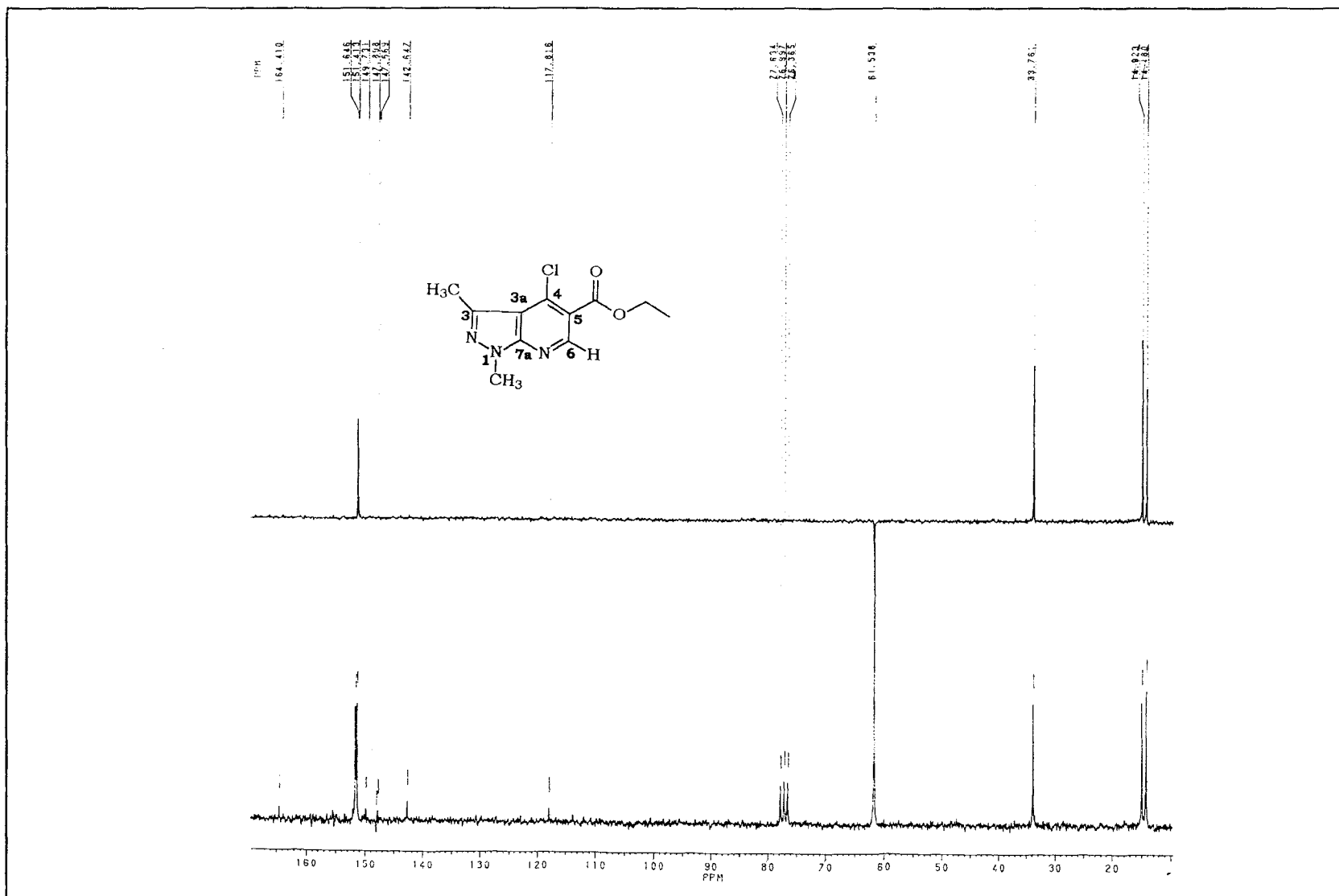


Figura 10: Espectro de RMN de ¹³C - DEPT da **4-cloro-pirazolopiridina** – Solvente CDCl₃ – 50,3MHz.

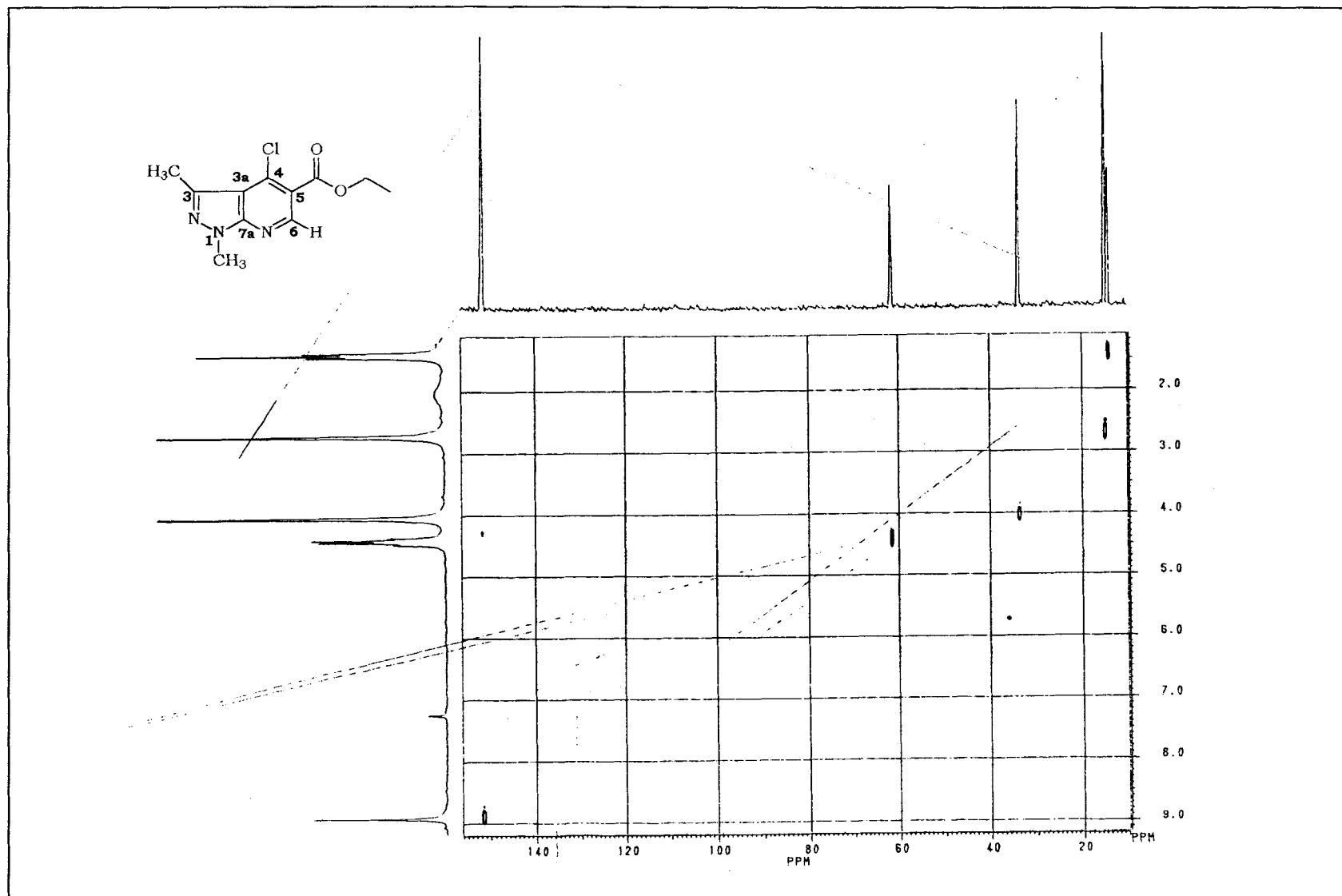


Figura 11: Espectro de RMN (2D) $^1\text{H}\times^{13}\text{C}$ -COSY, $^1\text{J}_{\text{CH}}$ da **4-cloro-pirazolopiridina** – Solvente CDCl_3 .

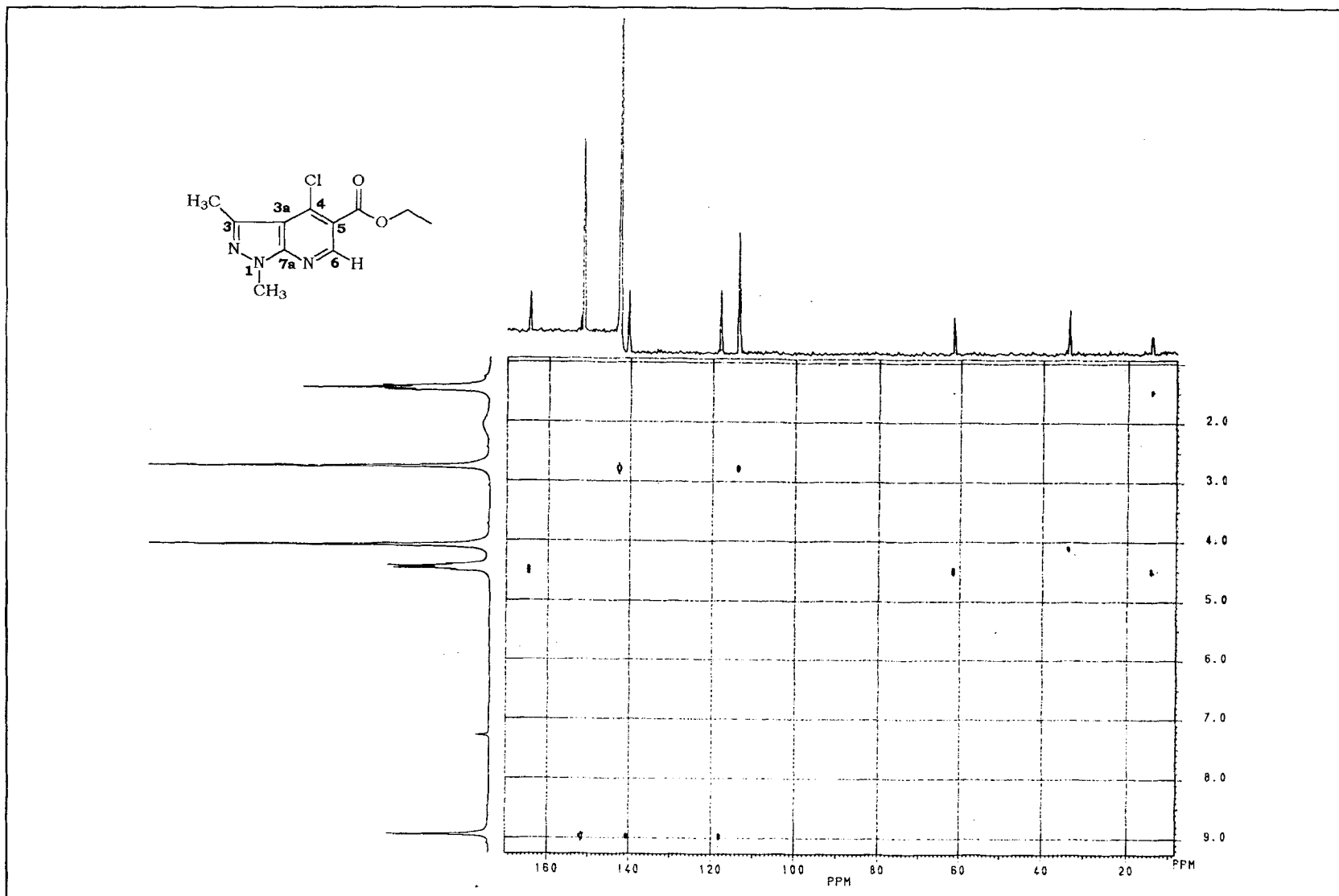


Figura 12: Espectro de RMN (2D) $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -COSY, $^n\text{J}_{\text{CH}}$, $n=2$ ou 3 da **4-cloro-pirazolopiridina** - Solv. CDCl_3

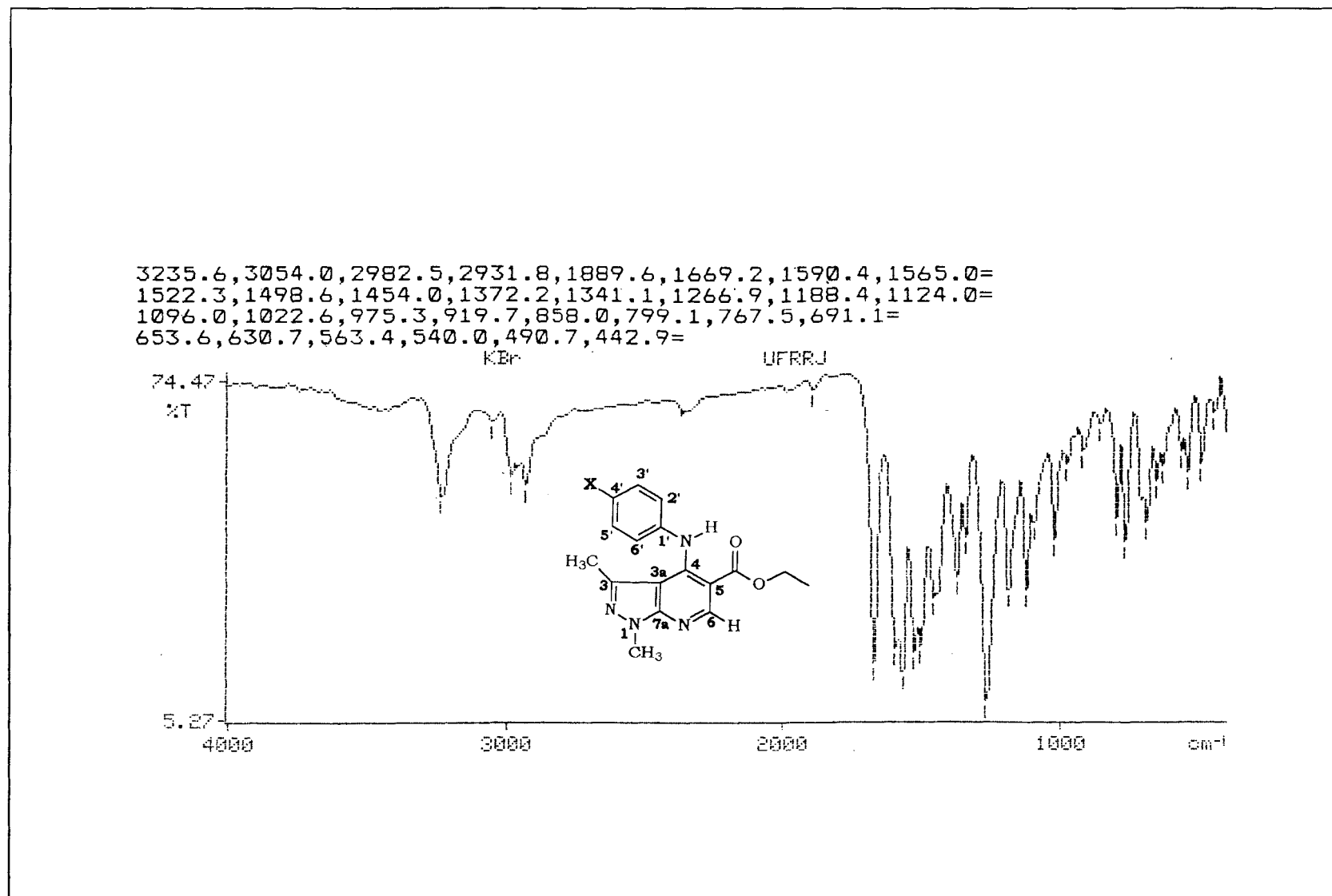


Figura 13: Espectro de IV de **X = H** – Pastilha de KBr.

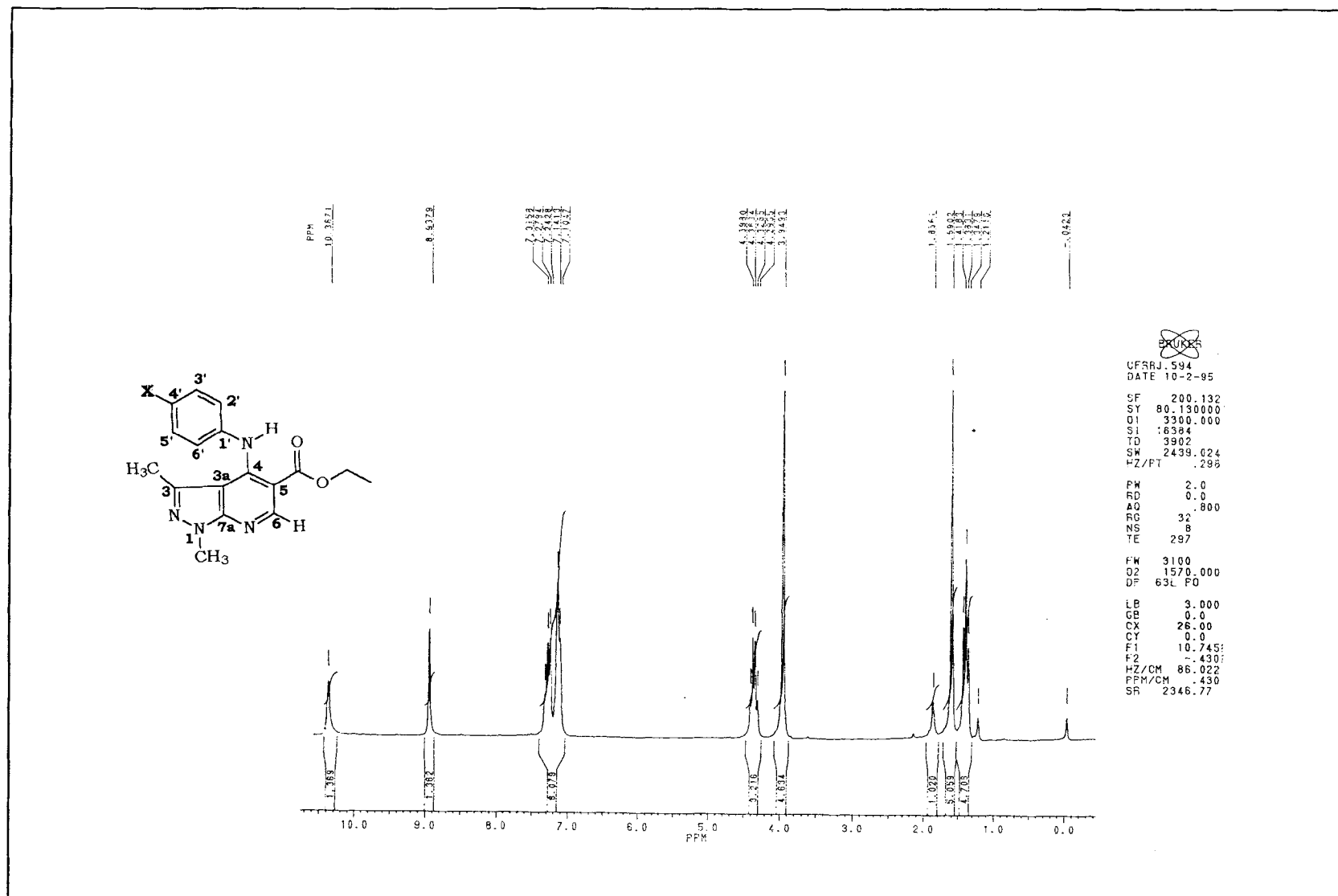


Figura 14: Espectro de RMN de ¹H de **X = H** – Solvente **CDCl₃** – 200.133MHz.

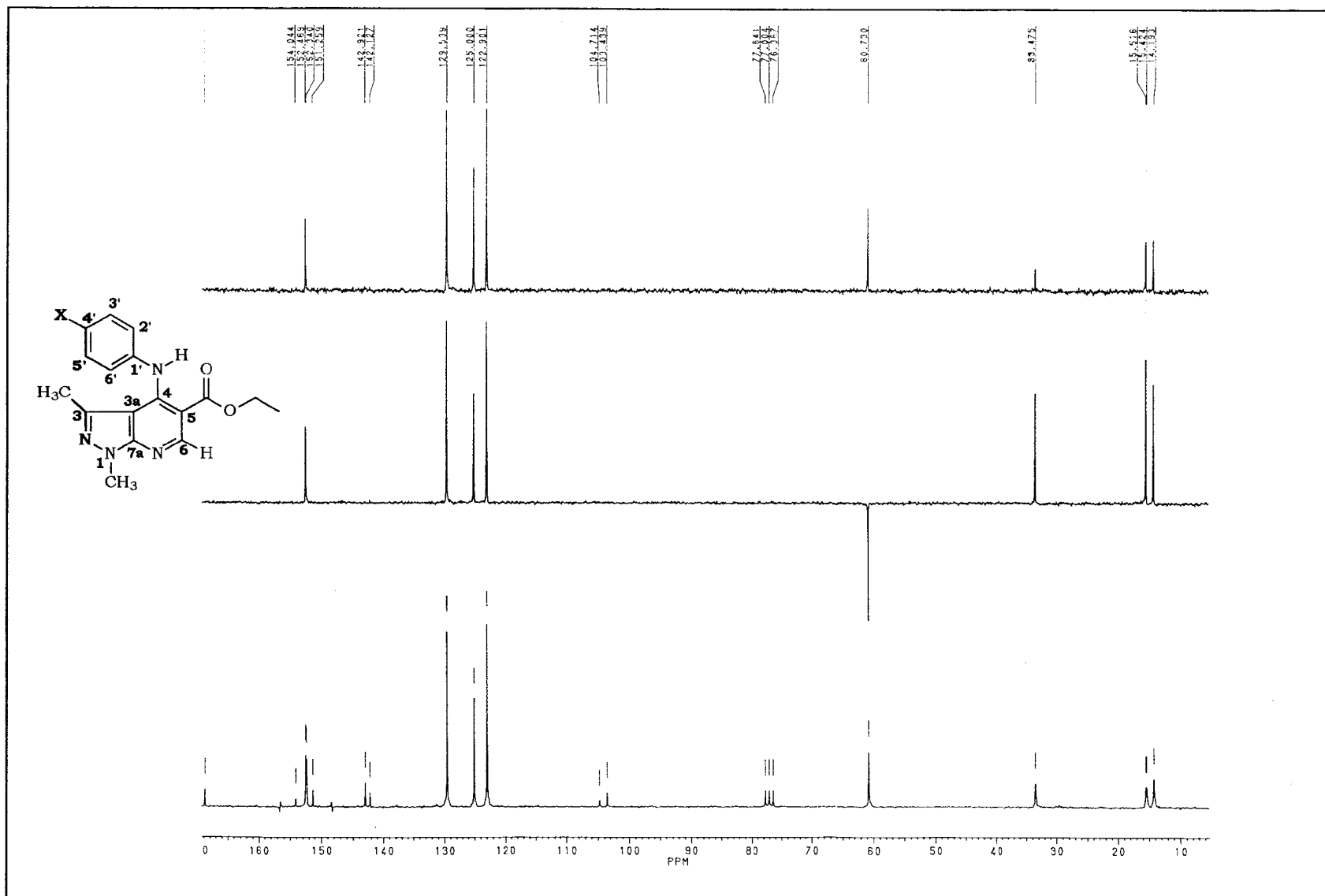


Figura 15: Espectro de RMN de ¹³C – DEPT de **X = H** – Solvente CDCl₃ – 50,3MHz.

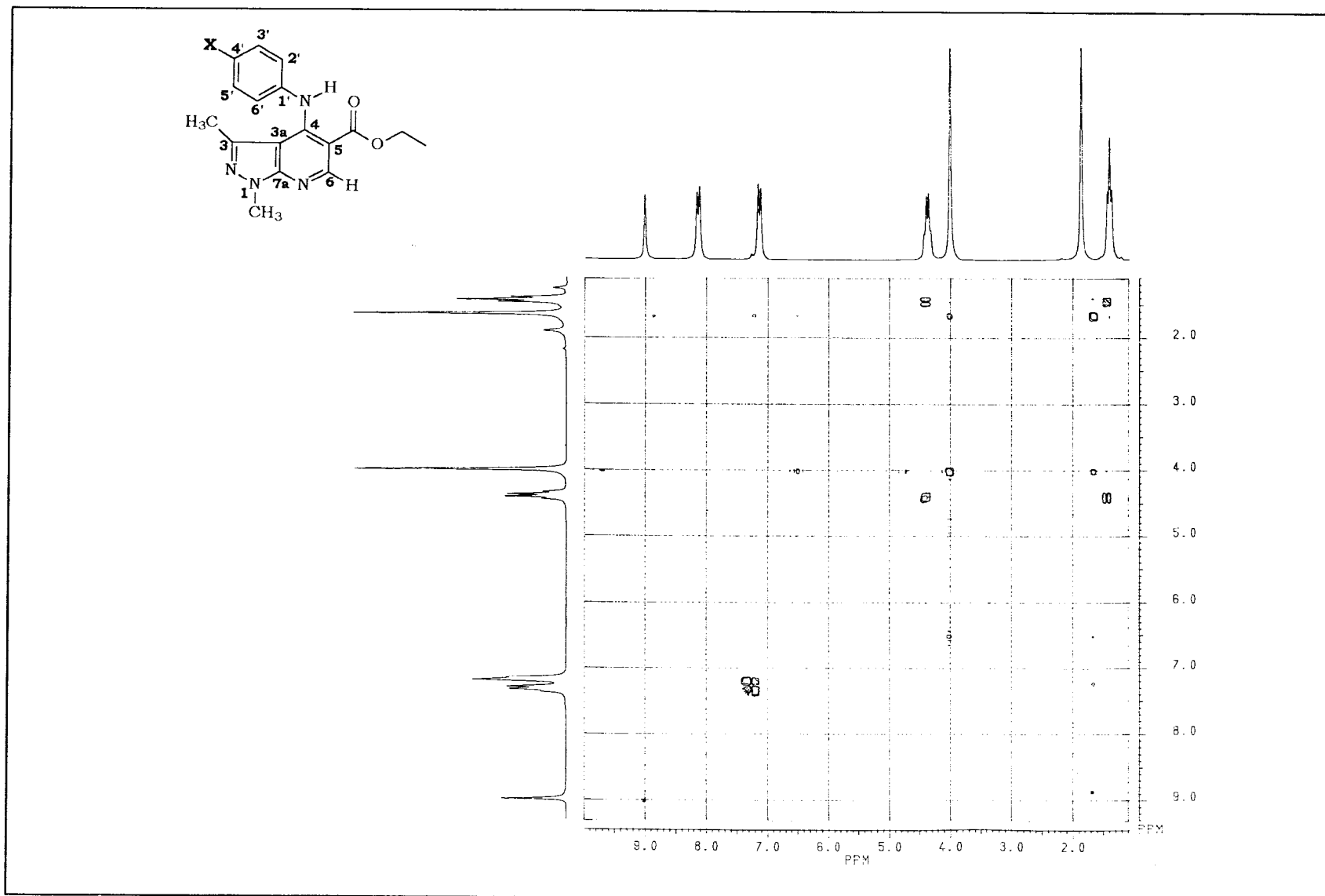


Figura 16: Espectro de RMN (2D) $^1\text{H}\times^1\text{H}$ -COSY de **X = H** – Solvente CDCl_3 .

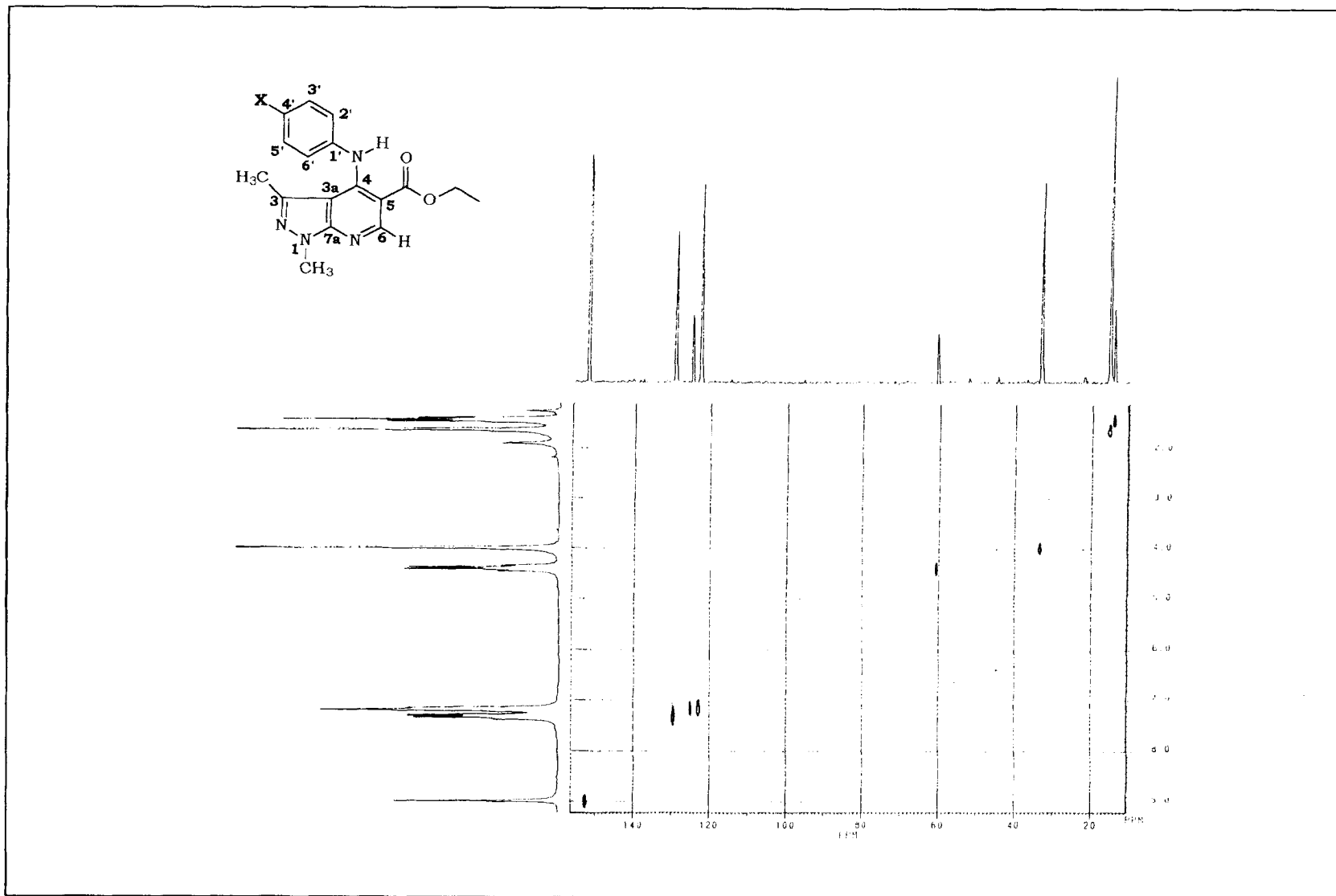


Figura 17: Espectro de RMN (2D) $^1\text{H}\times^{13}\text{C}$ -COSY, $^1\text{J}_{\text{CH}}$ de $\mathbf{X} = \mathbf{H}$ – Solvente CDCl_3 .

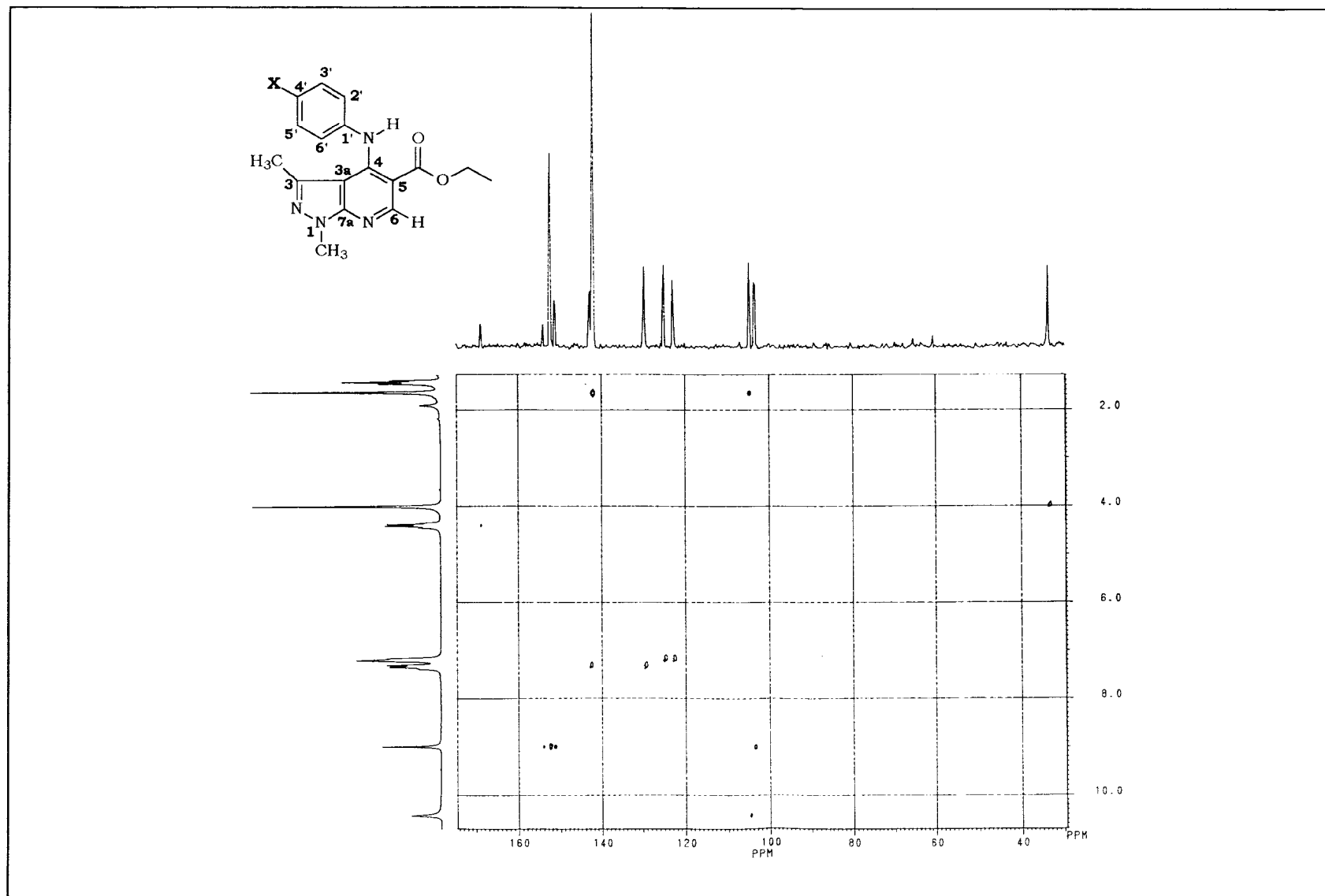


Figura 18: Espectro de RMN (2D) $^1\text{H}\text{X}^{13}\text{C}$ -COSY, $^n\text{J}_{\text{CH}}$, $n=2$ ou 3 de **X = H** – Solvente CDCl_3

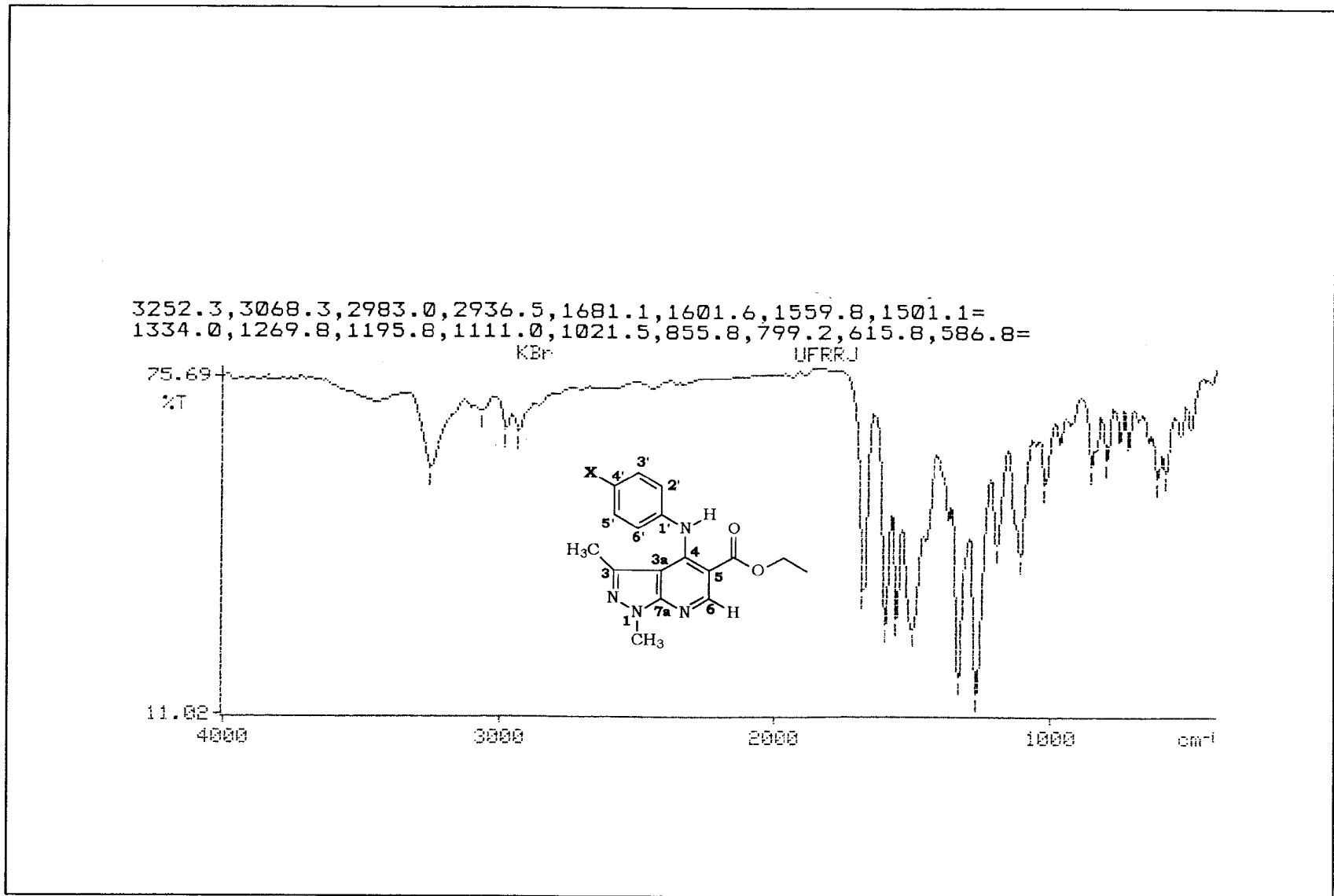


Figura 19: Espectro de IV de **X = NO₂** - Pastilha de KBr.

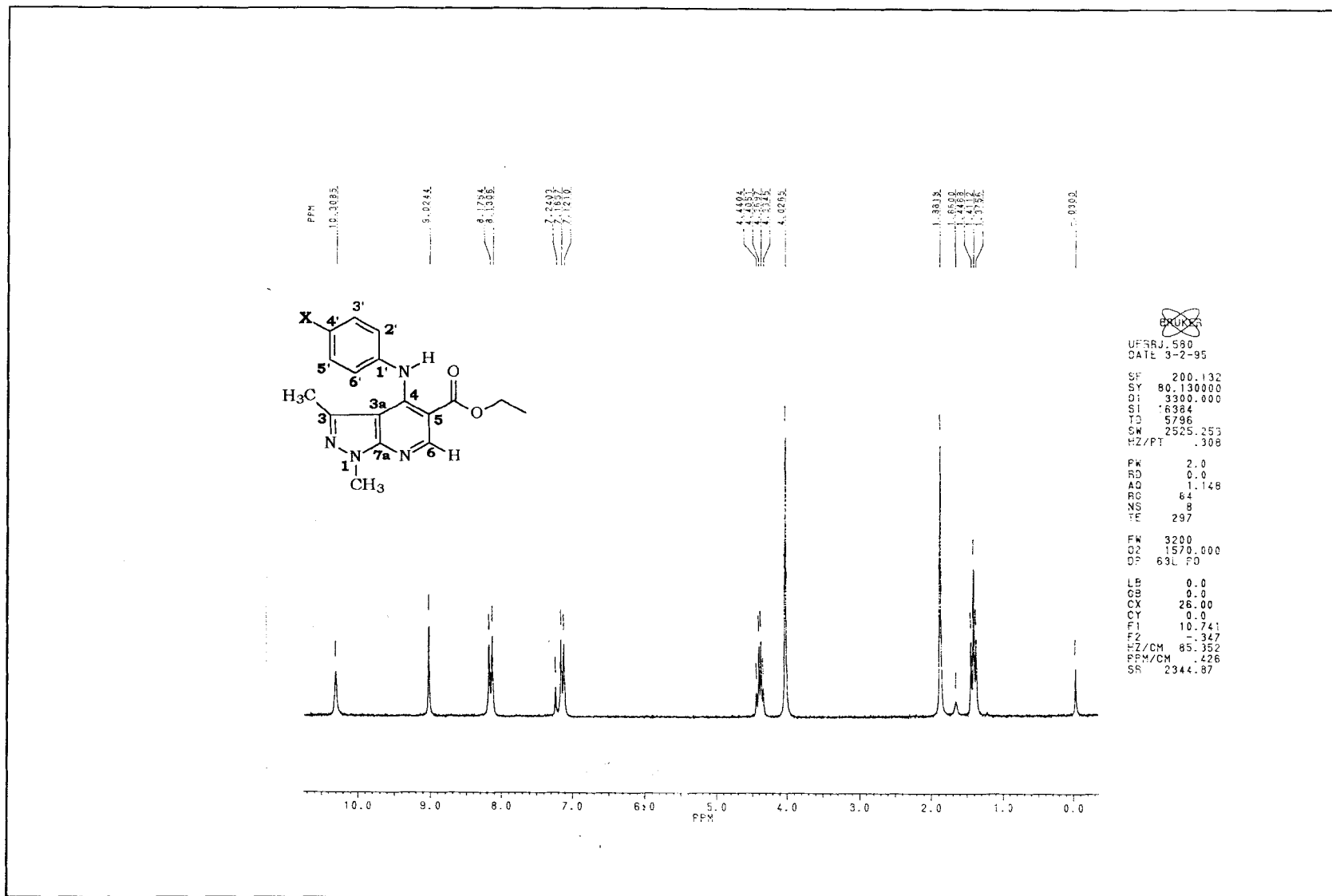


Figura 20: Espectro de RMN de ¹H de **X** = NO₂ – Solvente CDCl₃ – 200.133MHz.

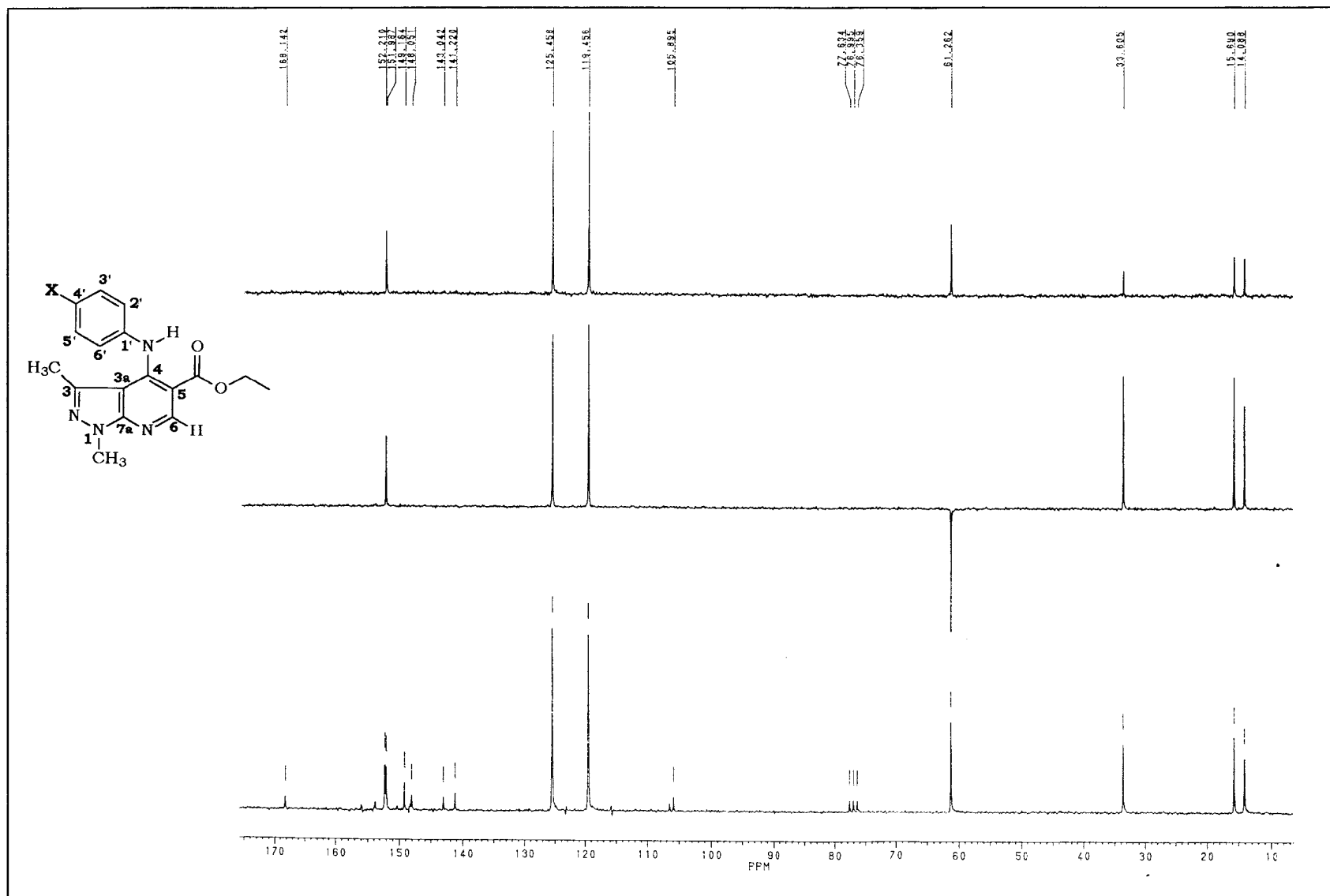


Figura 21: Espectro de RMN de ^{13}C – DEPT de $\text{X} = \text{NO}_2$ – Solvente CDCl_3 – 50,3MHz.

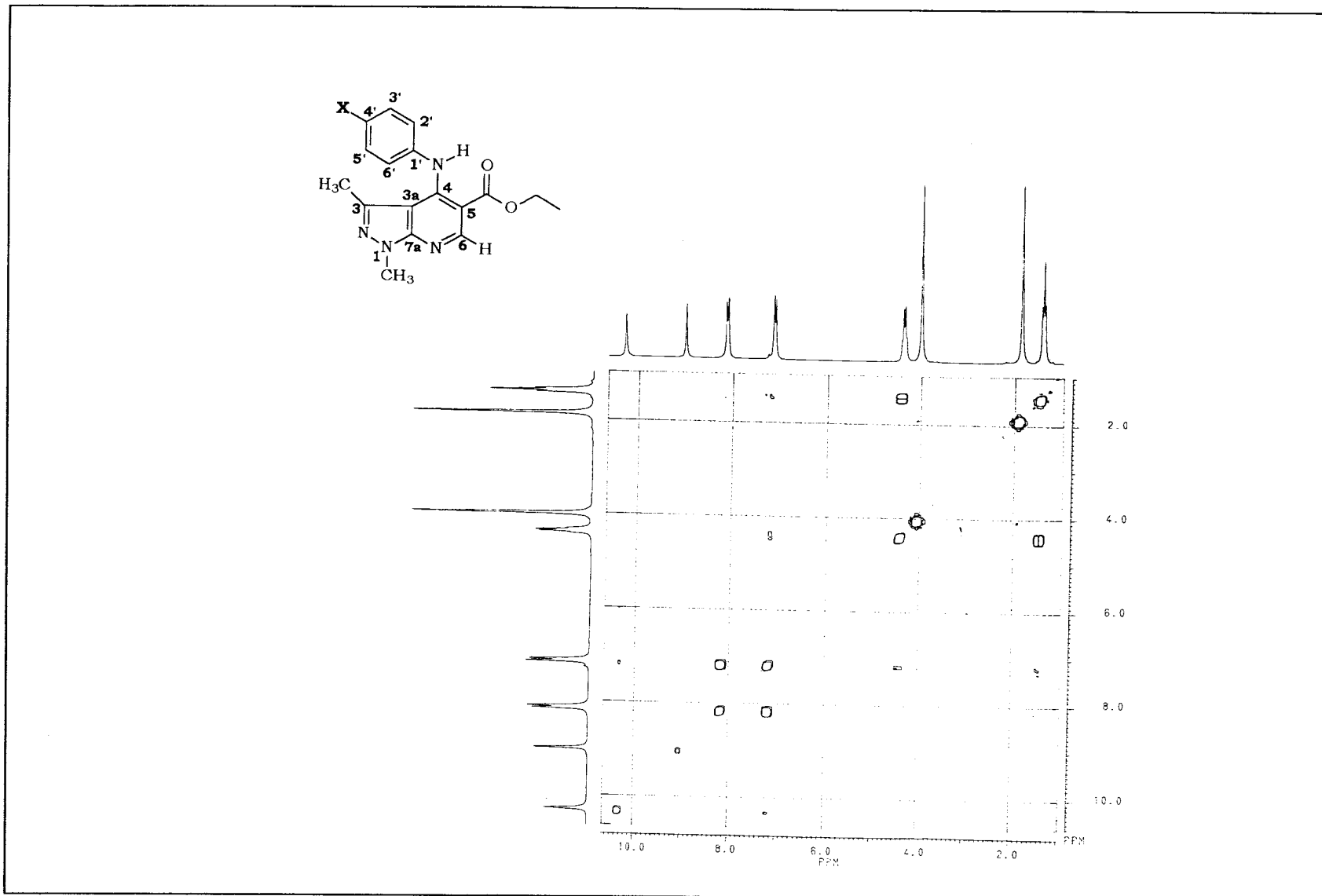


Figura 22: Espectro de RMN (2D) $^1\text{H}\times^1\text{H}$ -COSY de **X** = **NO₂** – Solvente CDCl_3 .

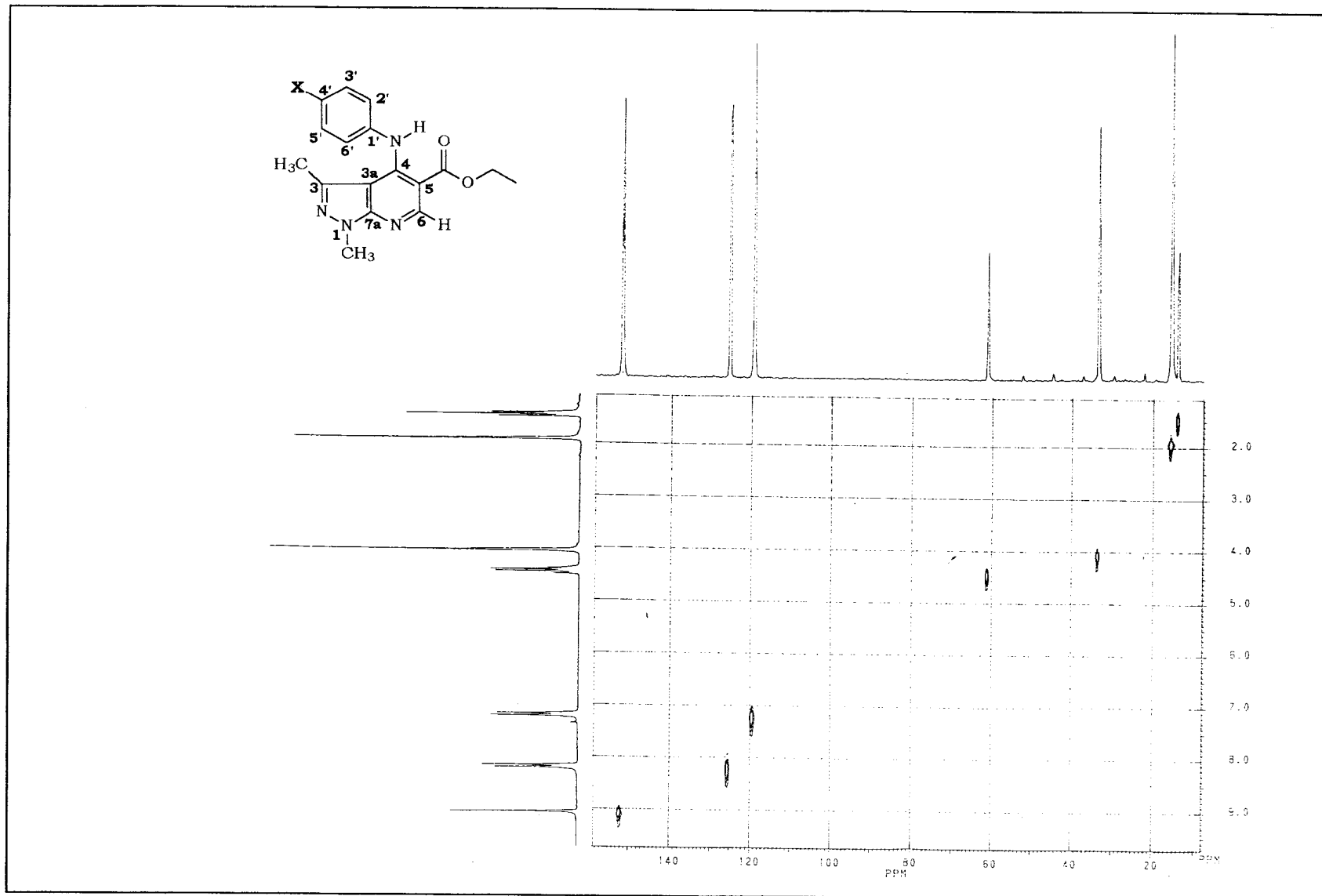


Figura 23: Espectro de RMN (2D) $^1\text{H}\times^{13}\text{C}$ -COSY, $^1\text{J}_{\text{CH}}$ de **X** = **NO₂** – Solvente CDCl_3 .

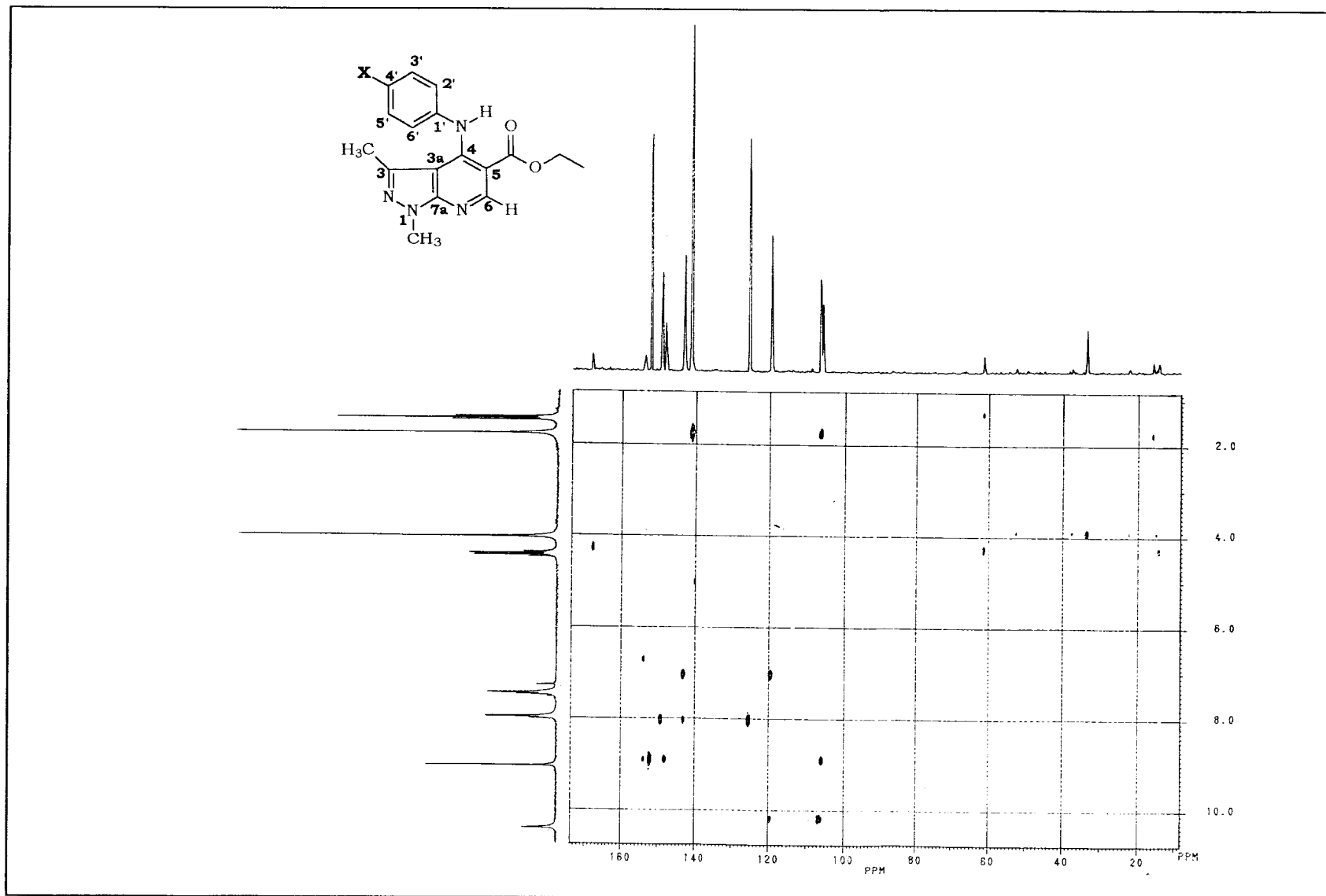


Figura 24: Espectro de RMN (2D) ^1H ^{13}C -COSY, $^n\text{J}_{\text{CH}}$, $n=2$ ou 3 de **X = NO₂** – Solvente CDCl_3

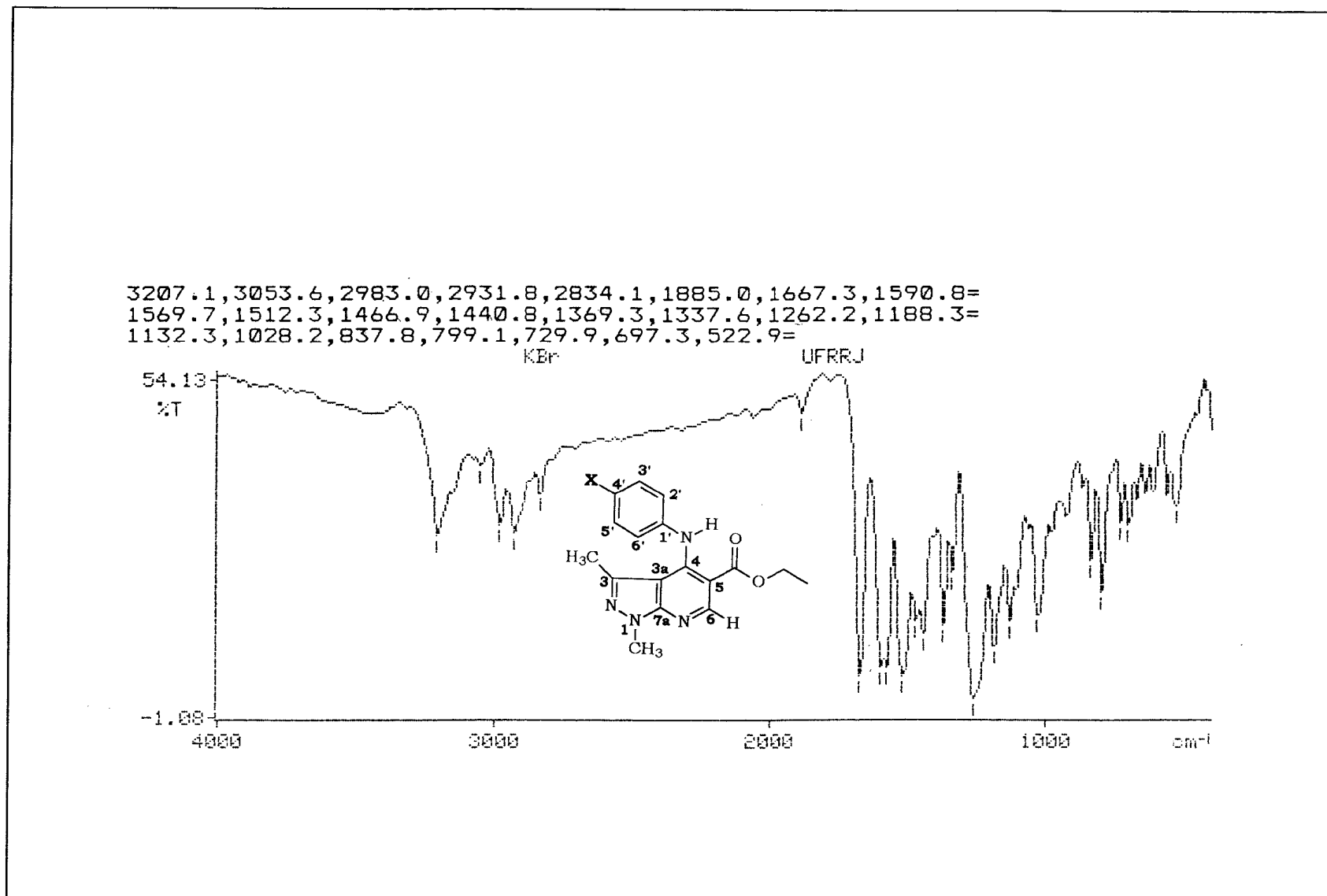


Figura 25: Espectro de IV de **X = OCH₃** – Pastilha de KBr.

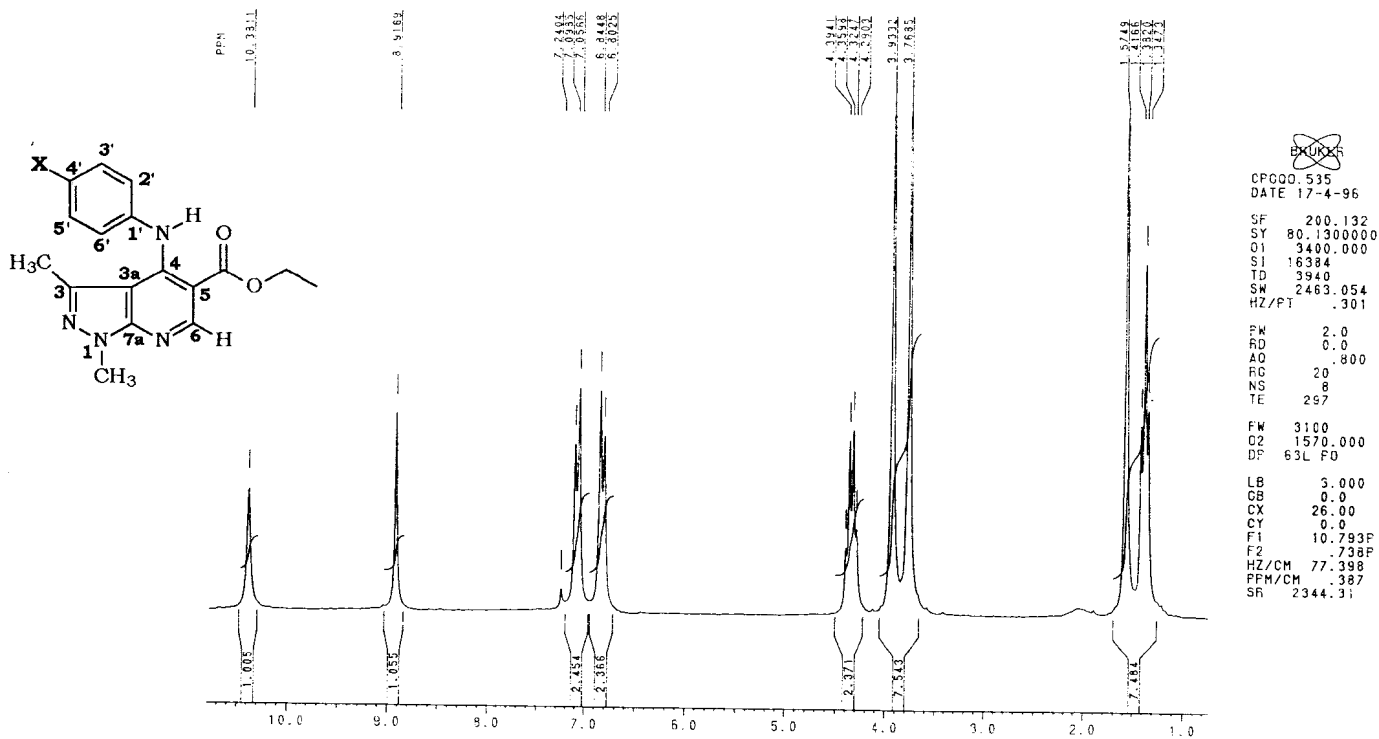


Figura 26: Espectro de RMN de ¹H de X = OCH₃ – Solvente CDCl₃ – 200.133MHz.

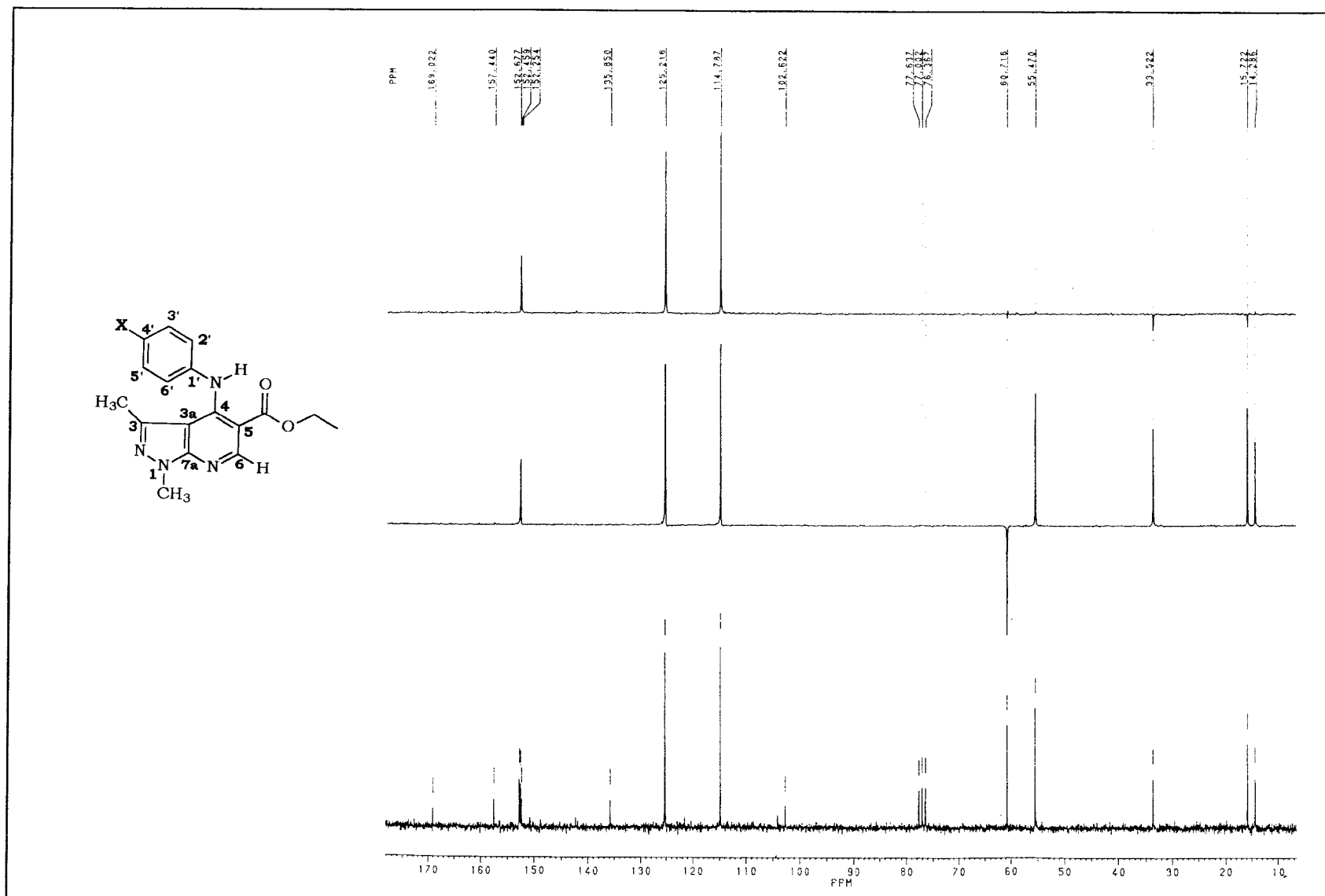


Figura 27: Espectro de RMN de ^{13}C - DEPT de $\text{X} = \text{OCH}_3$ - Solvente CDCl_3 - 50,3MHz.

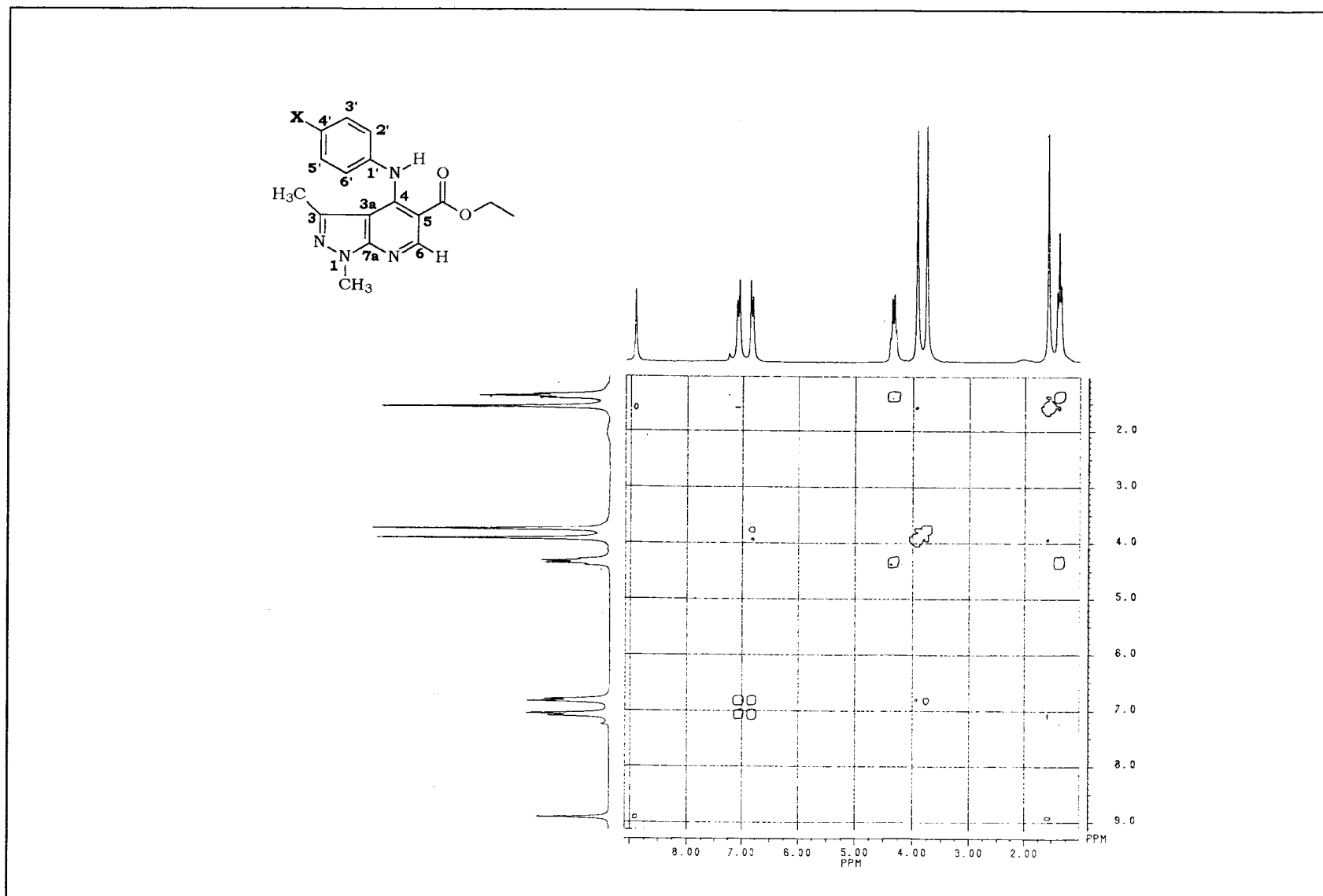


Figura 28: Espectro de RMN (2D) $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ -COSY de **X = OCH₃** – Solvente CDCl₃.

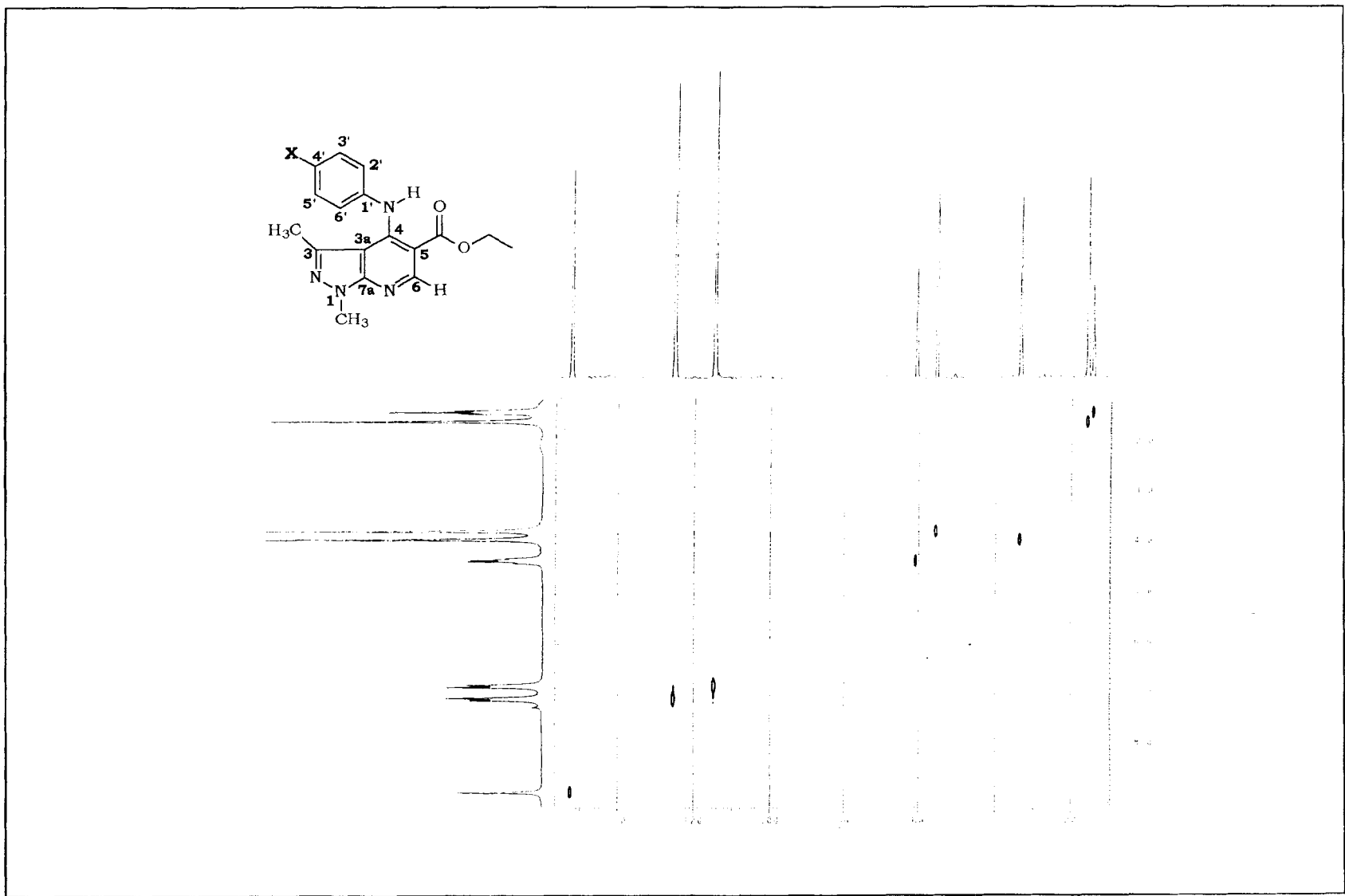


Figura 29: Espectro de RMN (2D) $^1\text{H}\times^{13}\text{C}$ -COSY, $^1J_{\text{CH}}$ de $\mathbf{X} = \text{OCH}_3$ – Solvente CDCl_3 .

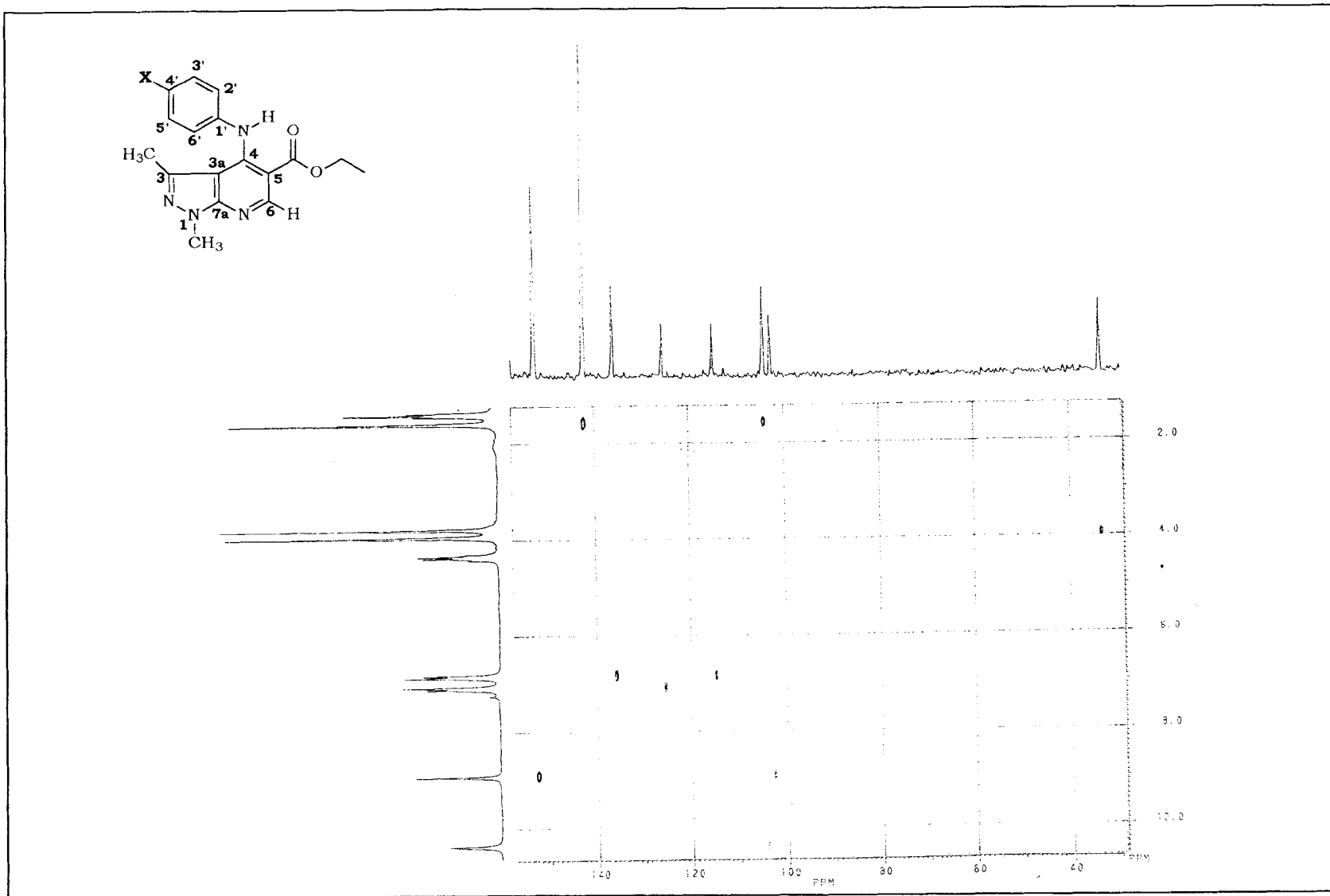


Figura 30: Espectro de RMN (2D) $^1\text{H}_x^{13}\text{C}$ -COSY, nJ_{CH} , $n=2$ ou 3 de $\mathbf{X} = \text{OCH}_3$ - Solvente CDCl_3

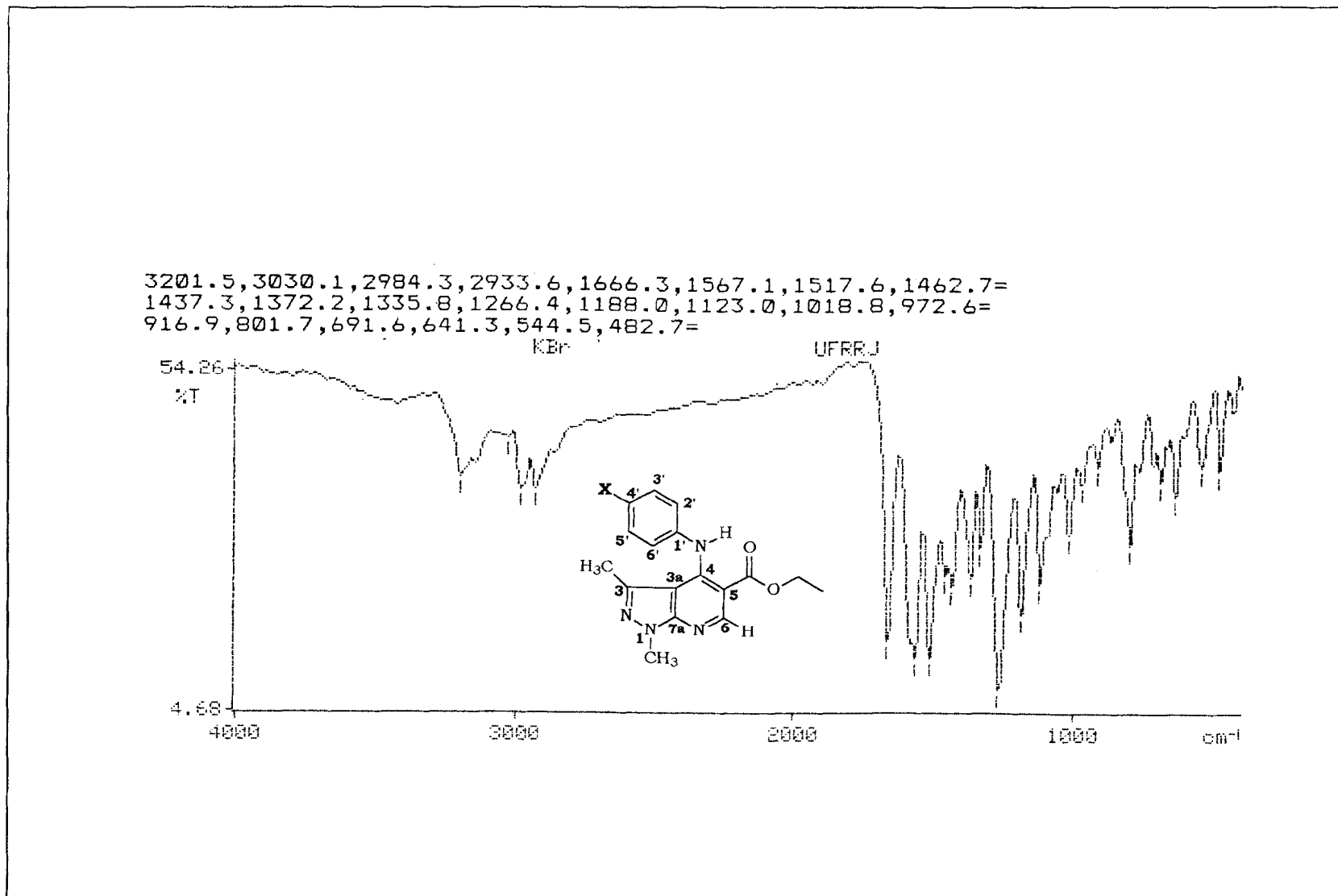


Figura 31: Espectro de IV de **X = CH₃** – Pastilha de KBr.

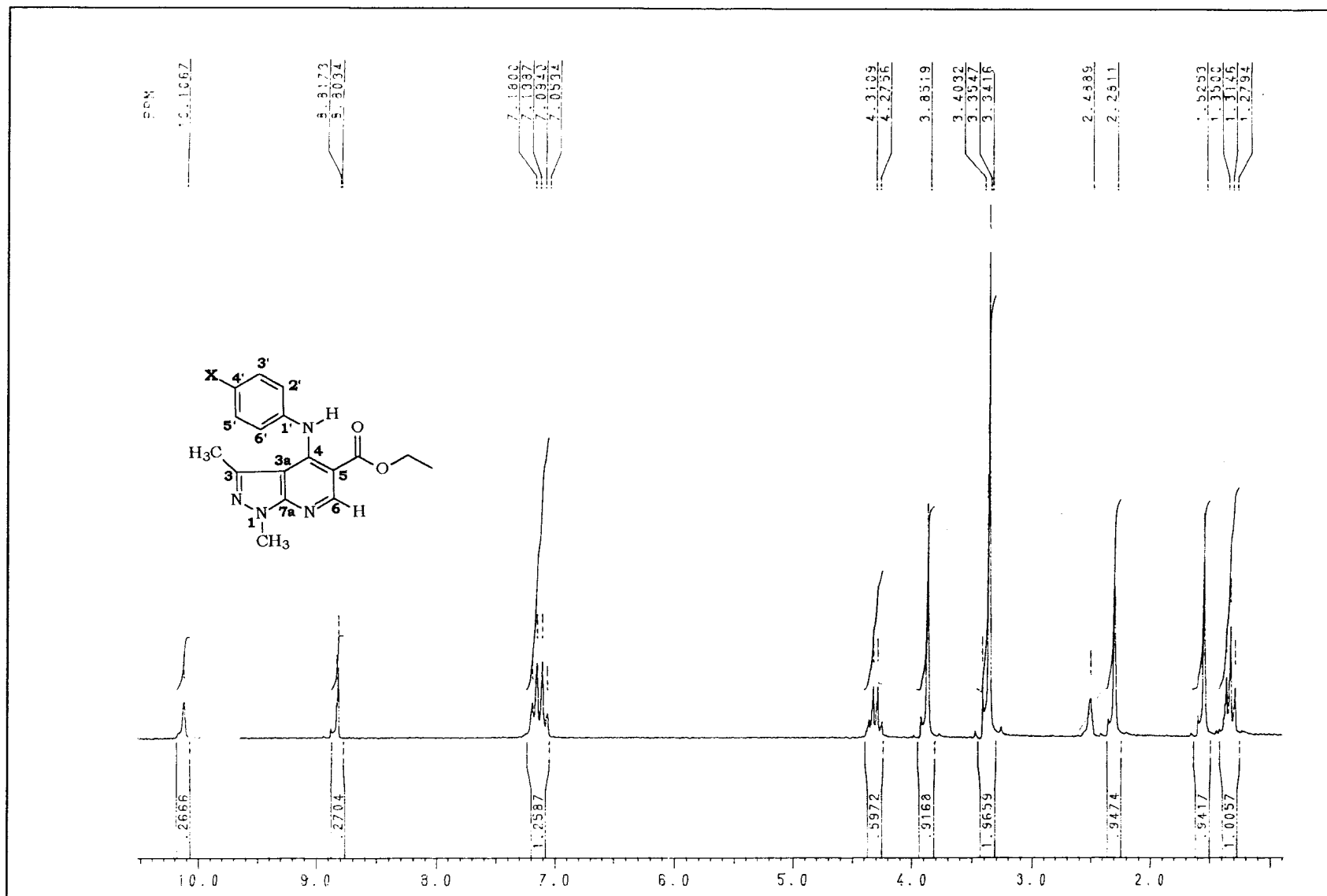


Figura 32: Espectro de RMN de ¹H de **X = CH₃** – Solvente DMSO-d₆ – 200.133MHz.

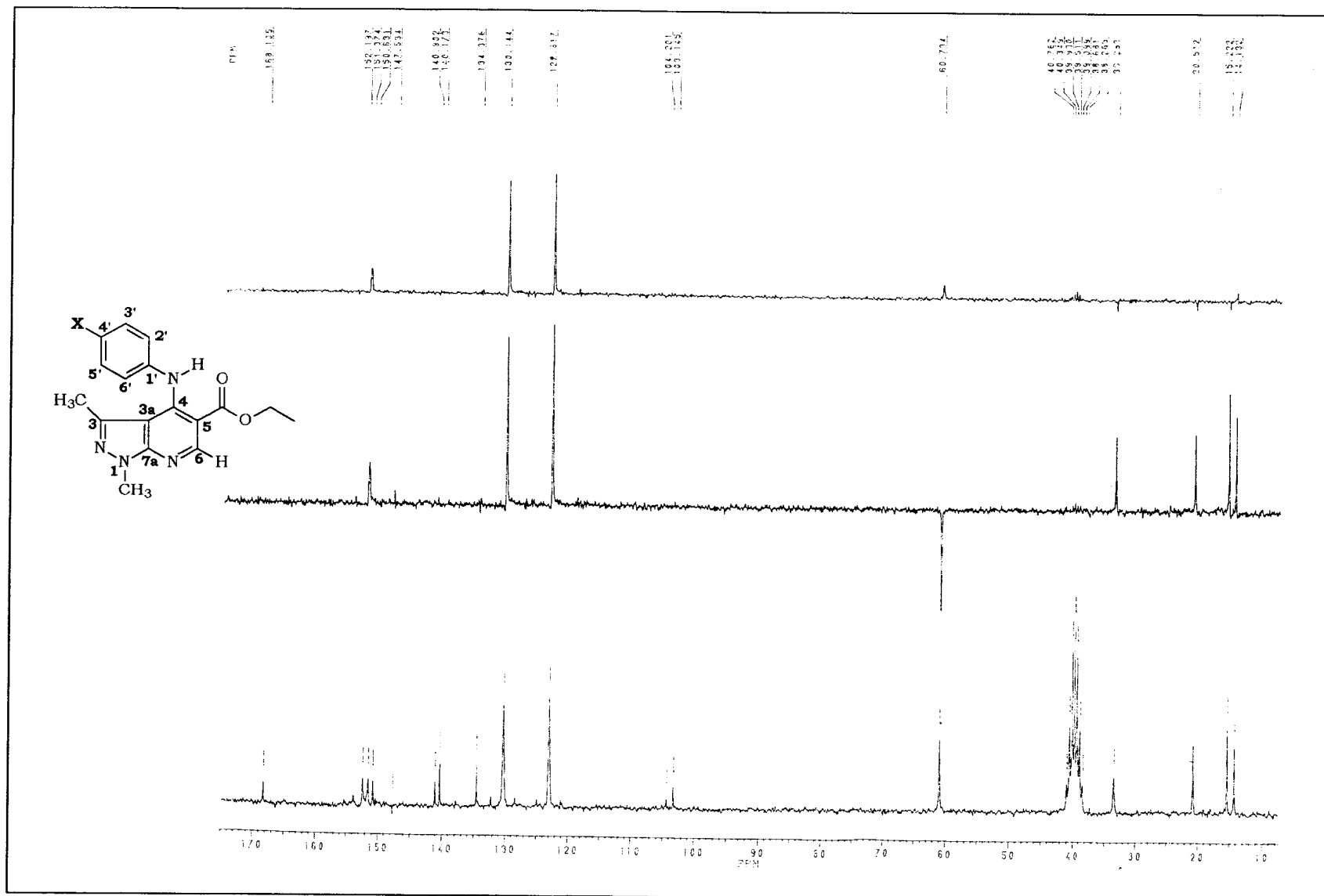


Figura 33: Espectro de RMN de ¹³C – DEPT de **X = CH₃** – Solvente DMSO-d₆ – 50,3MHz.

Heloisa de Melo
 21/12/99
 5360-pCH3
 Oper. Rodrigo
 Pulse Sequence: hmqc
 Solvent: DMSO
 Temp: 30.0 C 303.1 K
 File: 580-HMOC
 UNITYplus-300 "UFFu300"
 PULSE SEQUENCE: hmqc
 Relax. delay 1.030 sec
 Acq. time 0.155 sec
 Width 3300.3 Hz
 2D Width 13605.4 Hz
 4 repetitions
 2 x 320 Increments
 OBSERVE H1, 233.9495501 MHz
 DECOUPLE C13, 75.4232073 MHz
 Power 44 dB
 on during acquisition
 off during delay
 GARP-1 modulated
 DATA PROCESSING
 Gauss apodization 0.051 sec
 F1 DATA PROCESSING
 Gauss apodization 0.016 sec
 FT size 1024 x 4096
 Total time 2 hr, 4 min, 18 sec

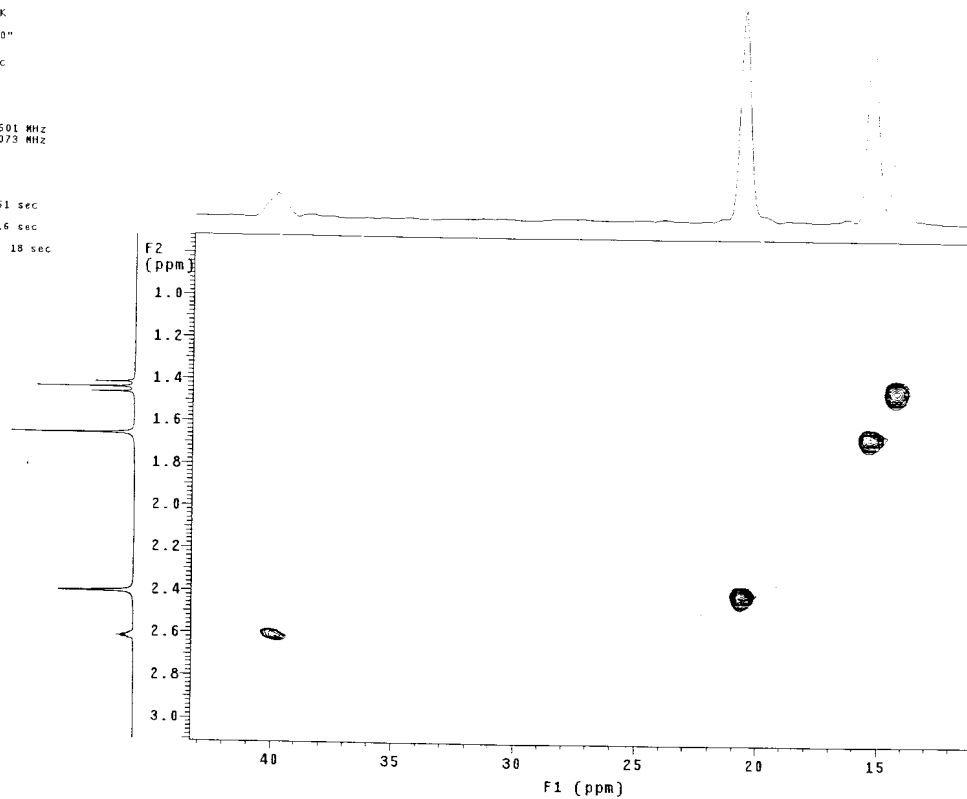
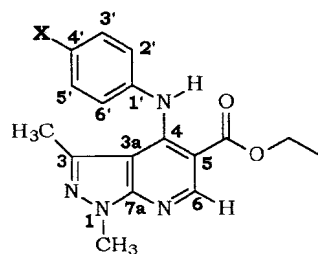


Figura 34: Espectro de RMN (2D) $^1\text{H}\times^{13}\text{C}$ -COSY, $^1\text{J}_{\text{CH}}$ de **X** = **CH₃** - δ de 15 a 40ppm
 Solvente DMSO- d_6 .

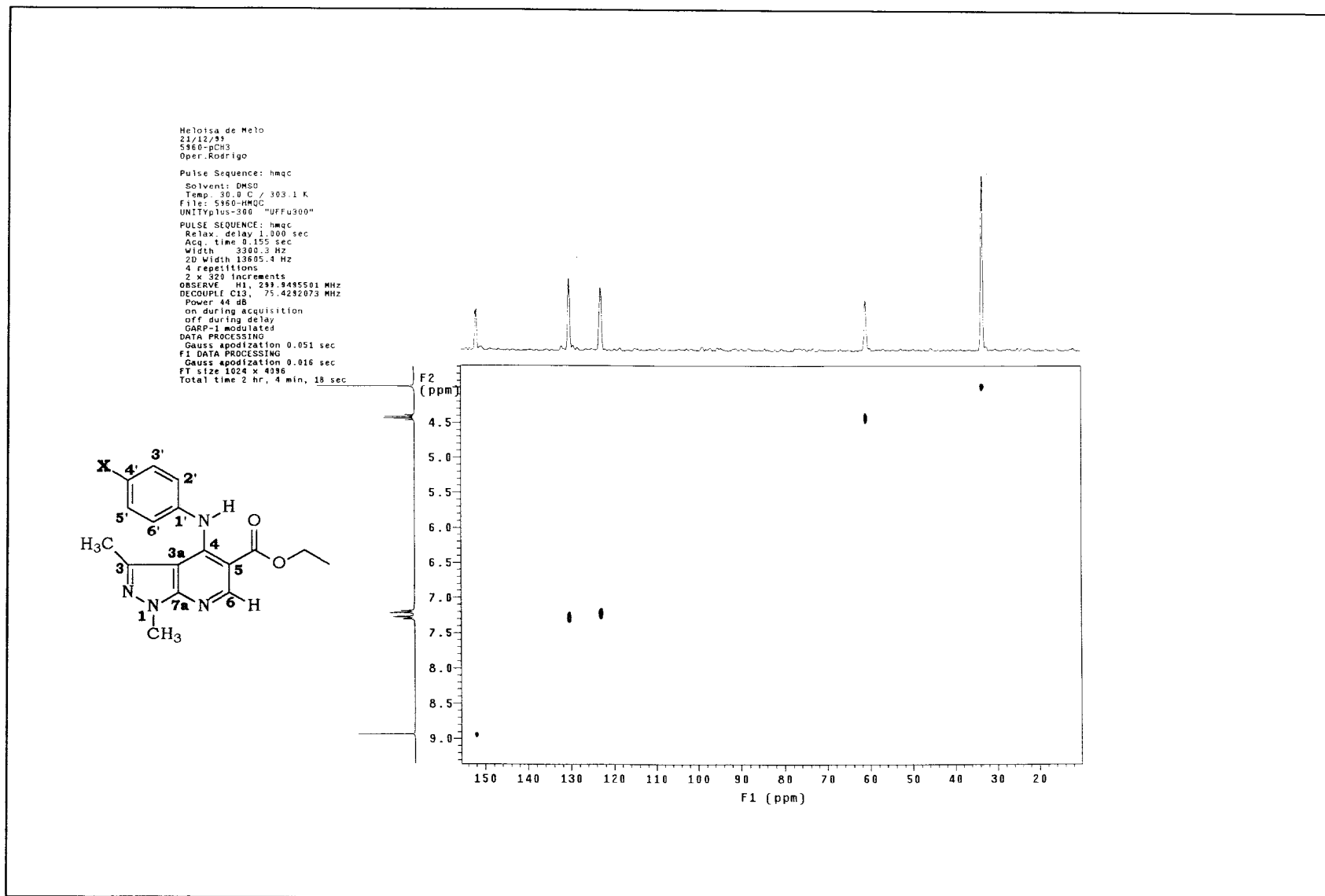


Figura 35: Espectro de RMN (2D) $^1\text{H}\text{-}^{13}\text{C}$ -COSY, $^1\text{J}_{\text{CH}}$ de **X** = CH_3 - δ de 20 a 150ppm
 Solvente DMSO- d_6 .

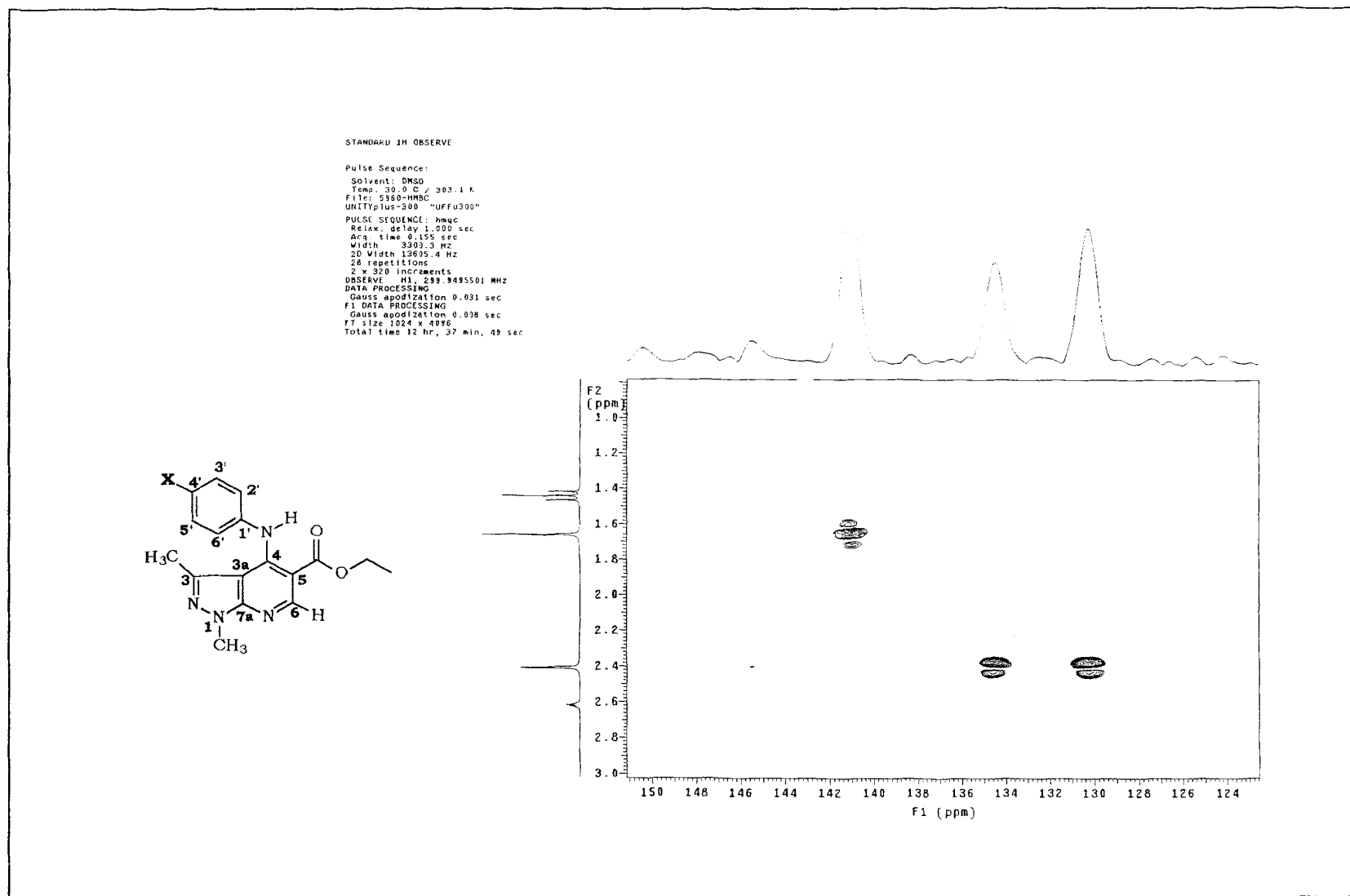


Figura 36: Espectro de RMN (2D) $^1\text{Hx}^{13}\text{C}$ -COSY, $n\text{J}_{\text{CH}}$, $n=2$ ou 3 de $\mathbf{X} = \text{CH}_3$ - δ de 124 a 150ppm Solvente DMSO- d_6 .

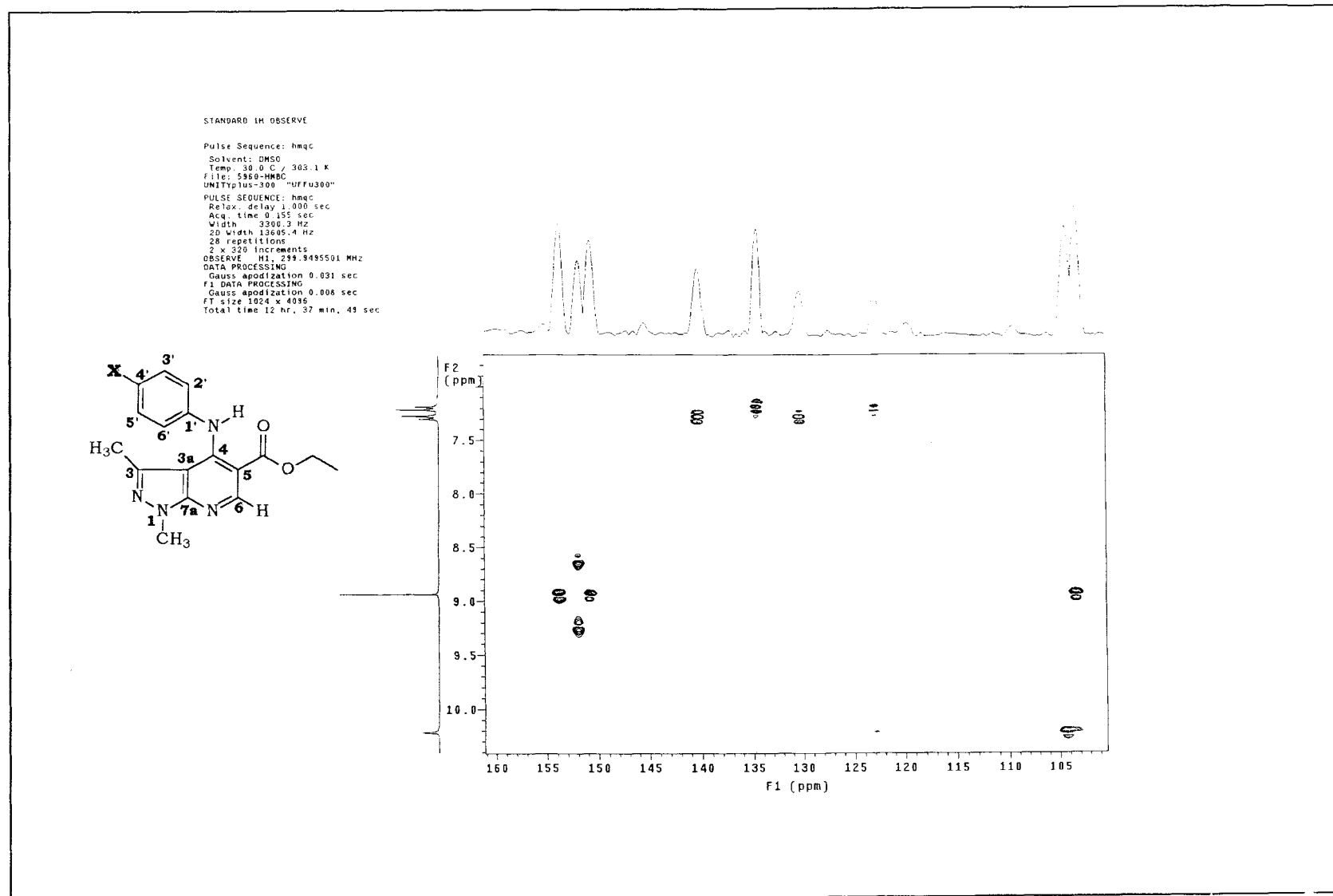


Figura 37: Espectro de RMN (2D) $^1\text{H}\text{X}^{13}\text{C}$ -COSY, $^n\text{J}_{\text{CH}}$, $n=2$ ou 3 de **X** = **CH₃** - δ de 105 a 160ppm Solvente DMSO- d_6 .

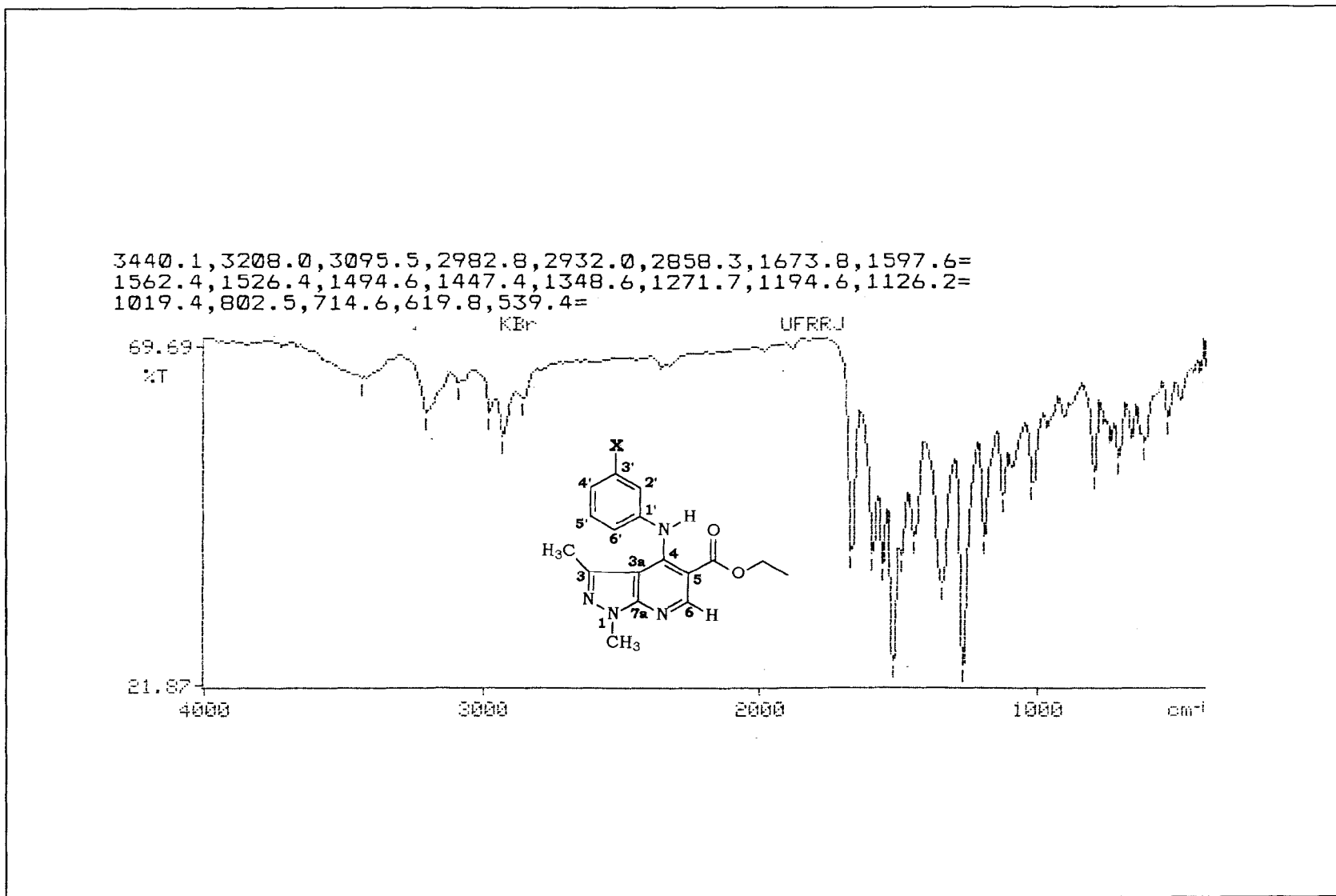


Figura 38: Espectro de IV de **X = NO₂** – Pastilha de KBr.

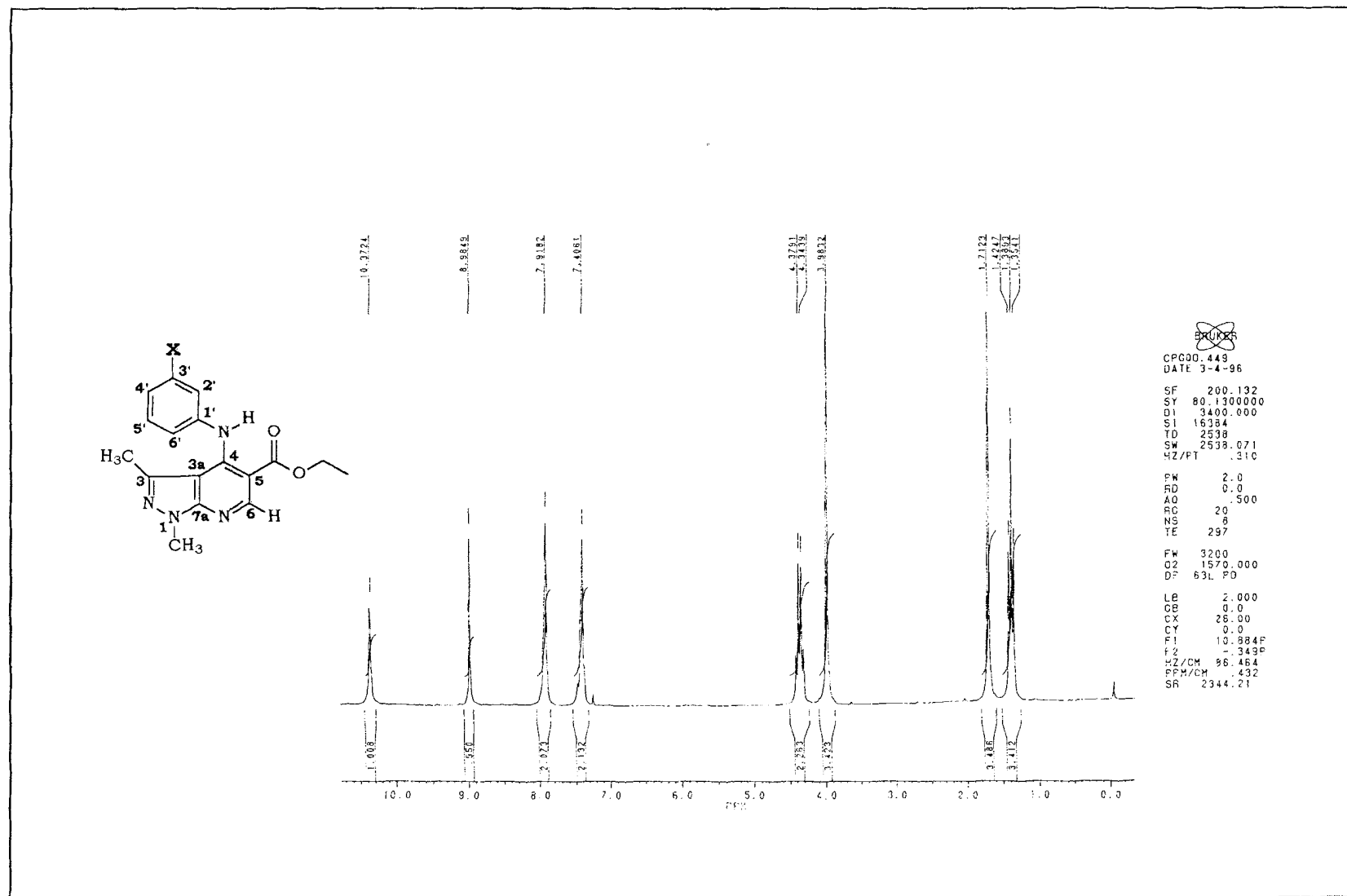


Figura 39: Espectro de RMN de ¹H de **X** = NO₂ – Solvente CDCl₃ – 200.133MHz.

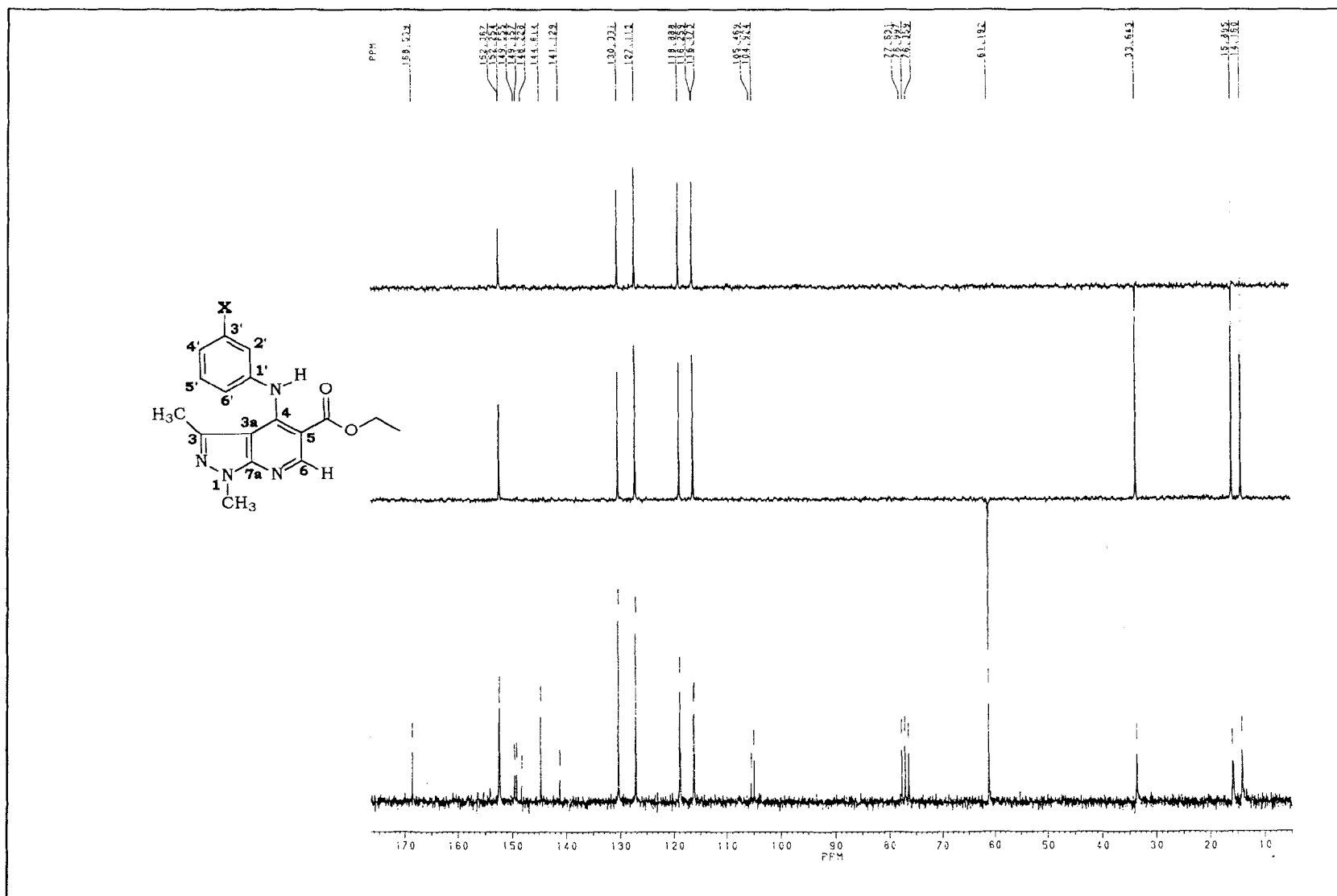


Figura 40: Espectro de RMN de ¹³C - DEPT de **X = NO₂** - Solvente CDCl₃ - 50,3MHz.

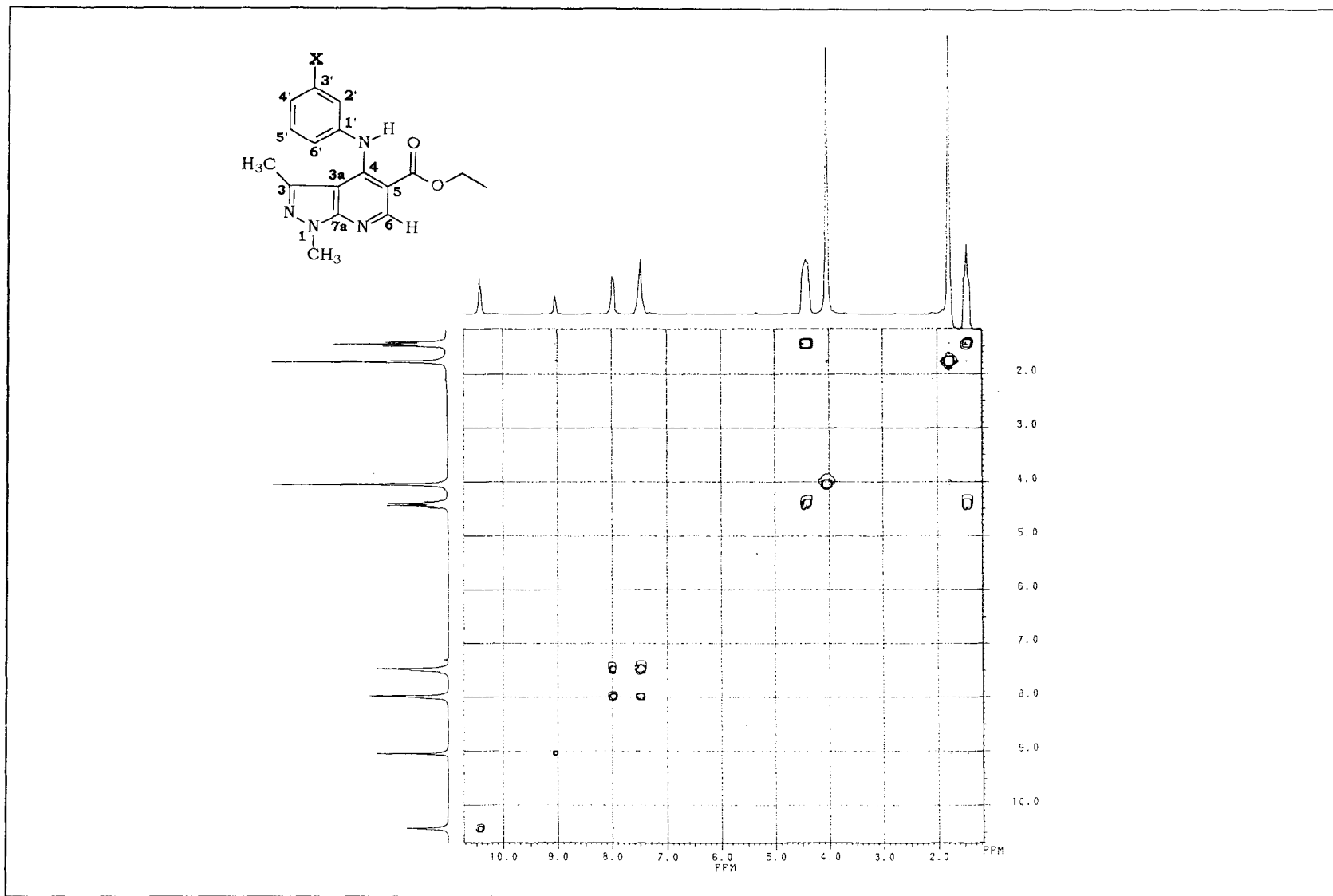


Figura 41: Espectro de RMN (2D) $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ -COSY de **X** = NO_2 – Solvente CDCl_3 .

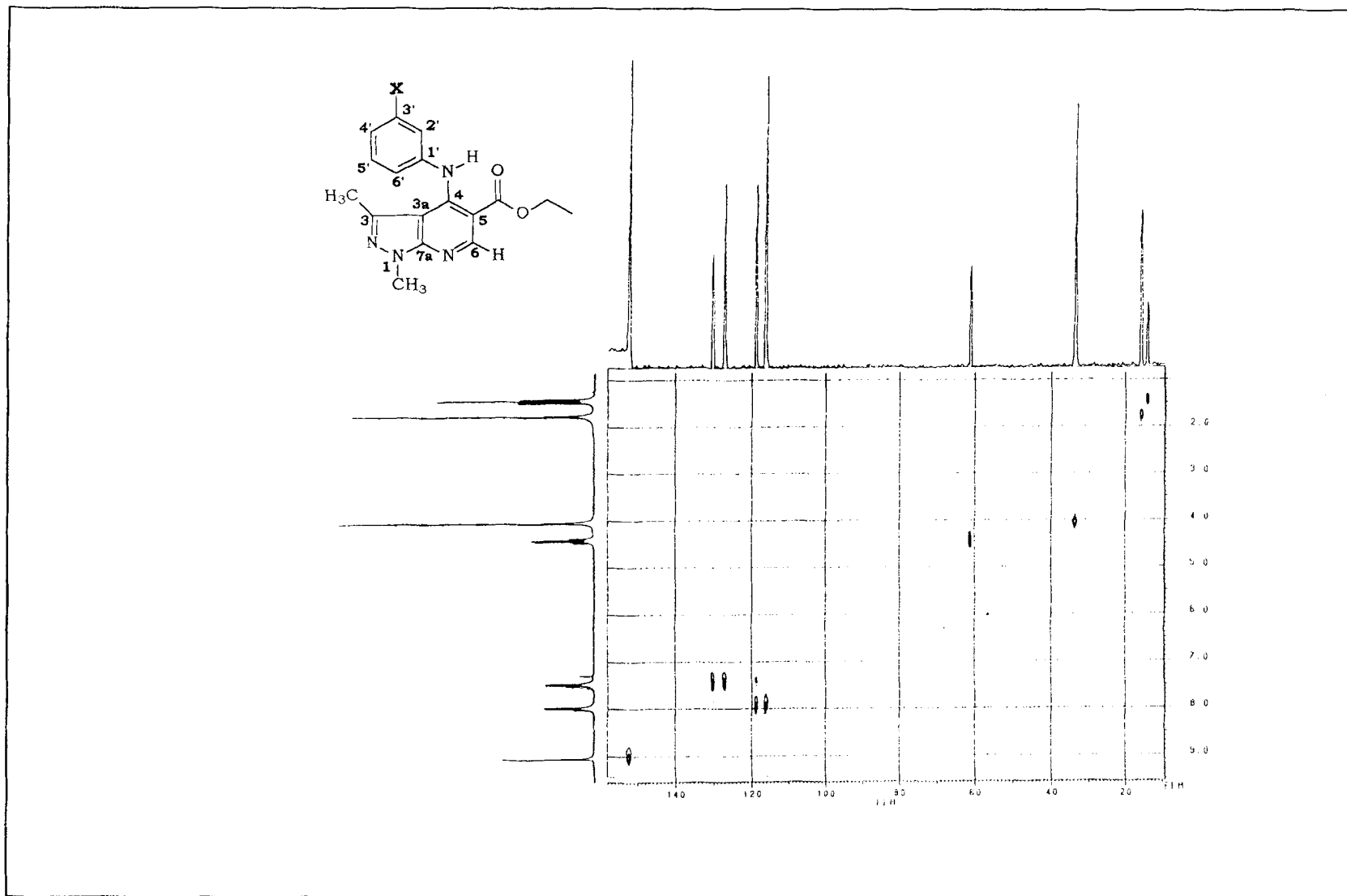


Figura 42: Espectro de RMN (2D) $^1\text{H}\text{X}^{13}\text{C}$ -COSY, $^1\text{J}_{\text{CH}}$ de $\text{X} = \text{NO}_2$ – Solvente CDCl_3 .

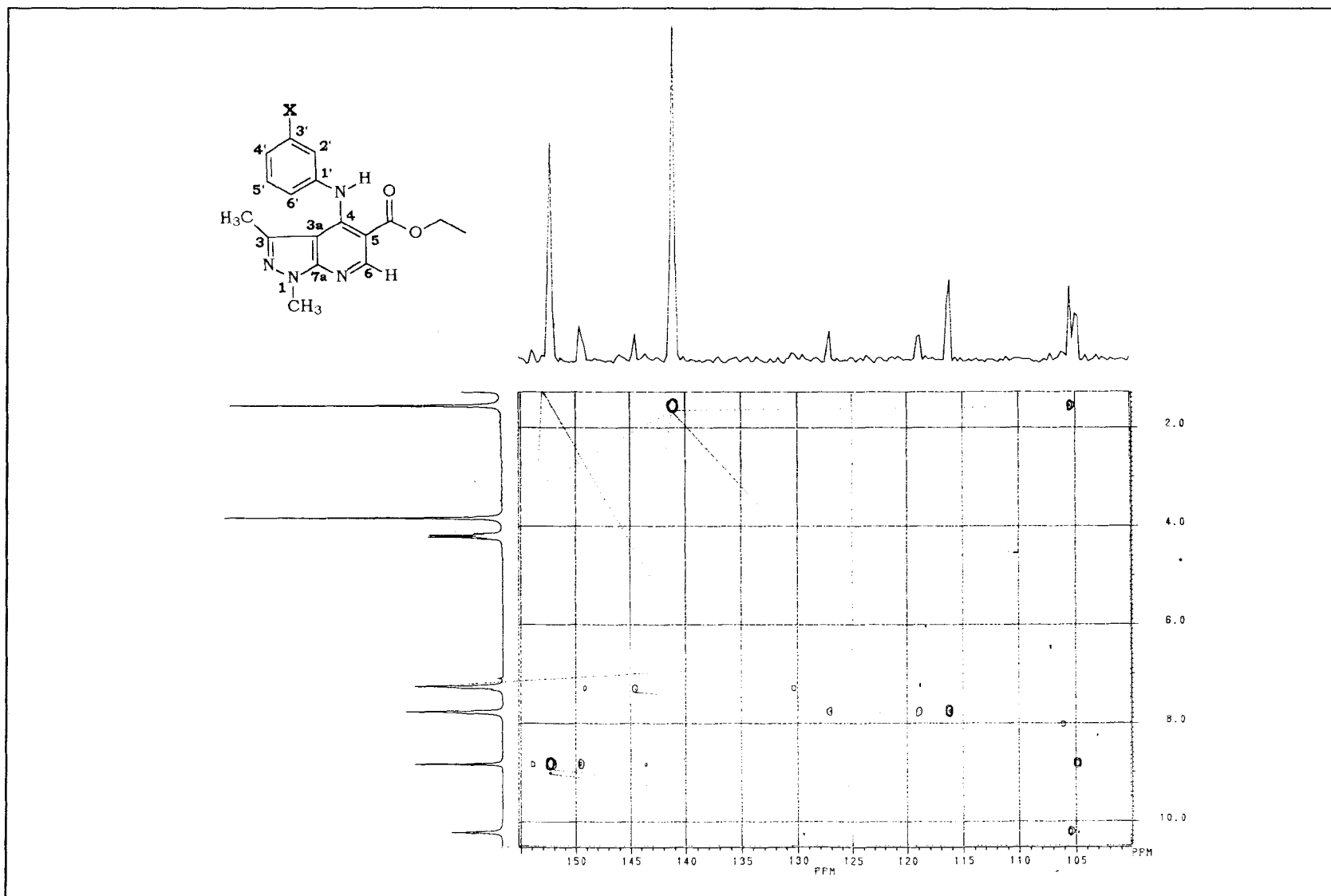


Figura 43: Espectro de RMN (2D) $^1\text{H}\times^{13}\text{C}$ -COSY, $^n\text{J}_{\text{CH}}$, $n=2$ ou 3 de $\text{X} = \text{NO}_2$ - Solvente CDCl_3

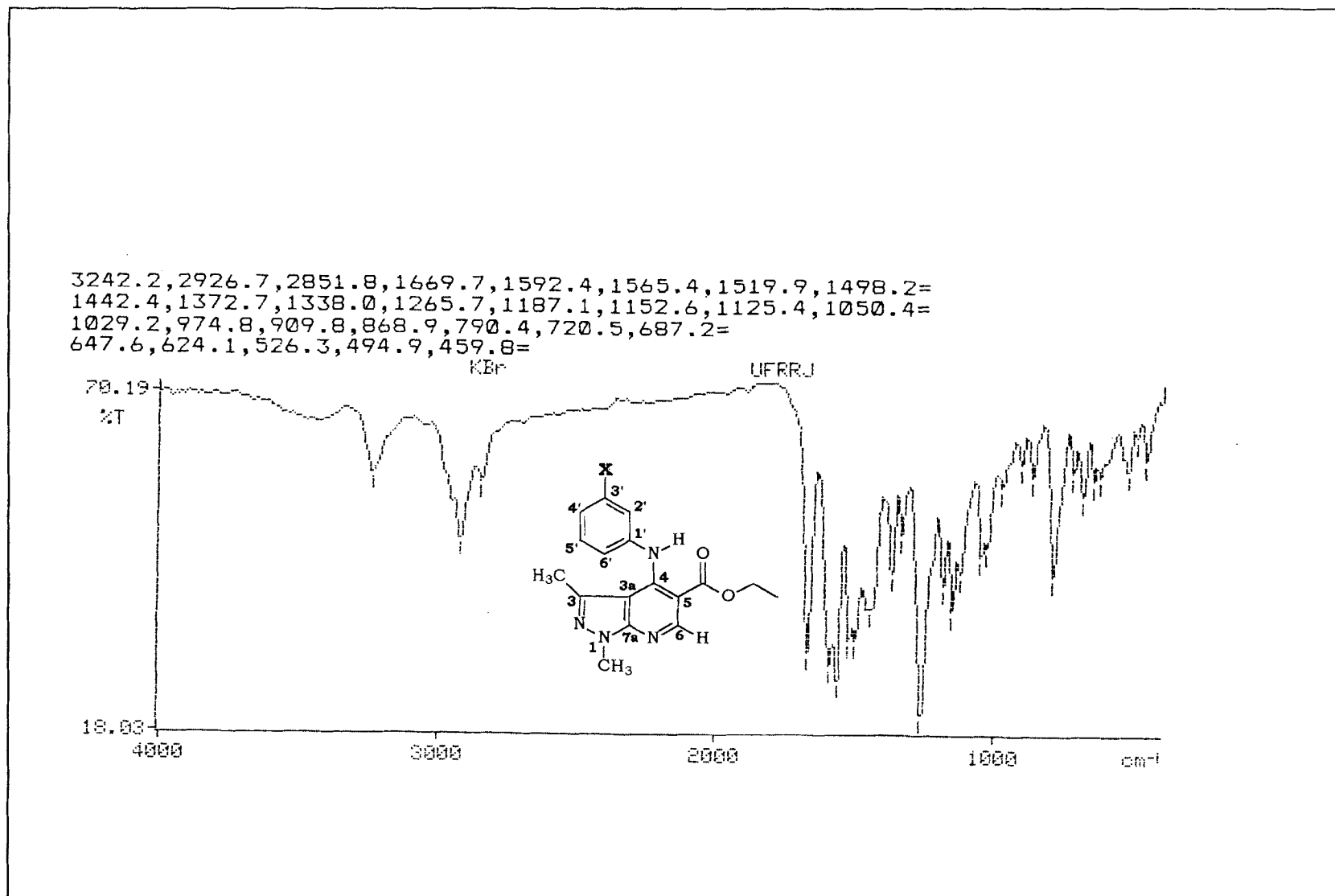


Figura 44: Espectro de IV de **X = OCH₃** – Pastilha de KBr.

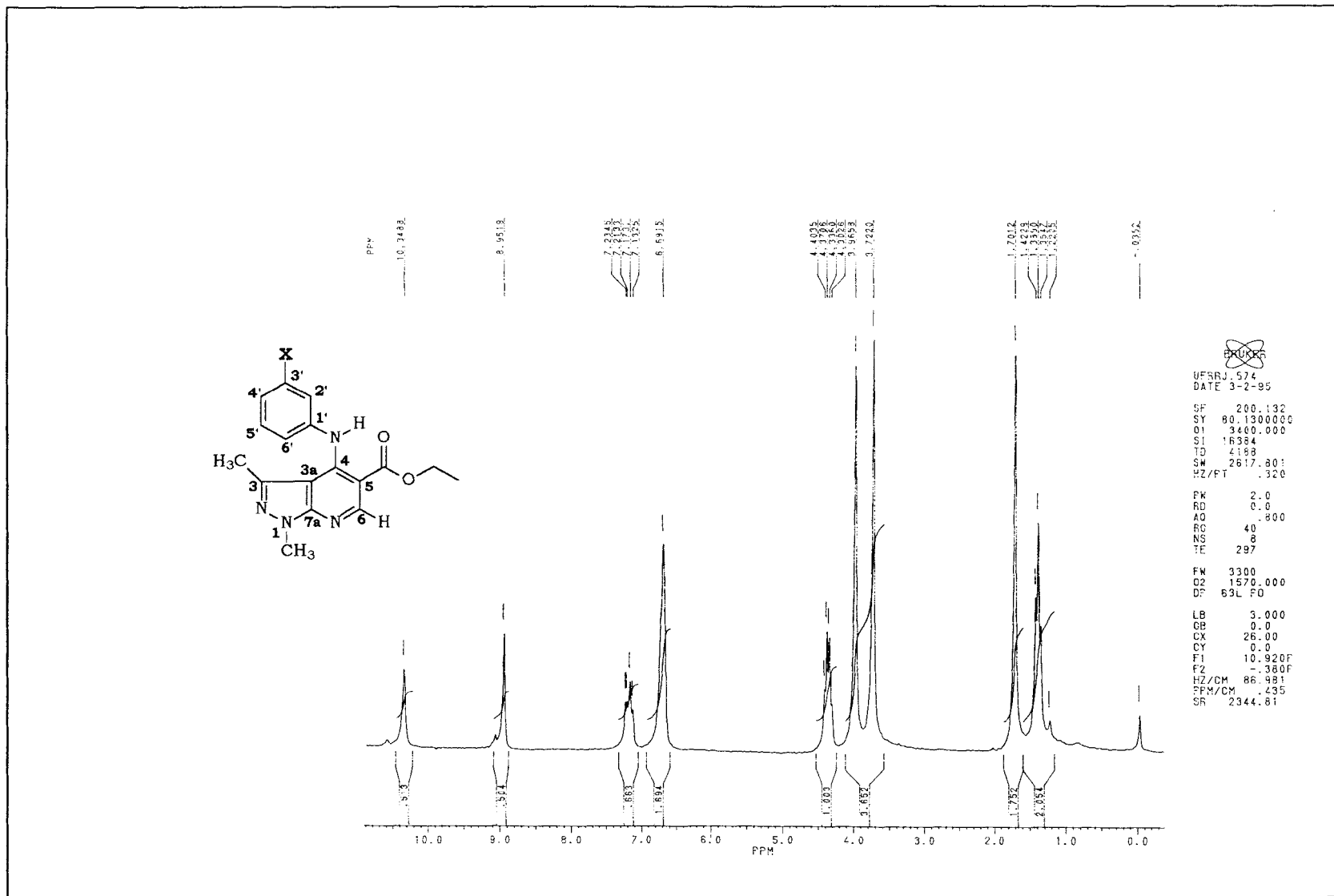


Figura 45: Espectro de RMN de ^1H de $\text{X} = \text{OCH}_3$ – Solvente CDCl_3 – 200.133MHz.

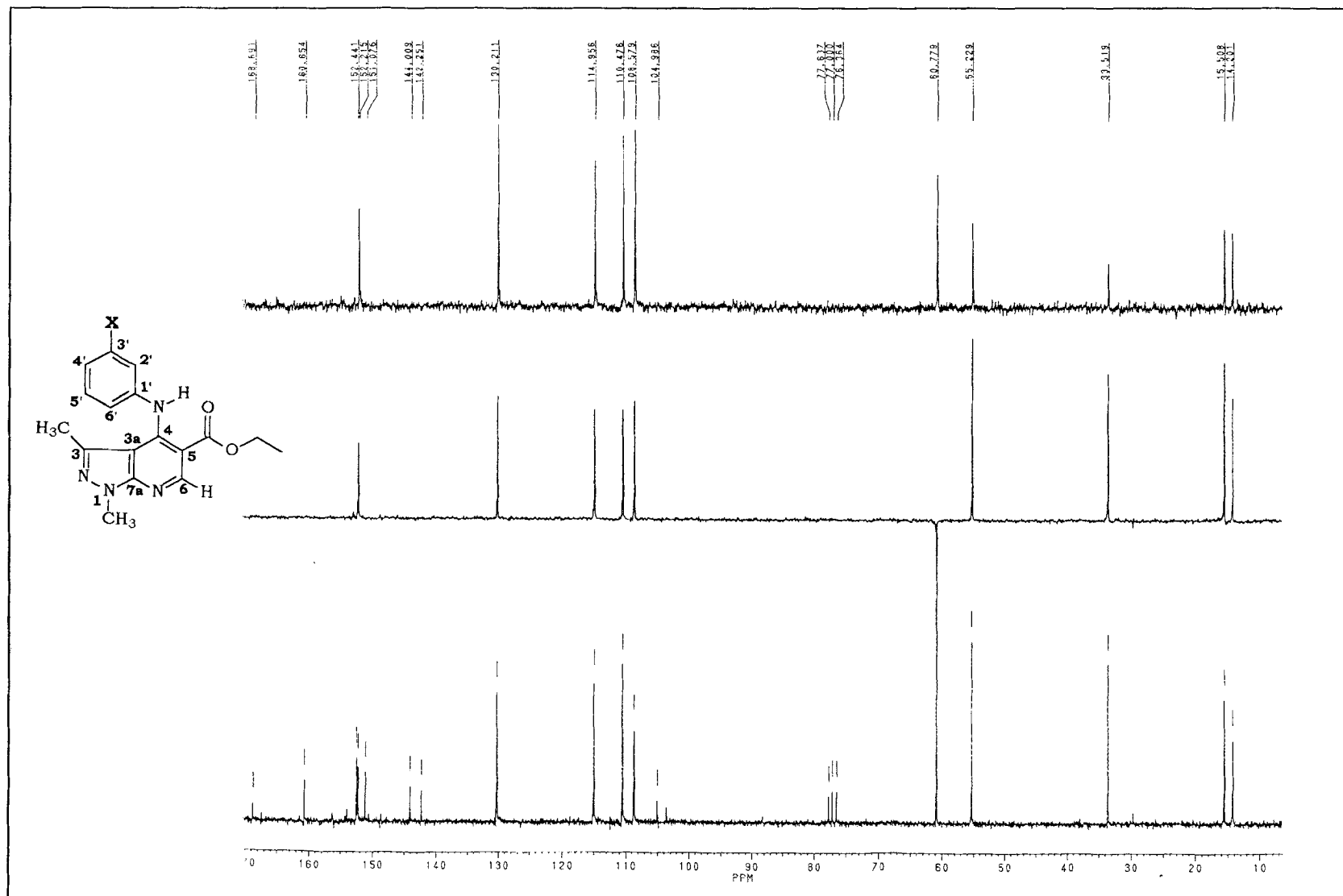


Figura 46: Espectro de RMN de ^{13}C – DEPT de $\text{X} = \text{OCH}_3$ – Solvente CDCl_3 – 50,3MHz.

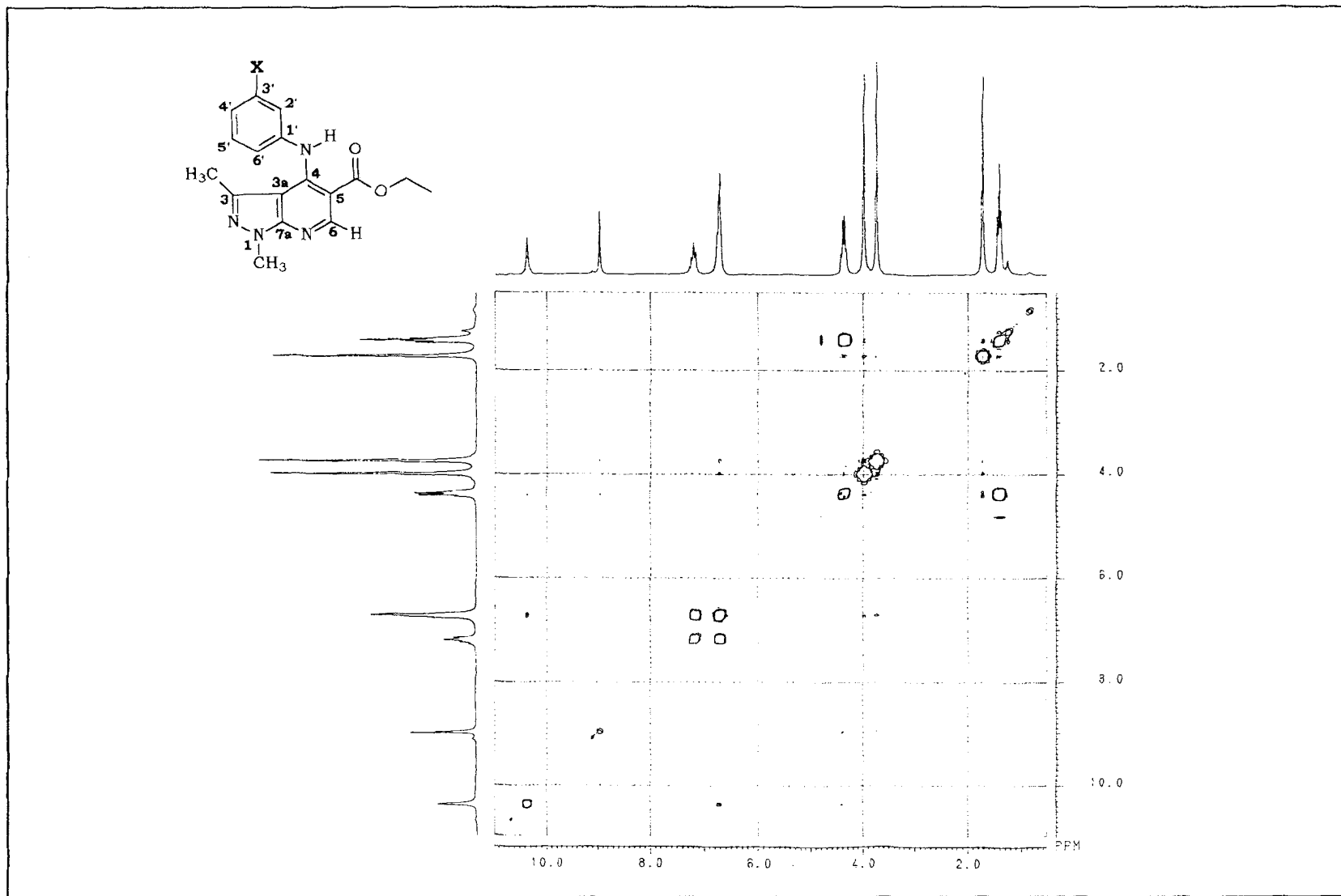


Figura 47: Espectro de RMN (2D) ¹Hx¹H-COSY de **X = OCH₃** – Solvente CDCl₃.

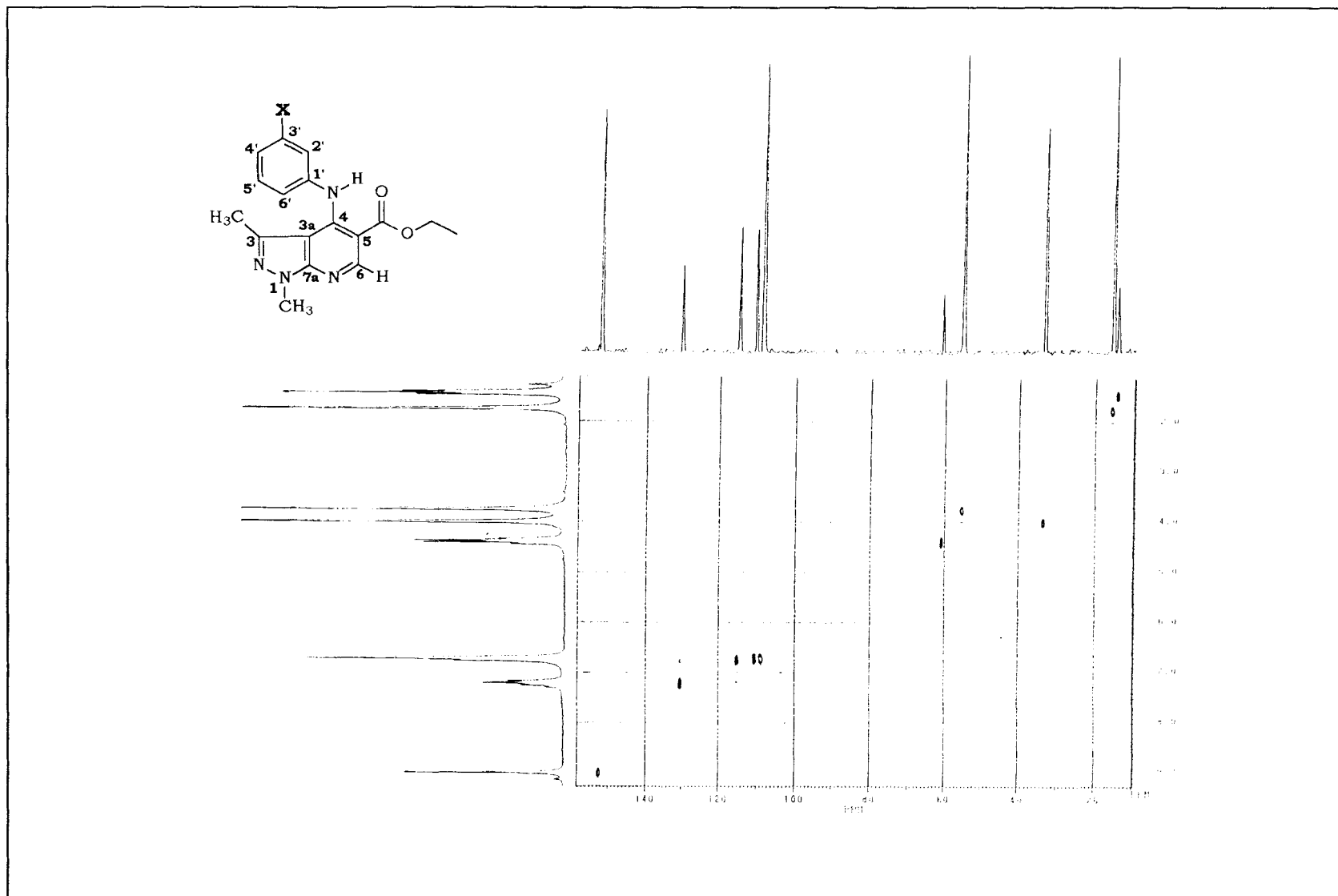


Figura 48: Espectro de RMN (2D) $^1\text{H}\text{X}^{13}\text{C}$ -COSY, $^1\text{J}_{\text{CH}}$ de **X = OCH₃** – Solvente CDCl_3 .

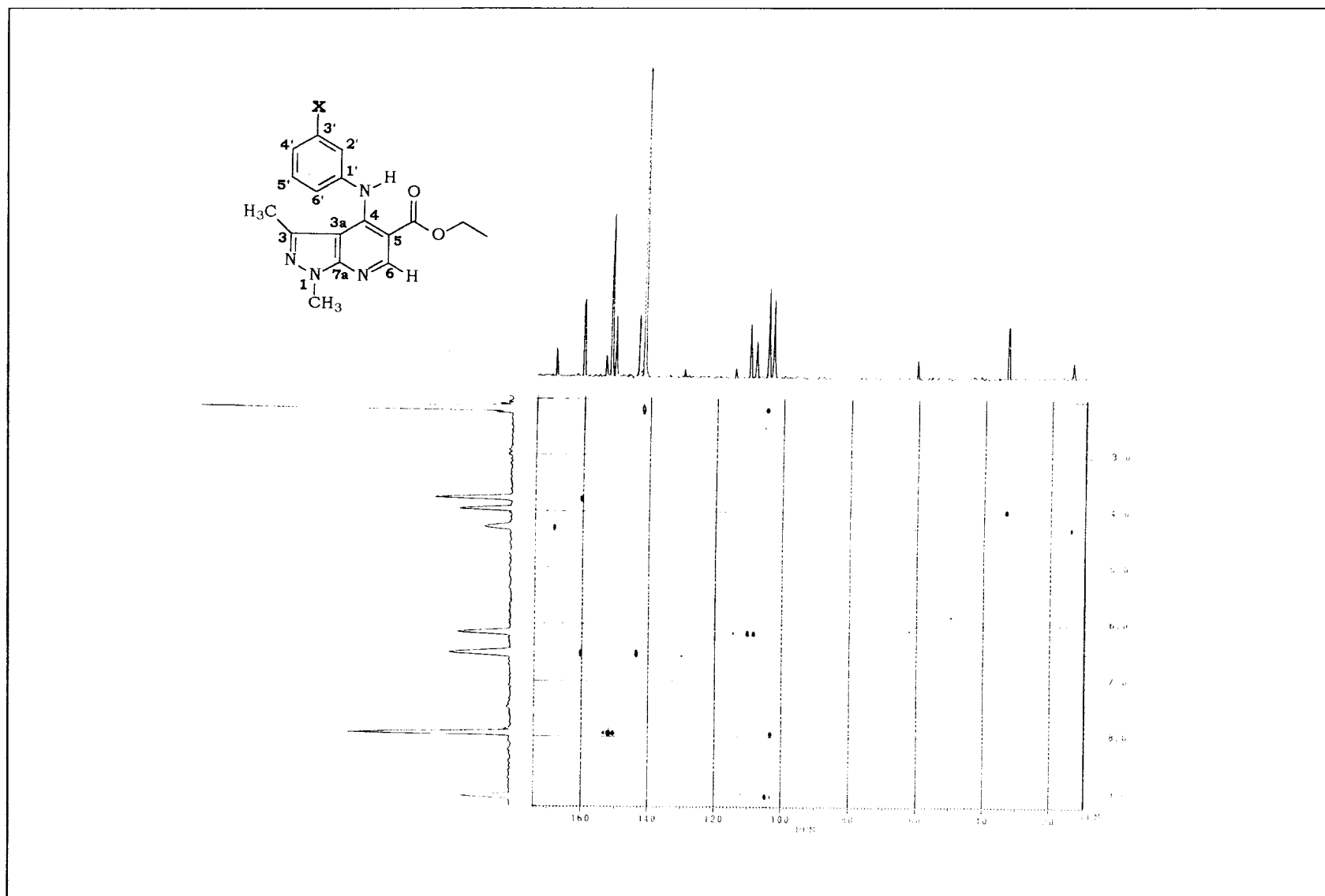


Figura 49: Espectro de RMN (2D) $^1\text{H}\times^{13}\text{C}$ -COSY, $n\text{J}_{\text{CH}}$ $n=2$ ou 3 de **X** = **OCH₃** – Solvente CDCl_3 .

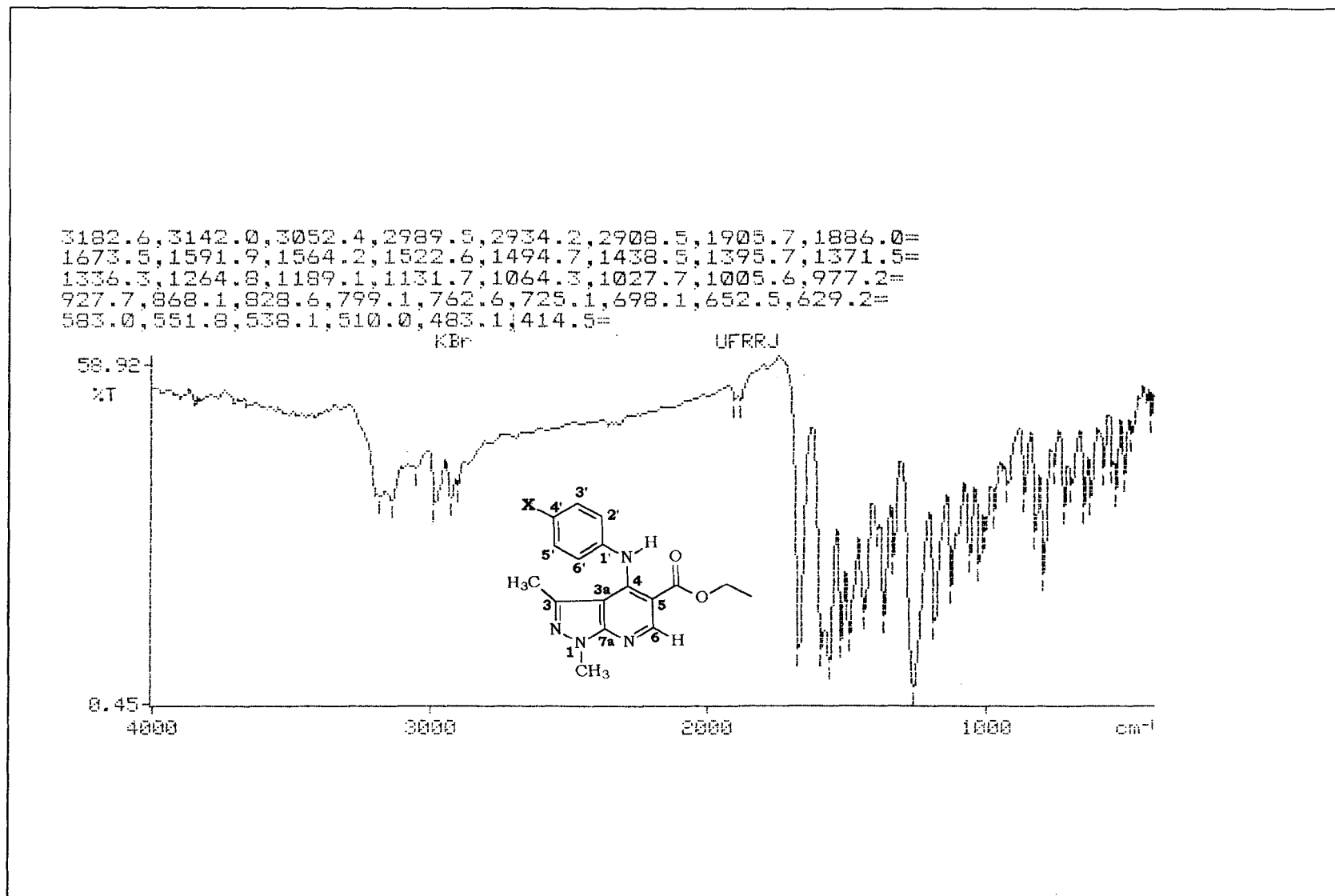


Figura 50: Espectro de IV de **X = Br** – Pastilha de KBr.

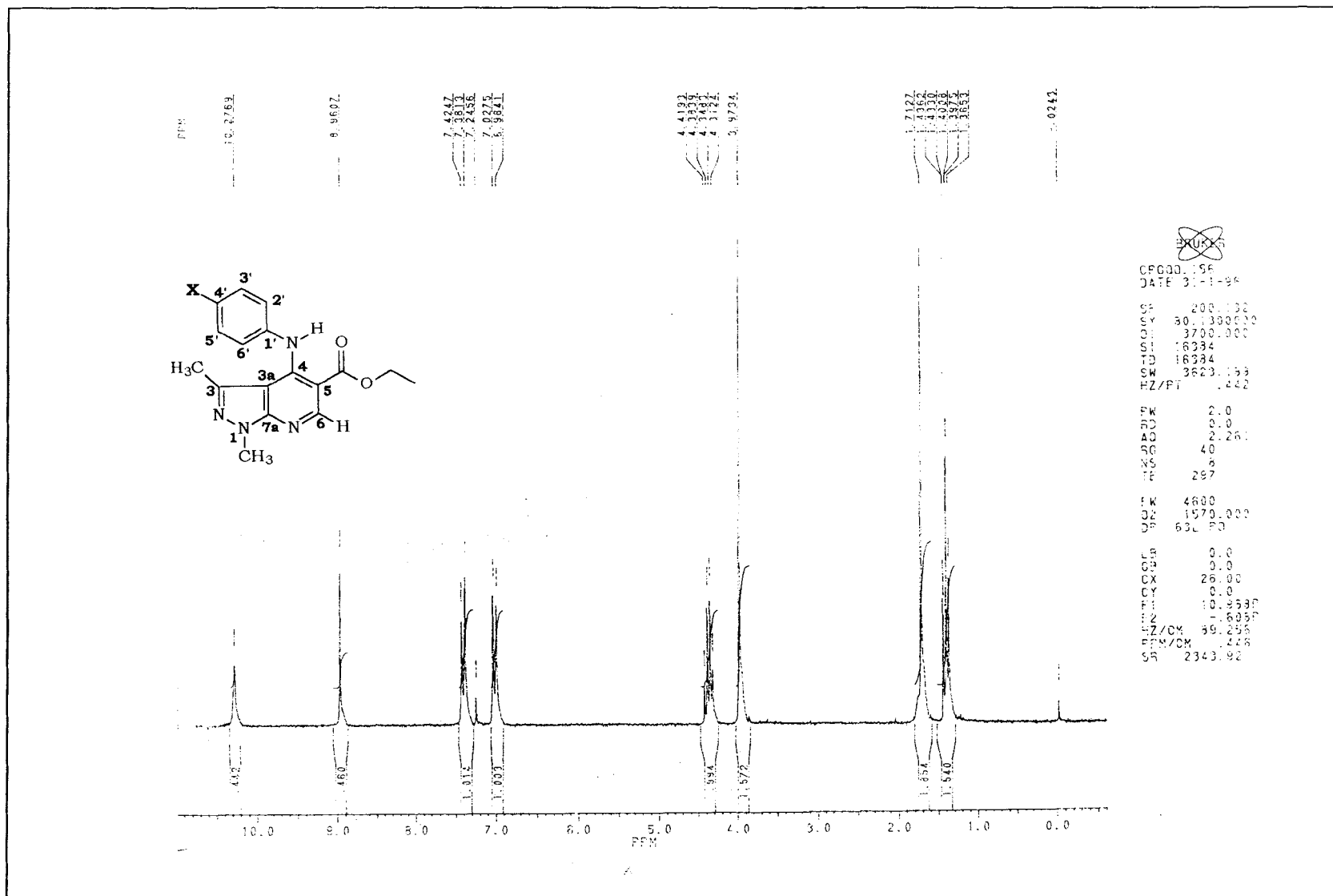


Figura 51: Espectro de RMN de ^1H de **X = Br** – Solvente CDCl_3 – 200.133MHz.

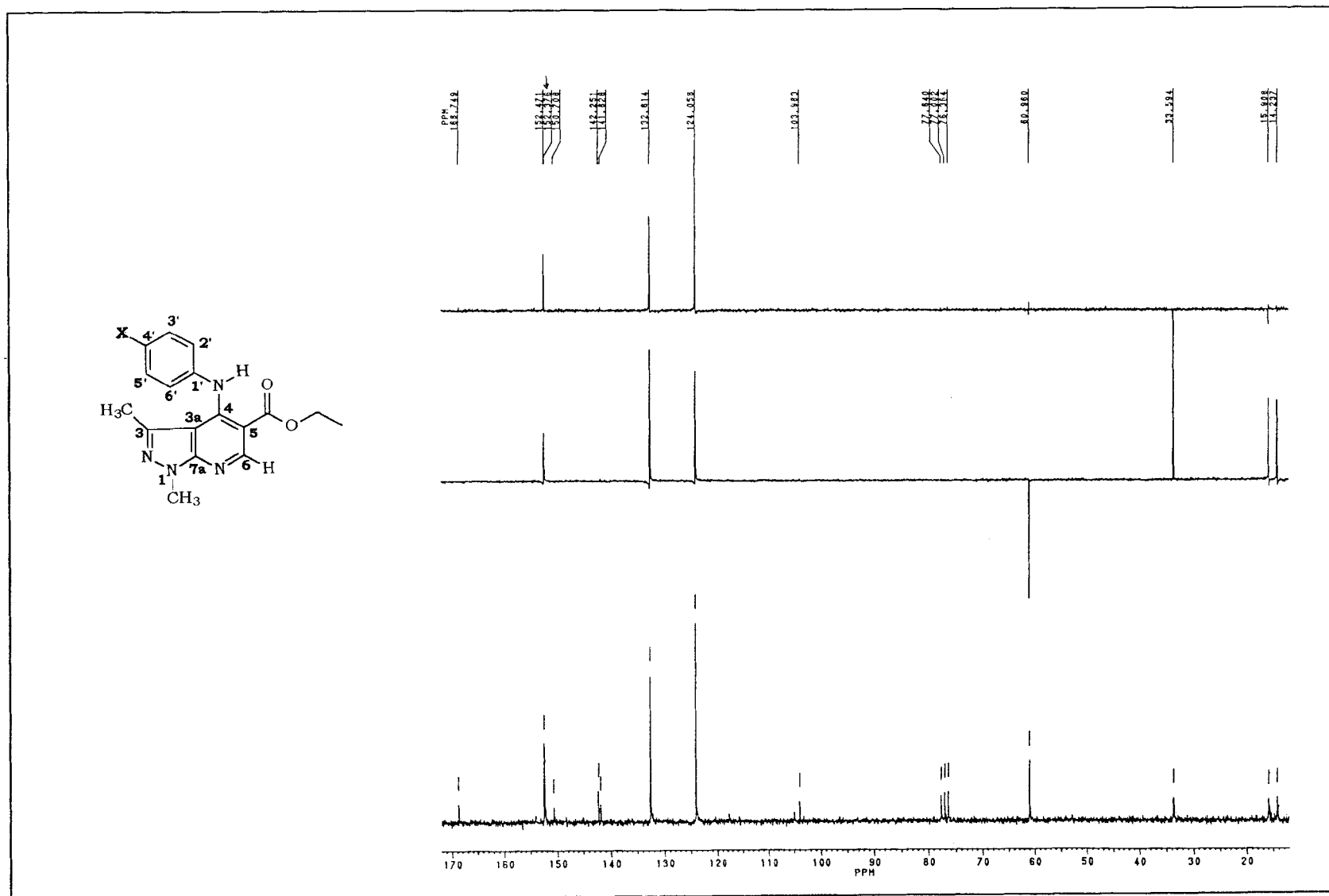


Figura 52: Espectro de RMN de ¹³C – DEPT de **X = Br** – Solvente CDCl₃ – 50,3MHz.

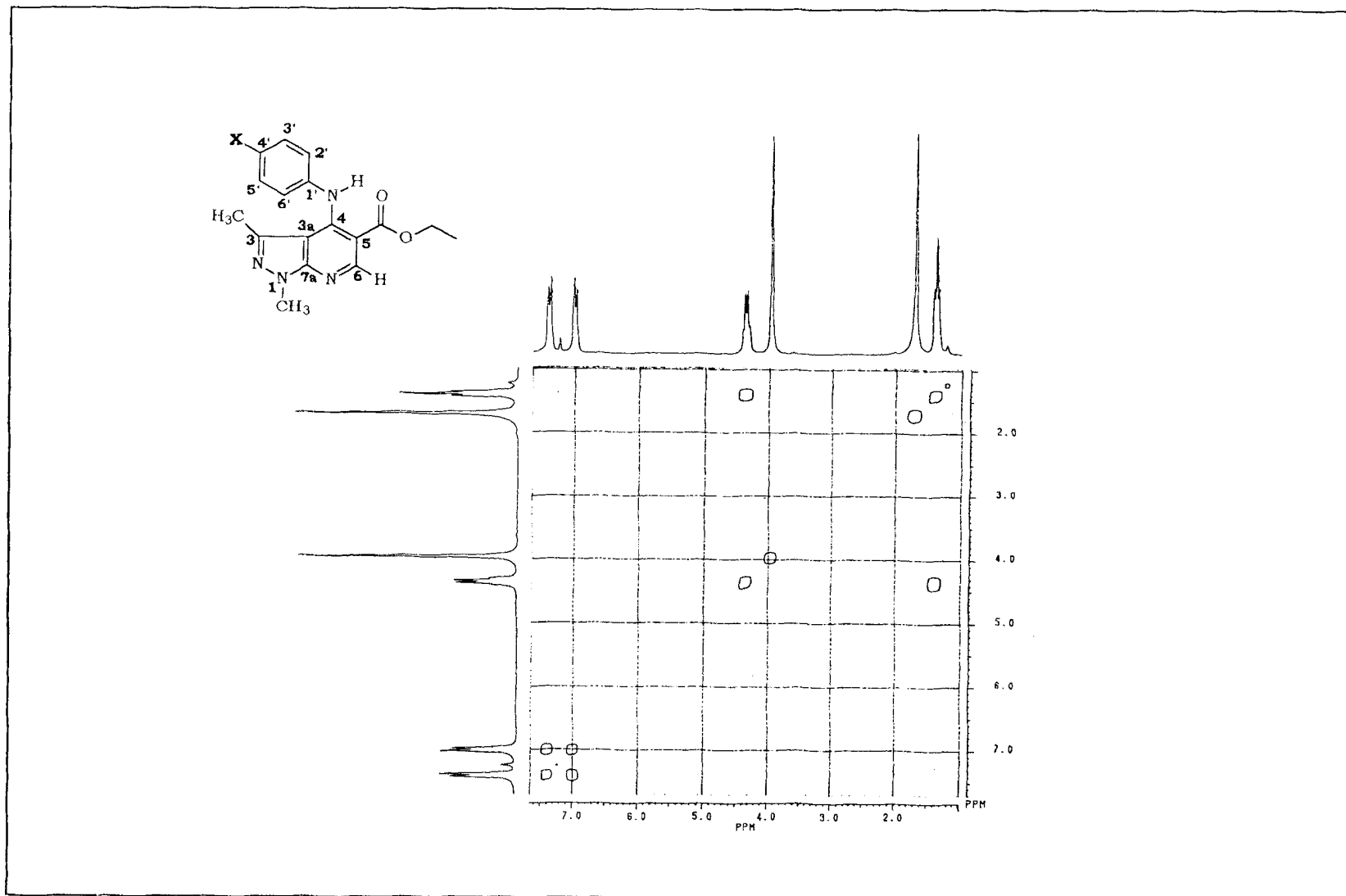


Figura 53: Espectro de RMN (2D) $^1\text{H}\times^1\text{H}$ -COSY de **X = Br** – Solvente CDCl_3 .

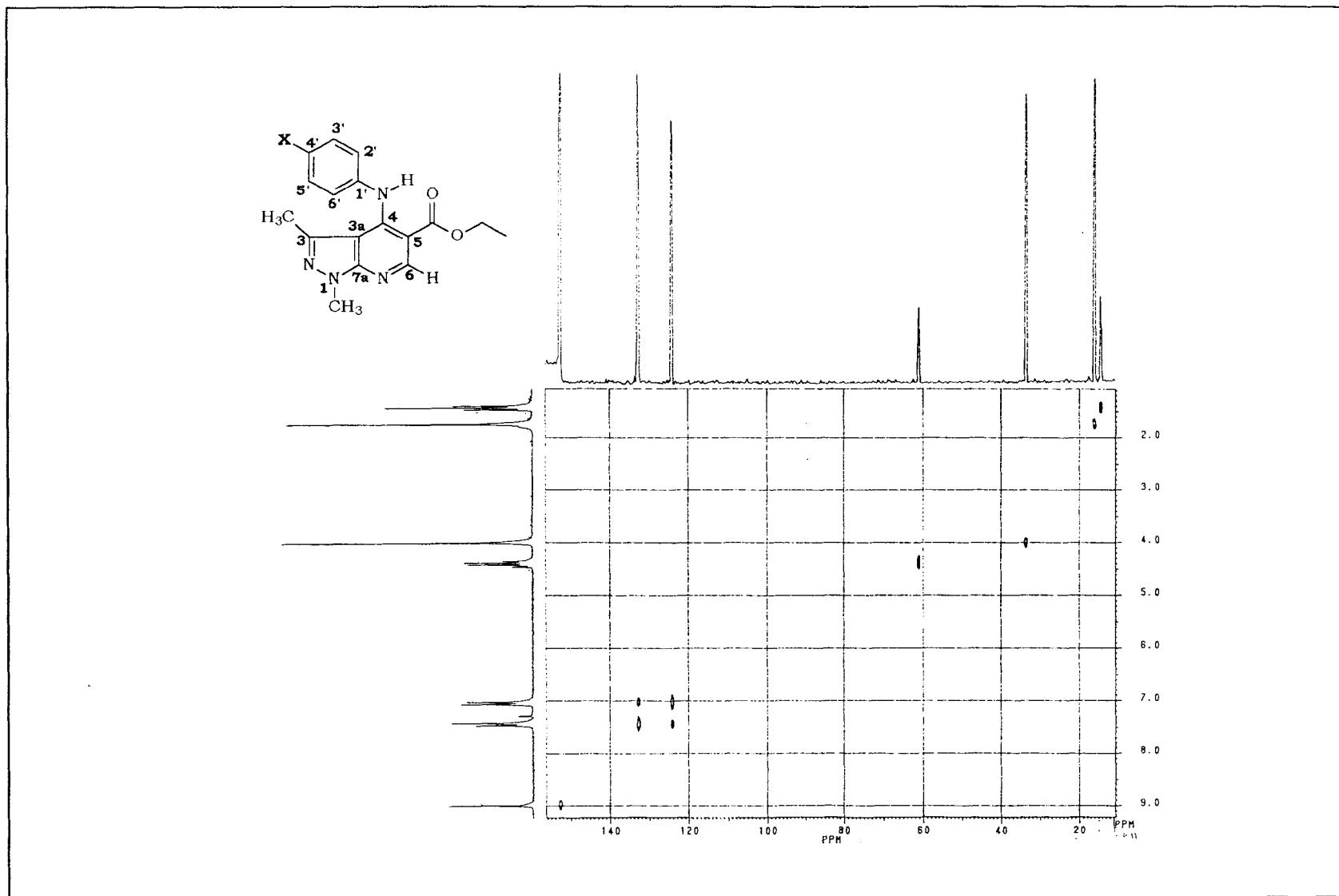


Figura 54: Espectro de RMN (2D) $^1\text{H}\times^{13}\text{C}$ -COSY, $^1\text{J}_{\text{CH}}$ de **X = Br** – Solvente CDCl_3 .

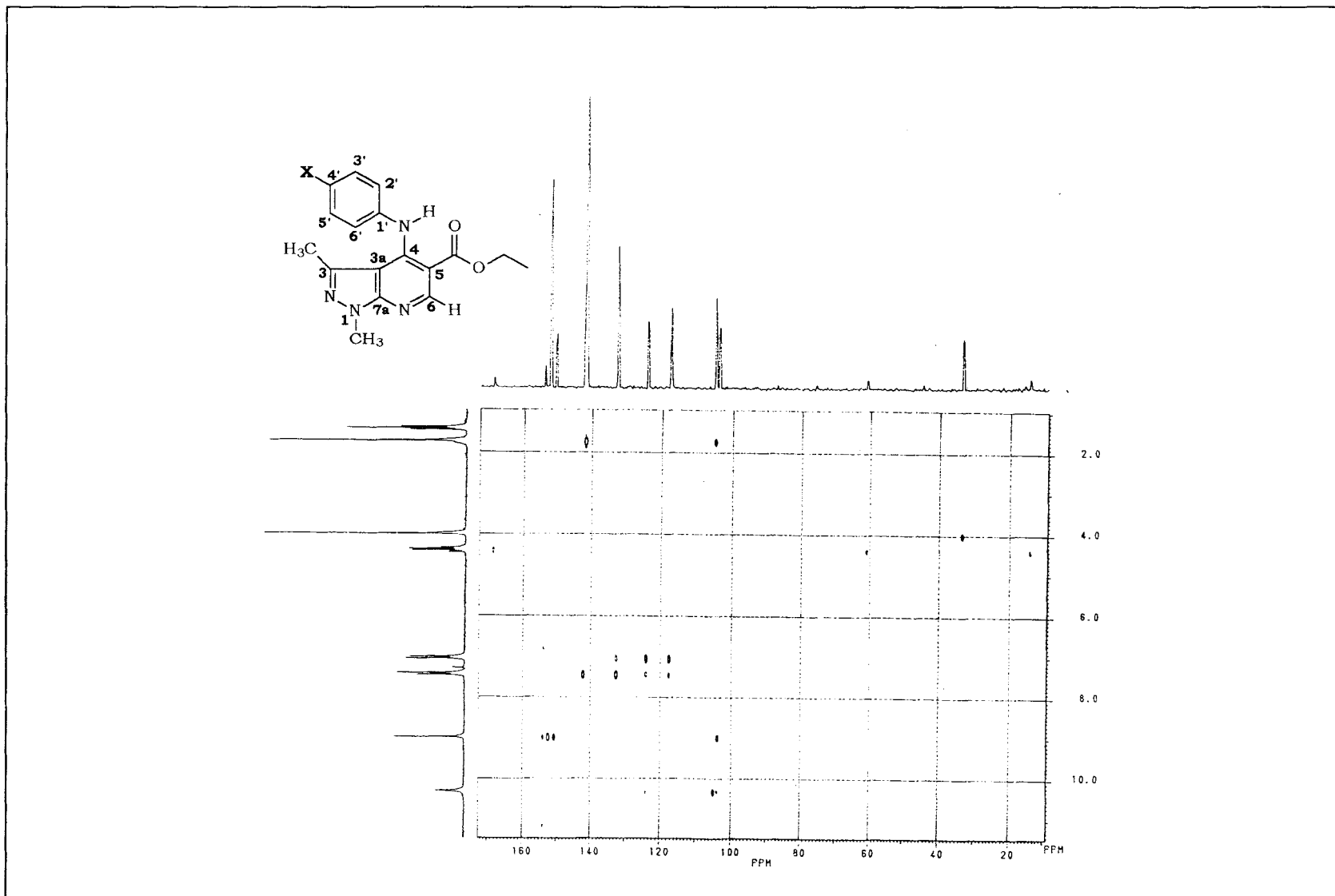


Figura 55: Espectro de RMN (2D) $^1\text{H}\text{X}^{13}\text{C}$ -COSY, $n\text{J}_{\text{CH}}$ $n=2$ ou 3 de **X = Br** – Solvente CDCl_3 .

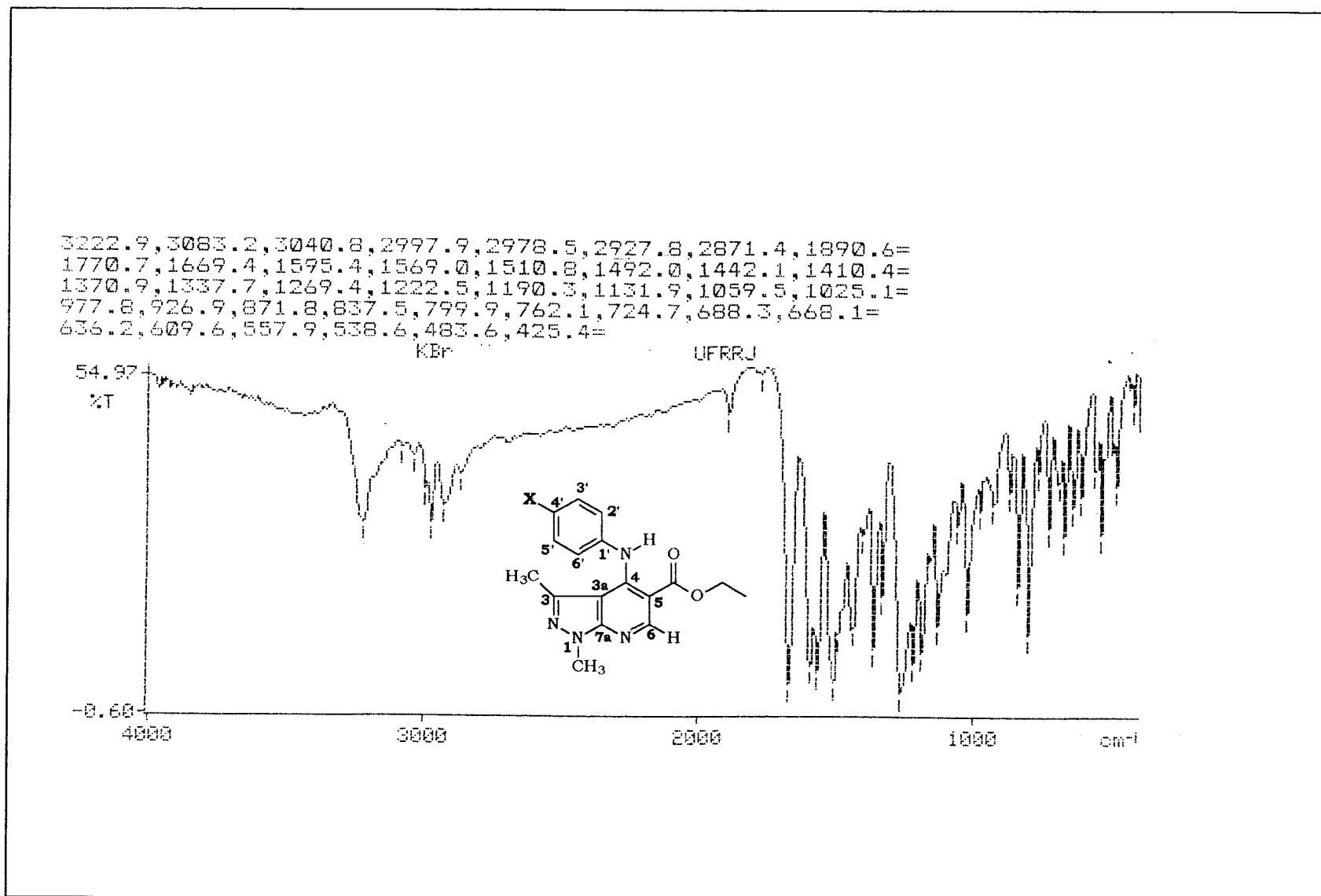


Figura 56: Espectro de IV de **X = F** – Pastilha de KBr.

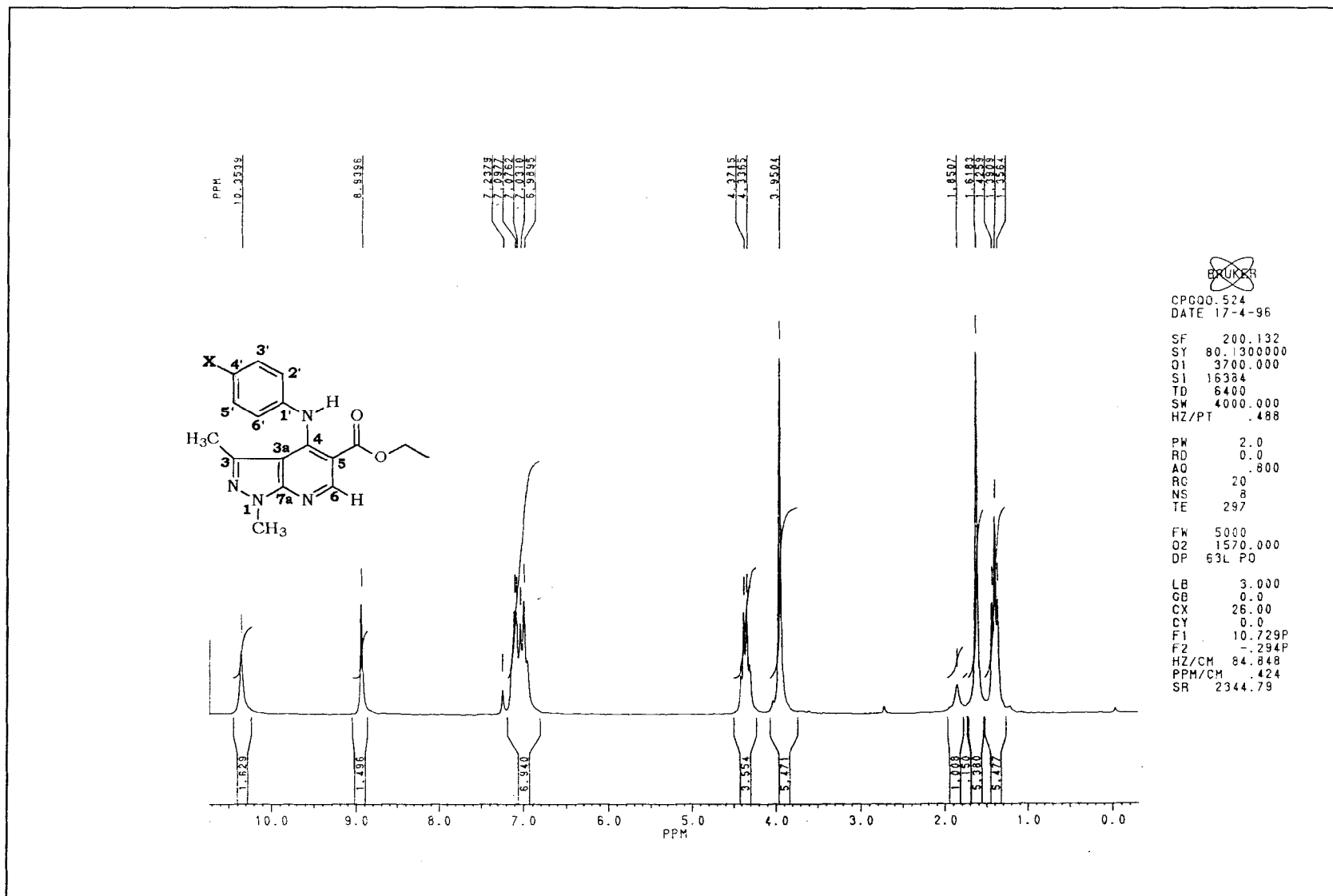


Figura 57: Espectro de RMN de ^1H de **X = F** – Solvente CDCl_3 – 200.133MHz.

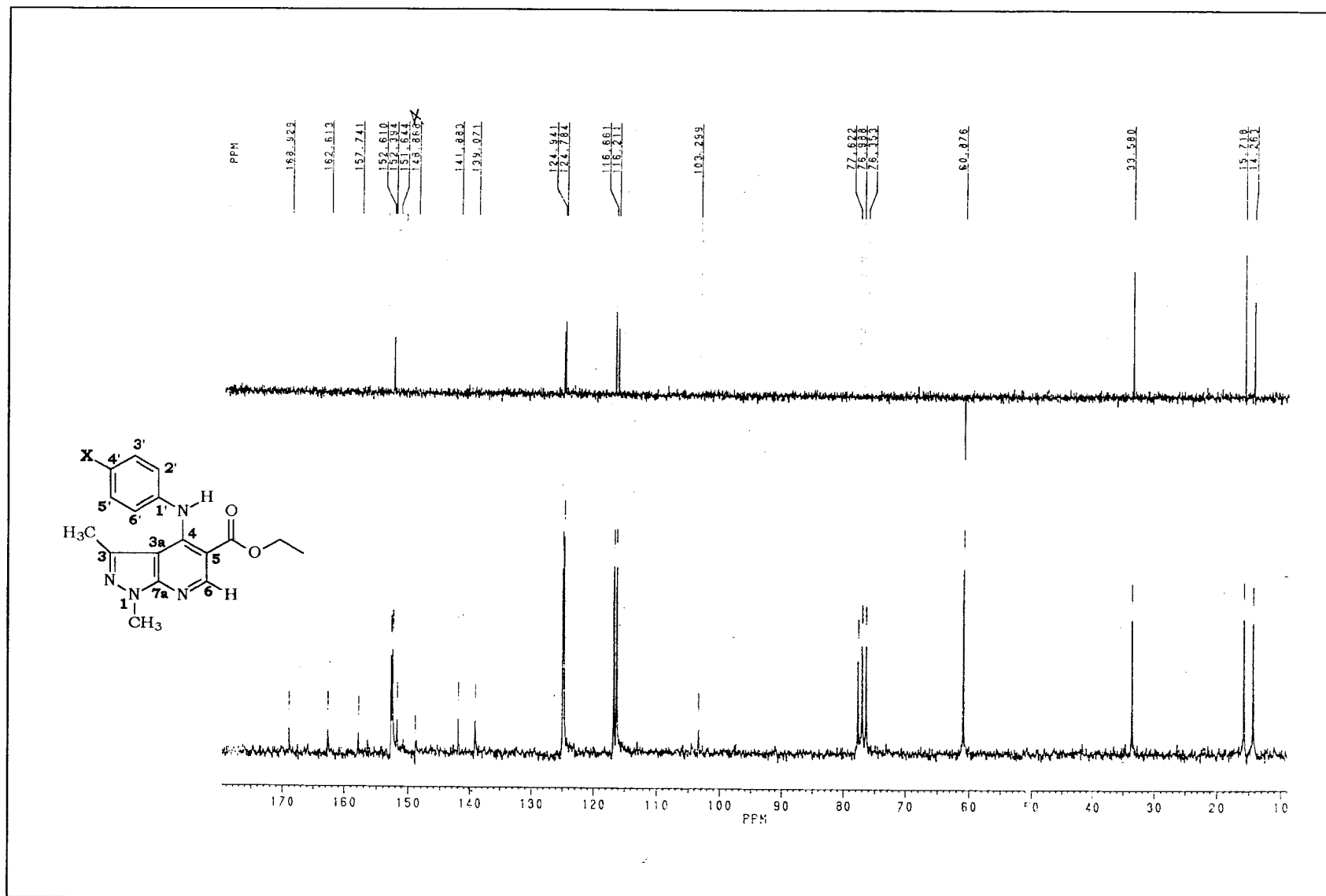


Figura 58: Espectro de RMN de ¹³C – DEPT de **X = F** – Solvente CDCl₃ – 50,3MHz.

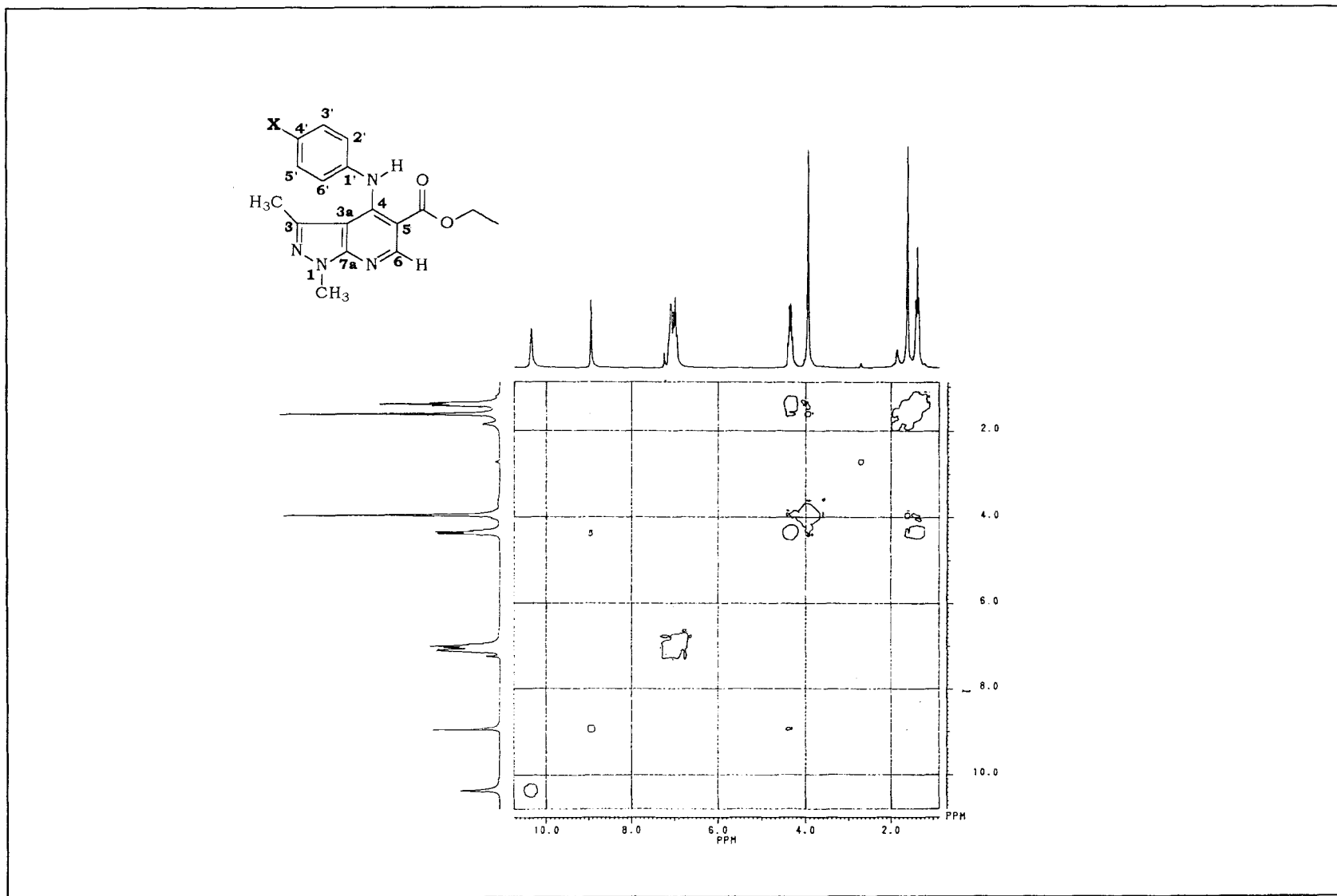


Figura 59: Espectro de RMN (2D) ¹Hx¹H-COSY de **X** = **F** – Solvente CDCl₃.

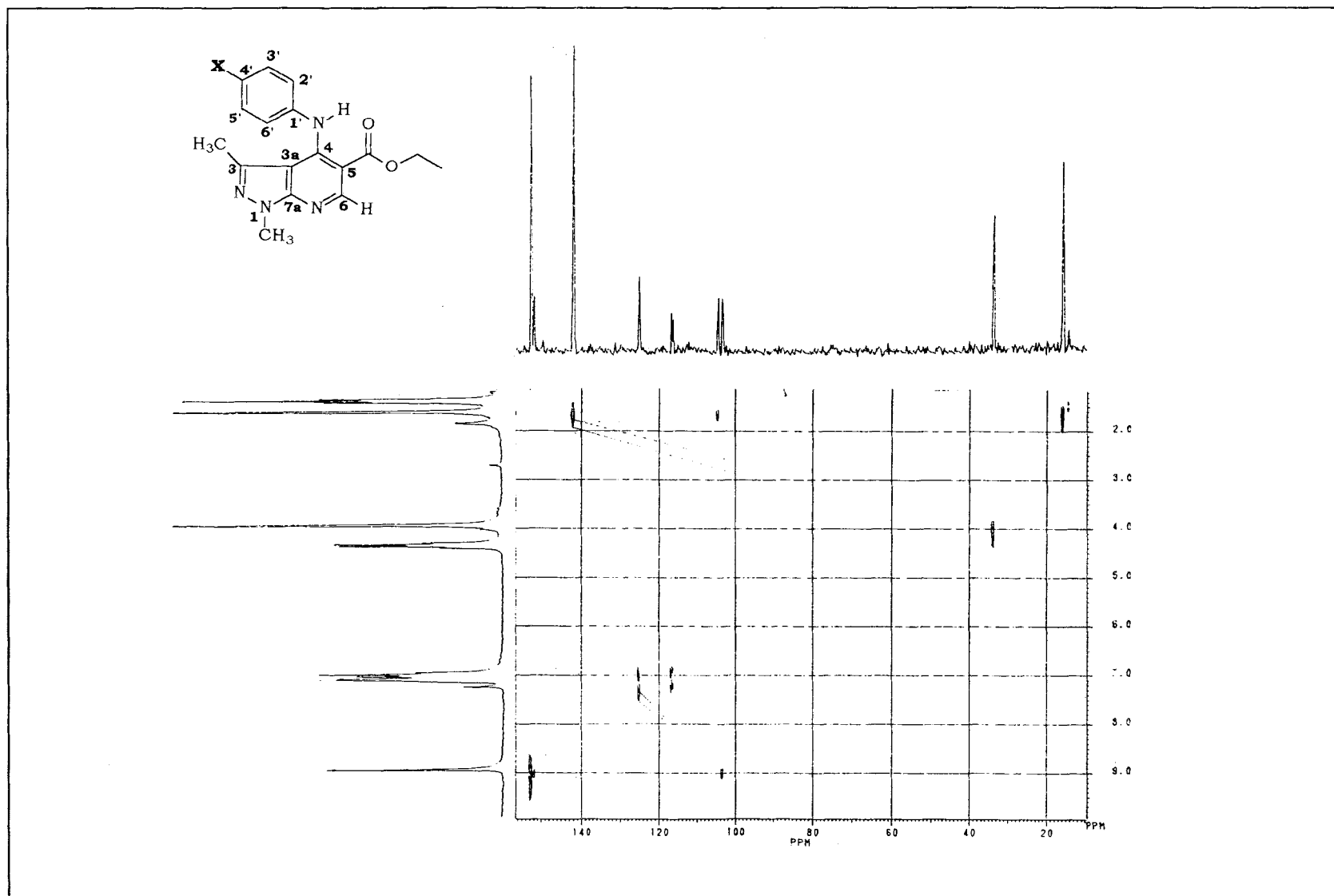


Figura 60: Espectro de RMN (2D) $^1\text{H}\text{X}^{13}\text{C}$ -COSY, $^1\text{J}_{\text{CH}}$ de $\text{X} = \text{F}$ – Solvente CDCl_3 – 299,95 MHz

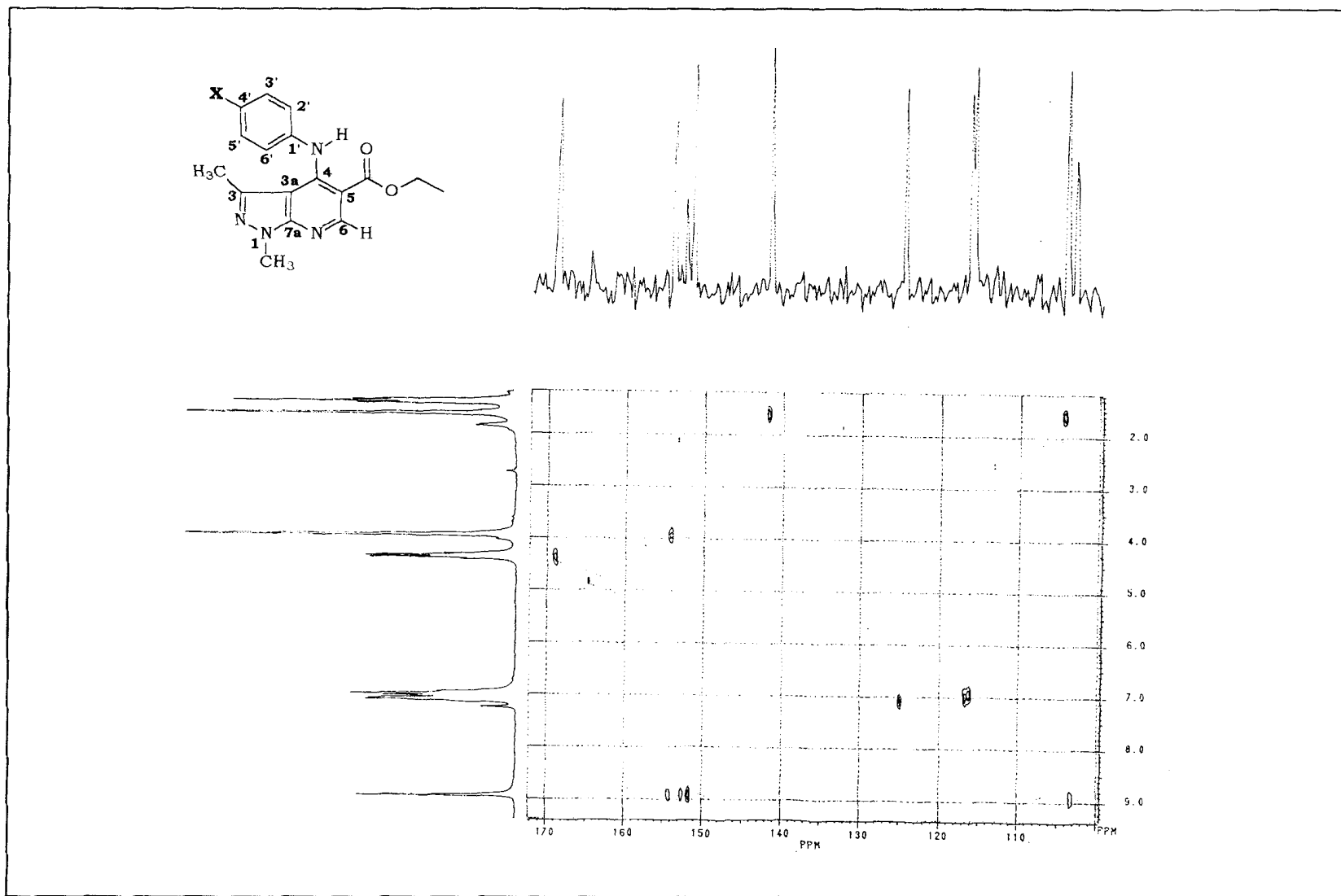


Figura 61: Espectro de RMN (2D) $^1\text{H}\times^{13}\text{C}$ -COSY, $^n\text{J}_{\text{CH}}$ $n=2$ ou 3 de $\mathbf{X} = \mathbf{F}$ – Solvente CDCl_3 .

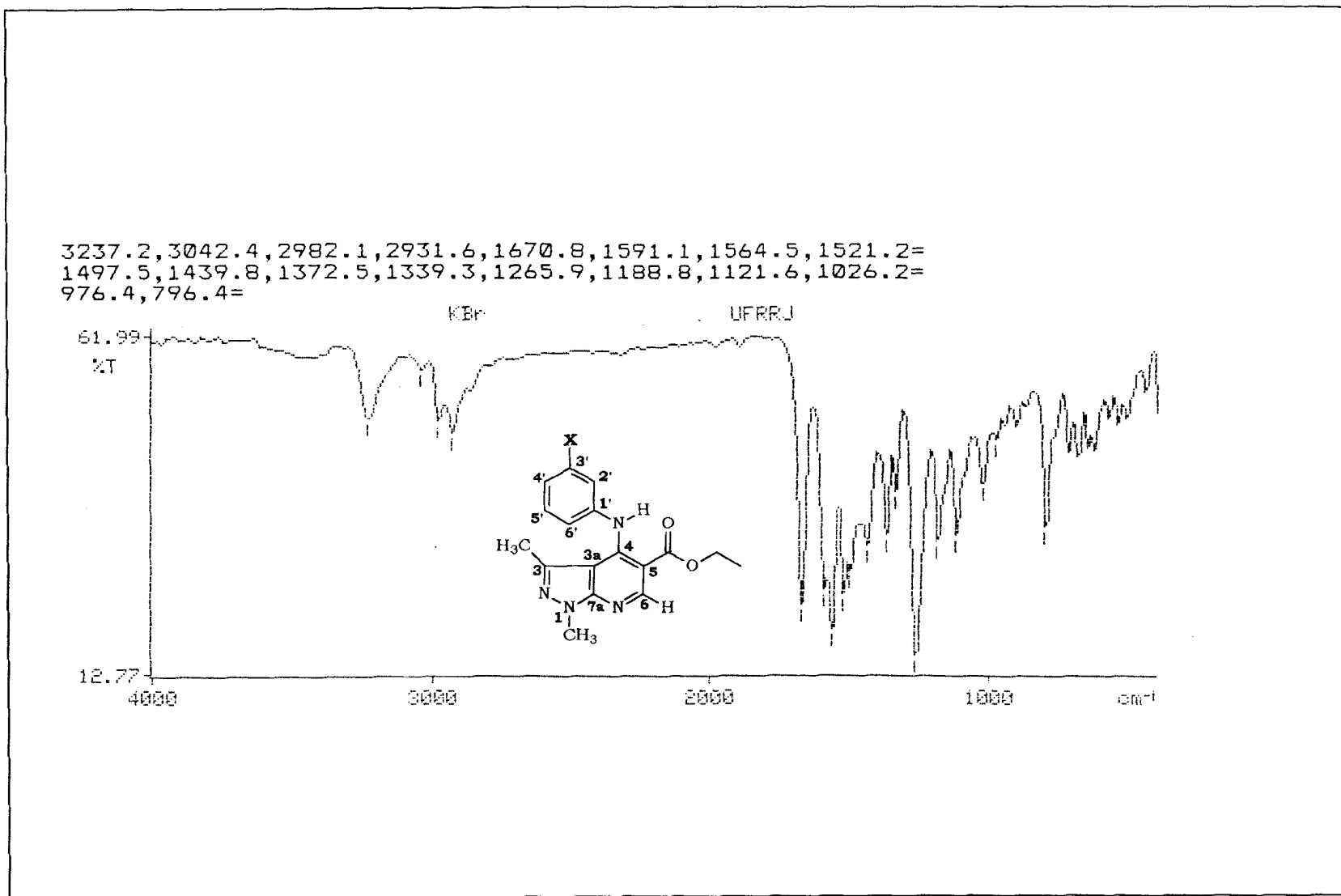


Figura 62: Espectro de IV de **X = CH₃** – Pastilha de KBr.

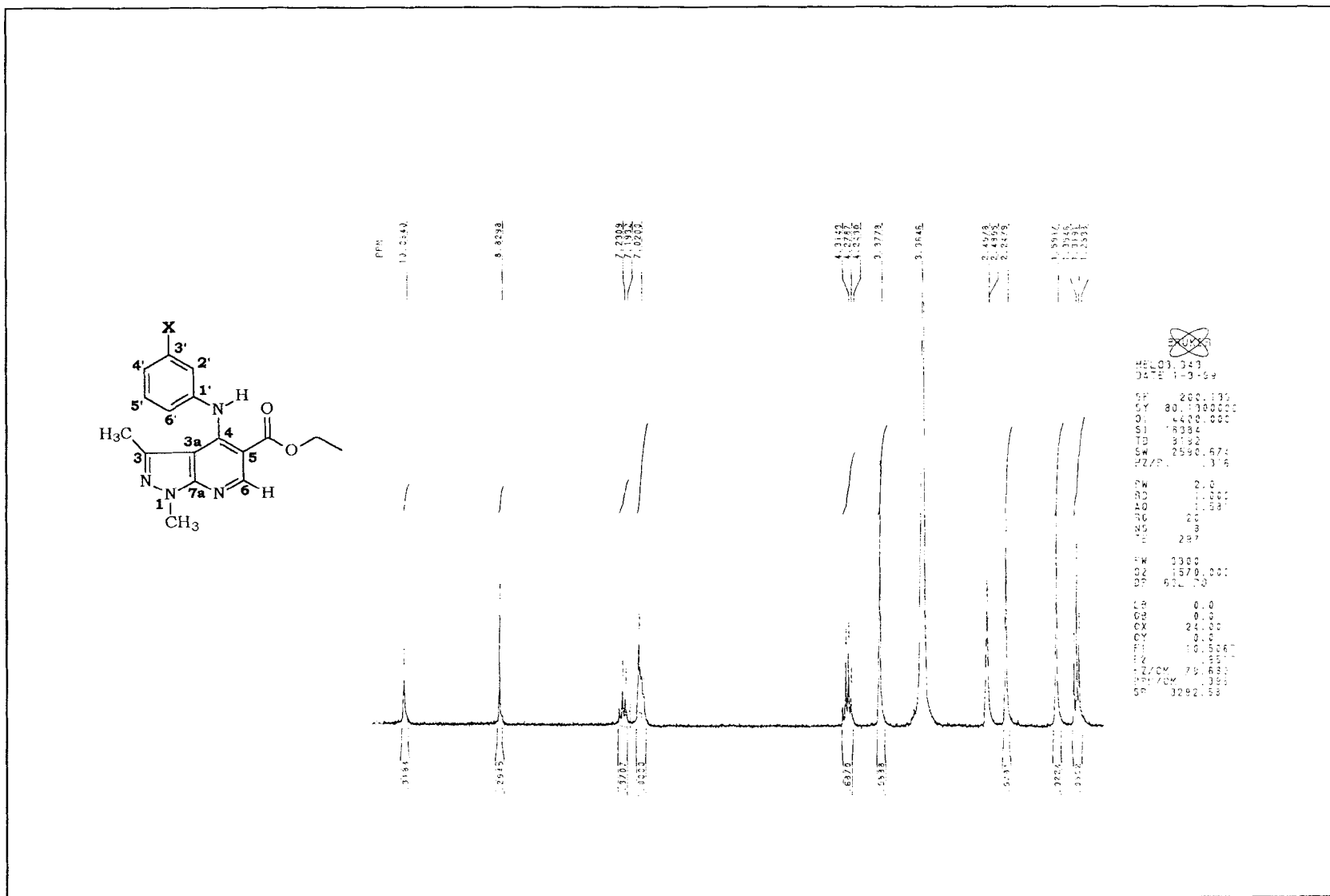


Figura 63: Espectro de RMN de ^1H de **X** = **CH₃** – Solvente DMSO- d_6 – 200.133MHz.

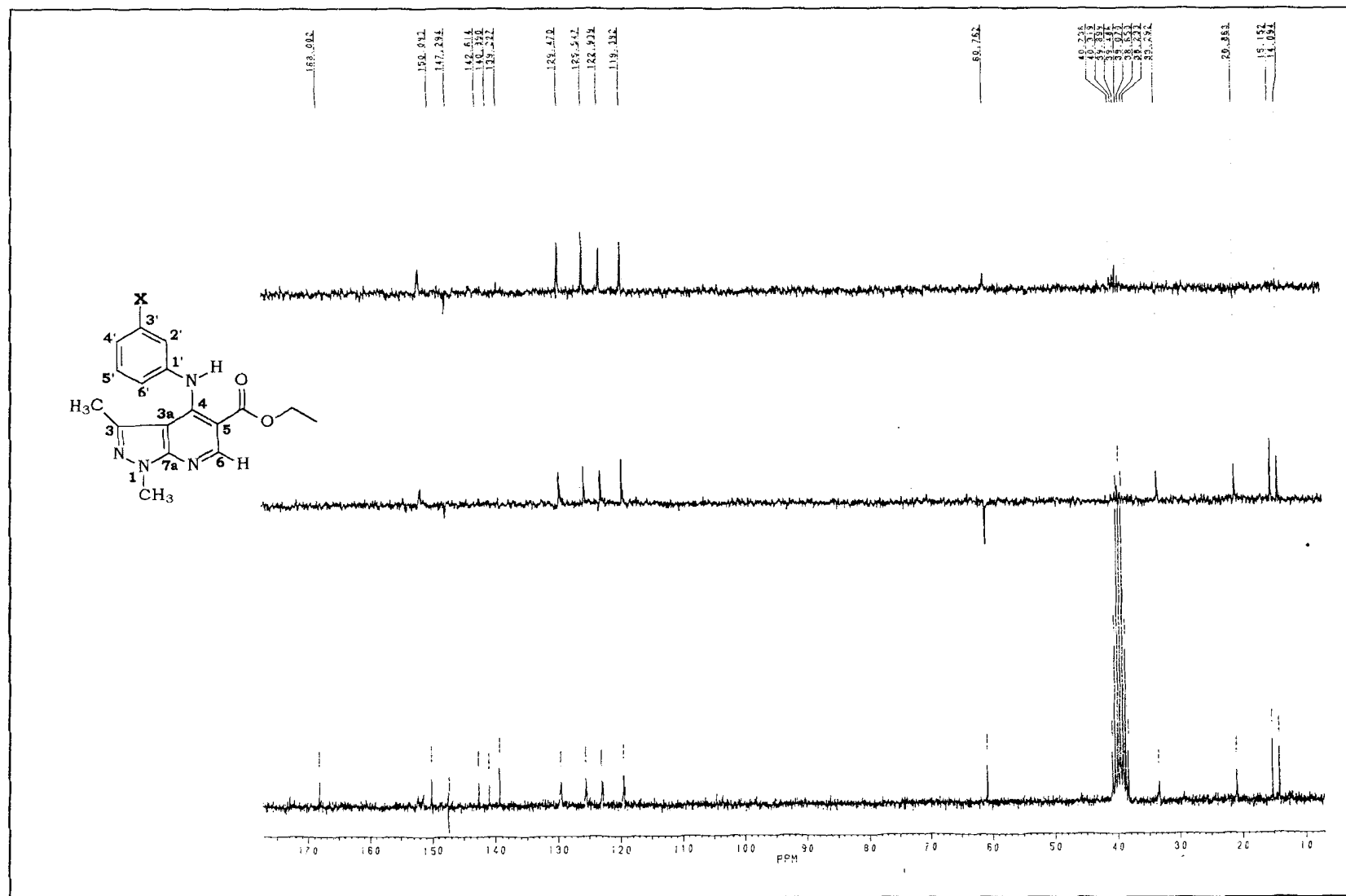


Figura 64: Espectro de RMN de ¹³C – DEPT de **X = CH₃** – Solvente DMSO-d₆ – 50,3MHz.

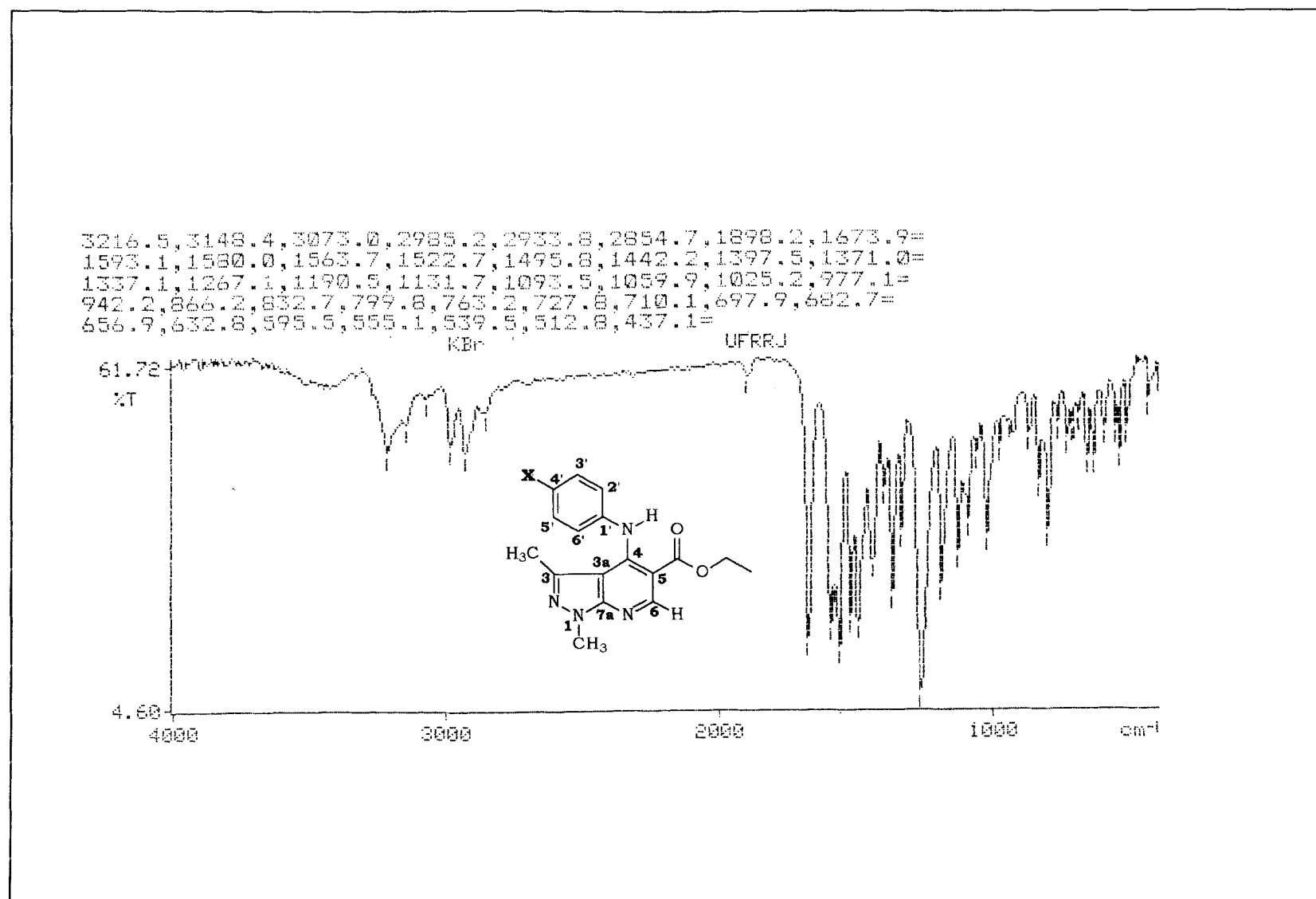


Figura 65: Espectro de IV de **X = Cl** – Pastilha de KBr.

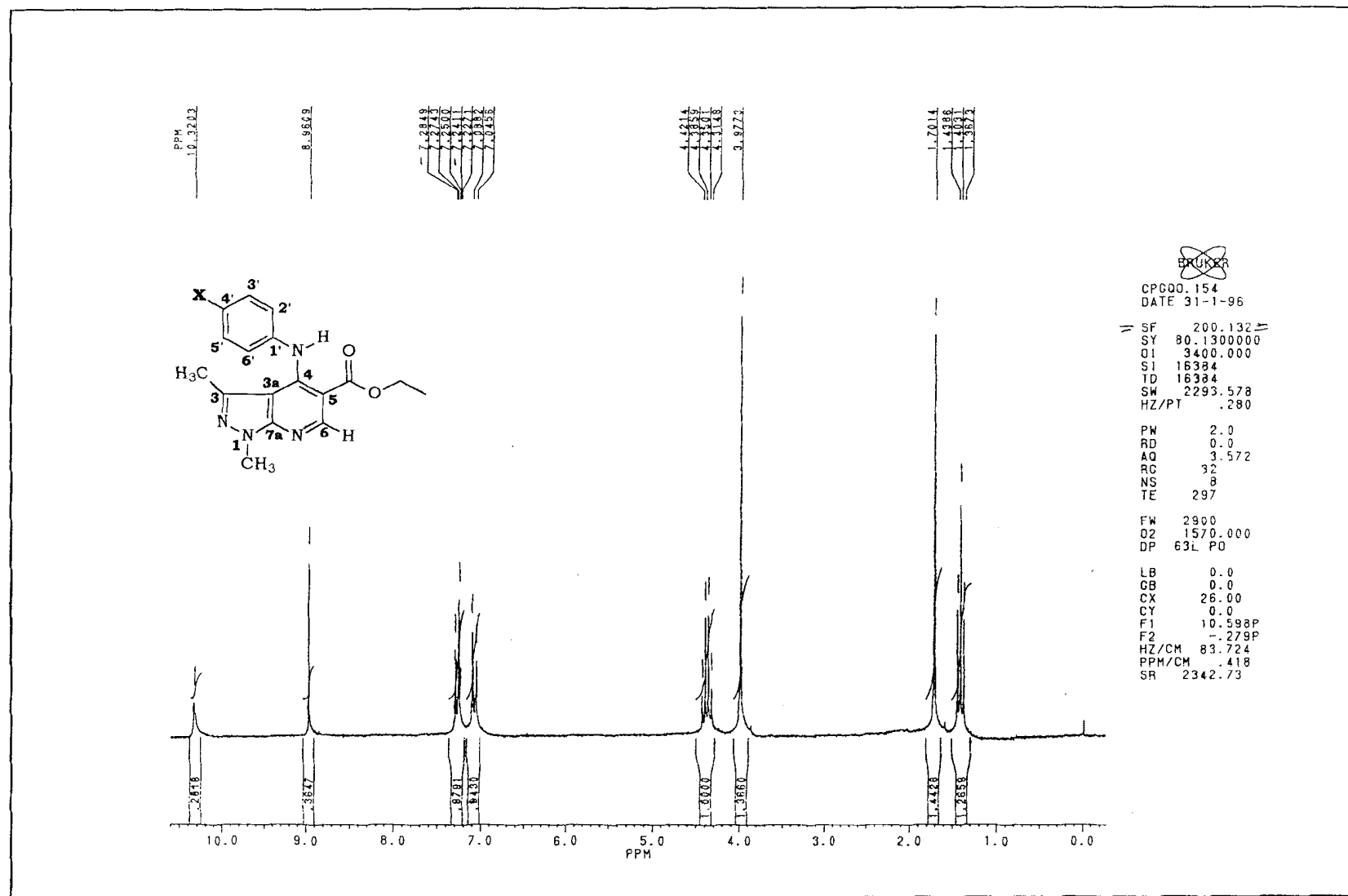


Figura 66: Espectro de RMN de ^1H de **X** = **Cl** – Solvente CDCl_3 – 200.133MHz.

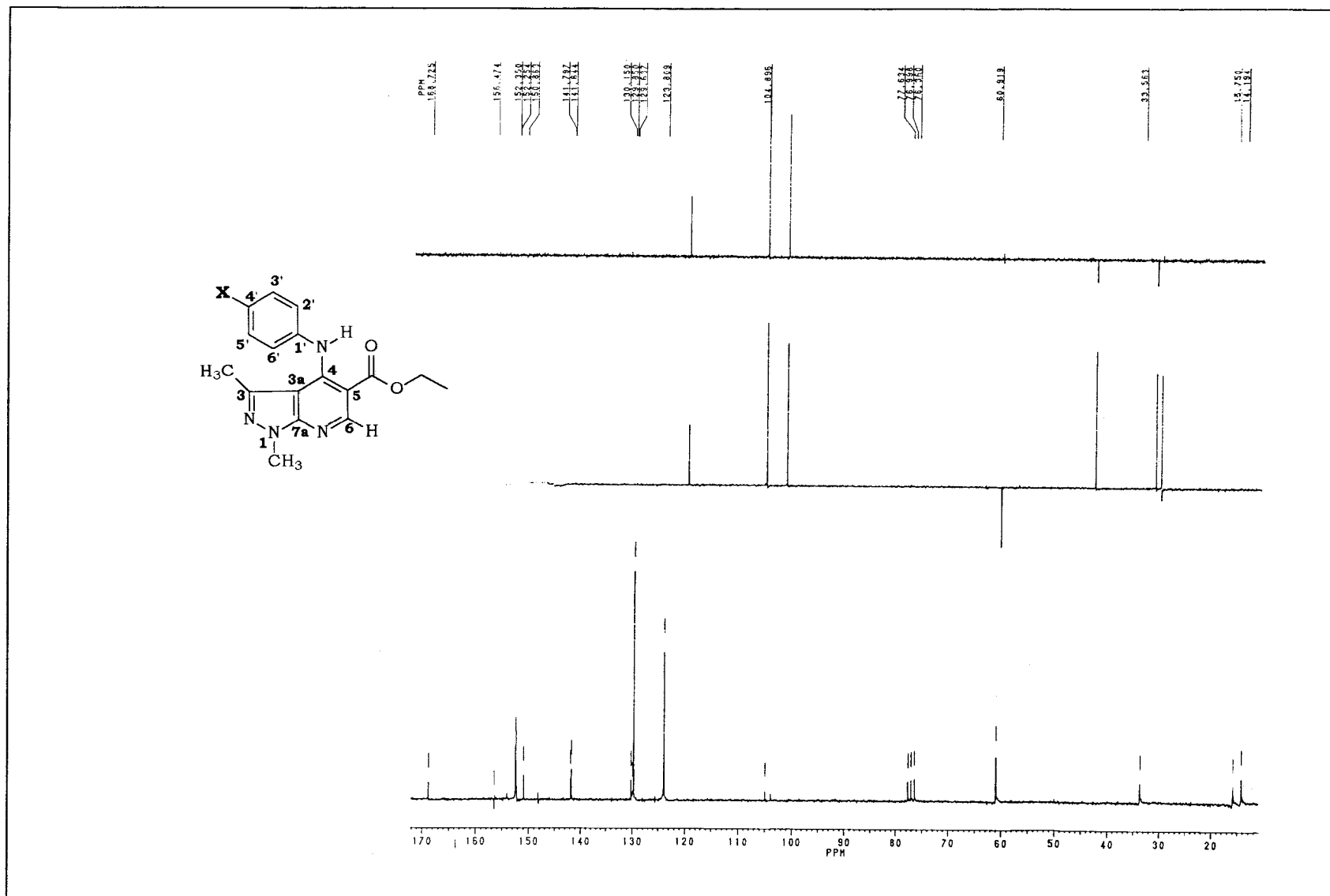


Figura 67: Espectro de RMN de ^{13}C - DEPT de **X** = **Cl** - Solvente CDCl_3 - 50,3MHz.

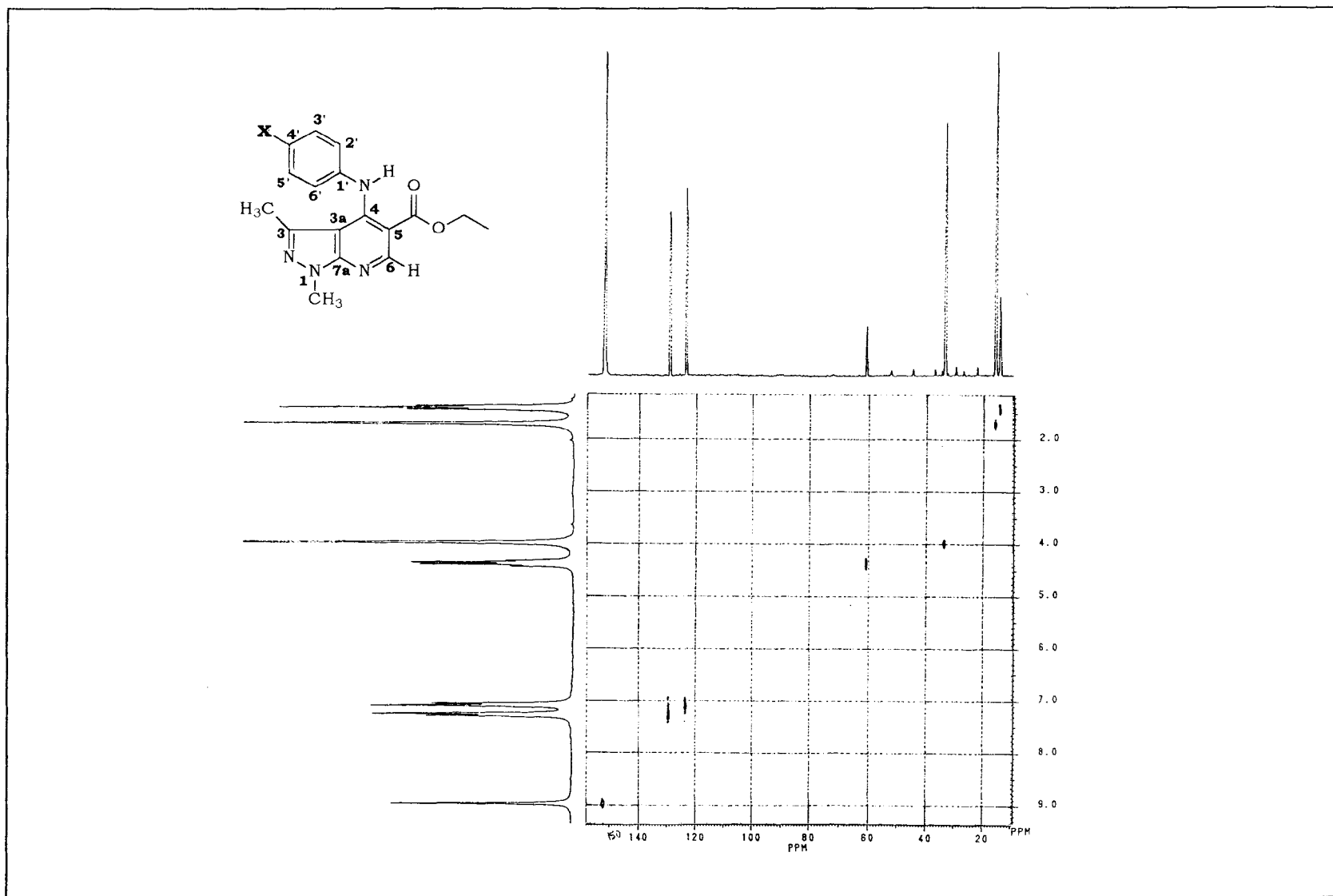


Figura 68: Espectro de RMN (2D) ^1H - ^{13}C -COSY, $^1\text{J}_{\text{CH}}$ de **X = Cl** - Solvente CDCl_3 .

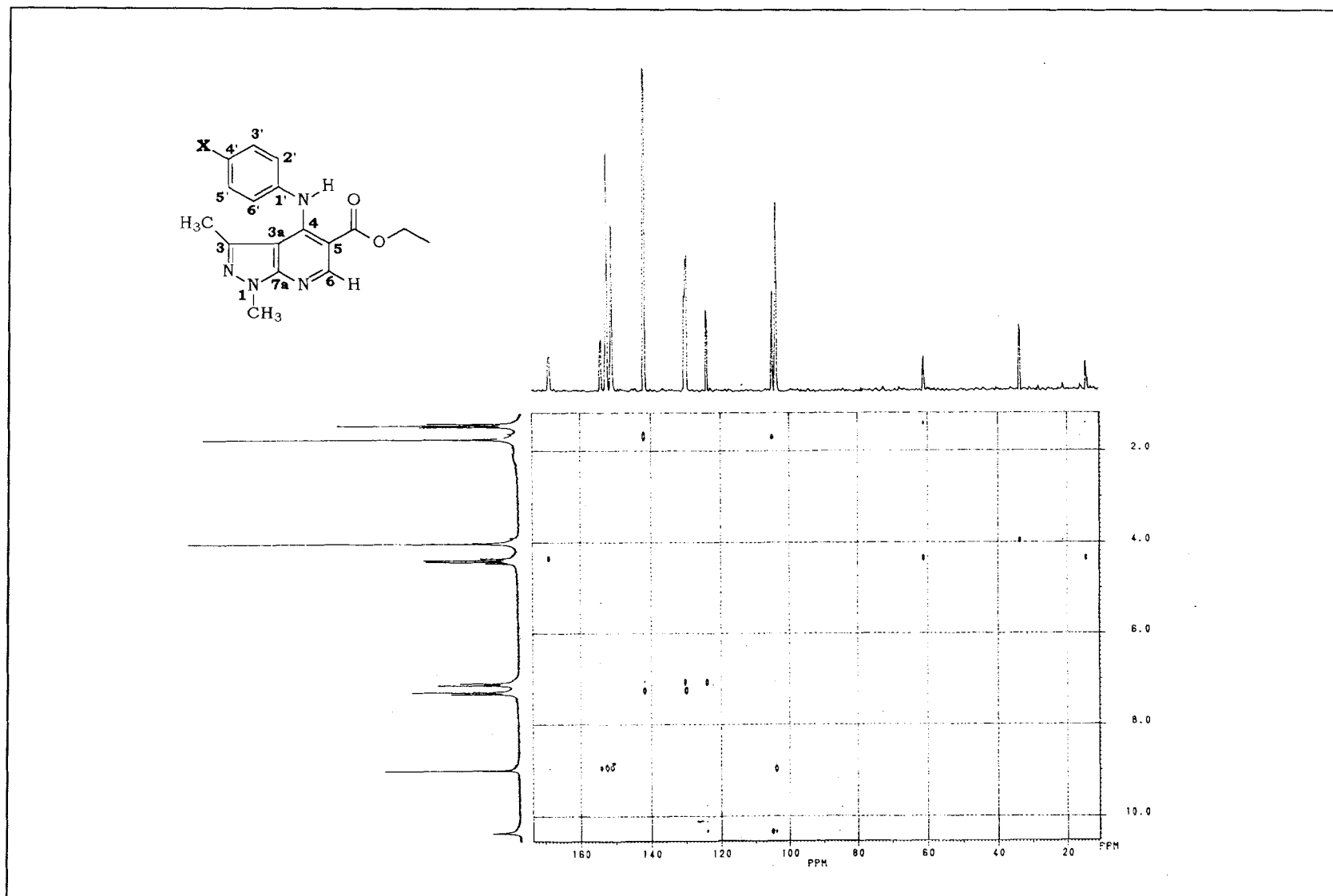


Figura 69: Espectro de RMN (2D) ^1H ^{13}C -COSY, $^n\text{J}_{\text{CH}}$ $n = 2$ ou 3 de **X = Cl** – Solvente CDCl_3 .

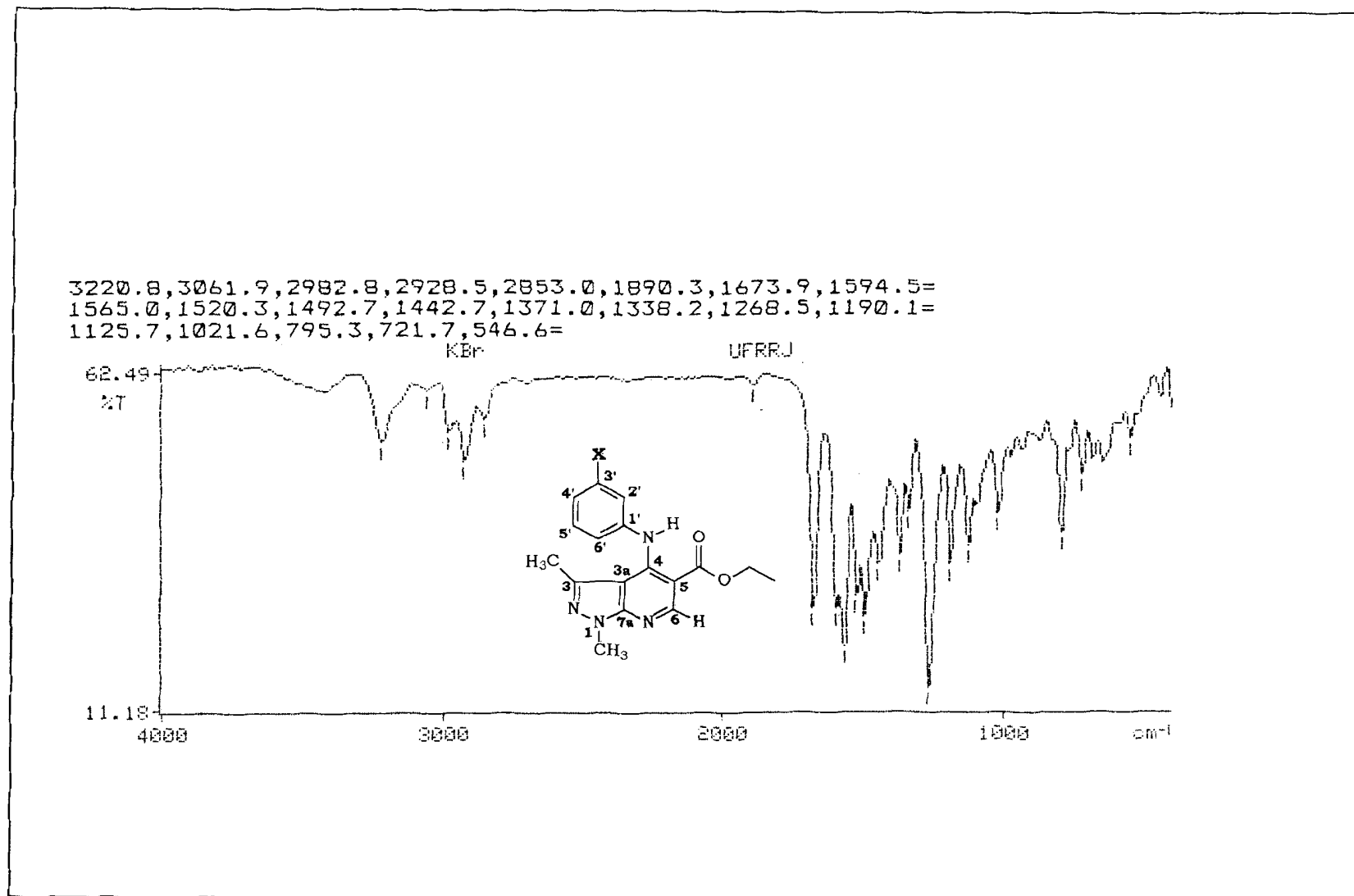


Figura 70: Espectro de IV de **X = Cl** – Pastilha de KBr.

Heloisa de Mello
08/12/93
5363 N-C1, 1H, DMSO
OPER: Fatima Azevedo
Pulse Sequence: s2pul
Solvent: DMSO
Ambient temperature
UNITYplus-300 "UFFU300"
PULSE SEQUENCE
Pulse 44.4 degrees
Acc. time 3.744 sec
Width 7000.4 Hz
16 repetitions
OBSERVE H1, 299.945499 MHz
DATA PROCESSING
FT size 65536
Total time 1 min, 0 sec

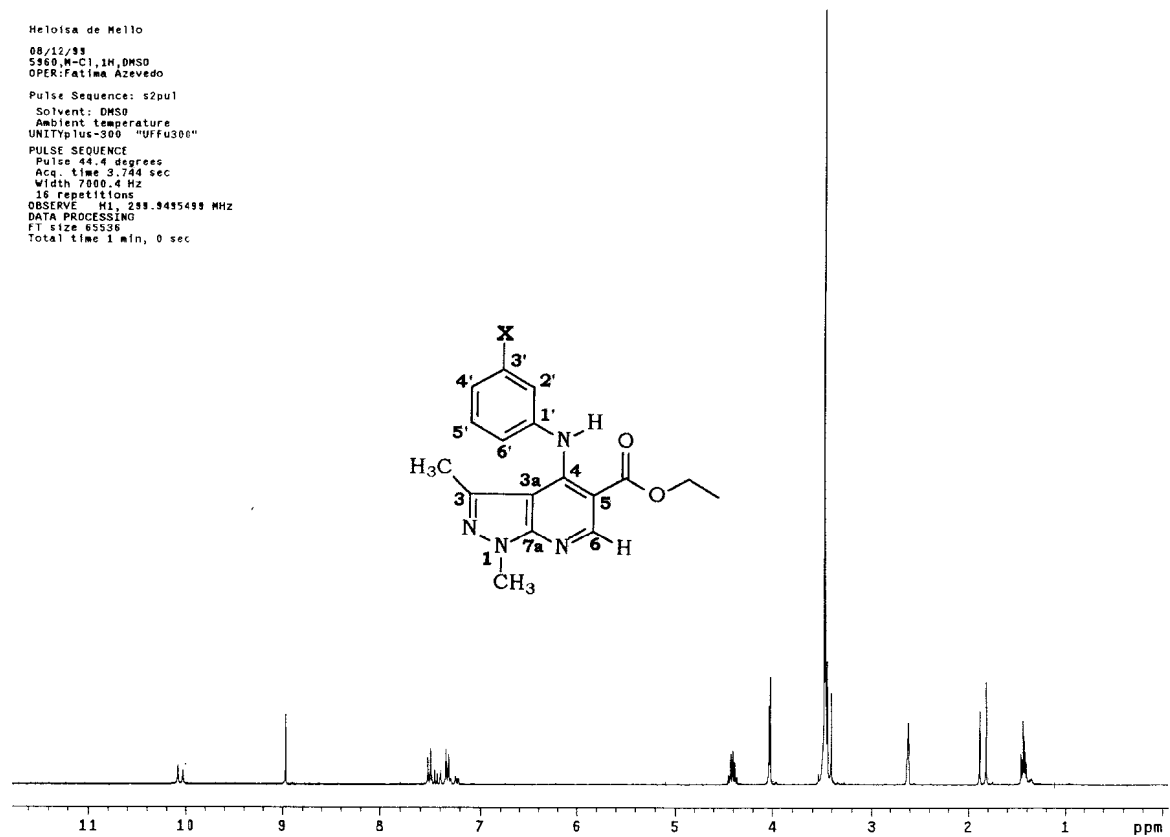


Figura 71: Espectro de RMN de ¹H de **X = Cl** Solvente DMSO-d₆ - 299.95 MHz.

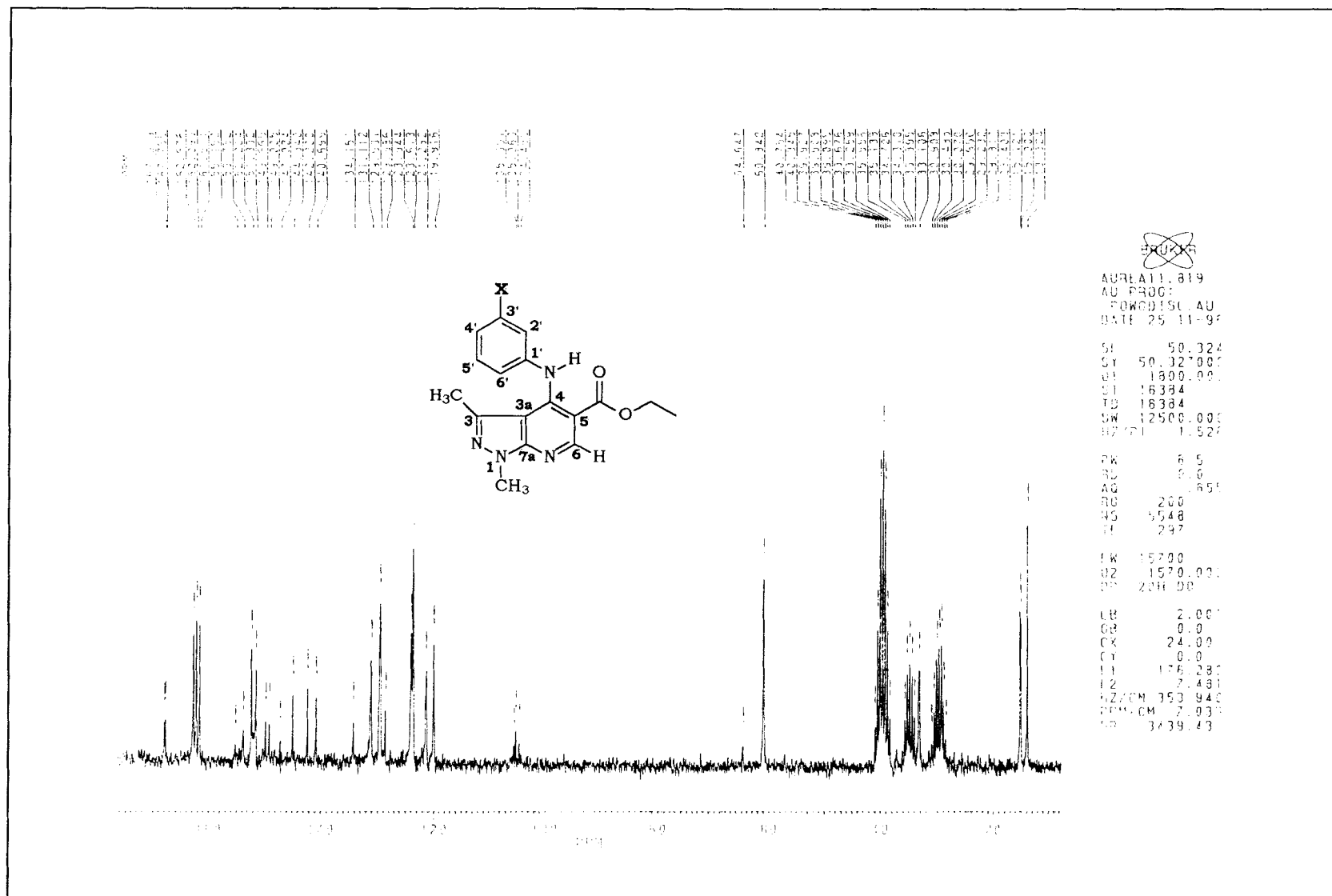


Figura 72: Espectro de RMN de ^{13}C de **X = Cl** – Solvente DMSO-d_6 – 50,3MHz.

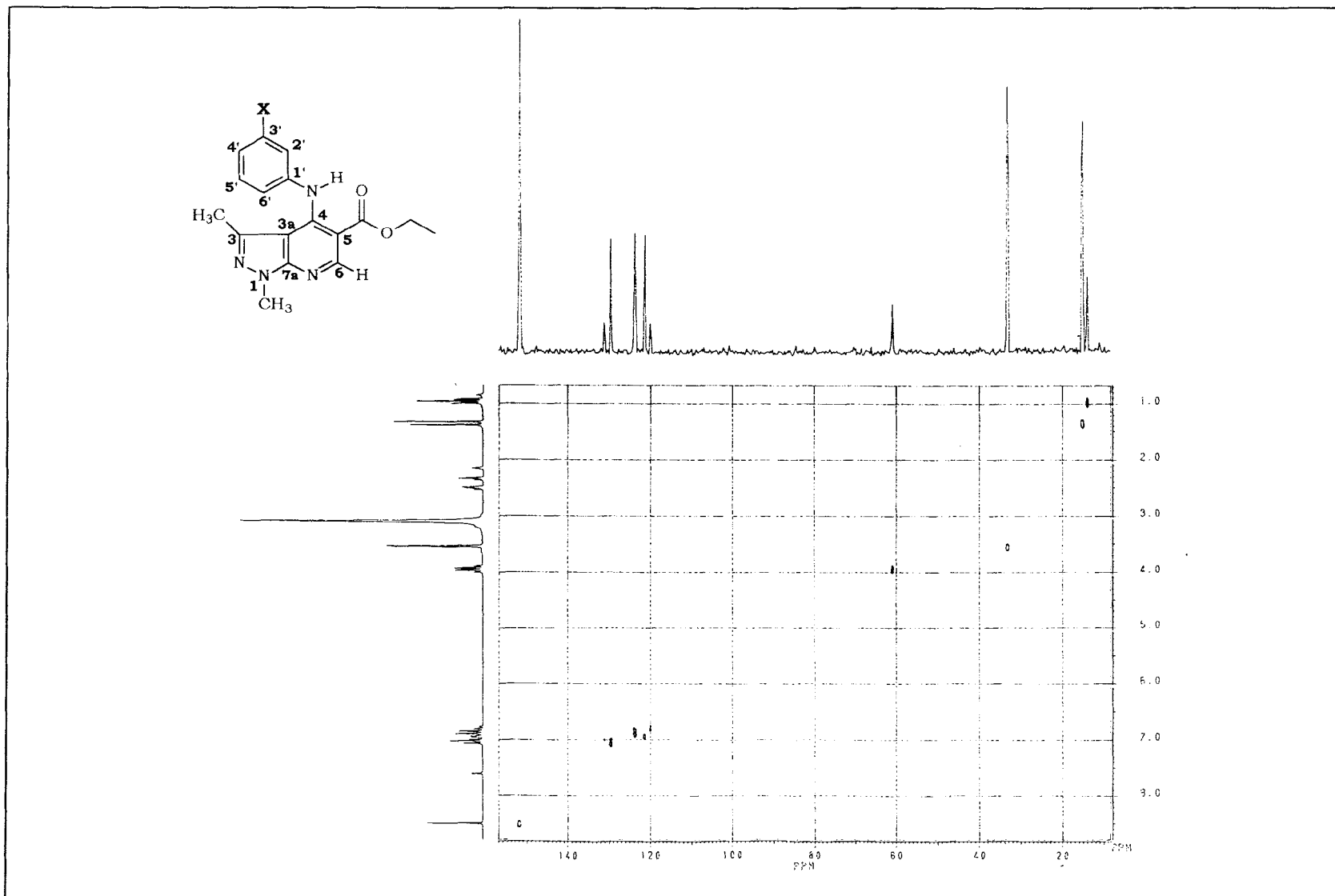


Figura 73: Espectro de RMN (2D) $^1\text{H}\text{x}^{13}\text{C}$ -COSY, $^1\text{J}_{\text{CH}}$ de **X = Cl** – Solvente DMSO- d_6 .

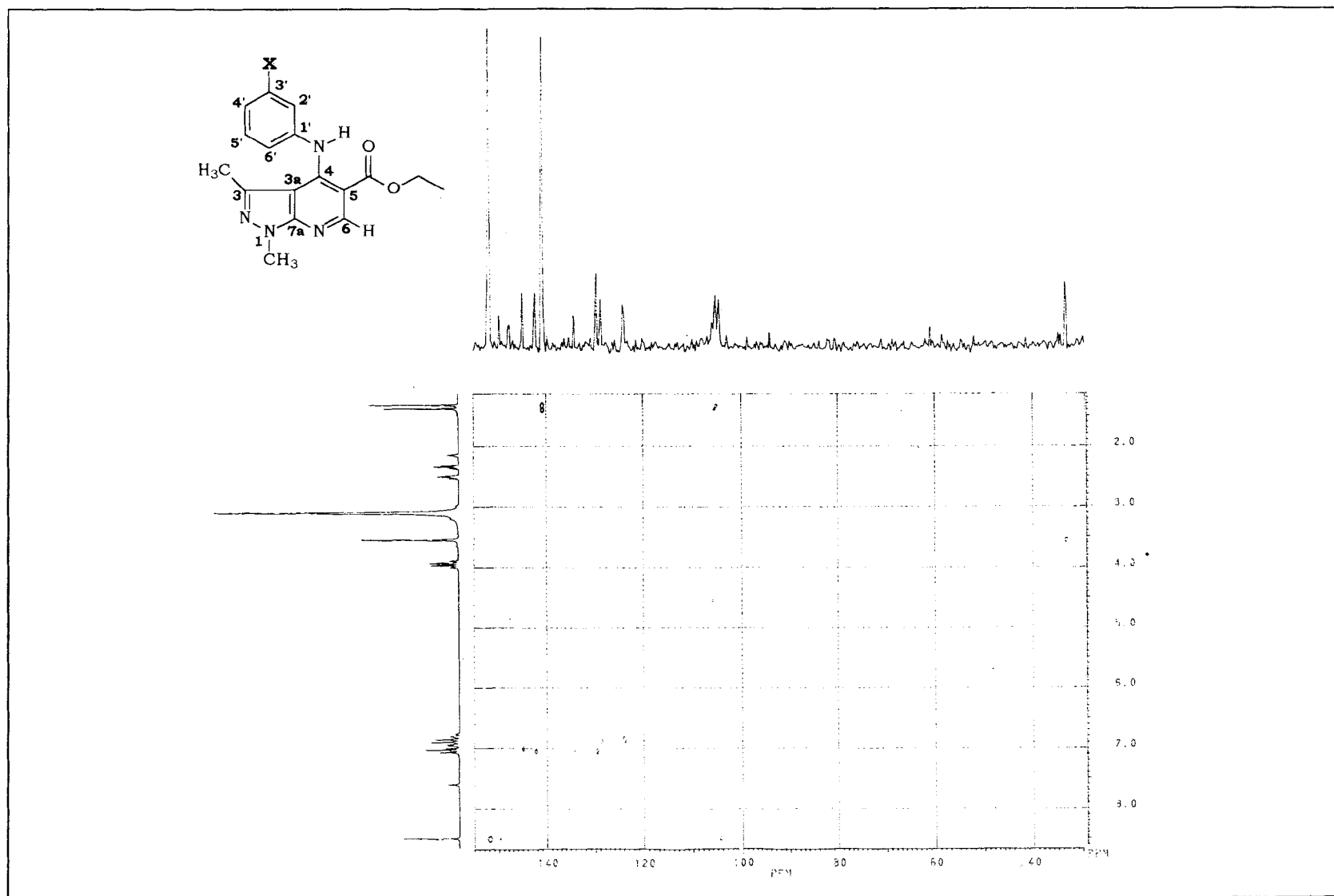


Figura 74: Espectro de RMN (2D) $^1\text{H}\text{x}^{13}\text{C}$ -COSY, $n\text{J}_{\text{CH}} n = 2$ ou 3 de **X = Cl** – Solvente DMSO- d_6 .

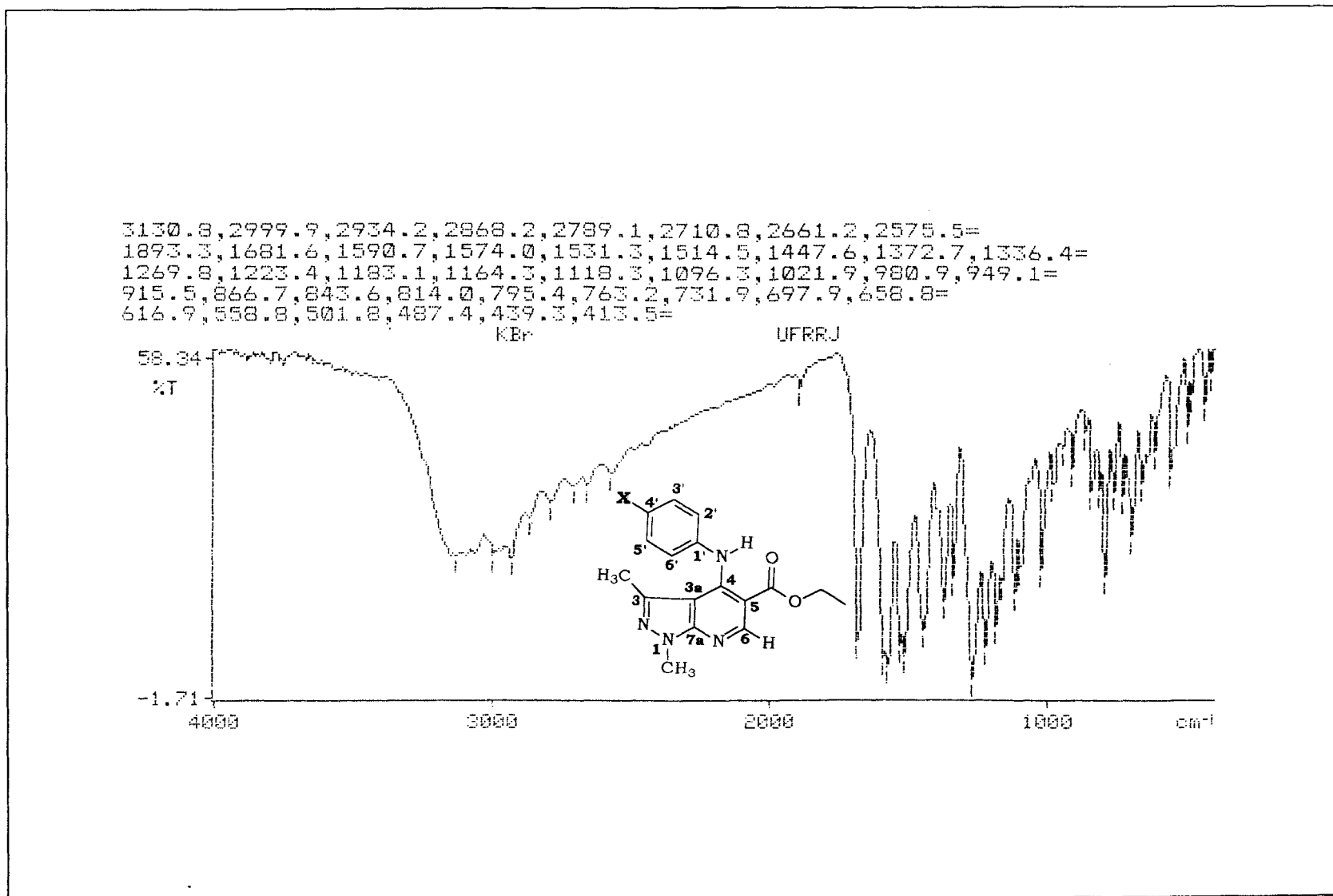


Figura 75: Espectro de IV de **X = OH** – Pastilha de KBr.

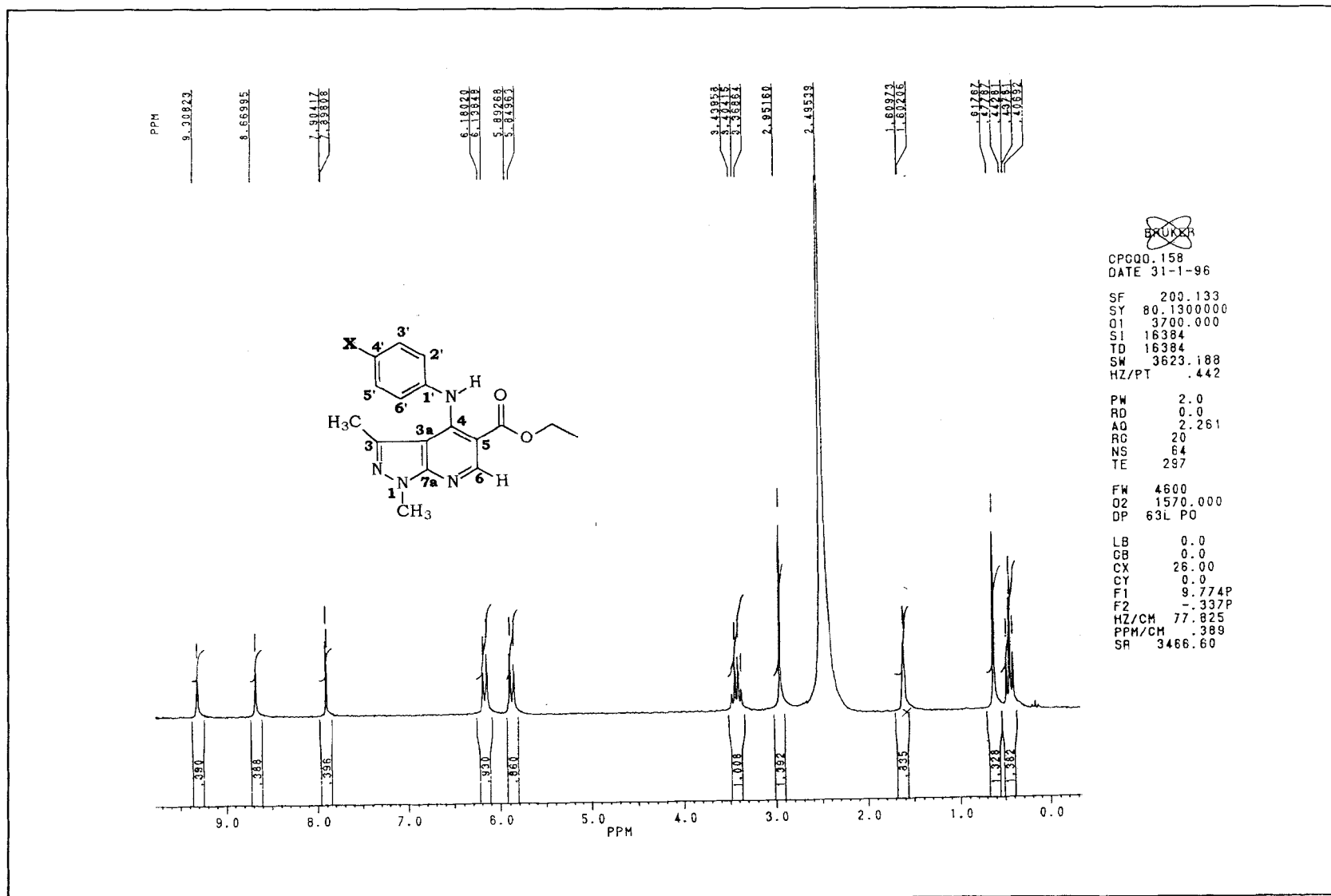


Figura 76: Espectro de RMN de ^1H de $\text{X} = \text{OH}$ - Solvente DMSO-d_6 - 200.133MHz.

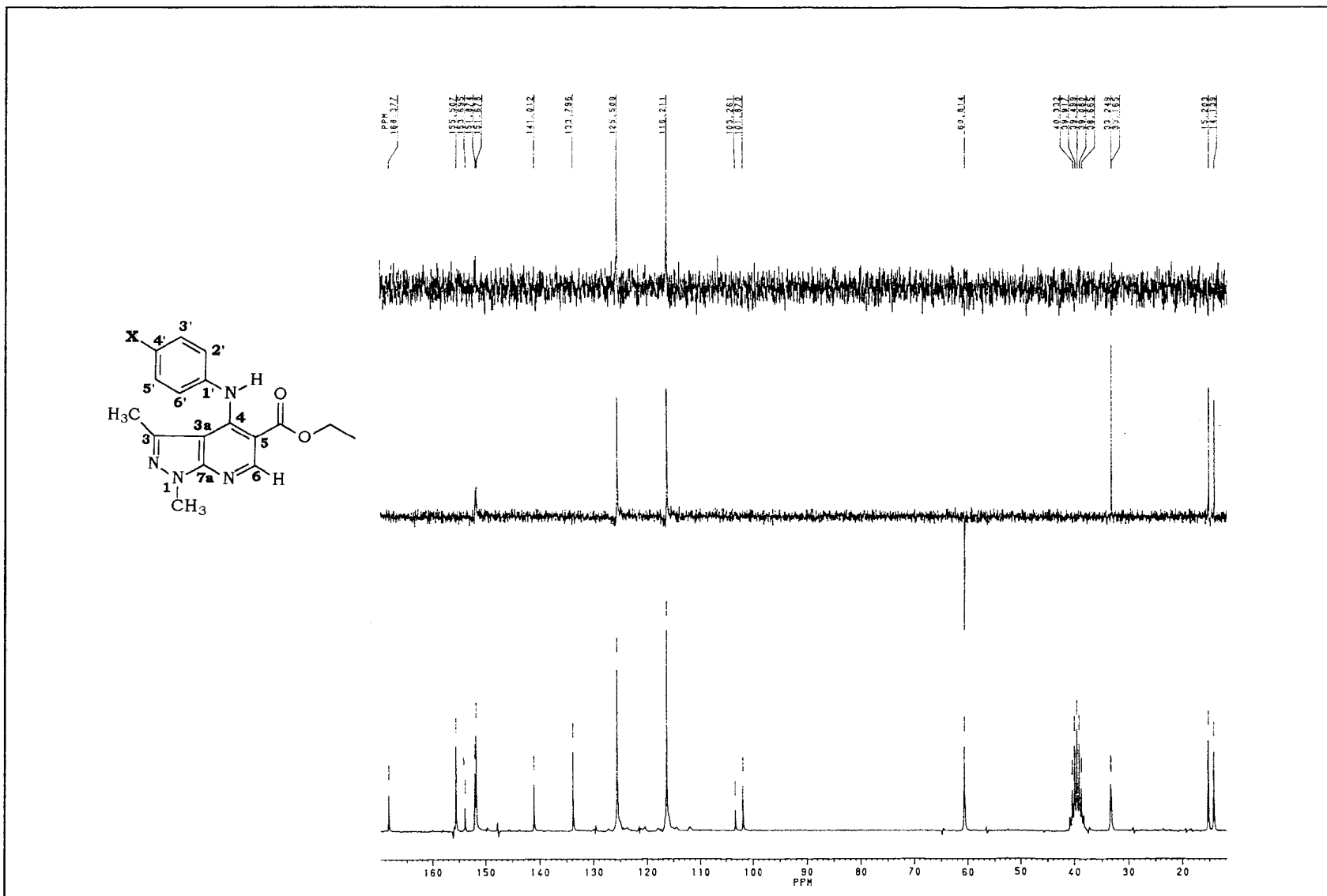


Figura 77: Espectro de RMN de ^{13}C – DEPT de $\text{X} = \text{OH}$ – Solvente $\text{DMSO-}d_6$ – 50,3MHz.

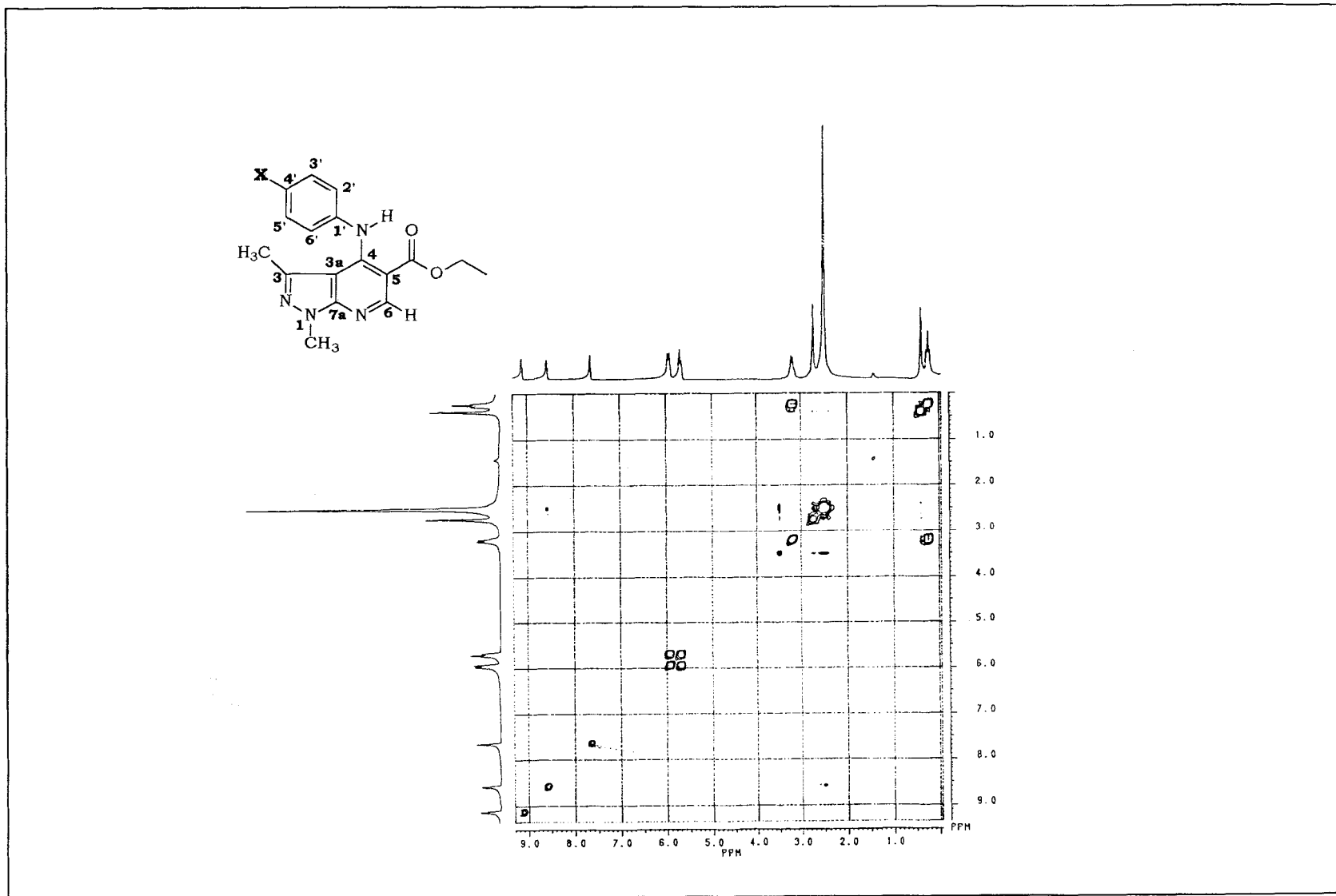


Figura 78: Espectro de RMN (2D) $^1\text{H}\times^1\text{H}$ -COSY de **X = OH** – Solvente DMSO- d_6 .

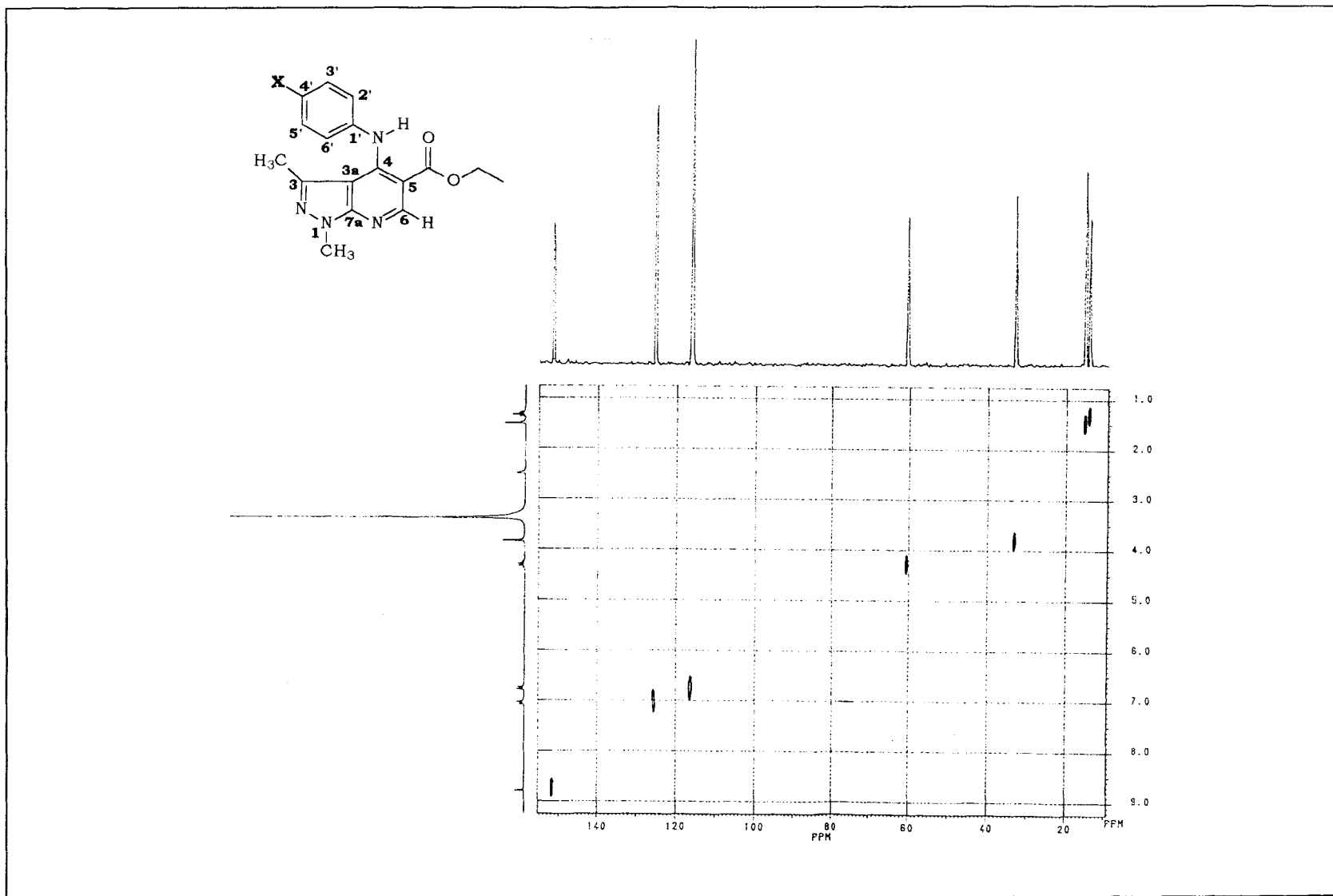


Figura 79: Espectro de RMN (2D) $^1\text{H}\times^{13}\text{C}$ -COSY, $^1\text{J}_{\text{CH}}$ de **X = OH** – Solvente DMSO- d_6 .

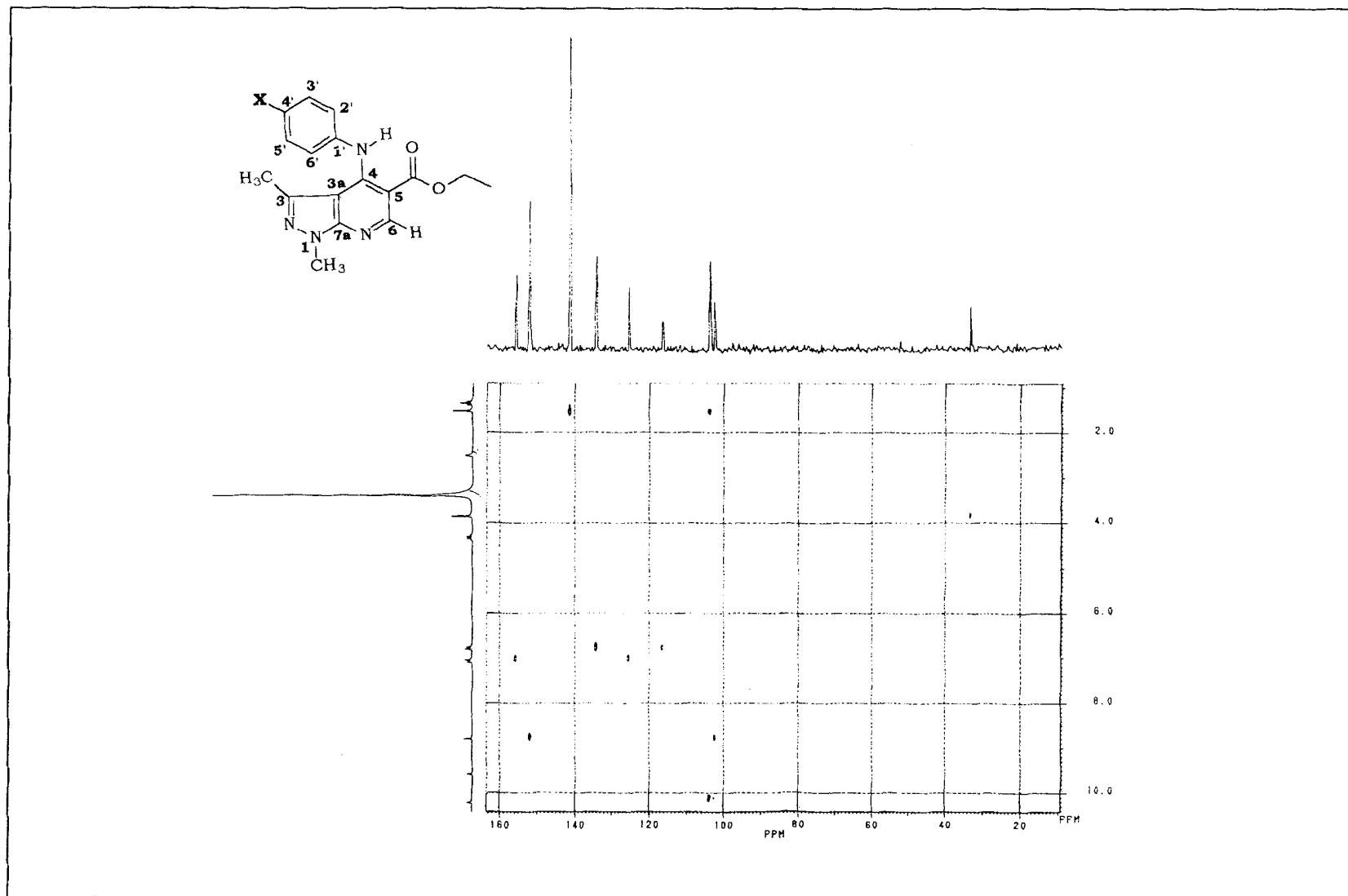


Figura 80: Espectro de RMN (2D) $^1\text{H}\text{X}^{13}\text{C}$ -COSY, nJ_{CH} $n = 2$ ou 3 de **X = OH** – Solvente DMSO- d_6 .

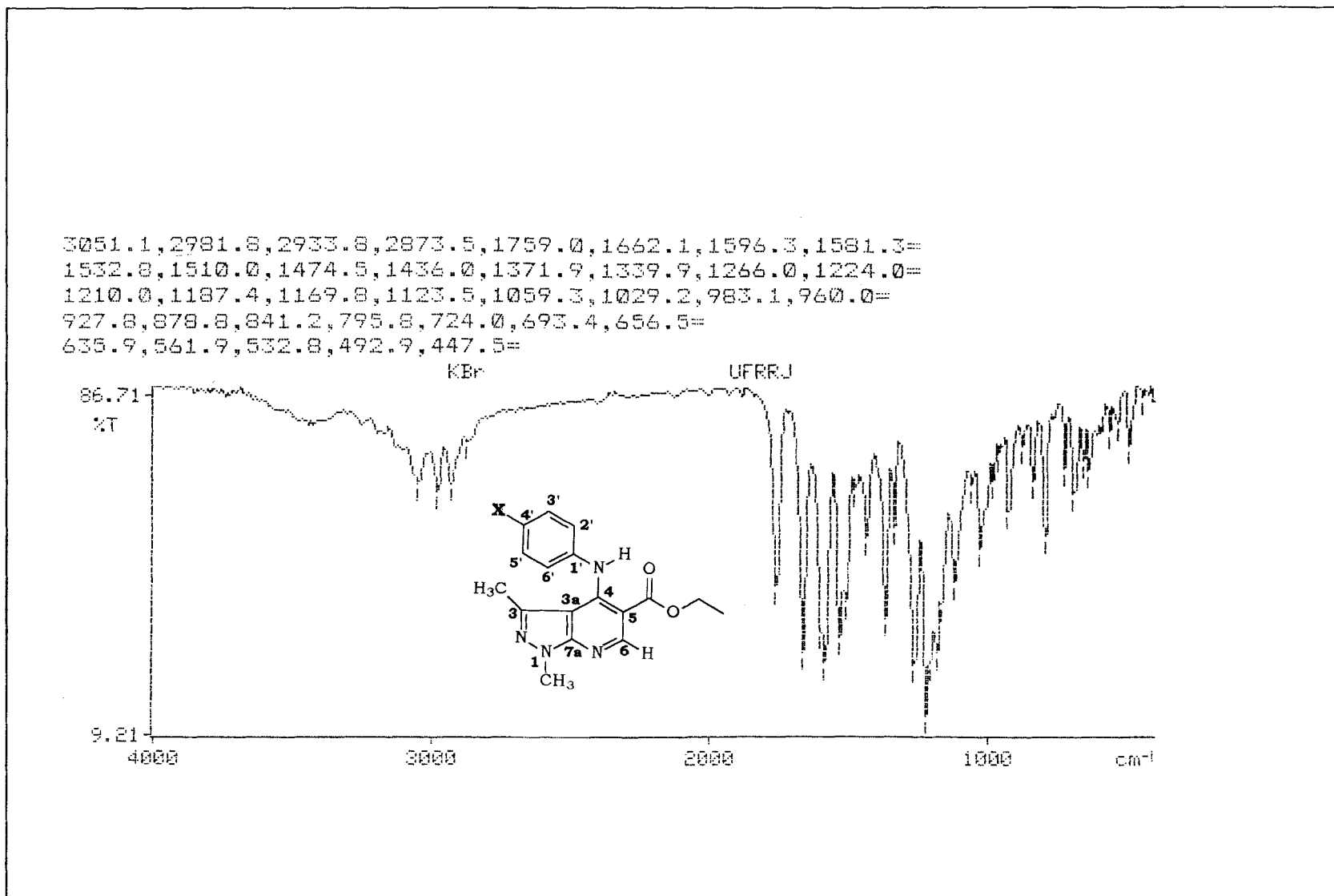


Figura 81: Espectro de IV de **X = OAc** – Pastilha de KBr.

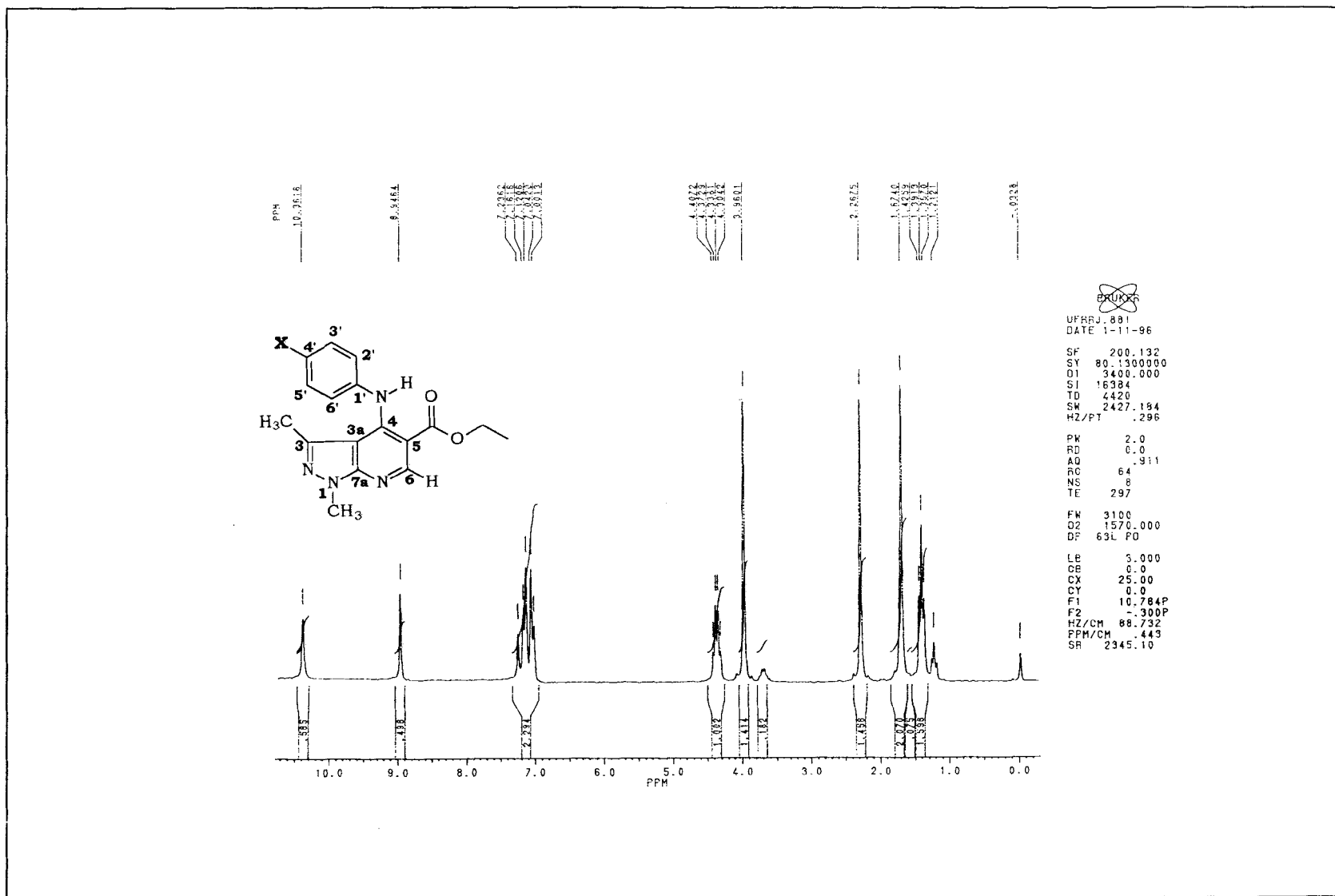


Figura 82: Espectro de RMN de ¹H de X = OAc – Solvente CDCl₃ – 200.133MHz.

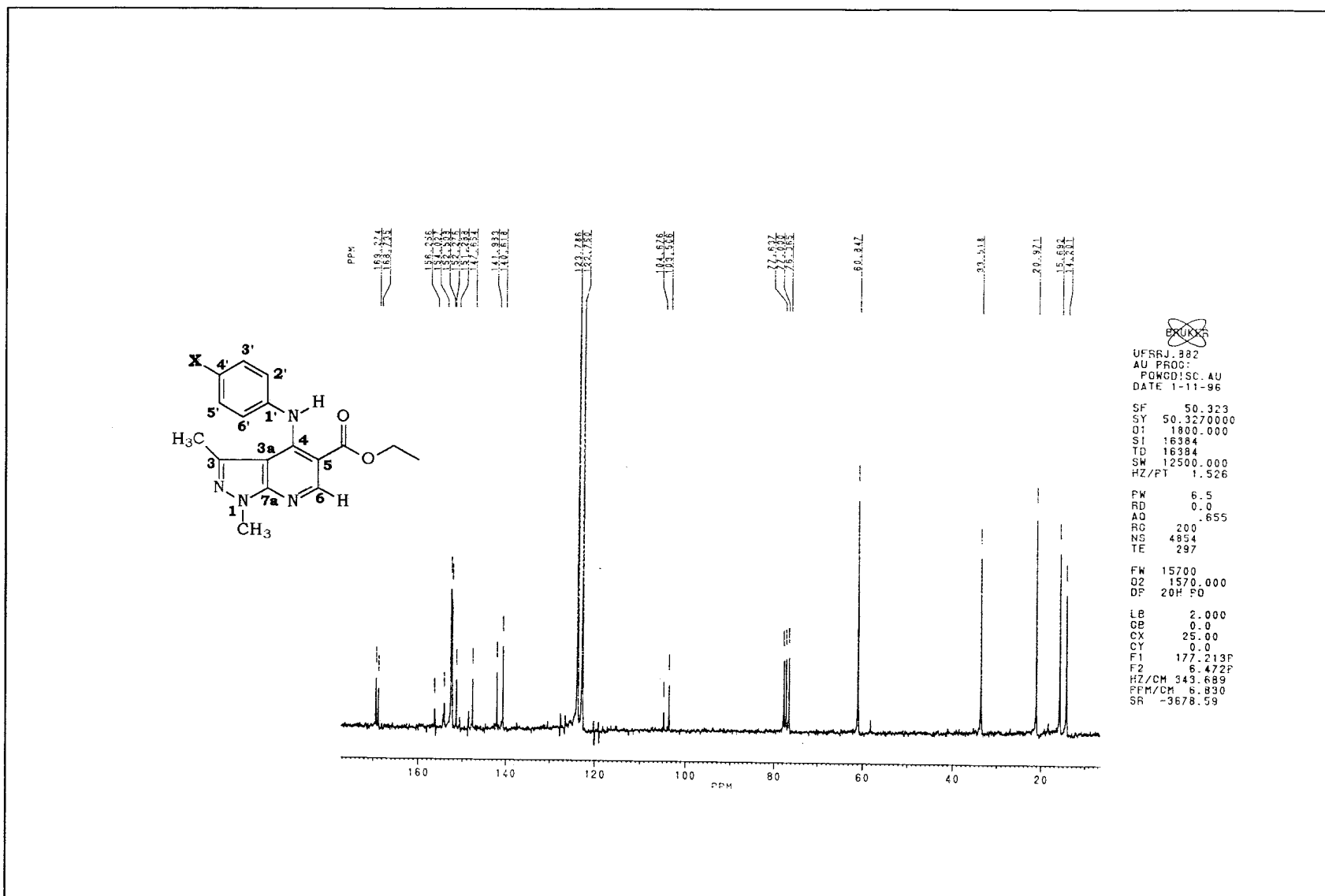


Figura 83: Espectro de RMN de ^{13}C de **X** = OAc – Solvente CDCl_3 – 50,3MHz.

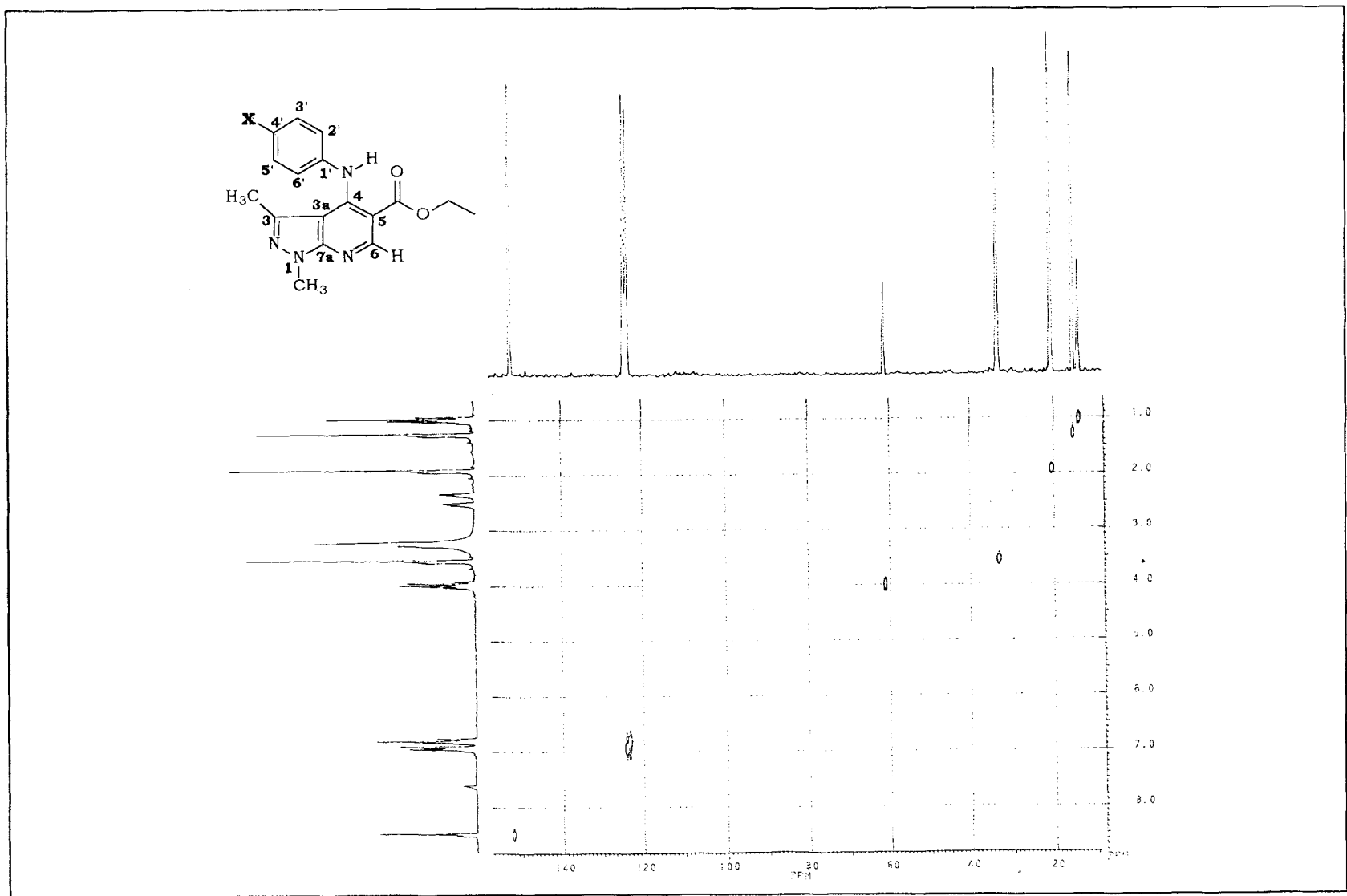


Figura 84: Espectro de RMN (2D) $^1\text{H}_X^{13}\text{C}$ -COSY, $^1\text{J}_{\text{CH}}$ de **X = OAc** – Solvente DMSO- d_6 .

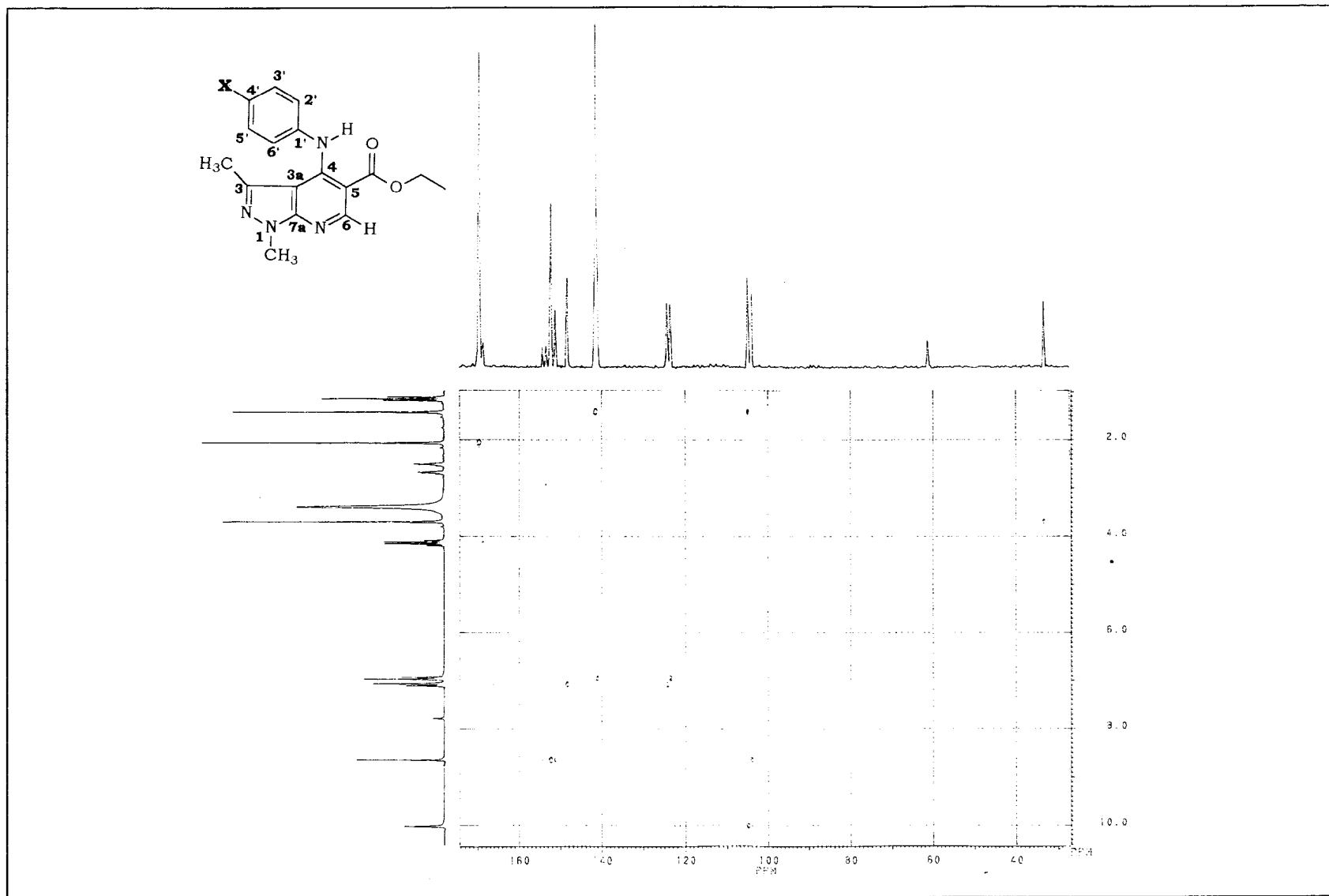


Figura 85: Espectro de RMN (2D) ^1H ^{13}C -COSY, $^n\text{J}_{\text{CH}}$ n =2 ou 3 de **X = OAc** – Solvente DMSO- d_6 .