



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ

CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**“SÍNTESE E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE
DIAZAHETEROCICLOS:
DIIDROPIRIDAZINONAS, BIS-PIRAZOLÓIS E
BENZIMIDAZÓIS”**

Tese apresentada por
Sabrina Alencar de Almeida Batista
ao Programa de Pós-Graduação em
Química do Departamento de
Química do Centro de Ciências
Exatas da Universidade Estadual de
Maringá como parte dos requisitos
para a obtenção do título de Doutor
em Química.



**Centro de
Ciências Exatas**

MARINGÁ, AGOSTO/2016



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ-UEM

CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**“SÍNTESE E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE
DIAZAHETEROCICLOS: DIIDROPIRIDAZINONAS, BIS-
PIRAZOLÓIS E BENZIMIDAZÓIS”**

**Doutoranda: Sabrina Alencar de Almeida Batista
Orientadora: Profa. Dra. Maria Helena Sarragiotto
Coorientadora: Profa. Dra. Fernanda Andreia Rosa**

Maringá, Agosto de 2016.

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá, PR, Brasil)**

Sobrenome, Nome
Título / Nome do autor. -- Maringá, 2013.
99 f. : il. col., figs., tabs., mapas

Orientador: Prof. Dr. nome do orientador.
Coorientadora: Prof.^a Dr.^a nome da orientadora.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro..., Departamento..., Programa de Pós-Graduação em..., 2013.

1. Assunto. 2. Assunto. I. Sobrenome, nome, orient. II. Universidade Estadual de Maringá... III. Título.

CDD 21.ed.

ECSL



Universidade Estadual de Maringá

Centro de Ciências Exatas
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

Este é o exemplar definitivo da Tese apresentada por **Sabrina de Alencar de Almeida Batista**, perante a Comissão Julgadora do Programa de Pós-Graduação em Química em 31 de agosto de 2016.

COMISSÃO JULGADORA:



.....
Prof. Dra. Maria Helena Sarragiotto
PRESIDENTE - DQ/UEM



.....
Prof. Dr. Ernani Abicht Basso
MEMBRO - DQ/UEM



.....
Prof. Dra. Debora Cristina Baldoqui
MEMBRO - DQ/UEM



.....
Prof. Dr. Nelson Luis de Campos Domingues
MEMBRO - UFGD



.....
Prof. Dra. Mary Ann Foglio
MEMBRO - UNICAMP

À Deus toda honra, toda glória e todo louvor;
ao meu filho Gustavo, meu melhor resultado, minha maior alegria;
ao meu esposo Luis, por todo amor, paciência e estímulo.
aos meus pais, meus maiores incentivadores.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus pela oportunidade de realização deste trabalho, que muito além de dados experimentais, proporcionou crescimento pessoal e profissional.

À minha querida orientadora Maria Helena, por acreditar em mim, pelo carinho, pela atenção e paciência.

Ao Prof. Emerson, que permitiu o desenvolvimento deste trabalho e a finalização.

Ao meu pequeno Gustavo, por sempre esperar a mamãe chegar do trabalho, com um sorriso no rosto e um abraço indescritível.

Ao meu esposo Luís, por toda confiança, carinho e sábias palavras.

Aos meus pais, meu irmão, por todo carinho e atenção.

À minha co-orientadora Fernanda. Bonita tu é admirável, muito obrigada por tudo.

À minha companheira de viagens diária, advogada, comediante, terapeuta e sobretudo amiga, Juliana, sem você estes anos não teriam a menor graça.

Às amigas “Mulheres DQI/CCE”, Liane, Gi, Lilian, Dani e Débora pelos momentos que muito além de trabalho e química passaram a ser familiar e de uma alegria imensa.

Aos meus colegas e amigos do laboratório GSPN, que me acolheram com tanto carinho...Beatriz, Darlon, Josi, Rodolfo, Letícia, Izabel, Márcia, Paula, Manu, Marcos, e os novatos, Aline, Ana Paula., Deysiane, Adriano e Anderson por toda cafeína compartilhada.

Aos meus colegas e amigos do laboratório 26, Fran 1, Fran 2, Diogo, Japonês (Du) e Anatália, foi uma alegria conviver com vocês.

À minha “coco-orientadora Katieli, pela sabedoria físico-química, paciência e amizade.

Aos amigos e familiares (galera da intercessão) pelas orações e certeza que no final tudo vai dar certo!!!

Aos professores do programa de pós-graduação por todos os ensinamentos, em especial Prof Ernani, Profa Silvana, Profa Gisele e Profa Débora pelas contribuições no exame de qualificação.

Aos professores Wilker e Hioka (DQI/UEM), Vilma (DFS/UEM), Ana Lúcia (CPQBMA/UNICAMP), Mary Ann (UNICAMP), Ísis e Josué (UFAL) pela obtenção dos formulados e ensaios biológicos realizados.

À Ana, Ivânia e Ulisses pelas análises de RMN.

Aos funcionários do programa de pós-graduação Cris e Claudemir, pela atenção e dedicação.

À todos os amigos que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho, muito Obrigada!!!

*"Pouca ciência nos afasta de Deus.
Muita nos aproxima"*

(Louis Pauster)

SUMÁRIO

RESUMO	4
ABSTRACT	6
ÍNDICE DE FIGURAS	8
ÍNDICE DE TABELAS	11
ÍNDICE DE ESQUEMAS	12
ÍNDICE DO ANEXO	14
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	17
1. INTRODUÇÃO	19
1.1 CÂNCER.....	19
1.2 DIABETES.....	21
1.3 DIAZAHETEROCICLOS.....	23
2. OBJETIVOS	29
3. APRESENTAÇÃO DO TRABALHO	30
I.1 METODOLOGIA DE SÍNTESE PARA 4,5-DIIDROPIRIDAZIN-3-ONAS.....	32
I.2 IMPORTÂNCIA BIOLÓGICA DE PIRIDAZINONAS E 4,5-DIIDROPIRIDAZINONAS.....	39
I.2.1 ATIVIDADE ANTITUMORAL.....	39
I.2.2 ATIVIDADE INIBIDORA DA ALDOSE-REDUTASE.....	42
I.2.3 OUTRAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE DIIDROPIRIDAZINONAS	43
I-3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
I.3.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DO DERIVADOS 4,5-DIIDROPIRIDAZINÔNICOS 8A-O E 9A-C E SEUS PRECURSORES 3A-L , 6A-L E 7A-C	49
I.3.2. ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA.....	74
I.3.3 AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO DOS DERIVADOS PIRIDAZINONAS 8A E 8H COM CTDNA EMPREGANDO FLUORESCÊNCIA MOLECULAR E UV-VIS	77
1.3.3.1 AVALIAÇÃO DO MODO DE LIGAÇÃO CTDNA-LIGANTE.....	83
I-3.4 ESTUDO DO EFEITO DAS DIIDROPIRIDAZINONAS 8A-E , 8G-L , 8N E 8O SOBRE O METABOLISMO HEPÁTICO.....	85
I-3.4.1 OBTENÇÃO DAS MICELAS COPOLIMÉRICAS DAS DIIDROPIRIDAZINONAS 8A-E , 8G-L , 8N E 8O	85
I.3.4.2 INFLUÊNCIA DAS DIIDROPIRIDAZINONAS 8A-E , 8G-L , 8N E 8O NO METABOLISMO HEPÁTICO.	87
CAPÍTULO II	95
SÍNTESE DE PIRAZOLONAS E BIS-PIRAZOLÓIS	95
II-1 METODOLOGIAS DE OBTENÇÃO DE PIRAZOLONAS- 3,4-DISSUBSTITUÍDAS.....	96
II-1.2 METODOLOGIA PARA OBTENÇÃO DE BIS-PIRAZOLÓIS.....	101
II-2 ATIVIDADE BIOLÓGICA	105
II-2 RESULTADOS E DISCUSSÃO	108
II-2.1 CARACTERIZAÇÃO DOS 4-(ARILMETILENO)-BIS-(5-FENIL-1H-PIRAZOL-3-OIS) 13A-F	114

CAPÍTULO III122

SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DE DERIVADOS BENZIMIDAZÓLICOS.....122

III-1. METODOLOGIA DE SÍNTESE DE BENZIMIDAZÓIS..... 123

III-2. ATIVIDADE BIOLÓGICA DE BENZIMIDAZÓIS 126

III.2.1 ATIVIDADE ANTITUMORAL..... 127

III-3 RESULTADOS E DISCUSSÃO 134

III-3.1 OTIMIZAÇÃO DOS RENDIMENTOS DOS DERIVADOS 2-ARILIDENOCARBOIDRAZIDA-BENZIMIDAZÓLICOS 24A-E E 25A-E..... 134

III-3.2 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS NOVOS DERIVADOS 2-ARILIDENOCARBOIDRAZIDA-BENZIMIDAZÓLICOS 36A-E E 37A-E..... 138

III-3.3 ATIVIDADE ANTITUMORAL 149

4. CONCLUSÃO.....155

5. PARTE EXPERIMENTAL.....157

5.1 INSTRUMENTAÇÃO 157

5.2 MATERIAIS E MÉTODOS 158

5.3 PROCEDIMENTO PARA A SÍNTESE DOS COMPOSTOS 158

PROCEDIMENTO PARA A SÍNTESE DA SÉRIE DE 5-ARILMETIL-2,2-DIMETIL-1,3-DIOXANO-4,6-DIONA 3A-L..... 158

5.3.2 DERIVADOS DIALQUILADOS DO ÁCIDO DE MELDRUM 159

PROCEDIMENTO PARA SÍNTESE DA SÉRIE DE 2,2-DIMETIL-1,3-DIOXANO-4,6-DIONAS-5,5-DISSUBSTITUÍDAS 6A-L E 7A-C..... 159

5.3.3 DIIDROPIRIDAZINONAS 161

PROCEDIMENTO PARA SÍNTESE DE DERIVADOS 4,5-DIIDRO-3(2H)-PIRIDAZINONAS 8A-L E 9A-C... 161

PROCEDIMENTO PARA SÍNTESE DO DERIVADO 4,5-DIIDRO-3(2H)-PIRIDAZINONA **8M**..... 161

PROCEDIMENTO PARA SÍNTESE DO DERIVADO 4,5-DIIDRO-3(2H)-PIRIDAZINONA **8N** 162

PROCEDIMENTO PARA SÍNTESE DO DERIVADO 4,5-DIIDRO-3(2H)-PIRIDAZINONA **8O**. 162

5.3.4 BIS-PIRAZOLÓIS 13A-F..... 163

METODOLOGIA DIRETA PARA PREPARAÇÃO DE PIRAZOLONAS 4,5 DISSUBSTITUÍDA **13A-F**. 163

5.3.5 DERIVADOS BENZIMIDAZÓLICOS..... 164

PROCEDIMENTO PARA SÍNTESE DO ÁCIDO 2-(1-METIL-BENZIMIDAZOL-2-IL)BENZÓICO E DO ÁCIDO 2-(1,5-DIMETIL-BENZIMIDAZOL-2-IL)BENZÓICO 164

PROCEDIMENTO PARA SÍNTESE DO ÉSTER METIL 2-(1-METIL-BENZIMIDAZOL-2-IL)BENZOATO **32** E DO ÉSTER METIL 2-(1,5-DIMETIL-BENZIMIDAZOL-2-IL)BENZOATO **33**..... 165

PROCEDIMENTO GERAL PARA A SÍNTESE DAS BENZOIDRAZIDAS **34** E **35**..... 166

PROCEDIMENTO GERAL PARA A SÍNTESE DAS ARILIDENO-CARBOIDRAZIDAS **24A-E**, **25A-E**, **36A-E** E **37A-E**. 166

5.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL 167

5.4.1 PROCEDIMENTO DOS ENSAIOS PARA A DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA 167

5.4.2 DILUIÇÃO DAS AMOSTRAS 168

5.4.3 ENSAIO DA SULFORODAMINA B 168

5.4.4 ANÁLISE DOS RESULTADOS..... 169

5.5 DETERMINAÇÃO DA INTERAÇÃO DOS DERIVADOS PIRIDAZINONAS 8A E 8H COM CTDNA EMPREGANDO FLUORESCÊNCIA MOLECULAR E UV-VIS..... 169

5.5.1 REAGENTES E SOLUÇÕES..... 169

5.5.2 APARATO..... 170

5.6 DETERMINAÇÃO DO EFEITO DAS DIIDROPIRIDAZINONAS **8A-E**, **8G-L**, **8N** E **8O** SOBRE OS PARÂMETROS HEPÁTICOS RELACIONADOS AO METABOLISMO ENERGÉTICO DO FÍGADO. 170

5.6.1 FORMULAÇÃO DAS 4,5-DIIDROPIRIDAZINONAS **8A-E**, **8G-L**, **8N** E **8O** INCORPORADAS EM NANOCARREADORES DE POLOXÂMEROS® 170

5.6.2 PERFUSÃO DE FÍGADO IN SITU 171

Resumo

Compostos heterocíclicos nitrogenados são de extrema importância para química farmacêutica e medicinal. Dentre estes, as diidropiridazinonas, pirazolonas e derivados do benzimidazol despertam um grande interesse, uma vez que compostos destas classes possuem uma vasta gama de propriedades biológicas. Em função da importância destes diazaheterociclos e, em continuidade aos estudos de nosso grupo de pesquisa, neste trabalho desenvolvemos a síntese de 4,5-diidropiridazinonas, bis-pirazolóis e derivados benzimidazólicos, bem como, a avaliação *in vitro* da atividade antitumoral, frente a linhagens de células tumorais humanas, das 4,5-diidropiridazinonas e dos derivados benzimidazólicos sintetizados. Além disto, foram realizados estudos da interação com o DNA e, de efeitos sobre o metabolismo hepático, das 4,5-diidropiridazinonas obtidas.

As 4,5-diidro-3(2*H*)-piridazinonas (**8a-l**) e (**9a-c**) foram preparadas pela condensação redutiva do ácido de Meldrum com aldeídos aromáticos, promovida por formiato de trietilamônio, seguida da alquilação dos substratos monoalquilados com brometos de fenacila e reação dos substratos dialquilados obtidos com hidrazina. Visando a otimização da rota sintética para (**8a-l**) e (**9a-c**), utilizou-se também irradiação de microondas nas etapas de preparação dos precursores monoalquilados e dialquilados do ácido de Meldrum. Para a obtenção dos bis-pirazolóis **13a-f**, empregou-se a reação *one pot* entre o benzoil acetato de etila, hidrazina e aldeídos aromático, em piridina e meio etanólico. A síntese dos derivados 2-arilidenocarboidrazida-benzimidazólicos (**24a-e** e **25a-e**) envolveu o tratamento das 2-(1'*H*-benzimidazol-2'-il) benzoidrazidas (**21** e **22**) com aldeídos aromático em etanol, sob catálise de H₂SO₄. Os novos derivados arilidenoidrazida-benzimidazólicos *N*-metilados (**36a-e**) e (**37a-e**) foram obtidos pelo tratamento dos precursores **34** e **35** com os aldeídos apropriados (**23a-e**) em etanol, sob catálise ácida.

Os ensaios de atividade antitumoral mostraram que as piridazinonas **8c** e **8e** apresentaram potente atividade para as células tumorais testadas, com valores de GI₅₀ na faixa de 2,0 a 22,4 µM. Os estudos de interação dos derivados mais seletivos **8a** e **8h** com ctDNA sugerem que mecanismo de

ação destes pode estar associado à interação com DNA, por intercalação. Os dados obtidos nos experimentos de perfusão hepática sugerem que o derivado **8g** pode atuar como inibidor da aldose redutase. Os resultados dos ensaios de atividade antitumoral para os benzimidazóis N-metilados **36a-e** e **37a-e** mostraram que a presença do grupo 2-clorofenil ligado ao carbono imínico da porção arilidênica, bem como, a presença do grupo metila na posição-6 do núcleo benzimidazol, favorecem a atividade antitumoral.

Palavras-chaves: Diazaheterociclos; diidropiridazinonas; pirazolonas; bis-pirazolóis; benzimidazóis.

Abstract

Heterocyclic nitrogen constitutes an important class of compounds for pharmaceutical and medicinal chemistry areas. Among these, dihydropyridazinones, pyrazolones and benzimidazoles are widely studied due to their large spectrum of important pharmacological and biological properties. The importance of these diazaheterocycles, prompted further work with the development of the synthesis of 4,5-dihydropyridazinones, bis-pyrazoles and benzimidazole derivatives. Furthermore the *in vitro* antitumor activity evaluation against human tumor cell lines of the 4,5-dihydropyridazinones and benzimidazole derivatives synthesized. In addition, studies on the interaction of 4,5-dihydropyridazinones with the DNA, and their effects on hepatic metabolism were carried out.

The 4,5-dihydro-3 (*2H*)-pyridazinones (**8a-l**) and (**9a-c**) were prepared by reductive condensation of aromatic aldehydes with Meldrum acid, promoted by triethylammonium formate, followed by alkylation of substrates with phenacyl bromides, and reaction of di-alkylated intermediates with hydrazine. Aiming the optimization of the synthetic route to (**8a-l**) and (**9a-c**), a microwave irradiation was used in preparation steps of mono- and di-alkylated precursors. For the synthesis of bis-pyrazoles **13a-f**, the *one pot* reaction between benzoyl ethyl acetate, hydrazine and aromatic aldehydes, in pyridine and ethanolic media, was performed. The synthesis of 2-arylidenehydrazidebenzimidazole (**24a-e**) and (**25a-e**) derivatives involved treatment of hydrazides **21** and **22** with aromatic aldehydes in ethanol, under catalytic sulfuric acid. The novel *N*-methylated benzimidazole derivatives (**36a-e**) and (**37a-e**) were obtained by treatment of precursors **34** and **35** with appropriate aldehydes (**23a-e**) in ethanol, under acid catalysis.

The antitumor activity assays showed potent activity of pyridazinones **8c** and **8e** for all tumor cells tested, with GI₅₀ values in the range of 2.0 to 22.4 μ M. Studies of interaction with ctDNA suggest that the mechanism of action is more selective for compounds **8a** and **8h** can be associated with DNA interaction by intercalation. The data obtained in hepatic perfusion experiments suggest that compound **8g** can act as aldose reductase inhibitor. The assay results for antitumor activity of *N*-methylated benzimidazoles **36a-**

e and **37a-e** showed that the presence of 2-chlorophenyl group connected to the iminic arylidene carbon, as well as the presence of the methyl group at 6-position of benzimidazole nucleus led to an antitumor activity enhancement.

Keywords: Diazaheterocycles; dihydropyridazinones; pirazoles; pyrazolones; bis-benzimidazoles.

Índice de Figuras

Figura 1. Processo de divisão celular normal e em células com DNA alterado (FIRST-SYMPOM, 2016)	19
Figura 2. Variáveis geradoras de processos cancerígenos (INCA, 2016).....	20
Figura 3. Medicamentos de consumo mundial, contendo núcleo heterociclo nitrogenado.....	24
Figura 4. Estrutura de diidropiridazinonas (I), pirazolonas (II) e benzimidazóis (III).....	25
Figura 5. Fármacos comercializados contendo o núcleo 4,5-diidropiridazinona.	25
Figura 6. Derivados 4,5-diidropiridazinônicos sintetizados por Meyer et al. (2004).....	26
Figura 7. Derivados benzimidazólicos sintetizados por Tanabe (2012) e Almeida (2015) que apresentaram maior atividade antiproliferativa.....	28
Figura I-1 Derivados piridazinônicos mais ativos da série obtida por El-Ghaffar et al. (2011).....	39
Figura I-2 Derivado piridazinônico mais ativo da série de 4-aril/heteroaril-6-fenil-piridazinonas avaliadas por Murty et al. (2012).....	40
Figura I-3 Derivado piridazinônico mais ativo da série de 2-benzenossulfonamidapiridazinona avaliadas por Ratish et al. (2012).....	41
Figura I-4 Derivado diidropiridazinônico mais ativo da série de diidropiridazinonas sintetizadas por Ovais et al. (2013).....	41
Figura I-5 Estrutura da 6-(5-cloro-3-metilbenzofuran-2-sulfo-nil)-2H-piridazin-3-ona.....	43
Figura I-6 Derivado de piridazinona com atividade inibidora da aldose redutase.	43
Figura I-7 Estrutura da Emorfazona, piridazinona com potente atividade analgésica e anti-inflamatória.....	44
Figura I-8 Diidropiridazinona com atividade anti-inflamatória.....	45
Figura I-9 Diidropiridazinonas com atividade anti-inflamatória e analgésica.....	46
Figura I-10 Diidropiridazinonas com atividade anti-inflamatória e broncodilatadora.....	47
Figura I-11 Diidropiridazinonas e piridazinonas sintetizadas por Pinna et al. (1988).....	47
Figura I-12 Estrutura da 6-fenil-5-hidroximetil-4,5-diidro-3(2H)-piridazinona e 6-tienil-5-hidroximetil-4,5-diidro-3(2H)-piridazinona obtidas por Pinna et al., 1988.....	48
Figura I-13 6-aril-diidropiridazin-3(2H)-onas com atividade antibacteriana e antifúngica.....	48
Figura I-14: Espectro de RMN ¹ H (300MHz, CDCl ₃) do composto 3a	57
Figura I-15: Espectro de RMN ¹³ C (75,46MHz, CDCl ₃) do composto 3a	58
Figura I-16 Espectro de infravermelho pastilha de KBr para o composto 3a	59
Figura I-17: Espectro de RMN ¹ H (300MHz, CDCl ₃) do composto 6a	64
Figura I-18: Espectro de RMN ¹³ C (75,46 MHz, CDCl ₃) do composto 6a	65
Figura I-19: Espectro de IV (pastilha de KBr) para o composto 6a	66
Figura I-20: Espectro de RMN ¹ H (300MHz, DMSO-d ₆) do composto 8a	72
Figura I-21: Espectro de RMN ¹³ C (75,46 MHz, DMSO-d ₆) do composto 8a	73

Figura I-22: Espectro de infravermelho pastilha de KBr para o composto 8a	74
Figura I-23 a) Perfil espectral do composto 8h (10 μM) com diferentes concentrações de ctDNA (53, 100, 150, 200, 250, 400, 500, 600, 700 e 848 μM , curvas a-k respectivamente); b) Gráfico de Stern–Volmer para o composto 8h (processo de <i>quenching</i>); c) Curva logarítmica dupla para cálculo da constante de ligação do composto 8h com o ctDNA Condição: pH = 7.2 (Tris–HCl 50 mM e 100 mM NaCl) a 30°C.....	78
Figura I-24. Espectro de absorção do composto 8h (10 μM), ctDNA (40 μM) e 8h -ctDNA e (8h -ctDNA) – ctDNA. Condição: pH = 7,2 (Tris–HCl 50 mM com 100 mM NaCl) a 30°C.....	79
Figura I-25 a) Valores de KSV dos compostos 8h e 8a (5,0 μM) por meio do quenching do KI na ausência e presença de ctDNA (50 μM). b) Decréscimo da intensidade de fluorescência do sistema BE-DNA por competição do composto 8h (50, 100, 150, 200 e 275 μM , curvas a-e, respectivamente)....	84
Figura I-26 Espectro de absorção do composto 8g (composto 6) em clorofórmio e incorporada nos copolímeros micelares.....	87
Figura I-27 Produção de glicose (2A) e lactato (2B) por hepatócitos isolados ($\mu\text{mol}/10^6$ céls.h) de ratos Wistar NDM1 alimentados. As piridazinonas numeradas de 1 a 13, o F-127 (C) e o controle (B, somente céls) encontram-se representados na figura. As barras coloridas representam as piridazinonas que apresentaram o melhor resultado metabólico. Dados expressos como média \pm dp, n=8, ANOVA one-way, ●p<0,05 vs B e C.....	90
Figura I-28: Área sob a curva (AUC, $\mu\text{mol}/\text{g}$) da liberação hepática dos indicadores de lesão hepática: Alanina Amino-transferase (ALT, 3A), Aspartato Amino-transferase (AST, 3B), Fosfatase Alcalina (ALP, 3C) e Bilirrubina Total (BLT, 3D), em fígados perfundidos <i>in situ</i> de ratos Wistar NDM1 alimentados. A piridazinona 6 ou o F-127 vazio (1,25 μmol) foram utilizados na fase de estímulo. Dados expressos como média \pm dp, n=8, ANOVA one-way, ●p<0,05 vs basal 1 P123, ■p<0,05 vs basal 1 piridazinona 6	92
Figura I-29: Área sob a curva (AUC, $\mu\text{mol}/\text{g}$) da liberação hepática de glicose (4A), Glicogenólise (4B), Glicólise (4C) e Razão NADH/NAD ⁺ (4D), em fígados perfundidos <i>in situ</i> de ratos Wistar NDM1 alimentados. A piridazinona 6 ou o F-127 vazio (1,25 μmol) foram utilizados na fase de estímulo. Dados expressos como média \pm dp, n=8, ANOVA one-way, ●p<0,05 vs basal 1 F-127, ■p<0,05 vs basal 1 piridazinona 6	94
Figura II-1 Tautômeros da pirazolona	96
Figura II-2 Estrutura da antipirina e da dipirona	105
Figura II- 3 Bis-pirazolóis com atividade antiviral.....	107
Figura II-4 Bis-pirazolóis com atividade antioxidante	107
Figura II-5. Pirazolonas 4,5-dissubstituídas 12a-f	108
Figura II-6 Tautomerismo 3-fenilpirazol-5-ona (11) e 3-fenil-5-hidroxipirazol (11')	109
Figura II-7 Espectro de RMN ¹ H (300MHz, DMSO-d ₆) do composto 11	110
Figura II- 8 Espectro de RMN ¹³ C (75,46 MHz, DMSO-d ₆) do composto 11	110
Figura II-9 Bis-pirazolóis 13a-f	112
Figura II-10: Espectro de RMN ¹ H (300MHz, DMSO-d ₆) do composto 13a	118
Figura II-11: Espectro de RMN ¹³ C (75,46MHz, DMSO-d ₆) do composto 13a . ..	119

Figura II-12: Mapa de contornos H-C HMBC (300,0/75,5 MHz, DMSO-d ₆) para o composto 13a	120
Figura II-13: Mapa de contornos H-H Noesy (300,0 MHz, DMSO-d ₆) para o composto 13a	121
Figura III-1 Núcleo benzimidazol	123
Figura III-2 Tautomerismo do benzimidazol.	124
Figura III-3 Relação estrutura-atividade de derivados benzimidazólicos.	127
Figura III.4 Estrutura da bendamustina	128
Figura III-5 Derivado mais ativo obtido por Rashid et al. (2015).....	129
Figura III-6 Derivados mais ativos da série obtida por Reddy et al. (2015).....	129
Figura III-7 Derivado mais ativo sintetizado por Singla, Luxami e Paul (2015)	130
Figura III-8 Derivados mais ativos contra as linhagens celulares de câncer cervical (HeLa), pulmão (A549), próstata (DU-145) e melanoma (B-16) obtidos por Kamal et al. (2015).....	130
Figura III-9 Derivados 2-antrilbenzimidazóis ativos obtidos por Sontakke et al. (2015).....	131
Figura III-10 Derivados de nucleosídeos benzimidazólicos obtidos por Sontakke et al. (2016).....	132
Figura III-11 Derivado mais potente frente as linhagens de células HepG2 MCF-7 e A549, obtido por Gaballah et al. (2016).....	132
Figura III-12 Composto mais ativo da série de Ozkay et al. (2016)	133
Figura III-13 Série de derivados obtidos por Reddy et al. (2016) com atividade antiproliferativa.....	133
Figura III-14: Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, DMSO-d ₆) do composto 32	141
Figura III-15: Espectro de RMN ¹³ C (75,46MHz, DMSO-d ₆) do composto 32 . ..	142
Figura III-16: Espectro de IV (pastilha de KBr) para o composto 34	143
Figura III-17: Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, DMSO-d ₆) do composto 34	144
Figura III-18: Espectro de Infravermelho pastilha de KBr para o composto 36a	146
Figura III-19: Espectro de RMN ¹ H (300MHz, DMSO-d ₆) do composto 36a	147
Figura III-20: Espectro de RMN ¹³ C (75,46MHz, DMSO-d ₆) do composto 36a . 148	
Figura III-21 Gráfico de porcentagem de crescimento das linhagens tumorais <i>versus</i> concentração (µg/mL) para o derivado 36c após 48h de exposição.	151
Figura III-22 Gráfico de porcentagem de crescimento das linhagens tumorais <i>versus</i> concentração (µg/mL) para o derivado 37c após 48h de exposição.	152
Figura 8: Protocolo demonstrativo do experimento de perfusão de fígado <i>in situ</i> de ratos Wistar NDM1 alimentados. Representa a concentração de glicose (µmol/min.g fígado) em função do tempo (min) de perfusão inicial (basal 1=0-15 min); estimulado (15-50 min); e final (basal 2=50-85 min). A piridazinona de escolha foi utilizada na fase de estímulo. Foi realizado o cálculo da área sob a curva (AUC) para cada parte do protocolo de perfusão e para cada grupo, de forma que os resultados dos experimentos estão apresentados na forma de AUC (µmol/g).....	172

Índice de Tabelas

Tabela I-1. Metodologias testadas na preparação do intermediário 3a	52
Tabela I-2. Dados de rendimento para os derivados monoalquilados 3a-l obtidos pelo uso da metodologia convencional e de irradiação de MO.....	53
Tabela I-3 Dados de RMN ¹ H, ¹³ C (δ-ppm, 300,06 e 75,45MHz, DMSO-d ₆) para os compostos 3a-f	55
Tabela I-4 Dados de RMN ¹ H, ¹³ C (δ-ppm, 300,06 e 75,45MHz, DMSO-d ₆) para os compostos 3g-l	56
Tabela I-5: Dados de rendimento para os intermediários dialquilados 6a-l e 7a-c preparados pelas Metodologias A e B.....	60
Tabela I-6 Dados de RMN ¹ H, ¹³ C (δ-ppm, 300,06 e 75,45MHz, DMSO-d ₆) para os compostos 6a-f	61
Tabela I-7 Dados de RMN ¹ H, ¹³ C (δ-ppm, 300,06 e 75,45MHz, DMSO-d ₆) para os compostos 6g-l	62
Tabela I-8 Dados de RMN ¹ H, ¹³ C (δ-ppm, 300,06 e 75,45MHz, DMSO-d ₆) para os compostos 7a-c	63
Tabela I-9 Dados de RMN ¹ H, ¹³ C (δ-ppm, 300,0/500,0* e 75,45/125,76*MHz, DMSO-d ₆) para os compostos 8a-8f	69
Tabela I- 10 Dados de RMN ¹ H, ¹³ C (δ-ppm, 300,06 e 75,45MHz, DMSO-d ₆) para os compostos 8g-8l	70
Tabela I-11 Dados de RMN ¹ H, ¹³ C (δ-ppm, 300,0/500,0 e 75,45/125,76 MHz, DMSO-d ₆) para os compostos 8m-8o e 9a-c	71
Tabela I-12. Valores de GI ₅₀ * (μM) para as diidropiridazinona 8a-o e 9a-c frente a linhagens de células tumorais humanas.....	76
Tabela I-13. Parâmetros de interação do ctDNA com os compostos 8a e 8h em diferentes temperaturas.	81
Tabela II-1 Dados de RMN de ¹ H, ¹³ C (δ-ppm, 300,06 e 75,45MHz, DMSO-d ₆) para os compostos 13a-f	117
Tabela III-1. Dados de rendimento e tempo reacional para os derivados 2-arilidenocarbohidrazida-benzimidazólicos preparados pela Metodologia A e Metodologia B.	137
Tabela III-2 Dados de GI ₅₀ (μM) para os derivados 2-arilidênocarbohidrazidas (36a-e e 37a-e).....	150
Tabela III-3 Dados de GI ₅₀ (μM) para os derivados 2-arilidênocarbohidrazidas (24a-e ; 25a-e ; 36a-e e 37a-e).....	154
Tabela 1: Rendimentos e faixas de fusão dos compostos 3a-l	159
Tabela 2: Rendimentos e faixas de fusão dos compostos 6a-l e 7a-c	160
Tabela 3: Rendimentos e faixas de fusão dos compostos 8a-o e 9a-c	163
Tabela 4: Rendimentos e faixas de fusão dos compostos 11 e 13a-f	164
Tabela 5: Rendimentos e faixas de fusão dos compostos 32-35 e 36a-e e 37a-e	167

Índice de Esquemas

Esquema 1 Ciclo dos ácidos tricarboxílicos (CAT) e via poliol (ativada com a hiperglicemia do diabético).....	22
Esquema I-1 Metodologia clássica para obtenção de diidropiridazinonas.....	32
Esquema I-2 Metodologia para obtenção de 6-fenoxipiridazinonas segundo Bansal et al. (2009).....	33
Esquema I-3 Metodologia utilizada por Dandu et al. (2011) e Hudkins et al. (2011, 2012a, 2012b) na síntese de 4,5-diidropiridazin-3-onas.	34
Esquema I-4 Estrutura das 5-metil-4,5-diidro-3-(2H)-piridazinonas obtidas por Kojima e Kohno (2013).....	34
Esquema I-5 Metodologias descritas para obtenção de diidropiridazinonas.	35
Esquema I-6 Metodologia para obtenção das 4,5-diidropiridazin-3-onas apresentada por Reddy, Saravanan e Kumar (1998).....	36
Esquema I-7 Método para obtenção seletiva de diidropiridazinonas ou piridazinonas descrito por Mao et al. (2015).....	37
Esquema I-8 Método de obtenção de diidropiridazinonas 4,6-dissubstituídas desenvolvido por Tóth et al. (1995, 1997).....	37
Esquema I-9 Estrutura da série de 4,5-diidropiridazin-3(2H)-onas 4,6-dissubstituídas obtidas por Li et al. (2015).....	38
Esquema I-10 Rota sintética para a preparação 4,5-diidro-3(2H)-piridazinonas (8a-l) e (9a-c).....	50
Esquema I-11 Síntese das 4,5-diidro-3(2H)-piridazinonas (8m-o).....	51
Esquema I-12 Mecanismo proposto para formação dos intermediários monoalquilados 3a-l.....	52
Esquema I-13 Mecanismo proposto para formação dos intermediários dialquilados 6a-l e 7a-c.....	59
Esquema I-14 Mecanismo para formação das diidropiridazinonas 8a-l e 9a-c. 67	
Esquema II-1 Metodologia convencional na obtenção de pirazolonas-3,4-dissubstituídas.....	97
Esquema II-2 Esquema de síntese para obtenção do derivado 3-metil-4-((piridin-4-il)metileno)-1H-pirazol-5(4H)-ona por Rao et al. (2012).....	97
Esquema II-3 Método utilizado por Kumar et al. (2014) na obtenção de uma série de derivados pirazolinônicos.....	97
Esquema II-4 Obtenção das séries de arilidenpirazolonas utilizando solução alcoólica de NaOH 20%.....	98
Esquema II-5 Metodologias descritas na obtenção de pirazolonas 3,4-dissubstituídas sob irradiação por micro-ondas.....	98
Esquema II-6 Síntese de uma série de pirazolonas com diferentes substituintes na posição-3.....	99
Esquema II-7 Metodologia para obtenção de uma série de 4-hidrazono-pirazol-5-onas.....	100
Esquema II-8 Metodologia <i>one pot</i> utilizando PEG-400 como suporte sólido, aplicada na obtenção de pirazolonas.....	100
Esquema II-9 Metodologia <i>one pot</i> utilizando irradiação de micro-ondas, aplicada na obtenção de pirazolonas.....	101
Esquema II-10 Obtenção de arilidenpirazolonas através de catálise de ouro.....	101

Esquema II-11 Diferentes condições reacionais para obtenção de 4-(arilmetileno)-bis-(3-metil-pirazol-5-óis).....	102
Esquema II-12 Metodologia <i>one pot</i> empregando liquid iônico na obtenção de derivados 4-(arilmetileno)-bis-(3-metil-pirazol-5-óis).....	104
Esquema II-13 Metodologia <i>one pot</i> aplicando catalise de nanopartícula de óxido de alumínio e zinco na obtenção de derivados 4-(arilmetileno)-bis-(3-metil-pirazol-5-óis).....	104
Esquema II-14 Metodologias <i>one pot</i> aplicando catálise com <i>N</i> -bromo sulfonamida na obtenção de derivados 4-(arilmetileno)-bis-(3-metil-pirazol-5-óis).....	104
Esquema II-15 Estruturas de pirazolonas com diferentes atividades biológicas.....	106
Esquema II-16 Método A para obtenção dos derivados 10a-f	109
Esquema II-17 Procedimentos realizados para obtenção dos derivados 12a-f	111
Esquema II-18 . Mecanismo proposto para formação dos bis-pirazolóis 13a-f	113
Esquema III-1 Primeira metodologia utilizada na obtenção de derivados benzimidazólicos.....	123
Esquema III-2 Metodologia geral para obtenção de derivados benzimidazólicos substituídos na posição-2.....	124
Esquema III-3 Algumas das metodologias mais utilizadas na obtenção de derivados benzimidazólicos substituídos na posição-2.....	125
Esquema III-5 Método " <i>one-pot</i> " na obtenção de derivados benzimidazólicos substituídos na posição-2.....	126
Esquema III-6 Rota de síntese para obtenção dos derivados benzimidazólicos 21 e 22	134
Esquema III-7 Mecanismo proposto para obtenção dos derivados 17 e 18	135
Esquema III-8 Mecanismo proposto para obtenção dos derivados 19 e 20.....	136
Esquema III-9 Rota de síntese para obtenção dos derivados 2- <i>arilidenocarboidrazida-benzimidazólicos</i>	136
Esquema III-10 Rota de síntese para obtenção dos derivados benzimidazólicos 36a-e e 37a-e , contendo o grupo arilidenocarboidrazida na posição-2.....	139

Índice do Anexo

Figura 1-A: Espectro de RMN ^1H (300MHz, DMSO- d_6) do composto 8a	195
Figura 2-A: Espectro de RMN ^{13}C (75,46 MHz, DMSO- d_6) do composto 8a	196
Figura 3-A: Espectro de RMN ^1H (500MHz, DMSO- d_6) do composto 8b	197
Figura 4-A: Espectro de RMN ^{13}C (125,76 MHz, DMSO- d_6) do composto 8b	198
Figura 5-A: Espectro de RMN ^1H (500MHz, DMSO- d_6) do composto 8c	199
Figura 6-A: Espectro de RMN ^{13}C (125,76 MHz, DMSO- d_6) do composto 8c	200
Figura 7-A: Espectro de RMN ^1H (300MHz, DMSO- d_6) do composto 8d	201
Figura 8-A: Espectro de RMN ^{13}C (75,46 MHz, DMSO- d_6) do composto 8d	202
Figura 9-A: Espectro de RMN ^1H (300MHz, DMSO- d_6) do composto 8e	203
Figura 10-A: Espectro de RMN ^{13}C (75,46 MHz, DMSO- d_6) do composto 8e	204
Figura 11-A: Espectro de RMN ^1H (300MHz, DMSO- d_6) do composto 8g	205
Figura 12-A: Espectro de RMN ^{13}C (75,46 MHz, DMSO- d_6) do composto 8g	206
Figura 13-A: Espectro de RMN ^1H (300MHz, DMSO- d_6) do composto 8h	207
Figura 14-A: Espectro RMN ^{13}C (75,46 MHz, DMSO- d_6) do composto 8h	208
Figura 15-A: Espectro de RMN ^1H (300MHz, DMSO- d_6) do composto 8i	209
Figura 16-A : Espectro de RMN ^{13}C (75,46 MHz, DMSO- d_6) do composto 8i	210
Figura 17-A: Espectro de RMN ^1H (300MHz, DMSO- d_6) do composto 8j	211
Figura 18-A: Espectro de RMN ^{13}C (75,46 MHz, DMSO- d_6) do composto 8j	212
Figura 19-A: Espectro de RMN ^1H (300MHz, DMSO- d_6) do composto 8l	213
Figura 20-A: Espectro de RMN ^{13}C (75,46 MHz, DMSO- d_6) do composto 8l	214
Figura 21-A: Espectro de RMN ^1H (300MHz, DMSO- d_6) do composto 8m	215
Figura 22-A: Espectro de RMN ^{13}C (75,46 MHz, DMSO- d_6) do composto 8m ...	216
Figura 23-A: Espectro de RMN ^1H (300MHz, DMSO- d_6) do composto 8n	217
Figura 24-A: Espectro de RMN ^{13}C (75,46 MHz, DMSO- d_6) do composto 8n	218
Figura 25-A: Espectro de RMN ^1H (300MHz, DMSO- d_6) do composto 8o	219
Figura 26-A: Espectro de RMN ^{13}C (75,46 MHz, DMSO- d_6) do composto 8o	220
Figura 27-A: Espectro de RMN ^1H (500,0 MHz, DMSO- d_6) do composto 9a	221
Figura 28-A: Espectro de RMN ^{13}C (125,76 MHz, DMSO- d_6) do composto 9a ..	222
Figura 29-A: Espectro de RMN ^1H (300MHz, DMSO- d_6) do composto 9b	223
Figura 30-A: Espectro de RMN ^{13}C (75,46 MHz, DMSO- d_6) do composto 9b	224
. 224	
Figura 31-A: Espectro de RMN ^1H (300MHz, DMSO- d_6) do composto 9c	225
Figura 32-A: Espectro de RMN ^{13}C (75,46 MHz, DMSO- d_6) do composto 9c	226
Figura 33-A: Espectro de RMN ^1H (300MHz, DMSO- d_6) do composto 13a	227
Figura 34-A: Espectro de RMN ^{13}C (75,46MHz, DMSO- d_6) do composto 13a ...	228
Figura 35-A: Mapa de contornos H-C HMBC (300,0/75,5 MHz, DMSO- d_6) para o composto 13a	229
Figura 36-A: Mapa de contornos H-H Noesy (300,0 MHz, DMSO- d_6) para o composto 13a	230
Figura 37-A: Espectro de RMN ^1H (300MHz, DMSO- d_6) do composto 13b	231
Figura 38-A: Espectro de RMN ^{13}C (75,46 MHz, DMSO- d_6) do composto 13b .	232
Figura 39-A: Mapa de contornos H-C HMBC (300,0/75,5 MHz, DMSO- d_6) para o composto 13b	233
Figura 40-A: Mapa de contornos H-H Noesy (300,0 MHz, DMSO- d_6) para o composto 13b	234
Figura 41-A: Espectro de RMN ^1H (500MHz, DMSO- d_6) do composto 13c	235

Figura 42-A: Espectro de RMN ^{13}C (125,76 MHz, DMSO- d_6) do composto 13c	236
Figura 43-A: Espectro de RMN ^1H (500MHz, DMSO- d_6) do composto 13d	237
Figura 44-A: Espectro de RMN ^{13}C (125,76 MHz, DMSO- d_6) do composto 13d	238
Figura 45-A: Mapa de contornos H-C HMBC (500,0/125,8 MHz, DMSO- d_6) para o composto 13d	239
Figura 46-A: Mapa de contornos H-H Noesy (500,0 MHz, DMSO- d_6) para o composto 13d	240
Figura 47-A: Espectro de RMN ^1H (500MHz, DMSO- d_6) do composto 13e	241
Figura 48-A: Espectro de RMN ^{13}C (125,76 MHz, DMSO- d_6) do composto 13e	242
Figura 49-A: Mapa de contornos H-C HMBC (500,0/125,8 MHz, DMSO- d_6) para o composto 13e	243
Figura 50-A: Mapa de contornos H-H Noesy (500,0 MHz, DMSO- d_6) para o composto 13e	244
Figura 51-A: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) do composto 13f	245
Figura 52-A: Espectro de RMN ^{13}C /DEPT (75,46 MHz, DMSO- d_6) do composto 13f	246
Figura 53-A: Mapa de contornos H-C HMBC (300,0/75,5 MHz, DMSO- d_6) para o composto 13f	247
Figura 54-A: Mapa de contornos H-H Noesy (300,0 MHz, DMSO- d_6) para o composto 13f	248
Figura 55-A: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) do composto 32	249
Figura 56-A: Espectro de RMN ^{13}C (75,46MHz, DMSO- d_6) do composto 32	250
Figura 57-A: Espectro de RMN ^1H (300MHz, DMSO- d_6) do composto 33	251
Figura 58-A: Espectro de RMN ^{13}C (75,46MHz, DMSO- d_6) do composto 33	252
Figura 60-A: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) do composto 34	253
Figura 61-A: Espectro de RMN ^{13}C (75,46MHz, DMSO- d_6) do composto 34	254
Figura 62-A: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) do composto 35	255
Figura 63-A: Espectro de RMN ^{13}C (75,46MHz, DMSO- d_6) do composto 35	256
Figura 64-A: Espectro de RMN ^1H (300MHz, DMSO- d_6) do composto 36a	257
Figura 65-A: Espectro de RMN ^{13}C (75,46MHz, DMSO- d_6) do composto 36a	258
Figura 66-A: Espectro de RMN ^1H (300MHz, DMSO- d_6) do composto 36b	259
Figura 67-A: Espectro de RMN ^{13}C (75,46MHz, DMSO- d_6) do composto 36b	260
Figura 68-A: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) do composto 36c	261
Figura 69-A: Espectro de RMN ^{13}C (75,46MHz, DMSO- d_6) do composto 36c	262
Figura 70-A: Espectro de RMN ^1H (300MHz, DMSO- d_6) do composto 36d	263
Figura 71-A: Espectro de RMN ^{13}C (75,46MHz, DMSO- d_6) do composto 36d	264
Figura 72-A: Espectro de RMN ^1H (300MHz, DMSO- d_6) do composto 36e	265
Figura 73-A: Espectro de RMN ^{13}C (75,46MHz, DMSO- d_6) do composto 36e	266
Figura 74-A: Espectro de RMN ^1H (300MHz, DMSO- d_6) do composto 37a	267
Figura 75-A: Espectro de RMN ^{13}C (75,46MHz, DMSO- d_6) do composto 37a	268
Figura 76-A: Espectro de RMN ^1H (500MHz, DMSO- d_6) do composto 37c	269
Figura 77-A: Espectro de RMN ^{13}C (125,76MHz, DMSO- d_6) do composto 37c	270
Figura 78-A: Espectro de RMN ^1H (500MHz, DMSO- d_6) do composto 37d	271
Figura 79-A: Espectro de RMN ^{13}C (125,76MHz, DMSO- d_6) do composto 37d	272
Figura 80-A: Espectro de RMN ^1H (300MHz, DMSO- d_6) do composto 37e	273

Figura 81-A: Espectro de RMN ^{13}C (75,46MHz, DMSO- d_6) do composto **37e**... 274
Figura 82-A. a) Perfil espectral do composto **8a** (10 μM) com diferentes concentrações de ctDNA (53, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700 e 848 μM , curvas a-l respectivamente); **b)** Gráfico de Stern–Volmer para o composto **8a** (processo de quenching); **c)** Curva logarítmica dupla para cálculo da constante de ligação do composto **8a** com o ctDNA Condição: pH = 7.2 (Tris–HCl 50 mM e 100 mM NaCl) a 30°C..... 275

Lista de Abreviaturas e Símbolos

[bmim]N₃	Azeto de 1-butil-3-metilimidazólio
[HMIN]HSO₄	1-metilimidazolil hidrogenossulfato
[P₄VPy-BuSO₃H]HSO₄	poli(4-vinilpiridina-co-1-sulfônico ácido butyl-4-vinilpiridinil) hidrogenossulfato
786-0	Linhagem de células de câncer de rim
A549	Linhagens de células de câncer de pulmão
ABTS	Sal de amônio do ácido 2,2'azino-bis-(3-etilbenzenotiazolina-6-sulfônio)
AR	Aldose redutase
B-16	Linhagem de células de câncer de melanoma
Caco2	Linhagem de células de adenocarcinoma colorretal
CAN	Nitrato de amônio cérico
CAT	Ciclo dos ácidos tricarbóxicos
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CDCl₃	Clorofórmio deuterado
CDSCS	Sulfato de sílica cuproso dopado com cobre
COSY	Correlação espectroscópica HxH
COX	Ciclo-oxigenase
ctDNA	Complexo supramolecular de DNA
d	Dupleto
DCC	N,N'-diciclohexilcarboimina
DCDBTSD	N,2-dibromo-6-cloro-3,4-diidro-2H-benzo[e][1,2,4] tiadiazina-7-sulfonamida-1,1-dióxido.
DCM	Diclorometano
dd	Duplo Dupleto
DEPT	<i>Distortioless Enhancement by Polarization Transfer</i> (aumento da distorção por transferência de polarização)
DHPB	2,5-dimetil-2,5-di- <i>tert</i> -butil-peroxi-hexano
DIPEA	Diisopropiletilamina
DM	Diabetes <i>mellitus</i>
DM1	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 1
DME	Dimetiléter
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazila
DU-145	Linhagem de células de câncer de prostate
F-127	copolímero da classe dos plurônicos
GC₅₀	Concentração necessária para inibir 50% do crescimento celular
HaCaT	Linhagem de células epiteliais humana queratinócitos
HeLa	Linhagens de células de câncer cervical
HepG2	Linhagem de células de câncer de fígado
HMQC	Correlação Heteronuclear <i>Multiple-Quantum</i>
HOBT	1-hidroxibenzotriazol
HSQC	Correlação Heteronuclear <i>Single-Quantum</i>
HT29	Linhagem de células de câncer de colorretal
Hz	Hertz
iPrAuCl/AgOTf	(cloro[1,3-bis(2,6-diisopropilfenil)imidazole-2-ilideno]ouro(I)/trifluormetano sulfonato de prata.

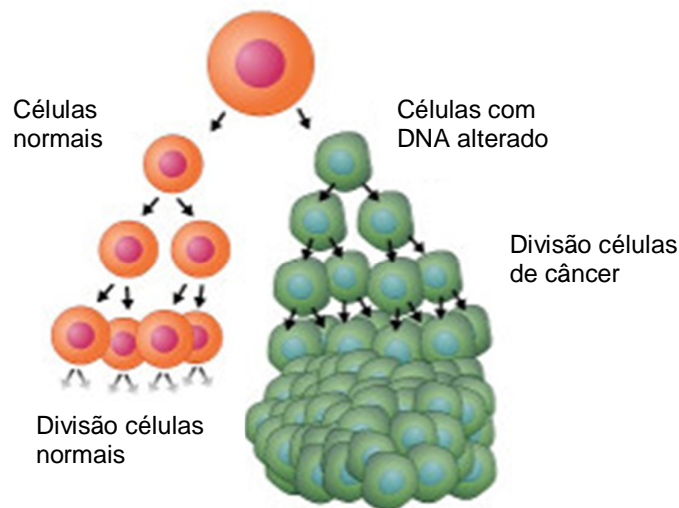
IV	Infravermelho
J	Constante de acoplamento
LLC	leucemia linfócita crônica
m	Multiplete
m/z	Razão massa/carga
MCF-7	Linhagem de células de câncer de mama
MDA-MB-231	Linhagem de células de câncer de mama
M.O.	Micro-ondas
MTSA	Melamina ácido trissulfônico
Na⁺-MMT-[pmim]HSO₄	1-metil-3-(trimetóxisililpropil)-imidazolilhidrogenossulfato suportado em montmorillonita de sódio
NAD⁺	Dinucleótido de nicotinamida e adenine (oxidado)
NADH	Dinucleótido de nicotinamida e adenine (reduzido)
NCI-ADR/RES	Linhagem de células de câncer de ovário resistente a múltiplos fármacos .
NCI-H460	Linhagem de células de câncer de pulmão, tipo pequenas células
NSAIDs	Fármacos anti-inflamatórios não esteroidais
OE	Óxido de etileno
OP	Óxido de propileno
OVCAR-3	Linhagem de células de câncer de ovário
PC-3	Linhagem de células de câncer de próstata
PDE	Fosfodiesterase
PEG-400	polímero polietileno glycol
PEG-SO₃H	polietileno glicol acidificado
ppm	Parte Por Milhão
PPRV	vírus peste de pequenos ruminantes
RMD	Resistente a múltiplos fármacos
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMN ¹³C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN ¹H	Ressonância Magnética Nuclear
ROS	Espécies reativas de oxigênio
s	Simpleto
SASPSPE	Ácido sulfúrico [3-(3-silicapropil)sulfanil]propil)ester
SBSSA	Sílica suportada com ácido S-sulfônico
s/	Simpleto largo
SNC	Sistema Nervoso Central
t	Tripleto
TBAB	Brometo de tetra-butilamônio
td	Tripleto de Duplete
TEAF	Formiato de trietilamônio
TFA	Ácido trifluoracético
TMS	Tetrametilsilano
U251	Linhagem de células de câncer de glioma
UACC-62	Linhagem de células de câncer de melanoma
ZR-75-1	Linhagem de células de câncer de mama
δ	Deslocamento Químico
δ_C	Deslocamento Químico de Carbono-13
δ_H	Deslocamento Químico de Hidrogênio

1. INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

O câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 200 tipos conhecidos de doenças, cuja característica mais comum é a ocorrência de alterações nos processos de divisão das células do corpo (**Figura 1**). Tais alterações proporcionam um crescimento anormal e geralmente mais rápido de um conjunto de células, dando origem ao que se denomina genericamente de tumor (COSTA , 2013).

Figura 1. Processo de divisão celular normal e em células com DNA alterado (FIRST-SYMPATOM, 2016)

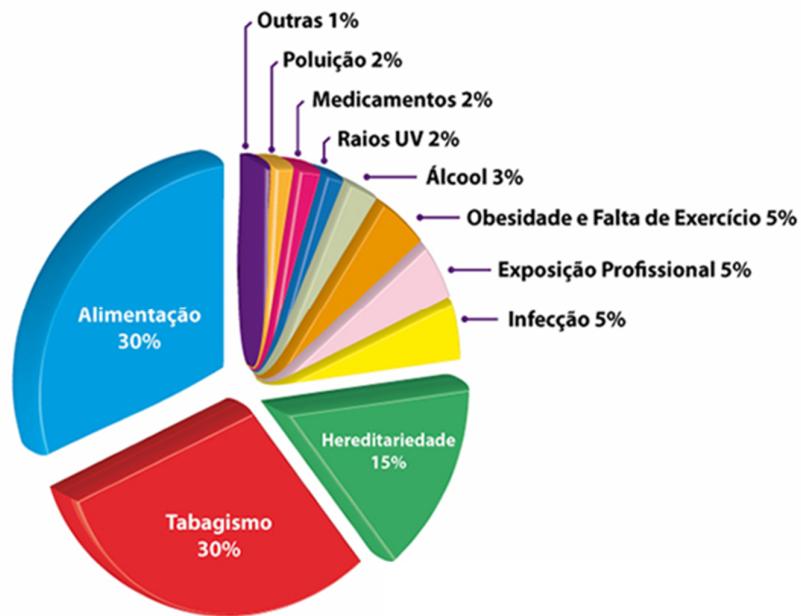


Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o câncer deve ser analisado como um relevante problema de saúde pública mundial, constituindo-se na segunda principal causa geral de morte por doença no mundo. Consideradas as atuais expectativas de aumento demográfico, mesmo com a maior eficiência do tratamento e com o prolongamento do período de sobrevivência de pacientes, a OMS prevê que, se medidas efetivas não forem tomadas, haverá 26 milhões de casos novos e 17 milhões de mortes por ano no mundo em 2030, sendo que 2/3 das vítimas vivem nos países em desenvolvimento (WHO, 2016; INCA, 2016).

As evoluções tecnológicas da área médica vêm acontecendo, mas mesmo diante de todo o conhecimento acumulado, os fatores causadores do câncer ainda não foram suficientemente compreendidos, sendo possível

incluir causas tão diversas quanto a própria evolução da doença. Segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), as principais variáveis geradoras de processos cancerígenos são: hábitos alimentares inadequados (30%), tabagismo (30%) e um conjunto complexo de fatores relacionados à exposição a radiações ionizantes, submissão a contextos ambientais estressantes, comportamentos de risco e fatores genéticos, étnicos e ocupacionais (35%) (**Figura 2**)(Costa, 2013; INCA, 2016).

Figura 2. Variáveis geradoras de processos cancerígenos (INCA, 2016)



O tratamento do câncer varia conforme o estágio e o tipo da doença, podendo ser realizado através de cirurgia, transplante de medula óssea, radioterapia, quimioterapia, ou, pelo conjunto destes métodos. Os procedimentos quimioterápicos se destacam e estão em constante crescimento, chegando, no Brasil, a quase 1,8 milhões em 2007 (MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2009).

Os agentes quimioterápicos atualmente adotados na prática clínica incluem fármacos que alteram o ciclo celular em diversos pontos, modificando as funções de crescimento descontrolado característico dessas células. Dentre eles, podem-se citar os agentes alquilantes, cujo mecanismo principal é a alquilação do DNA; os antimetabólitos, que interferem com o metabolismo do DNA, impedindo sua replicação; os compostos antimetabólicos,

fármacos ciclo-específicos que se ligam às cadeias de β -tubulina, interferindo com a formação do fuso mitótico; os análogos da camptotecina, responsáveis pela ligação e estabilização da topoisomerase-I, inibindo a religação do DNA à enzima e acúmulo de fitas simples de DNA; e os antibióticos, com variados mecanismos de ação. Podemos ainda citar na terapia antineoplásica as enzimas e os agentes imunológicos (CHABNER et al., 2006).

Muitos tratamentos para o câncer, embora eficazes, estão associados à alta toxicidade devido à inespecificidade dos medicamentos disponíveis, colocando órgãos não afetados pelo tumor em risco, limitando o emprego dos agentes quimioterápicos e, não raro, reduzindo as chances de sucesso dos tratamentos (MEYERS, 2008; JACOBSON et al., 2009). Além disso, a aquisição de resistência pelas células tumorais aos agentes quimioterápicos é um dos grandes impedimentos na eficácia da terapia antitumoral. Embora vários mecanismos de resistência tenham sido identificados, a resistência à quimioterapia continua sendo uma das maiores causas de morte em pacientes com câncer (DE VISSER; JONKERS, 2009).

Apesar de grandes avanços terapêuticos, é evidente a necessidade de novos agentes antitumorais que apresentem melhor espectro de ação, eficácia contra tumores resistentes aos fármacos disponíveis e, ainda, que melhorem a tolerabilidade ao tratamento (LEIGHL et al., 2008).

1.2 Diabetes

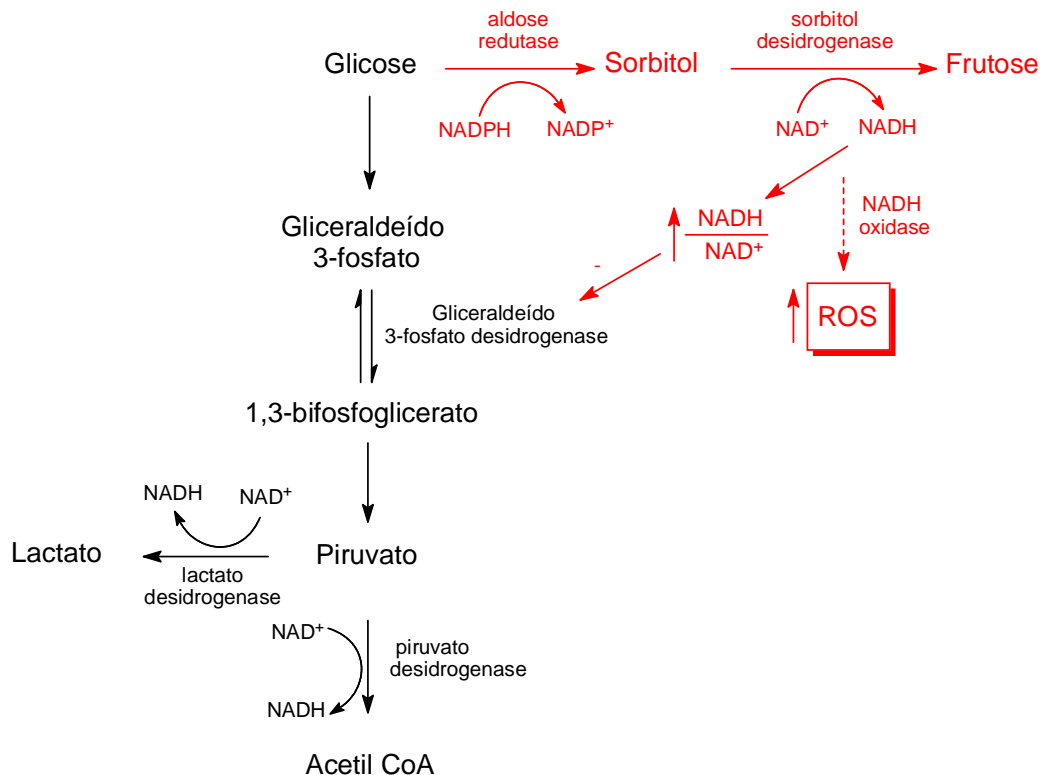
Outro grande problema de saúde mundial é o Diabetes *Mellitus* (DM). Atualmente, mais de 250 milhões de pessoas convivem com a doença, mas espera-se que este número chegue a 380 milhões, em 2025. O Brasil ocupa a 4ª posição entre os países com maior prevalência de diabetes: são 13,7 milhões de pessoas (IDF, 2016).

O Diabetes *Mellitus* tipo 1 (DM1) se caracteriza como uma doença autoimune resultante da perda da secreção de insulina pelas células β -pancreáticas. Como consequência, ocorre o surgimento de anormalidades metabólicas típicas como a redução da captação de glicose, a redução da atividade das enzimas da via glicolítica e glicogenogênica, e aumento da atividade das enzimas da gliconeogênese (PRASAD et al., 2014; SBD, 2016).

Dessa forma, na ausência de insulina a utilização e metabolização da glicose estão reduzidas, contribuindo com o quadro de hiperglicemia crônica, característico da doença (COTRAN, KUMAR E ROBBINS, 1994).

A hiperglicemia do diabético ativa a via poliol pelo aumento da atividade da enzima aldose redutase (AR). O ciclo dos ácidos tricarboxílicos (CAT) e via poliol pode ser observado no **Esquema 1**. Essa, resumidamente, promove a oxidação do NADPH e induz a redução do NAD⁺ citosólico. O resultado é a elevação da razão NADH/NAD⁺ citosólica, depleção do NAD⁺, inibição da glicólise e redução de fluxo de substratos para o ciclo dos ácidos tricarboxílicos (CAT). Esse acúmulo de equivalentes redutores no citosol, direta e indiretamente, é a principal causa do aumento na geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) observado no diabético descompensado. Os resultados são as neuropatias e vasculopatias observadas nos pacientes diabéticos crônicos.

Esquema 1 Ciclo dos ácidos tricarboxílicos (CAT) e via poliol (ativada com a hiperglicemia do diabético).



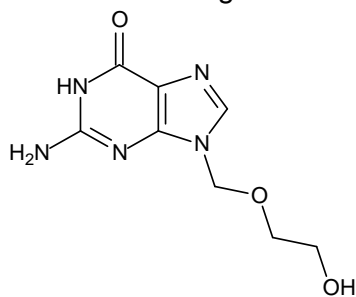
A administração de insulina exógena, obrigatória em DM1, normaliza a glicemia, reduz ROS e melhora o quadro de estresse oxidativo. No entanto, o esquema de insulinização deve ser rígido e pragmático (injeções diárias múltiplas e em horários bem definidos) para que o controle metabólico possa se aproximar do normal. Infelizmente, a grande maioria dos DM1 apresenta dificuldade em manter um bom controle metabólico ao longo do tempo. Contudo, é intensa a busca por fármacos inibidores de AR (ARIs) para que atuem com o objetivo de normalizar a razão NADH/NAD. Com a redução do potencial redox celular, ocorre a redução da formação de ROS e atenuação no desenvolvimento das complicações crônicas.

1.3 Diazaheterociclos

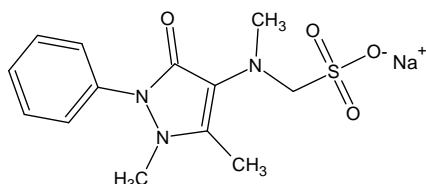
Compostos heterocíclicos nitrogenados são de extrema importância para química farmacêutica e medicinal. A natureza bioativa desses sistemas tem estimulado a busca de novas abordagens sintéticas para sua obtenção e o estudo da relação estrutura atividade entre sistemas heterocíclicos homólogos, visto que, pequenas modificações estruturais podem influenciar consideravelmente na atividade farmacológica.

Dentre os medicamentos heterocíclicos sintéticos, podemos destacar alguns heterociclos nitrogenados de consumo mundial, que apresentam atividades farmacológicas diversificadas, tais como anti-hipertensiva (candesartana cilexetila); antiviral (aciclovir); antihelmínico (mebendazol); antiinflamatória e analgésica (dipirona); cardiovascular (levosimendan); antiulcera (omeprazol) (**Figura 3**).

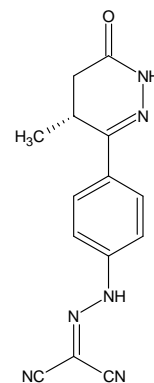
Figura 3. Medicamentos de consumo mundial, contendo núcleo heterociclo nitrogenado.



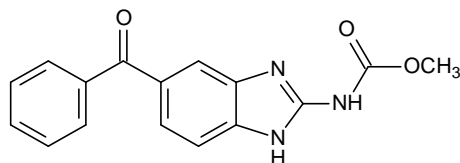
Aciclovir



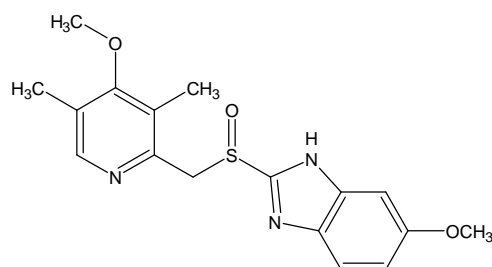
Dipirona



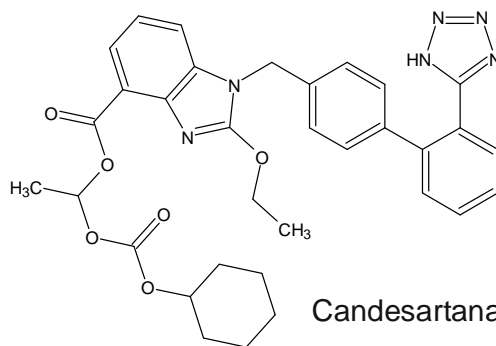
Levosimendana



Mebendazol



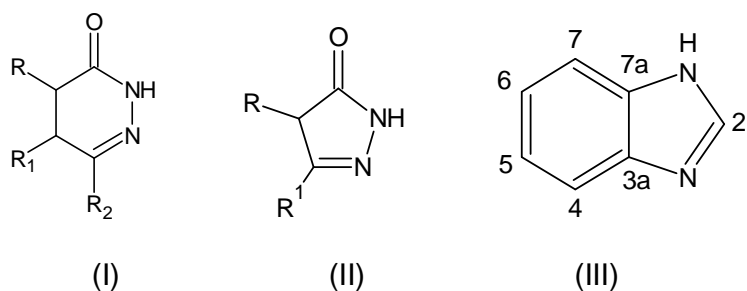
Omeprazol



Candesartana cilexetila

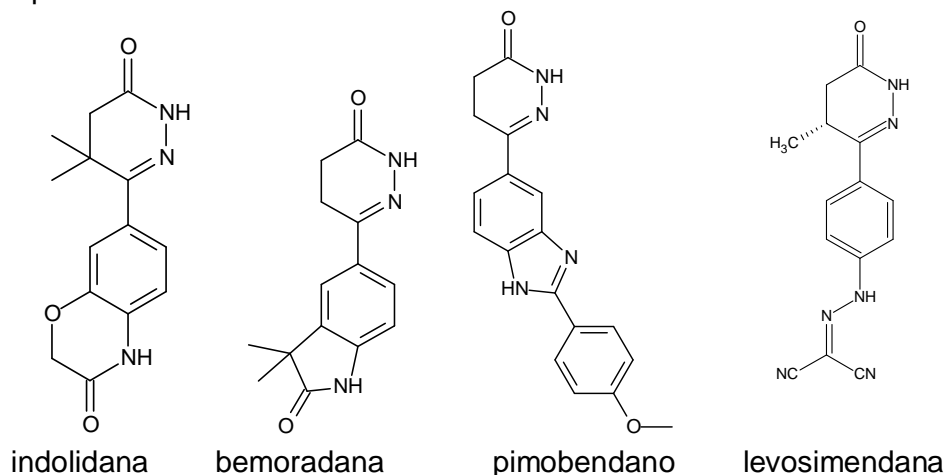
Dentre os heterocíclis contendo nitrogênio, as 4,5-diidropiridazinonas (I), pirazolonas (II) e derivados do benzimidazol (III) (**Figura 4**) despertam um grande interesse já que são encontradas em diversos compostos biologicamente ativos e em medicamentos consolidados na indústria farmacêutica.

Figura 4. Estrutura de diidropiridazinonas (I), pirazolonas (II) e benzimidazóis (III).



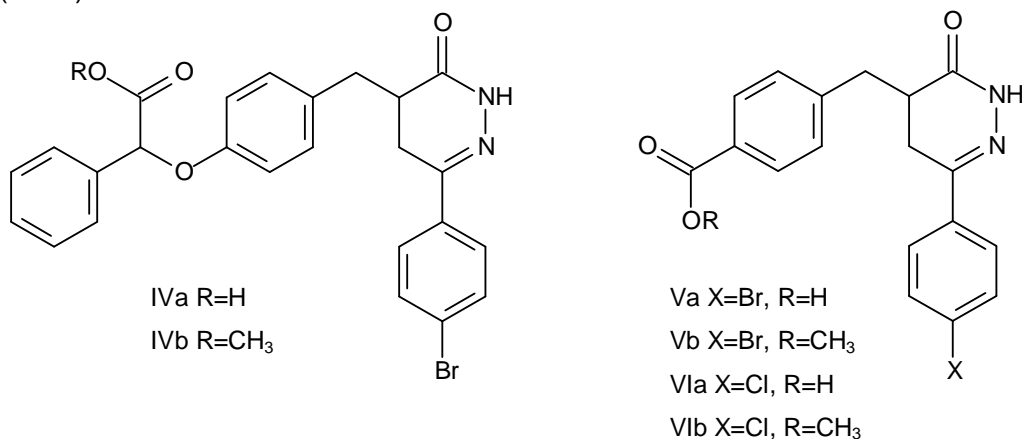
As principais 4,5-diidropiridazinonas comercializadas no mercado farmacêutico são indolidana, bemoradana, o pimobendano e o levosimendana como antihipertensivos (**Figura 5**). Estes compostos são caracterizados por apresentar um anel tipo lactâmico de seis membros contendo dois átomos de nitrogênio adjacentes. Derivados diidropiridazinônicos se destacam também por apresentarem atividade antiplaquetária (WEXLER et al., 1996) anti-inflamatória (TAO et al., 2012), inibidora de fosfodiesterase (SIRCAR et al., 1987), anti-hipertensiva (SIDDIQUI et al., 2010) antiproliferativa contra células tumorais (MURTY et al., 2012; MALINKA et al., 2004; OVAIS et al., 2013), antagonista dos receptores histamínicos H3 (SUNDAR et al., 2011; DANDU et al., 2011) com potencial terapêutico no tratamento de uma variedade de doenças do SNC associados com atenção e déficits cognitivos (PUROHIT et al., 2008).

Figura 5. Fármacos comercializados contendo o núcleo 4,5-diidropiridazinona.



Meyer et. al. (2004) realizou a síntese de derivados 4,5-diidropiridazinônicos (**Figura 6**), na busca de novos antagonistas dos receptores da angiotensina II.

Figura 6. Derivados 4,5-diidropiridazinônicos sintetizados por Meyer et al. (2004).



Tendo em mente a importância biológica desta classe de compostos, no presente trabalho novos derivados 4,5-diidropiridazinônicos 4,6-dissubstituídos foram propostos para um estudo de relação estrutura-atividade antiproliferativa, mecanismo de ação com o DNA e efeito sobre o metabolismo energético do fígado. Esses resultados foram apresentados no capítulo I.

A pirazolona de maior importância comercial é a dipirona (**Figura 3**), um dos analgésicos mais utilizados mundialmente. Pirazolonas (II) são compostos análogos às diidropiridazinonas, porém apresentam anel de cinco membros, essa similaridade estrutural também é observada em relação a atividade biológica (OCHIAI et al., 2012; SINCAR et al., 1987). Dentre o amplo perfil de atividade farmacológica que as pirazolonas exibem podemos citar: anti-inflamatória (EL-HAWASHA et al., 2006), analgésica (EL-HAWASHA et al., 2006), antitumoral (ANTRE et al., 2012; BRANA et al., 2006; KIM et al., 2005), antioxidante (MAZIMBA et al., 2014), antimicrobiana (RAGAVAN et al., 2013), inibidora de fosfodiesterase (ALLCOCK et al., 2011; SIRCAR et al., 1987) que são utilizados nos tratamentos de asma e inflamação, potencial inibidor da enzima GSK3 (ARNOST et al., 2010)

identificada como potencial alvo terapêutico para algumas doenças incluindo transtorno bipolar, esquizofrenia, Alzheimer, doenças cardíacas e diabetes.

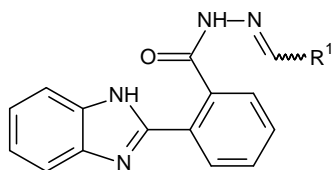
A relação entre atividade biológica de diidropiridazinonas e pirazonas (OCHIAI et al., 2012; SINCAR et al., 1987), influenciou nosso estudo na síntese da mesma.

Outro heterociclo presente em uma série de fármacos consolidados no mercado trata-se do benzimidazol, podendo-se destacar, dentre estes, o omeprazol, a candesartana cilexetila e o mebendazol são os mais populares (**Figura 3**), sendo utilizados no tratamento de distúrbios gástricos e da hipertensão arterial, respectivamente. O benzimidazol (III) é um composto aromático bicíclico resultante da fusão do benzeno com o imidazol. Derivados contendo o núcleo benzimidazol apresentam uma diversidade de atividade biológica relatada na literatura, dentre estas, antiparasitária (HAUGWITZ et al., 1979), cardiovascular (GUNGOR et al., 1992), antimicrobiana (SKEDEL et al., 2011), inibidora da secreção gástrica (SIH et al., 2010) e antitumoral (TONG et al., 2009; WHITE et al., 2004).

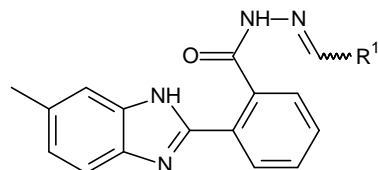
Em estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa (TANABE, E., 2012; ALMEIDA, D. D., 2015) foram preparadas quatro séries de derivados do benzimidazol, sendo: série I- arilideno-carboidrazidas sem grupo metila no núcleo benzimidazol; série II- arilideno-carboidrazidas com grupo metila na posição-5 do núcleo benzimidazol; série III - derivado peptóide sem grupo metila no núcleo benzimidazol; série IV - derivado peptóide com grupos metilas nas posições-1 e -5 do núcleo benzimidazol. As estruturas gerais destas séries estão mostradas na **Figura 7**, nas quais R¹ corresponde aos grupos fenil, 4-metóxfenil, 2-clorofenil, 4-flúorfenil e 2- tiofeno.

Estes compostos foram submetidos à avaliação da atividade antiproliferativa frente a diferentes linhagens de células tumorais humanas. Os compostos com o grupo R¹ = 2-clorofenil foram os mais ativos em todas as séries, mostrando potente atividade para células de mama (MCF-7), rim (786-0) e próstata (PC-3), conforme mostrado na **Figura 7**.

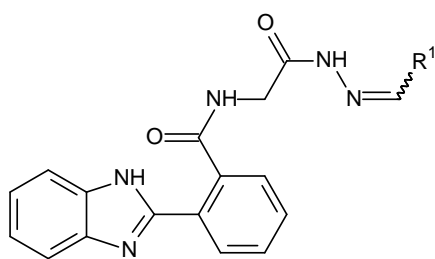
Figura 7. Derivados benzimidazólicos sintetizados por Tanabe (2012) e Almeida (2015) que apresentaram maior atividade antiproliferativa.



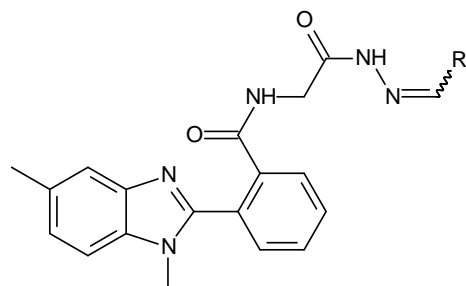
Série I
 $R^1=2\text{-clorofenil}$: $GI_{50}= 8,14 \mu\text{g.mL}^{-1}$
Câncer de mama (MCF-7)



Série II
 $R^1=2\text{-clorofenil}$: $GI_{50}= 1,73 \mu\text{g.mL}^{-1}$
Câncer de mama (MCF-7)



Série III
 $R^1=2\text{-clorofenil}$: $GI_{50}= 3,7 \mu\text{g.mL}^{-1}$
Câncer de rim (786-0) e próstata (PC-3)



Série IV
 $R^1=2\text{-clorofenil}$: $GI_{50}= 6,7 \mu\text{g.mL}^{-1}$
Câncer de rim (786-0)

Diante dos estudos relatados na literatura e dos bons resultados obtidos pelo nosso grupo de pesquisa, houve o interesse na ampliação das séries I e II para estudo de relação estrutura-atividade e ainda estudo de interação com o DNA, para propor mecanismo de ação destes derivados.

2. OBJETIVOS

Tendo em vista a gama de atividades biológicas descritas na literatura para as 4,5-diidropiridazinonas, pirazolonas e benzimidazóis, além dos resultados obtidos pelo nosso grupo de pesquisa na síntese e atividade antitumoral de derivados benzimidazólicos, e, ainda, considerando a necessidade de encontrar novos fármacos antitumorais e inibidores da aldose redutase, nosso trabalho teve como objetivo geral, a síntese e avaliação da atividade antiproliferativa e inibidora da aldose redutase de derivados 4,5-diidropiridazinônicos, pirazolônicos e benzimidazólicos e como objetivos específicos:

- Sintetizar uma série 4,5-diidropiridazinonas 4,6-dissubstituídas;
- Sintetizar uma série de pirazol-5-onas 3,4-dissubstituídas;
- Sintetizar uma série de derivados arilideno-carboidrazida-benzimidazólicos *N*-metilados;
- Avaliar a atividade antiproliferativa *in vitro*, em células tumorais humanas, dos derivados 4,5-diidropiridazinonas e benzimidazólicos *N*-metilados.
- Avaliar o mecanismo de interação das diidropiridazinonas sintetizadas com o DNA, a fim de propor mecanismo de ação.
- Avaliar o efeito das 4,5-diidropiridazinonas sobre o metabolismo energético do fígado.

3. APRESENTAÇÃO DO TRABALHO

A apresentação do trabalho foi dividida em três capítulos, cada um contendo uma breve revisão de metodologias de síntese, atividade biológica e discussão dos resultados.

No Capítulo I será abordado a síntese, estudos de atividade, mecanismo de ação antitumoral e de efeitos sobre o metabolismo hepático de 4,5-diidropiridazinonas.

No Capítulo II será descrito os resultados referentes a síntese de pirazolonas e bis-pirazolóis.

E, no Capítulo III, a síntese e avaliação da atividade antitumoral de derivados benzimidazólicos.

Cada capítulo apresentará uma numeração própria para figuras, esquemas e tabelas. As figuras do texto contidas em anexo serão numeradas como 1-A, 2-A assim sucessivamente.

Os compostos citados da literatura serão numerados no padrão romano, já os derivados obtidos neste trabalho, serão numerados no padrão arábico.

CAPÍTULO I

4,5-Diidropiridazinonas: Síntese, estudos de atividade e mecanismo de ação antitumoral e de efeitos sobre o metabolismo hepático

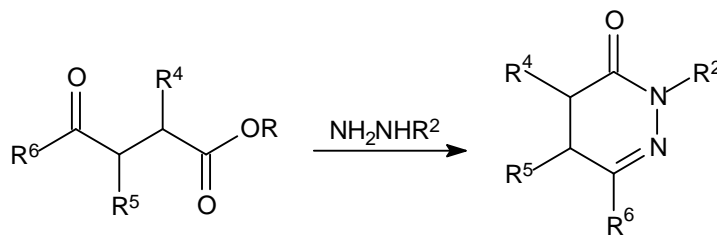
I.1 Metodologia de Síntese para 4,5-diidropiridazin-3-onas.

Em função da importância biológica de piridazinonas e diidropiridazinonas, várias pesquisas relacionadas com a síntese e estudos de relação estrutura-atividade de derivados que incorporam estas unidades vem sendo desenvolvidas. Desta forma, metodologias na obtenção deste compostos foram surgindo conforme interesse no padrão de substituição do anel piridazinônico.

As metodologias descritas para a preparação de 4,5-diidropiridazin-3-onas envolvem, em geral, a ciclocondensação de compostos γ -cetoácidos carboxílicos ou γ -cetoésteres com hidrazina e seus derivados (**Esquema I.1**).

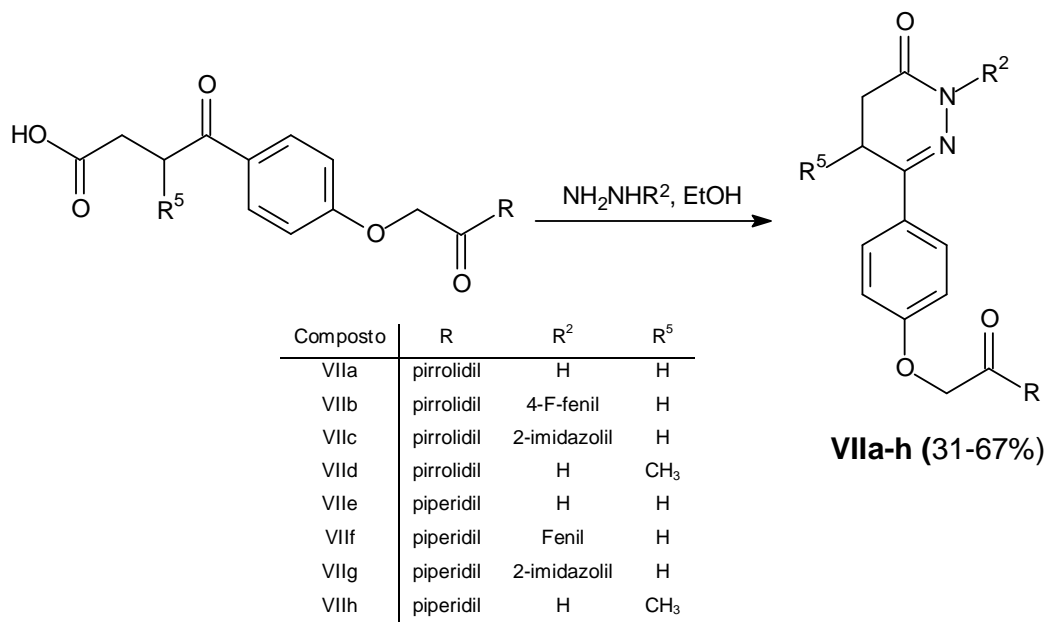
Como exemplos do emprego desta metodologia clássica podemos destacar os trabalhos de Bansal et al. (2009), Bacon et al. (2010), Dandu et al. (2011), Hudkins et al. (2011, 2012a, 2012b) e Kojima e Kohno (2013), apresentados a seguir.

Esquema I-1 Metodologia clássica para obtenção de diidropiridazinonas.



Bansal et al. (2009) sintetizaram uma série de 6-fenoxipiridazinonas (**VIIa-h**) (**Esquema I-2**), através da ciclocondensação de γ -cetoácidos com monohidrato de hidrazina, cloridrato de fenilhidrazina, cloridrato de p-fluor-fenilhidrazina e cloridrato de 2-hidrazina-2-imidazol em meio etanólico, para avaliação do efeito do substituinte na posição-2 do anel piridazinônico em relação a atividade vasodilatadora.

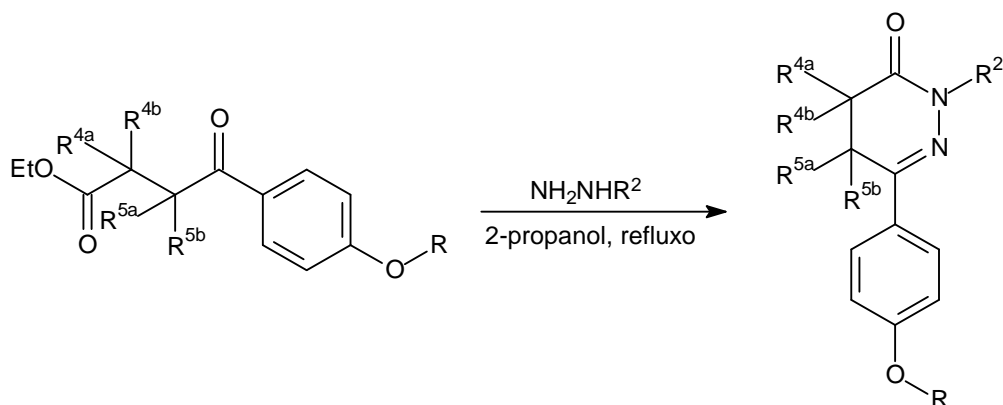
Esquema I-2 Metodologia para obtenção de 6-fenoxipiridazinonas segundo Bansal et al. (2009).



Bacon et al. (2010), depositou patente descrevendo a síntese e atividade biológica de novas piridazin-3-onas e 4,5-diidropiridazin-3-onas utilizando o 2-propanol como solvente.

Dando continuidade aos trabalhos de Bacon et al. (2010), Dandu et al. (2011) e Hudkins et al. (2011, 2012a, 2012b), publicaram trabalhos relacionados a síntese das 4,5-diidropiridazin-3-onas (**Esquema I-3**) não substituídas ou com os grupos metila e/ou 2-piridina nas posições 4a/4b e 5a/5b, a partir da reação de compostos dicarbonílicos com diferentes hidrazinas, na busca de antagonistas e ou agonista inverso do receptor H₃ da histamina.

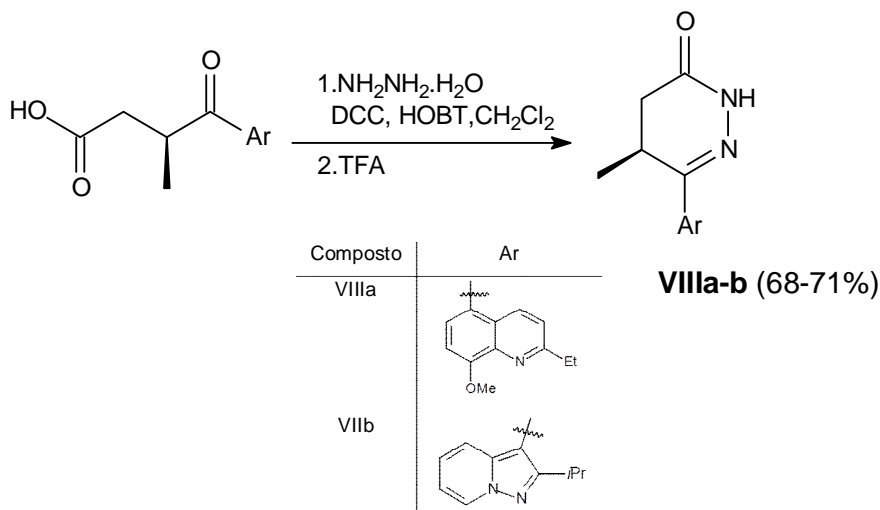
Esquema I-3 Metodologia utilizada por Dandu et al. (2011) e Hudkins et al. (2011, 2012a, 2012b) na síntese de 4,5-diidropiridazin-3-onas.



$R^{4a}/R^{4b}/R^{5a}/R^{5b} = H, CH_3$ ou 2-piridinil

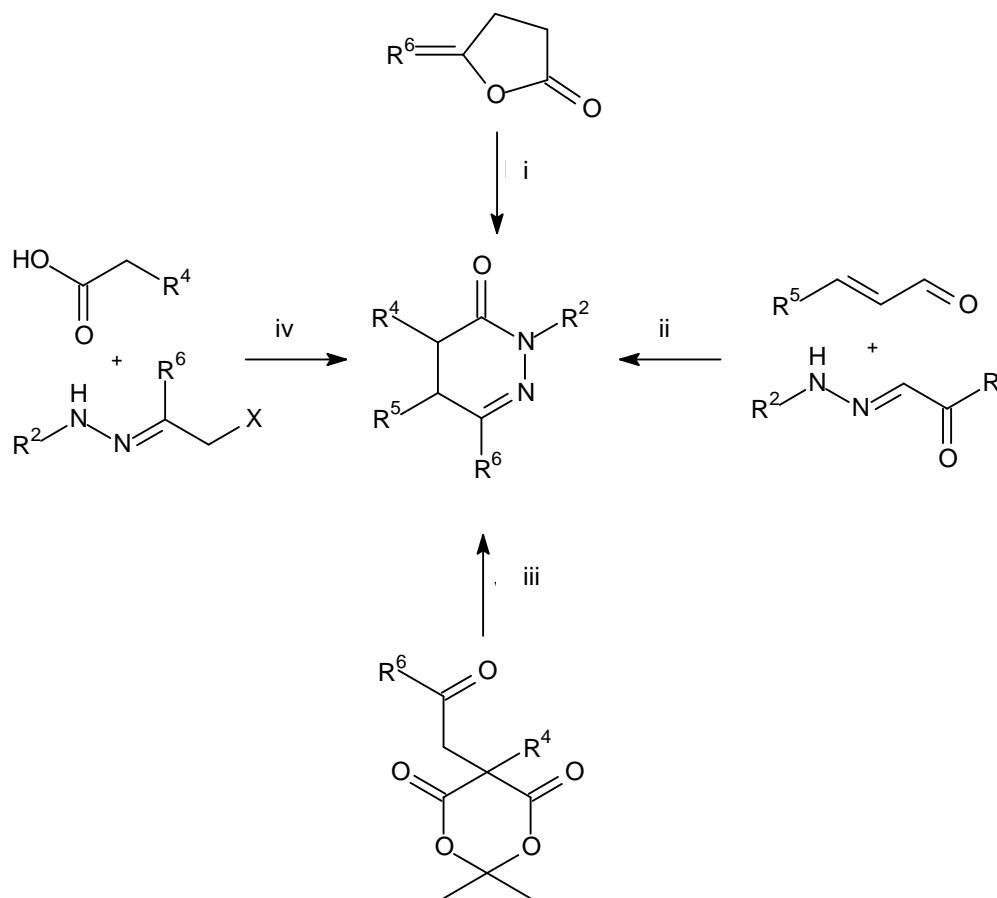
A síntese assimétrica de 5-metil-4,5-diidro-3-(2H)-piridazinonas (**VIIIa-b**) com substituinte na posição-6 (**Esquema I-4**), com 68 e 71% de rendimento, foi descrita por Kojima e Kohno (2013) através da condensação de ácidos β -metil- γ -cetocarboxílico opticamente ativo com hidrazina, DCC (N,N'-diciclohexilcarbodiimina), HOBT (1-hidroxibenzotriazol) em diclorometano e, posterior adição de TFA (ácido trifluoracético) em temperatura ambiente

Esquema I-4 Estrutura das 5-metil-4,5-diidro-3-(2H)-piridazinonas obtidas por Kojima e Kohno (2013).



Metodologias alternativas na obtenção do núcleo piridazinônico foram propostas por Reddy, Saravanan e Kumar (1998); Mao et al. (2015); Tóth et al. (1995, 1997) e Li et al. (2015) e estão apresentadas a seguir (**Esquema I-5**).

Esquema I-5 Metodologias descritas para obtenção de diidropiridazinonas.

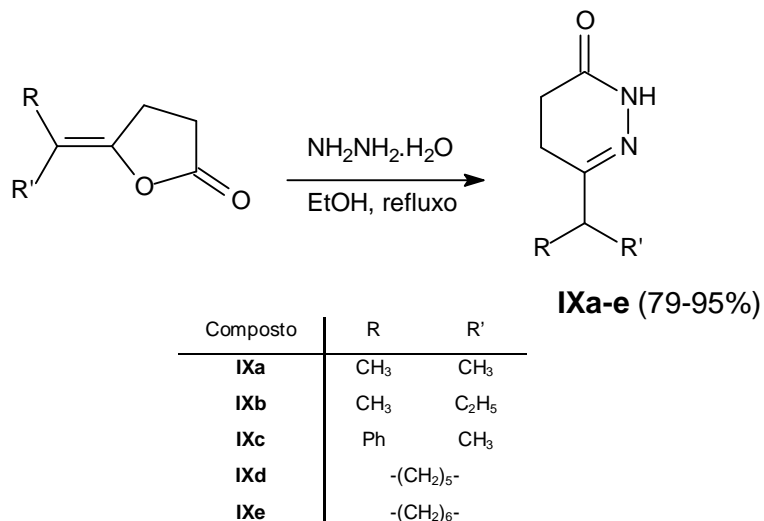


Metodologias: (i) $\text{NH}_2\text{NH}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, etanol, refluxo (REDDY, SARAVANAN E KUMAR, 1998); (ii) sal de N-mesitiltriazol (catalisador específico), quinona, DIPEA, DCM, 20-30°C, 24-48h (MAO et al., 2015). (iii) $\text{NH}_2\text{NH}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, DMF, temperatura ambiente, 24h. (TÓTH et al., 2004; 2005) (iv) DHPB, $(\text{CH}_3)_2\text{CCOCl}$, (*i*-Pr)₂-NET, DME, temperatura ambiente, atmosfera de argônio (LI et al., 2015).

O uso de γ -butirolactonas na obtenção de diidropiridazinonas foi uma alternativa utilizada por Reddy, Saravanan e Kumar (1998) (Metodologia i, **Esquema I-6**). A fácil obtenção destas lactonas e, eficiente reação com

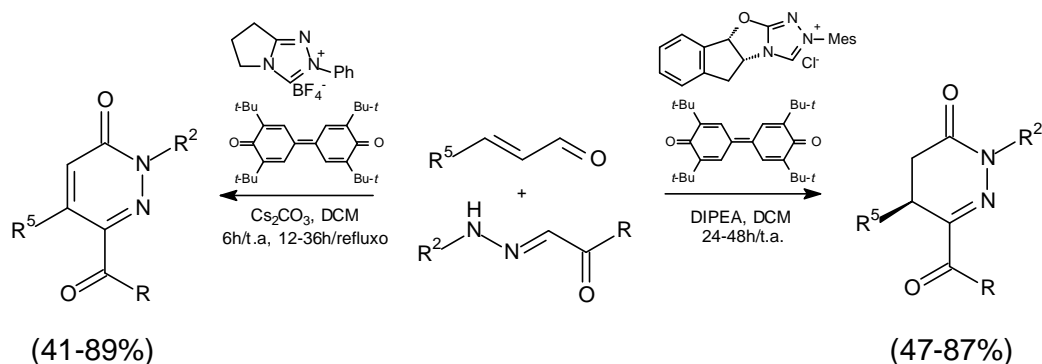
hidrazina, permitiu a síntese das 4,5-diidropiridazin-3-onas (**IXa-e**), substituídas na posição-6, com rendimentos superiores a 92%.

Esquema I-6 Metodologia para obtenção das 4,5-diidropiridazin-3-onas apresentada por Reddy, Saravanan e Kumar (1998).



Mao et al. (2015) publicaram um método novo e eficiente na síntese enantiosseletiva de derivados 4,5-diidropiridazinônicos quirais (**Esquema I-7**). O método consiste na anelação oxidativa (quinona como agente oxidante) catalisada por sal de triazol (N-mesitil-indeno-[2,1-b]triazol[4,3-d][1,4]oxazínio) entre hidrazonas α, β -insaturadas e aldeídos, com DIPEA (diisopropiletilamina) em DCM e temperatura ambiente por 24-48h. Esta metodologia também possibilitou a síntese seletiva de 4,5-diidropiridazin-3-onas ou piridazin-3-ona a partir dos mesmos reagentes com variação das condições catalíticas da reação (**Esquema I-7**).

Esquema I-7 Método para obtenção seletiva de diidropiridazinonas ou piridazinonas descrito por Mao et al. (2015).

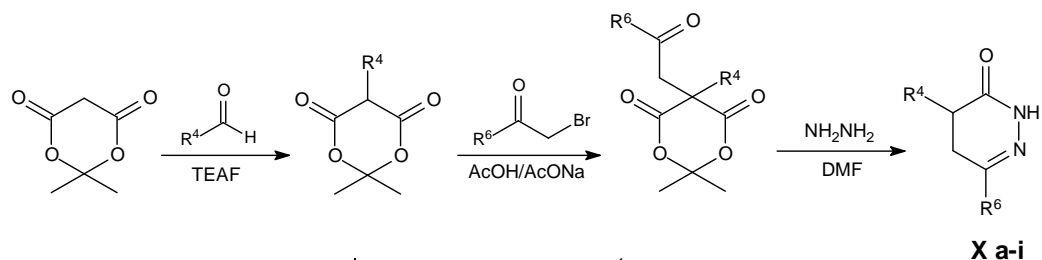


$R^2 = C_6H_5, 4-MeOC_6H_4, 4-BrC_6H_4, 4-CF_3C_6H_4, C_6H_5CHO$

$R^5 = C_6H_5, 4-MeOC_6H_4, 4-BrC_6H_4, 3-MeC_6H_4, 2-MeC_6H_4, n-Pr$ e $i-Pr$.

A preparação de diidropiridazinonas 4,6-dissubstituídas, objeto do nosso estudo, não é comumente relatada na literatura. Tóth et al. (1995, 1997) desenvolveram uma rota sintética simples e versátil na preparação de derivados diidropiridazinônicos 4,6-dissubstituídos (**Esquema I-8**).

Esquema I-8 Método de obtenção de diidropiridazinonas 4,6-dissubstituídas desenvolvido por Tóth et al. (1995, 1997).



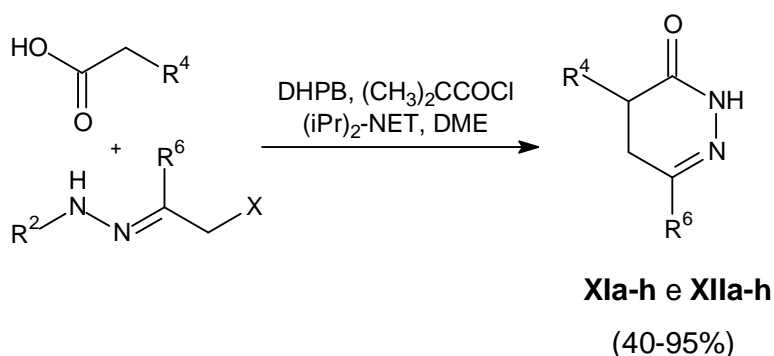
Produto	R	R ¹
Xa	H	C ₆ H ₅
Xb	C ₆ H ₅	C ₆ H ₅
Xc	3-ClC ₆ H ₄ CH ₂	C ₆ H ₅
Xd	4-ClC ₆ H ₄ CH ₂	C ₆ H ₅
Xe	3,4-(OMe) ₂ C ₆ H ₃ CH ₂	C ₆ H ₅
Xf	3-ClC ₆ H ₄ CH ₂	4-ClC ₆ H ₄
Xg	4-ClC ₆ H ₄ CH ₂	4-ClC ₆ H ₄
Xh	3,4-(OMe) ₂ C ₆ H ₃ CH ₂	4-ClC ₆ H ₄
Xi	2-tienilmetil	4-ClC ₆ H ₄

A etapa inicial da metodologia de Tóth et al. (1995, 1997) consiste na condensação redutiva do ácido de Meldrum com aldeídos aromáticos na presença de formiato de trietilamônio (TEAF), seguido pela alquilação do substrato monoalquilado com α -halocetonas e reação do intermediário

formado com hidrazina. O que torna este método importante é a obtenção exclusiva do substrato monoalquilado reduzido, devido à presença de hidreto gerado *in situ* pelo também solvente, formiato de trietilamônio (TEAF). Desta forma, Tang e Hung (2003) e Meyer et al. (2004) sintetizaram séries de 4,5-diidropiridazinonas 4,6-dissubstituídas aplicando a metodologia de Tóth et al. (1995, 1997).

Recentemente, Li et al. (2015) desenvolveram um novo protocolo de síntese para 4,5-diidropiridazin-3(2*H*)-onas 4,6-dissubstituídas, através de uma cicloadição [4+2] de 1,2-diaza-1,3-dienos, gerados *in situ*, com ácidos acéticos aromáticos sob organocatalise (**Esquema I-9**).

Esquema I-9 Estrutura da série de 4,5-diidropiridazin-3(2*H*)-onas 4,6-dissubstituídas obtidas por Li et al. (2015).



R ² =Boc; R ⁶ =C ₆ H ₅				R ² =Boc; R ⁴ =C ₆ H ₅					
	R ⁴	R ⁴	R ⁴		R ⁶	R ⁶	R ⁶		
XIa	C ₆ H ₅	XIe	4-F C ₆ H ₄	XIi	2-MeC ₆ H ₄	XIIa	4-Me C ₆ H ₄	XIle	4-OMe C ₆ H ₄
XIb	4-Me C ₆ H ₄	XIf	4-Cl C ₆ H ₄	XIj	3-Me C ₆ H ₄	XIib	4-Br C ₆ H ₄	XIlf	4-CF ₃ C ₆ H ₄
XIc	4-OMe C ₆ H ₄	XIlg	4-Br C ₆ H ₄	XIk	3-OMe C ₆ H ₄	XIic	4-FC ₆ H ₄	XIlg	3-OMe C ₆ H ₄
XId	4-CF ₃ C ₆ H ₄	XIh	2-Br C ₆ H ₄	XIl	2-tienil	XIId	4-Cl C ₆ H ₄	XIih	3-ClC ₆ H ₄

I.2 Importância biológica de piridazinonas e 4,5-diidropiridazinonas

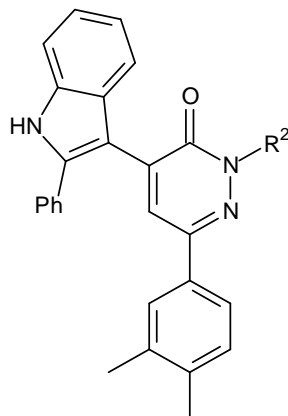
Nesta revisão da literatura relacionada a importância biológica de diidropiridazinonas, inicialmente serão apresentados dados a respeito da atividade antiproliferativa e atividade inibidora da aldose-redutase, objeto de estudo do presente trabalho. Posteriormente serão apresentadas as principais atividades características desta classe de compostos.

I.2.1 Atividade Antitumoral

Na busca por novos agentes antitumorais, algumas séries de piridazinonas foram sintetizadas e avaliadas frente a atividade antiproliferativa, destacando-se neste contexto os estudos de El-Ghaffar et al. (2011); Murty et al. (2012); Ratish et al. (2012) e o trabalho de Ovais et al. (2013).

El-Ghaffar et al. (2011) avaliou a atividade antitumoral de piridazinonas 4,6-dissubstituídas contendo o grupo 2-fenil-1*H*-indol na posição-4 do anel piridazinônico. Estes derivados foram avaliados frente a três linhagens de células, carcinoma de mama (MCF7), carcinoma de fígado (HEPG2) e carcinoma de colorretal (HCT116). As piridazinonas mostradas na **Figura I-1**, **XIIIa** e **XIIIb**, foram as mais ativas frente a carcinoma de colorretal ($IC_{50} < 5 \mu\text{g/mL}$) e carcinoma de fígado ($IC_{50} < 10 \mu\text{g/mL}$), respectivamente.

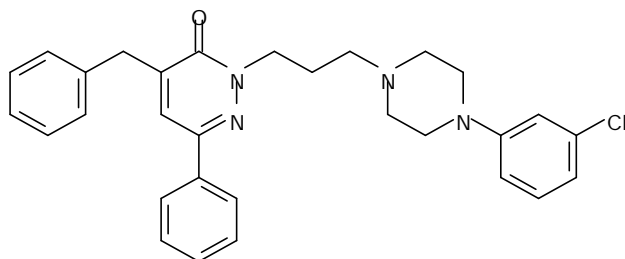
Figura I-1 Derivados piridazinônicos mais ativos da série obtida por El-Ghaffar et al. (2011).



XIIIa) $R^2=H$, **XIIIb)** $R^2=CH_2COOEt$

Murty et al. (2012) descreveu a síntese e atividade anticâncer para uma série de 4-aryl/heteroaryl-6-fenil-piridazinonas frente a cinco linhagens de células de câncer: colo de útero (HeLa); mama (SKBR3); colorretal (HCT116); pele (A375) e próstata (H1299). O derivado mais ativo (**XIV**, Figura I-2) apresentou GI_{50} de 40,3 μ M frente células de carcinoma colorretal (HCT116).

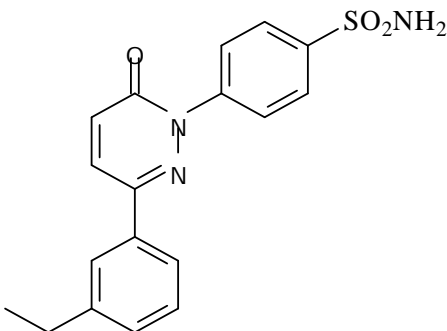
Figura I-2 Derivado piridazinônico mais ativo da série de 4-aryl/heteroaryl-6-fenil-piridazinonas avaliadas por Murty et al. (2012).



XIV

Uma série de novos derivados de 2-benzenossulfonamidapiridazinona foi sintetizada por Ratish et al. (2012), pela ciclocondensação do ácido aroil acrílico e cloridrato de *p*-hidrazinobenzenosulfonamida em etanol. Os compostos foram avaliados quanto à sua atividade antitumoral frente a 59 linhagens de células de câncer. O derivado mostrado na **Figura I-3** inibiu o crescimento de 34 linhagens células tumorais, mostrando uma atividade notável contra SR (leucemia) e NCI-H522 (pulmão de não pequenas células), com um valor de GI_{50} inferior a 0,1 μ M. Este composto também exibiu uma boa atividade contra a leucemia (CCRF-CEM, HL-60 (TB), K-562, MOLT-4, RPMI-8226), câncer de pulmão (NCI-H460), cólon (HCT-116, HCT-15, HT29, KMI2, SW-620), do SNC (SF-295), melanoma (MALME-3M, M14, MDA-MB-435 SK-MEL-5), do ovário (OVCAR-3, NCI / ADR- RES) e mama (MCF7), com GI_{50} inferior a 1,0 μ M.

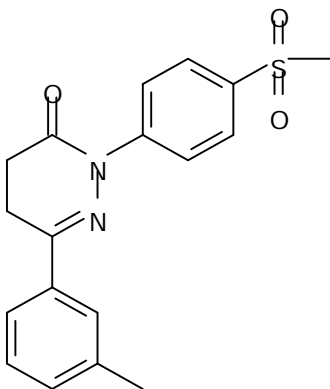
Figura I-3 Derivado piridazinônico mais ativo da série de 2-benzenossulfonamidapiridazinona avaliadas por Ratish et al. (2012).



Dando continuidade aos estudos de Ratish et al. (2012), Ovais et al. (2013) realizou a síntese de uma série de 2-benzenometanossulfonil-diidropiridazinonas, através de metodologia similar, utilizando ácido β -aróil propionico e *p*-(metanosulfonil)fenilhidrazina. A avaliação da atividade antiproliferativa *in vitro*, mostrou que, dentre os onze compostos selecionados e avaliados pelo *National Cancer Institute (EUA)*, a diidropiridazinona com o grupo etilfenil na posição-6 (**Figura I-4**) com atividade mais notável, com GI_{50} inferior a 1 μ M contra 36 linhagens de células diferentes.

Analisando a atividade antiproliferativa da série das piridazinonas descritas por Ratish et al. (2012) com as das diidropiridazinonas sintetizadas por Ovais et al. (2013), observamos o grande potencial antitumoral para esta classe de compostos, e ainda, o considerável aumento da atividade das diidropiridazinonas em relação as piridazinonas.

Figura I-4 Derivado diidropiridazinônico mais ativo da série de diidropiridazinonas sintetizadas por Ovais et al. (2013).



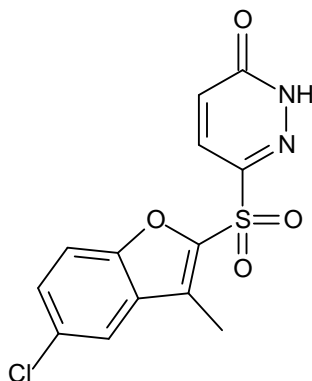
Devido à suas importantes propriedades biológicas, estes compostos também têm sido utilizados nos estudos de interação com DNA. Muitos fármacos antitumorais possuem o DNA como principal alvo molecular, uma vez que ele é o responsável pelo transporte do código genético, onde estão contidas todas as informações necessárias para a síntese das proteínas e enzimas, por meio dos processos de tradução e transcrição (ZHAO et al., 2014). A literatura reporta alguns trabalhos referentes à interação de derivados piridazinonas com DNA (MEHD et al., 2009; BARLOCCO et al., 2009; AHMADI et al., 2011; KUMAR et al., 2016) através de voltametria cíclica, fluorescência molecular, UV-vis e dicroísmo circular.

1-2.2 Atividade inibidora da aldose-redutase

Estudos *in vitro* e *in vivo* sugerem um claro benefício da administração de inibidores da aldose-redutase (ARis) em vários modelos de sistemas expostos a altos níveis de glicose, bem como no tratamento de pacientes diabéticos (STEUBER et al., 2006). Devido a estas observações, grandes esforços foram feitos entre as duas últimas décadas para desenvolver fármacos inibidores da aldose-redutase (ARis). Para a classe das piridazinonas são encontrados poucos estudos de avaliação do perfil destas moléculas como inibidoras da aldose-redutase, sendo os mais relevantes descritos por Mylari et al. (2003, 2005), Rastelli et al. (1997) e Constantino et al. (2000), que serão apresentados a seguir.

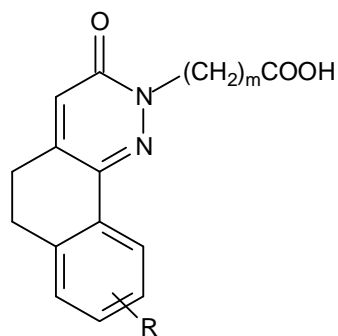
Mylari et al. (2003) relataram o desenvolvimento de um novo inibidor da aldose-redutase contendo o núcleo piridazinona, o composto 6-(5-cloro-3-metilbenzofuran-2-sulfo-nil)-2H-piridazin-3-ona (**Figura I-5**), o qual apresentou um valor de IC₅₀ de 840 pM, com seletividade de mais de 1000 vezes para aldose-redutase em relação ao aldeído-redutase, além de uma excelente biodisponibilidade oral e acentuada eficiência *in vivo* (Mylari et al., 2003; Mylari et al., 2005).

Figura I-5 Estrutura da 6-(5-cloro-3-metilbenzofuran-2-sulfo-nil)-2H-piridazin-3-ona



Estudos de Rastelli et al. (1997) e Constantino et al. (2000) relatam derivados de piridazinonas de fórmula geral mostrada na **Figura I-6**, contendo uma unidade alquilcarboxílica ligada ao N-2, como inibidores seletivos da aldose-redutase, com uma potência comparável à do sorbinil que é a droga padrão de controle.

Figura I-6 Derivado de piridazinona com atividade inibidora da aldose redutase.



$m=1, 2.$

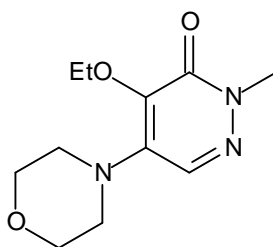
1-2.3 Outras atividades biológicas de diidropiridazinonas

O núcleo piridazinona e diidropiridazinona ganhou destaque na química medicinal nas últimas décadas, graças ao amplo perfil farmacodinâmico que seus derivados apresentam. Os primeiros estudos apontaram atividade anti-hipertensiva e cardiotônica para esta classe de compostos. O êxito destes estudos é visto no número de piridazinonas comercializadas para o tratamento de doenças cardiovasculares, como: indolidana; bemoradana; pimobendano e levosimendana (**Figura 5**).

Na análise da estrutura destes derivados, observamos que todos são classificados como 4,5-diidropiridazinonas (não apresentam insaturação entre os carbonos 4 e 5), ausência de substituinte ou presença de grupo metila na posição-5 e substituintes volumosos na posição-6. A influência do sistema heterocíclico ligado à piridazinona, (presente nos derivados indolidan, bemoradan e pimobendano, foi analisada por Demirayak, Karaburun e Beis (2004), sendo constatado que este sistema é o responsável pela regulação da farmacocinética da molécula.

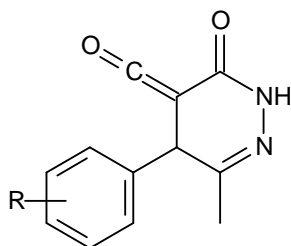
A atividade analgésica, anti-inflamatória, antipirética de piridazinonas é bastante relatada na literatura (OCHIAI et al. 2011; 2012, 2013; OVAIS et al., 2013; TAO et al., 2012; WANG et al. 2007). Diversas 2-alkil ou 2-alcenil-4-alcóxi-5-(amino substituído)-3(2H)-piridazinonas foram sintetizadas e avaliadas quanto às atividades analgésicas e anti-inflamatórias. O composto 4-etóxi-2-metil-5-morfolino-3(2H)-piridazinona (emorfazona, **Figura I-7**) foi o mais potente nesta categoria.

Figura I-7 Estrutura da Emorfazona, piridazinona com potente atividade analgésica e anti-inflamatória



Com relação a atividade anti-inflamatória e analgésica, podemos destacar o trabalho de Wang et al. (2007), onde uma série de 4-carbomil-5-aril-6-metil-4,5-diidropiridazin-3(2H)-onas foram sintetizadas e analisadas em relação as propriedades anti-inflamatória e analgésica. O composto contendo os grupos carbomil e metil, nas posições-4 e -5, respectivamente (**Figura I-8**), mostrou atividade anti-inflamatória satisfatória, os demais compostos exibiram propriedades analgésicas significativas.

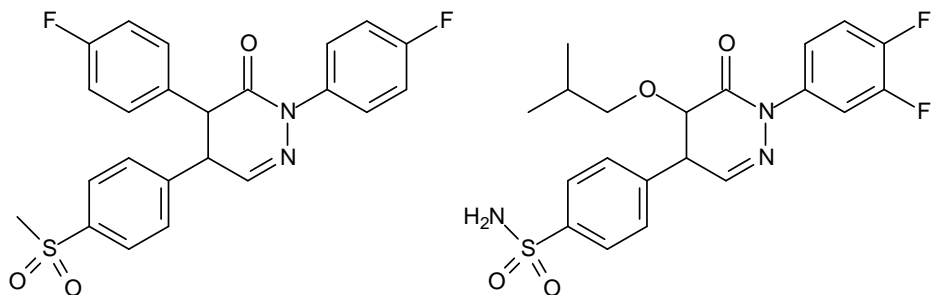
Figura I-8 Diidropiridazinona com atividade anti-inflamatória.



Uma classe importante de fármacos anti-inflamatórios e analgésicos são os NSAIDs (fármacos anti-inflamatórios não esteroidais), que são inibidores da ciclo-oxigenase (COX), enzima chave na manifestação da inflamação e da dor. Em 2004, Harris et al. relataram as propriedades de diidropiridazinonas como inibidores potentes e seletivos da COX-2.

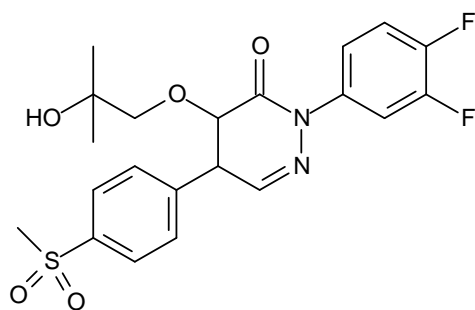
O composto **XV** foi o primeiro a apresentar perfil anti-inflamatório tanto agudo como crônico em modelos de ratos, porém apresentava baixa solubilidade aquosa e, portanto, menor taxa de eliminação. Outro composto desenvolvido foi o **XVI**, com o grupo 2-metil-propóxi na posição-4, com potência anti-inflamatória e analgésica maior que **XV** (**Figura I-9**), mas também com baixa solubilidade. A introdução de um grupo hidroxila na posição-2 da cadeia do 2-metil-propóxi, composto **XVII**, resultou em potente inibição seletiva de COX-2, além de solucionar o problema de baixa solubilidade quando comparados aos compostos anteriores e mesmo com drogas padrões como celecoxib e rofecoxib, estabelecidas no tratamento de artrite. Neste estudo fica claro a importância do substituinte não apenas na atividade biológica, mas também no estudo da farmacodinâmica da molécula.

Figura I-9 Diidropiridazinonas com atividade anti-inflamatória e analgésica.



XV

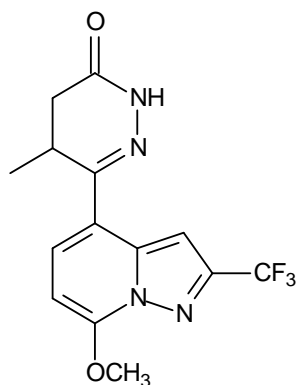
XVI



XVII

Ochiai et al. (2011; 2012a; 2013) apresentou estudos na busca de inibidores da fosfodiesterase, uma classe de drogas que bloqueiam um ou mais dos cinco subtipos da enzima fosfodiesterase (PDE), responsável pelo relaxamento da passagem das vias aéreas. Os estudos revelaram que o composto **XVIII** (**Figura I-10**) apresentou perfil de duplo inibidor de PDE III / IV, com atividade anti-inflamatória e broncodilatadora. Através do estudo de uma série de análogos de **XVIII** observou-se que a subunidade 5-metildiidropiridazinona é essencial para a atividade inibidora de PDE III.

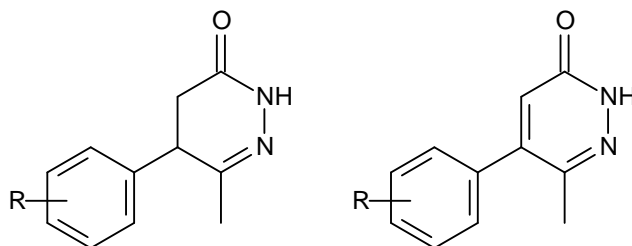
Figura I-10 Diidropiridazinonas com atividade anti-inflamatória e broncodilatadora.



XVIII

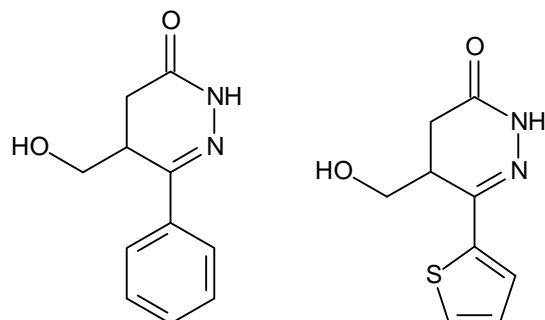
Além de atividade anti-inflamatória, diidropiridazinonas apresentam também ação antitrombótica e anti-úlceras, como o demonstrado para uma série de 5-aryl-6-metil-4,5-diidropiridazin-3(2H)-onas e 5-aryl-6-metil-piridazin-3(2H)-onas (**Figura I-11**) sintetizadas por Pinna et al. (1988).

Figura I-11 Diidropiridazinonas e piridazinonas sintetizadas por Pinna et al. (1988).



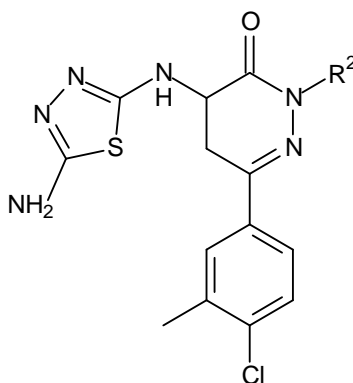
Num outro trabalho, as 6-fenil-5-hidroximetil-4,5-diidro-3(2H)-piridazinona e 6-tienil-5-hidroximetil-4,5-diidro-3(2H)-piridazinonas (**Figura I-12**) inibiram a agregação de plaquetas induzida por trombina ($IC_{50} = 0,25$ e $0,26$ mm, respectivamente) ou pelo ionóforo de cálcio ionomicina ($CI_{50} = 0,42$ e $0,43$ mm, respectivamente) (PINNA et al., 1988).

Figura I-12 Estrutura da 6-fenil-5-hidroximetil-4,5-diidro-3(2H)-piridazinona e 6-tienil-5-hidroximetil-4,5-diidro-3(2H)-piridazinona obtidas por Pinna et al., 1988.



As diidropiridazinonas ainda se destacam por exibir atividade antibacteriana e antifúngica. Estudos conduzidos por Sallan, El-Hashash e Guirguis, (2016), mostraram um série de 6-aryl-diidropiridazin-3(2H)-onas substituídas na posição-4 pelo substituinte 1,3,4-tiadiazolil (**Figura I-13**) com alto potencial antimicrobiano frente às bactérias Gram-positivas *Streptococcus pneumoniae* e *Bacillus subtilis*, e bactérias Gram-negativas *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, bem como contra fungos, *Aspergillus fumigatus*, *Syncephalastrum racemosum*, *Geotrichum candidum*, e *Cândida albicans*.

Figura I-13 6-aryl-diidropiridazin-3(2H)-onas com atividade antibacteriana e antifúngica



$R^2 = -H, -COCH_3, -COH, -CONH_2$ e $CSNH_2$

I-3 Resultados e Discussão

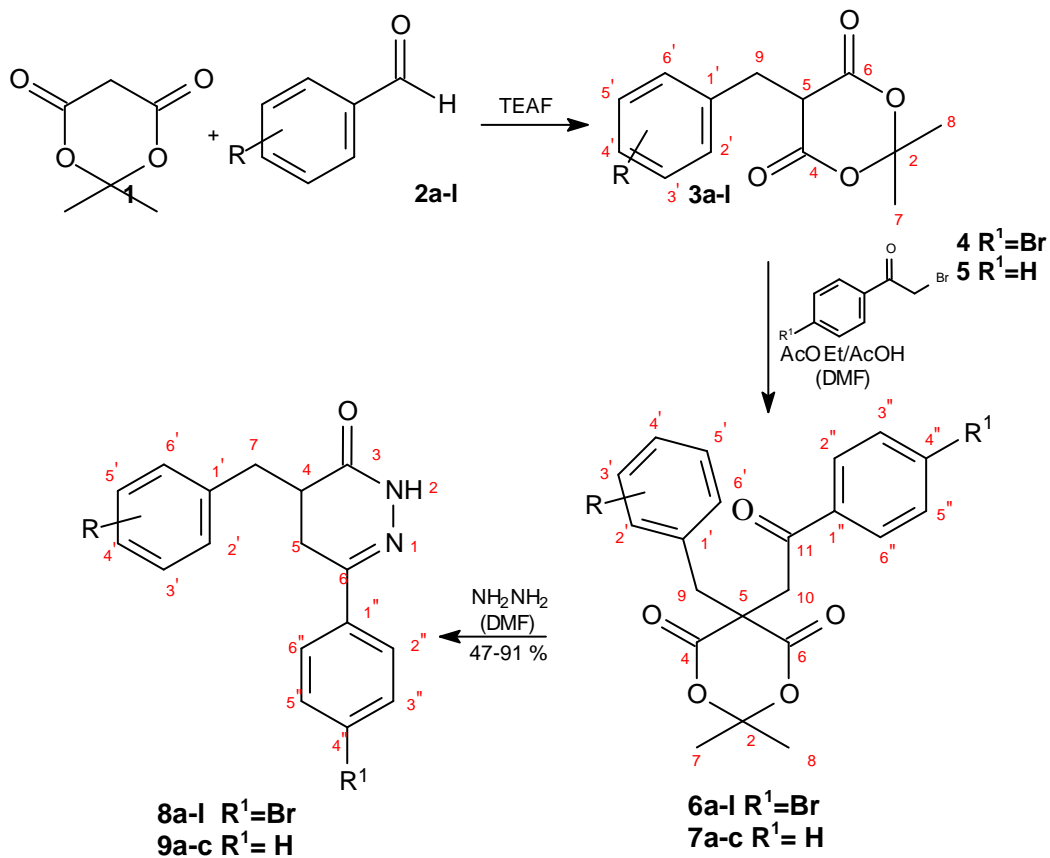
1.3.1 Síntese e Caracterização do derivados 4,5-diidropiridazinônicos 8a-o e 9a-c e seus precursores 3a-l, 6a-l e 7a-c.

A rota sintética empregada para a preparação das diidropiridazinonas **8a-l** e **9a-c** encontra-se ilustrada no **Esquema I-10**. Os derivados **8m-o** foram obtidos a partir de **8l** conforme apresentado no **Esquema I-11**. Vale ressaltar que os derivados **8a-k**, **8n**, **8o**, **9b** e **9c** são inéditos, assim como seus precursores **6a-k**, **7b** e **7c**.

Dentre as metodologias descritas para a preparação de diidropiridazinonas utilizamos, em nosso trabalho, a metodologia de Tóth *et al.*(1997), devido à sua simplicidade e versatilidade.

A etapa inicial na preparação das diidropiridazinonas (**Esquema I-10**) consiste na condensação redutiva do ácido de Meldrum (**1**) com aldeídos aromáticos (**2a-l**), promovida pelo formiato de trietilamônio, conforme metodologia de Tóth (TÓTH, G., 1995; TÓTH, G., 1997). A alquilação do substrato monoalquilado (**3a-l**) com brometos de fenacila (**4**) e (**5**) seguido da reação dos substratos dialquilados (**6a-l**) e (**7a-c**) com hidrazina, forneceu as respectivas 4,5-diidro-3(2*H*)-piridazinonas (**8a-l**) e (**9a-c**).

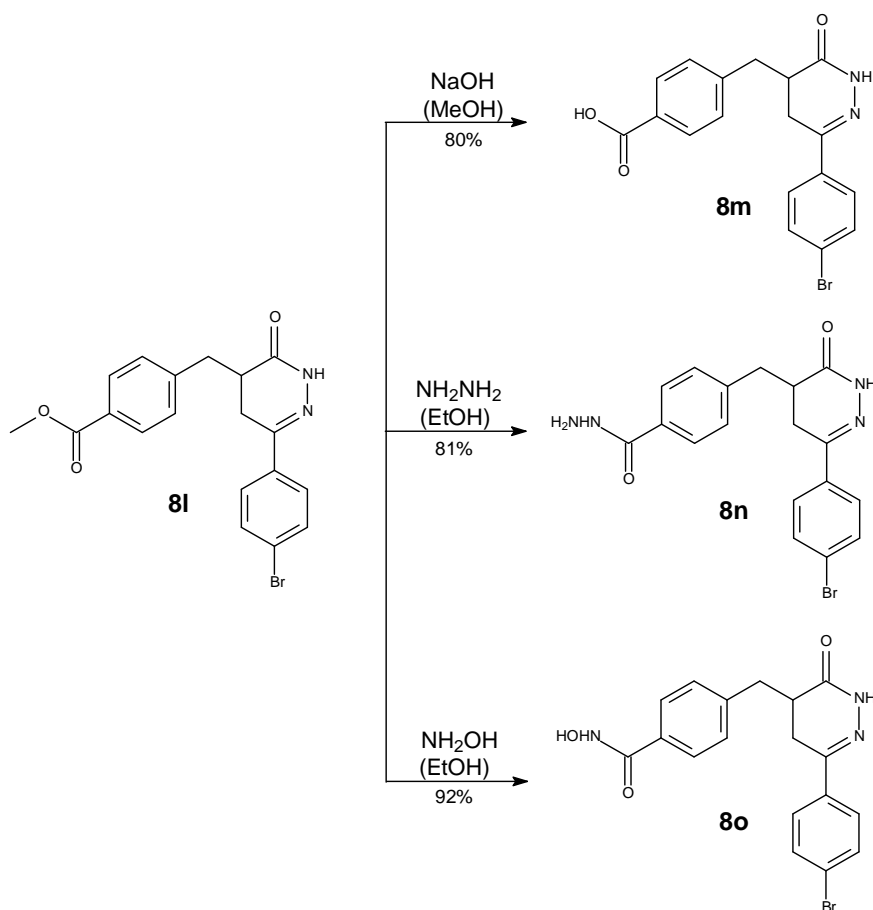
Esquema I-10 Rota sintética para a preparação 4,5-diidro-3(2*H*)-piridazinonas (**8a-l**) e (**9a-c**).



R: a) H; b) 4-F; c) 4-OCH₃; d) 4-NO₂; e) 4-Cl; f) 4-CH₃; g) 3-F; h) 3-NO₂; i) 2-F;
 j) 2-OCH₃; k) 2-NO₂; l) 4-COOCH₃

Os derivados **8m**, **8n** e **8o** foram obtidos a partir do tratamento do derivado **8l** com hidróxido de sódio, hidrazina e hidroxilamina, respectivamente, em meio alcoólico (**Esquema I-11**).

Esquema I-11 Síntese das 4,5-diidro-3(2*H*)-piridazinonas (**8m-o**)

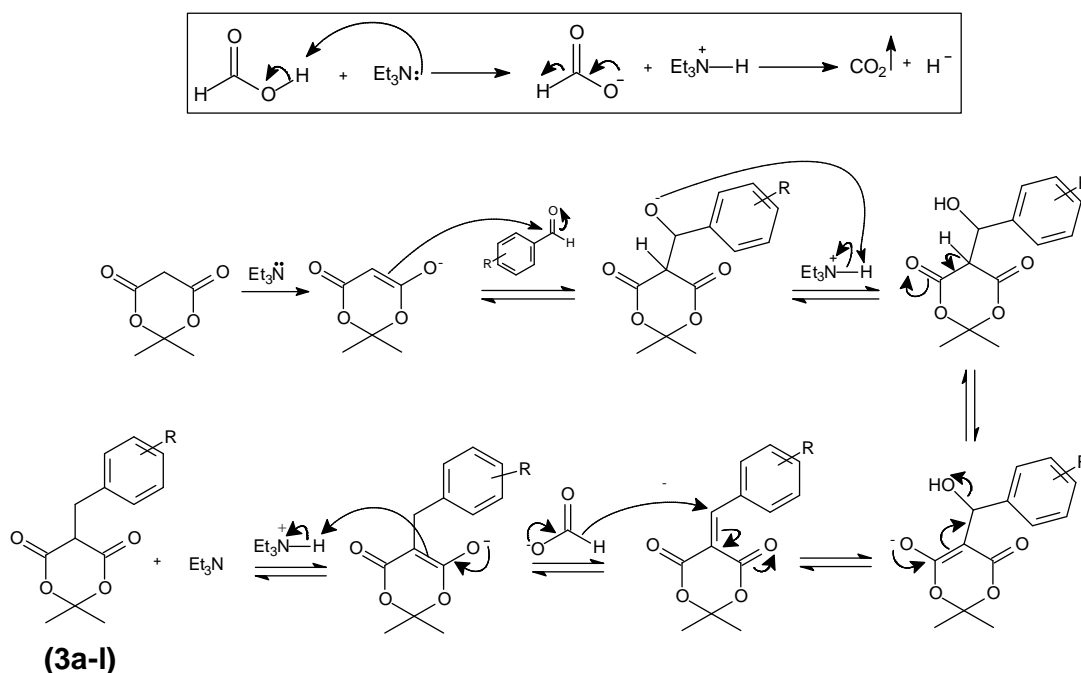


Os produtos monoalquilados **3a-l** foram obtidos com rendimentos na faixa de 50 a 75% a partir da reação do ácido de Meldrum (**1**) com aldeídos aromáticos (**2a-l**), na presença de formiato de trietilamônio, em temperatura ambiente, com tempos reacionais de 3-4 dias. Os aldeídos aromáticos contendo grupos retiradores de densidade eletrônica (**2b-4-F**, **2d-4-NO₂**, **2e-4-Cl**, **2g-3-F**, **2h-3-NO₂**, **2i-2-F**, **2k-2-NO₂** e **2l-4-COOCH₃**) apresentaram maior reatividade que os aldeídos aromáticos com grupos doadores (**2c-4-OCH₃**, **2f-4-CH₃** e **2j-2-OCH₃**), em razão dos rendimentos maiores obtidos para os produtos **3b**, **3d**, **3e**, **3g-3i**, **3k** e **3l** (66-75%), comparado aos produtos **3c**, **3f** e **3j** (50-54%).

O mecanismo proposto para a formação do produto monoalquilado envolve a reação de Knoevenagel, através da adição nucleofílica do ácido de

Meldrum à carbonila do aldeído aromático, formando o respectivo intermediário arilidênico. O formiato de trietilamônio promove a redução da ligação dupla α,β -insaturada, conforme mostrado no **Esquema I-12**.

Esquema I-12 Mecanismo proposto para formação dos intermediários monoalquilados **3a-l**.



Com o intuito de diminuir o tempo reacional e melhorar o rendimento desta etapa de monoalquilação empregamos diferentes temperaturas, bem como, irradiação de micro-ondas para a reação do ácido de Meldrum com o benzaldeído (1:1) em TEAF. As condições utilizadas e resultados obtidos estão mostrados na **Tabela I-1**. As reações foram acompanhadas por cromatografia em camada delgada, o final da reação pode ser confirmado ao término da formação de CO_2 . Os produtos foram confirmados através do ponto de fusão e RMN ^1H e ^{13}C .

Tabela I-1. Metodologias testadas na preparação do intermediário **3a**.

Entrada	Metodologia	Condições	Tempo reacional (min.)	Rendimento (%)
1	Convencional	T. amb.	2880	64
2	Convencional	40°C	300	61
3	Convencional	80°C	60	69
4	M.O. P=50W	40°C	10	55
5	M.O. P=50W	60°C	4	59
6	M.O. P=50W	80°C	2	71

As reações foram realizadas conforme o método convencional, em temperatura ambiente e a 40 e 80°C, e também utilizando irradiação de micro-ondas em baixa potencia (50W), nas temperaturas de 40, 60 e 80°C. O aumento da temperatura levou a uma diminuição considerável do tempo reacional em ambas as metodologias; os rendimentos variaram pouco. A condição empregada na Entrada 6 (temperatura de 80°C e irradiação de micro-ondas) foi a que forneceu melhor resultado em um tempo reacional de 2 minutos.

A partir deste estudo, as condições da Entrada 6 foram aplicadas na preparação dos derivados monoalquilados do ácido de Meldrum **3a-l**. Na **Tabela I-2**, podemos comparar os rendimentos obtidos através da metodologia convencional e de irradiação de micro-ondas. De modo geral, a variação no rendimento foi pequena, mas, o tempo reacional de apenas 2 minutos torna esta metodologia mais vantajosa em relação ao método convencional.

Tabela I-2. Dados de rendimento para os derivados monoalquilados **3a-l** obtidos pelo uso da metodologia convencional e de irradiação de MO.

Composto	R	Rendimento (%)	
		(Metodol. conv., Tamb, 3 a 4 dias)	(MO, 80°C, 2 min)
3a	H	64	71
3b	4-F	68	56
3c	4-OCH ₃	54	nt
3d	4-NO ₂	75	62
3e	4-Cl	71	60
3f	4-CH ₃	nt	50
3g	3-F	73	48
3h	3-NO ₂	70	61
3i	2-F	66	56
3j	2-OCH ₃	51	53
3k	2-NO ₂	71	59
3l	4-COOCH ₃	67	nt

nt= reação não testada nesta condição.

Os espectros de RMN de ¹H e RMN ¹³C para todos os derivados monoalquilados do ácido de Meldrum (**3a-l**) apresentaram sinais similares, as atribuições dos deslocamentos químicos estão apresentados nas **Tabelas I-3 e I-4**.

Como ilustração será apresentado os dados de RMN de ^1H e RMN ^{13}C para o derivado **3a**. No espectro de RMN de ^1H do derivado **3a** (**Figura I-14**) podemos destacar um tripleto em δ 3,76 atribuído ao hidrogênio ácido (H5), duplete em δ 3,49 referente aos hidrogênios metilênicos (H9) e simpletos em δ 1,49 e δ 1,73 correspondentes aos hidrogênios dos grupos metila do ácido de Meldrum, além dos sinais de hidrogênios aromáticos na região de 7,24-7,35 ppm. O espectro de RMN de ^{13}C para o derivado **3a** (**Figura I-15**) apresentou sinais em δ 165,32 referente às carbonilas, em δ 32,1 correspondente ao carbono metilênico (C9) e em δ 27,2 e δ 28,5 atribuídos aos grupos metila (C7 e C8), além dos sinais de carbonos aromáticos na região de 127,2-137,2 ppm. No espectro de IV (**Figura I-16**) podemos observar as bandas correspondentes ao estiramento C=O das carbonilas em 1788 e 1756 cm^{-1} .

Tabela I-3 Dados de RMN 1H, 13C (δ -ppm, 300,06 e 75,45MHz, DMSO-d₆) para os compostos **3a-f**.

C/H	3a		3b		3c		3d		3e		3f		3g	
	δ_H (mult, J em Hz)	δ_C	δ_H (mult, J em Hz)	δ_C	δ_H (mult, J em Hz)	δ_C	δ_H (mult, J em Hz)	δ_C	δ_H (mult, J em Hz)	δ_C	δ_H (mult, J em Hz)	δ_C	δ_H (mult, J em Hz)	δ_C
2	-	105,3	-	105,2	-	105,4	-	105,4	-	105,2	-	105,2	-	105,3
4	-	165,3	-	165,2	-	165,7	-	164,6	-	165,0	-	165,4	-	164,7
5	3,76 (t, 4,7)	48,2	3,73 (d, 4,7)	48,2	3,72 (t, 4,7)	48,5	3,82 (t, 4,7)	47,7	3,72 (t, 4,7)	48,0	3,74 (d, 4,7)	48,2	3,76 (t, 4,7)	47,9
6	-	165,3	-	165,2	-	165,7	-	164,6	-	165,3	-	165,4	-	164,7
7	1,49 (s)	27,2	1,54 (s)	27,3	1,48 (s)	27,6	1,67 (s)	27,0	1,58 (s)	27,2	1,50 (s)	27,2	1,59 (s)	27,1
8	1,73 (s)	28,5	1,74 (s)	28,4	1,72 (s)	28,7	1,79 (s)	28,3	1,75 (s)	28,4	1,73 (s)	28,5	1,76 (s)	28,4
9	3,49 (d, 4,7)	32,1	3,46 (d, 4,7)	31,3	3,44 (d, 4,7)	31,7	3,58 (d, 4,7)	31,4	3,46 (d, 4,7)	31,3	3,45 (d, 4,7)	31,7	3,48 (d, 4,7)	31,6
1'	7,24-7,35 (m)	137,2	-	-	-	131,2	-	-	-	135,5	-	129,7	-	139,6
2'	7,24-7,35 (m)	129,8	7,28-7,33 (m)	131,6	7,24 (d, 8,7)	129,2	7,54 (d, 9,0)	123,7	7,24-7,30 (m)	131,3	7,20 (d, 9,0)	134,1	7,12 (t, 1,2)	116,8
3'	7,24-7,35 (m)	128,6	6,94-7,00 (m)	115,4	6,82 (d, 8,7)	114,2	8,15 (d, 9,0)	130,9	7,24-7,30 (m)	128,7	7,10 (d, 9,0)	129,3	-	163,1
4'	7,24-7,35 (m)	127,2	-	-	-	159,0	-	144,7	7,24-7,30 (m)	133,2	-	136,8	7,25 (m)	114,2
5'	7,24-7,35 (m)	128,6	6,94-7,00 (m)	115,4	6,82 (d, 8,7)	114,2	8,15 (d, 9,0)	130,9	7,24-7,30 (m)	128,7	7,10 (d, 9,0)	129,3	6,93 (td, 8,6 e 2,5)	130,1
6'	7,24-7,35 (m)	129,8	7,28-7,33 (m)	131,6	7,24 (d, 8,7)	129,2	7,54 (d, 9,0)	123,7	7,24-7,30 (m)	131,3	7,20 (d, 9,0)	134,1	7,06 (dt, 10,2 e 1,8)	125,4
					3,77 (s, OCH ₃)	55,4								

Tabela I-4 Dados de RMN 1H, 13C (δ -ppm, 300,06 e 75,45MHz, DMSO-d₆) para os compostos **3g-l**.

C/H	3g		3h		3i		3j		3k		3l	
	δ_H (mult, J em Hz)	δ_C	δ_H (mult, J em Hz)	δ_C	δ_H (mult, J em Hz)	δ_C	δ_H (mult, J em Hz)	δ_C	δ_H (mult, J em Hz)	δ_C	δ_H (mult, J em Hz)	δ_C
2	-	105,3	-	105,5	-	105,2	-	104,9	-	105,3	-	105,3
4	-	164,7	-	164,7	-	164,8	-	165,4	-	164,6	-	164,9
5	3,76 (t, 4,7)	47,9	3,82 (t, 4,7)	47,7	3,87 (t, 4,7)	46,8	4,03 (t, 4,7)	46,1	4,21 (t, 4,7)	47,8	3,79 (d, 4,7)	47,8
6	-	164,7	-	164,7	-	164,8	-	165,4	-	164,6	-	164,9
7	1,59 (s)	27,1	1,69 (s)	26,2	1,73 (s)	25,8	1,73 (s)	26,6	1,78 (s)	26,1	1,59 (s)	27,1
8	1,76 (s)	28,4	1,80 (s)	28,8	1,80 (s)	26,3	1,77 (s)	28,0	1,82 (s)	28,7	1,76 (s)	28,4
9	3,48 (d, 4,7)	31,6	3,58 (d, 4,7)	29,5	3,45 (d, 4,7)	28,6	3,40 (d, 4,7)	28,7	3,65 (d, 4,7)	29,4	3,53 (d, 4,7)	31,8
1'	-	139,6	-	128,4	-	124,1	-	131,9	-	133,0	-	-
2'	7,12 (t, 1,2)	116,8	8,23 (t, 1,8)	133,4	-	151,0	-	157,1	-	-	7,41 (d, 8,4)	129,1
3'	-	163,1	-	-	7,23 (m)	128,8	6,86 (d, 8,1)	110,2	8,01 (dd, 8,0 e 1,2)	134,9	7,97 (d, 8,4)	129,9
4'	7,25 (m)	114,2	8,12 (dd, 8,1 e 2,1)	134,9	7,40 (td, 7,8 e 1,8)	132,0	7,25 (td, 7,8 e 1,8)	125,7	7,45 (td, 8,0 e 1,2)	125,1	-	142,5
5'	6,93 (td, 8,6 e 2,5)	130,1	7,48 (t, 7,8)	125,0	6,99-7,08 (m)	115,3	6,93 (td, 7,2 e 0,9)	120,7	7,61 (td, 7,5 e 1,2)	128,4	7,97 (d, 8,4)	129,9
6'	7,06 (dt, 10,2 e 1,8)	125,4	7,73 (d, 7,8)	133,0	7,11 (dd, 7,5 e 1,2)	124,7	7,35 (dd, 7,4 e 1,8)	128,3	7,78 (dd, 7,5 e 1,2)	133,4	7,41 (d, 8,4)	129,1
							3,83 (s, OCH ₃)	55,2 (OCH ₃)			3,90 (s, OCH ₃)	52,1 (OCH ₃)
											-	166,8 (C=O)

Figura I-14: Espectro de RMN ¹H (300MHz, CDCl₃) do composto 3a.

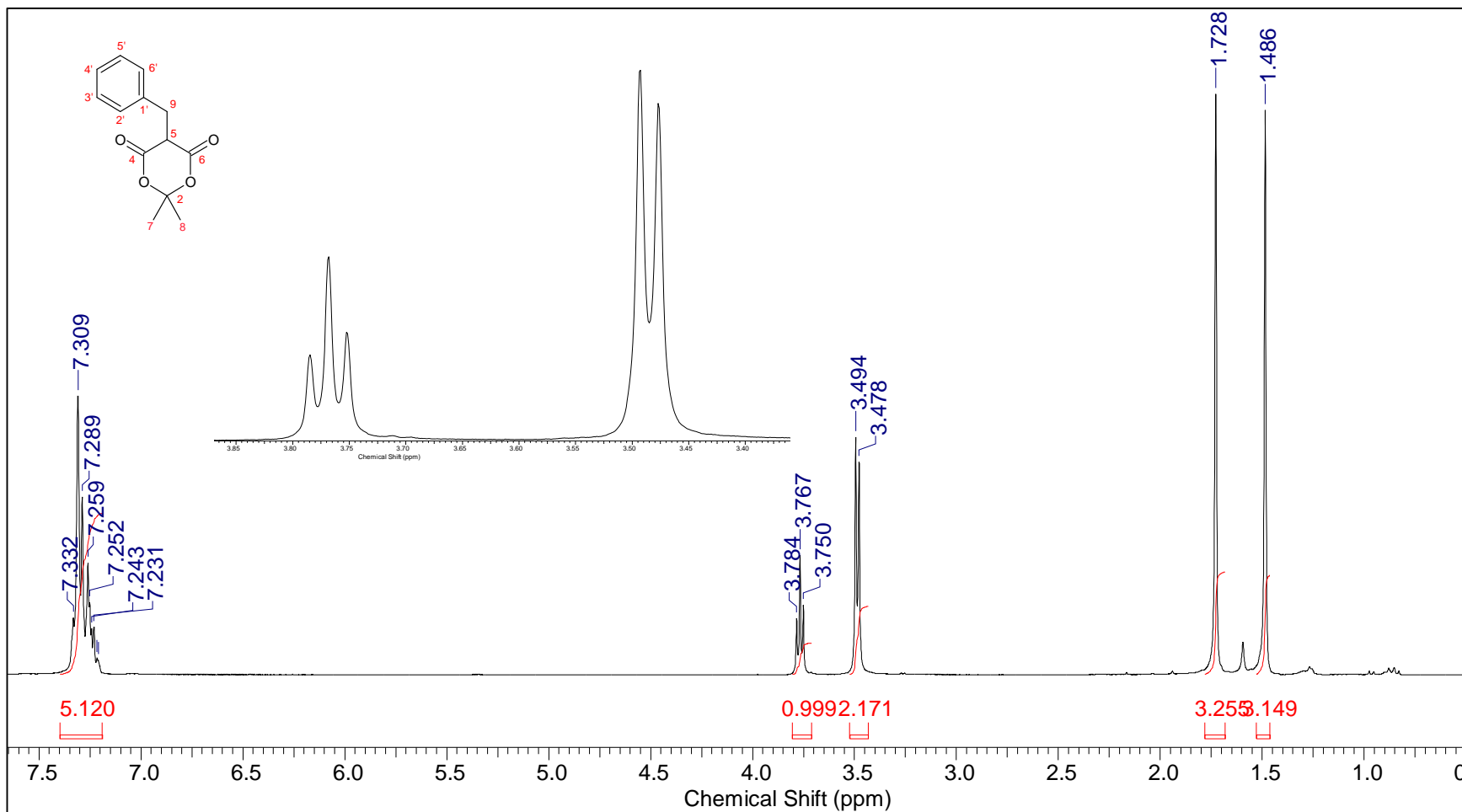


Figura I-15: Espectro de RMN ^{13}C (75,46MHz, CDCl_3) do composto **3a**.

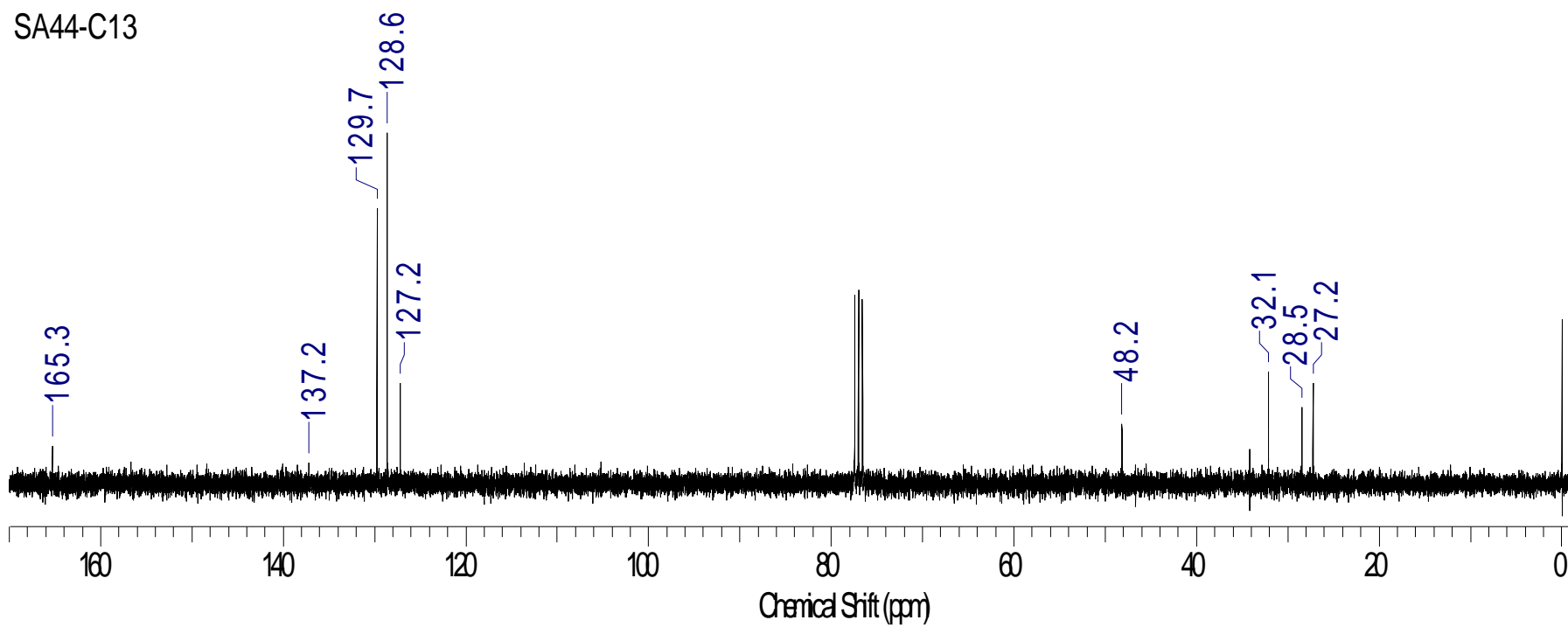
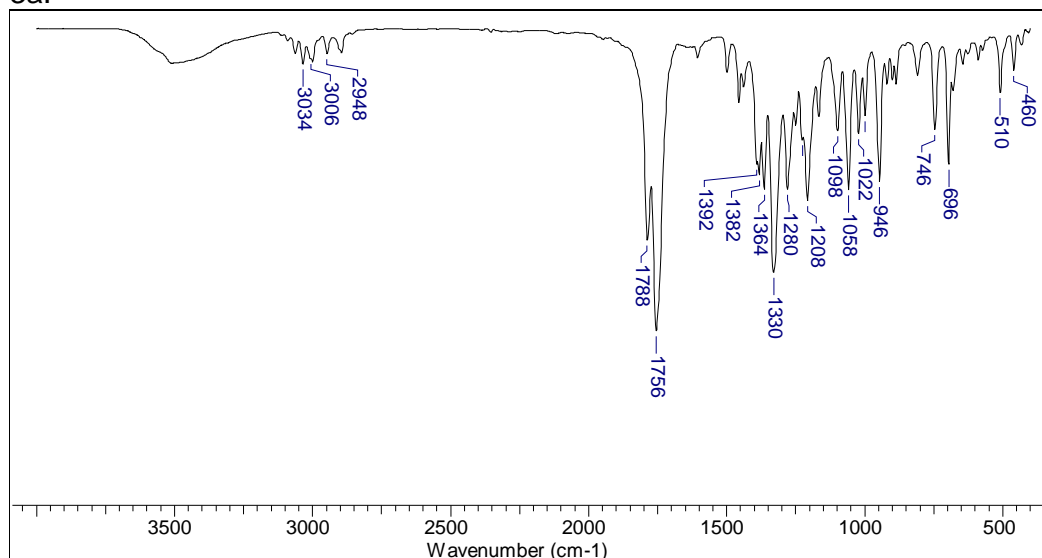
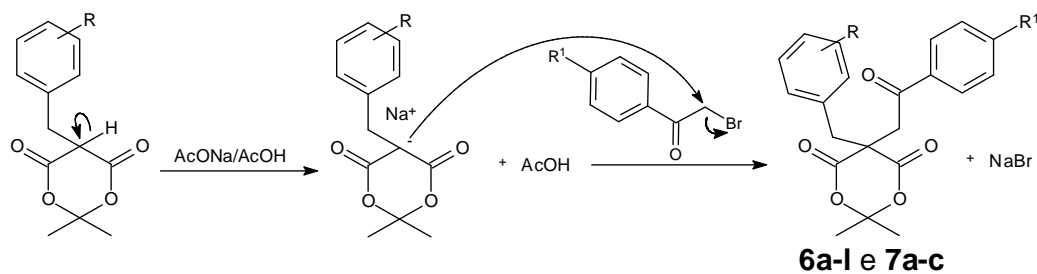


Figura I-16 Espectro de infravermelho pastilha de KBr para o composto **3a**.



A segunda etapa para a obtenção das diidropiridazinonas propostas em nosso trabalho consistiu na alquilação dos intermediários (**3a-l**) pela reação com brometos de fenacila **4** e **5** (**Esquema I-13**), utilizando acetato de sódio/ ácido acético e DMF, em temperatura ambiente por 24 horas (Metodologia A).

Esquema I-13 Mecanismo proposto para formação dos intermediários dialquilados **6a-l** e **7a-c**.



Adaptamos esta metodologia para o uso em micro-ondas utilizando carbonato de sódio e acetona à $T=80^{\circ}\text{C}$, ($P=50\text{W}$) num tempo médio de 4 minutos (Metodologia B). Em relação aos rendimentos, estes foram maiores ou similares ao método convencional, mas a redução do tempo reacional com

o uso de irradiação de micro-ondas torna este método mais vantajoso que o convencional (**Tabela I-5**).

Tabela I-5: Dados de rendimento para os intermediários dialquilados **6a-l** e **7a-c** preparados pelas Metodologias A e B.

Composto	R ₁	R ₂	Metodologia A (%)	Metodologia B (%)
6a	H	Br	65	85
6b	4-F	Br	70	nt
6c	4-OCH ₃	Br	65	nt
6d	4-NO ₂	Br	72	72
6e	4-Cl	Br	70	81
6g	3-F	Br	63	70
6h	3-NO ₂	Br	52	56
6i	2-F	Br	46	79
6j	2-OCH ₃	Br	47	54
6k	2-NO ₂	Br	64	65
6l	4-COOCH ₃	Br	94	nt
7a	H	Br	nt	80
7b	4-F	H	70	86
7c	4-OCH ₃	H	nt	70

nt= reação não testada nesta condição.

Todos os derivados dialquilados apresentaram padrões de sinais semelhantes nos espectros de RMN de ¹H e ¹³C as atribuições dos deslocamentos químicos estão apresentados nas **Tabelas I-6, I-7 e I-8**. Tomando como exemplo o derivado **6a**, observou-se no espectro de RMN de ¹H (**Figura I-17**) a presença de simpletos em δ 0,70 e δ 1,96 correspondentes aos hidrogênios das metilas geminadas (H7 e H8), um simpleto em δ 3,30 atribuído aos hidrogênios metilênicos benzílicos (H9) e um simpleto em δ 4,01, referente aos hidrogênios α-carbonílico (H10). O espectro de RMN de ¹³C para o derivado **6a** (**Figura I-18**) apresentou um sinal em δ 45,2, correspondente ao carbono metilênico benzílico (C9), em δ 47,8 referente ao carbono α-carbonílico (C10) e em δ 195,6 um pico correspondente à carbonila da cetona (C11). No espectro de IV (**Figura I-19**) podemos observar as bandas correspondentes ao estiramento C=O das carbonilas em 1758, 1720 e 1682 cm⁻¹.

Tabela I-6 Dados de RMN 1H, 13C (δ -ppm, 300,06 e 75,45MHz, DMSO-d₆) para os compostos **6a-f**.

C/H	6a		6b		6c		6d		6e		6f	
	δ_H (mult, J em Hz)	δ_c	δ_H (mult, J em Hz)	δ_c	δ_H (mult, J em Hz)	δ_c	δ_H (mult, J em Hz)	δ_c	δ_H (mult, J em Hz)	δ_c	δ_H (mult, J em Hz)	δ_c
2	-	107,7	-	107,7	-	107,6	-	107,9	-	107,7	-	105,5
4	-	168,1	-	168,1	-	168,3	-	167,5	-	168,1	-	168,7
5	-	51,9	-	51,9	-	52,0	-	51,6	-	51,9	-	54,5
6	-	168,1	-	168,1	-	168,3	-	167,5	-	168,1	-	168,7
7	0,70 (s)	28,0	0,81 (s)	28,3	0,81 (s)	28,2	0,83 (s)	28,3	0,85 (s)	28,0	0,84 (s)	28,9
8	1,96 (s)	28,5	1,99 (s)	28,4	1,99 (s)	28,5	2,00 (s)	28,6	1,99 (s)	28,5	2,01 (s)	29,6
9	3,30 (s)	45,2	3,29 (s)	44,4	3,27 (s)	44,5	3,39 (s)	44,5	3,26 (s)	45,2	3,25 (s)	39,9
10	4,01 (s)	47,8	4,05 (s)	47,8	4,04 (s)	47,8	4,02 (s)	47,5	4,00 (s)	47,8	3,99 (s)	43,3
11	-	195,6	-	196,4	-	196,5	-	195,2	-	195,6	-	196,3
1'	-	133,5	-	-	-	-	-	133,4	-	133,5	-	-
2'	7,18-7,36 (m)	129,8	7,18 (d, 8,5)	129,4	7,12 (d, 8,7)	125,6	7,38 (d, 8,7)	124,0	7,33 (d, 8,4)	129,8	7,17 (d, 8,5)	130,3
3'	7,18-7,36 (m)	130,2	7,03 (d, 8,5)	116,1	6,86 (d, 8,7)	114,3	8,22 (d, 8,7)	129,8	7,14 (d, 8,4)	130,2	7,00 (d, 8,5)	127,6
4'	7,18-7,36 (m)	130,2	-	162,8	-	159,6	-	147,9	-	130,2	-	136,0
5'	7,18-7,36 (m)	130,2	7,03 (d, 8,5)	116,1	6,86 (d, 8,7)	114,3	8,22 (d, 8,7)	129,8	7,14 (d, 8,4)	130,2	7,00 (d, 8,5)	127,6
6'	7,18-7,36 (m)	129,8	7,18 (d, 8,5)	129,4	7,12 (d, 8,7)	125,6	7,38 (d, 8,7)	124,0	7,33 (d, 8,4)	129,8	7,17 (d, 8,5)	130,3
1''	-	128,4	-	128,1	-	129,1	-	129,2	-	128,4	-	130,2
2''	7,82 (d, 8,5)	132,1	7,82 (d, 8,5)	132,2	7,82 (d, 8,7)	131,7	7,81 (d, 8,7)	132,2	7,82 (d, 8,4)	132,1	7,82 (d, 8,5)	131,1
3''	7,63 (d, 8,5)	129,0	7,63 (d, 8,5)	131,9	7,63 (d, 8,7)	129,7	7,64 (d, 8,7)	131,3	7,64 (d, 8,4)	129,0	7,63 (d, 8,5)	130,9
4''	-	133,7	-	134,9	-	134,9	-	140,8	-	133,7	-	135,4
5''	7,63 (d, 8,5)	129,0	7,63 (d, 8,5)	131,9	7,63 (d, 8,7)	129,7	7,64 (d, 8,7)	131,3	7,64 (d, 8,4)	129,0	7,63 (d, 8,5)	130,9
6''	7,82 (d, 8,5)	132,1	7,82 (d, 8,5)	132,2	7,82 (d, 8,7)	131,7	7,81 (d, 8,7)	132,2	7,82 (d, 8,4)	132,1	7,82 (d, 8,5)	131,1
					3,78 (s, OCH ₃)	55,4 (OCH ₃)					2,30 (s, CH ₃)	21,0

Tabela I-7 Dados de RMN 1H, 13C (δ -ppm, 300,06 e 75,45MHz, DMSO-d₆) para os compostos **6g-l**

C/H	6g		6h		6i		6j		6k		6l	
	δ_H (mult, J em Hz)	δ_c	δ_H (mult, J em Hz)	δ_c	δ_H (mult, J em Hz)	δ_c	δ_H (mult, J em Hz)	δ_c	δ_H (mult, J em Hz)	δ_c	δ_H (mult, J em Hz)	δ_c
2	-	108,0	-	107,8	-	107,7	-	107,0	-	106,8	-	107,8
4/6	-	168,0	-	167,4	-	167,9	-	167,9	-	167,0	-	167,8
5	-	51,8	-	51,6	-	51,3	-	51,0	-	67,4	-	51,6
7	0,83 (s)	28,4	0,86 (s)	28,3	1,07 (s)	28,4	1,10 (s)	28,0	1,39 (s)	27,7	0,74(s)	28,3
8	1,99 (s)	28,6	2,00 (s)	28,5	2,01 (s)	28,9	1,97 (s)	28,9	1,90 (s)	28,3	1,97 (s)	28,4
9	3,30 (s)	44,9	3,40 (s)	44,4	3,36 (s)	38,0	3,35 (s)	38,7	3,78 (s)	45,9	3,34 (s)	44,9
10	4,01 (s)	48,0	4,02 (s)	47,3	3,99 (s)	46,6	3,95 (s)	46,6	4,03 (s)	49,9	4,02 (s)	47,7
11	-	195,6	-	195,2	-	195,8	-	195,8	-	196,8	-	195,4
1'	-	-	-	-	-	121,0	-	132,2	-	-	-	138,6
2'	7,31 (m)	117,2	8,06 (s)	130,0	-	161,7	-	158,2	7,31 (m)	149,1	7,28 (d, 7,5)	129,8
3'	-	-	-	148,5	7,07-7,36 (m)	116,0	6,88 (d, 7,5)	110,6	8,06 (d, 8,1)	-	8,01 (d, 7,5)	130,1
4'	6,92 -7,07 (m)	115,6	8,21 (dt, 6,9 e 2,1)	129,7	7,07-7,36 (m)	130,5	6,93 (t, 7,5)	122,1	7,77-7,80 (m)	-	-	-
5'	6,92 -7,07 (m)	130,7	7,51-7,59 (m)	123,4	7,07-7,36 (m)	124,7	7,29 (td, 7,5 e 1,8)	120,7	7,88-7,95 (m)	-	8,01 (d, 7,5)	130,1
6'	6,92 -7,07 (m)	126,2	7,51-7,59 (m)	124,9	7,07-7,36 (m)	132,7	7,15 (dd, 7,5 e 1,8)	131,9	7,88-7,95 (m)	-	7,28 (d, 7,5)	129,8
1''	-	-	-	129,2	-	129,7	-	129,6	-	-	-	129,9
2''	7,82 (d, 8,7)	132,4	7,81 (d, 8,4)	132,2	7,81 (d, 8,7)	132,3	7,78 (d, 8,4)	132,0	7,77-7,80 (m)	132,0	7,81 (d, 7,5)	132,2
3''	7,64 (d, 8,7)	130,0	7,64 (d, 8,4)	129,8	7,62 (d, 8,7)	130,0	7,61 (d, 8,4)	129,8	7,65 (d, 7,5)	130,2	7,63 (d, 7,5)	130,3
4''	-	133,4	-	136,3	-	133,9	-	133,9	-	-	-	133,5
5''	7,64 (d, 8,7)	130,0	7,64 (d, 8,4)	129,8	7,62 (d, 8,7)	130,0	7,61 (d, 8,4)	129,8	7,65 (d, 7,5)	130,2	7,63 (d, 7,5)	130,3
6''	7,82 (d, 8,7)	132,4	7,81 (d, 8,4)	132,2	7,81 (d, 8,7)	132,3	7,78 (d, 8,4)	132,0	7,77-7,80 (m)	132,0	7,81 (d, 7,5)	132,2
							3,79 (s, OCH ₃)	55,2 (OCH ₃)			3,92 (s, OCH ₃)	52,3
											C=O	166,5

Tabela I-8 Dados de RMN 1H, 13C (δ -ppm, 300,06 e 75,45MHz, DMSO-d₆) para os compostos **7a-c**

	7a		7b		7c	
C/H	$\bar{\delta}_H$ (mult, J em Hz)	$\bar{\delta}_C$	$\bar{\delta}_H$ (mult, J em Hz)	$\bar{\delta}_C$	$\bar{\delta}_H$ (mult, J em Hz)	$\bar{\delta}_C$
2	-	107,7	-	107,7	-	107,6
4/6	-	168,1	-	168,1	-	168,3
5	-	54,5	-	51,9	-	52,0
7	0,70 (s)	28,9	0,82 (s)	28,3	0,81 (s)	28,3
8	1,96 (s)	29,6	1,99 (s)	28,4	1,99 (s)	28,5
9	3,30 (s)	39,9	3,29 (s)	44,4	3,27 (s)	44,9
10	4,01(s)	43,8	4,05 (s)	47,8	4,04 (s)	47,8
11	-	195,6	-	196,4	-	196,5
1'	-	133,5	-	129,4	-	134,1
2'	7,19-7,21 (m)	129,8	7,15-7,21 (m)	131,9	7,12 (d, 8,7)	131,3
3'	7,32-7,34 (m)	130,2	6,99-7,07 (m)	115,9	6,86 (d, 8,7)	114,3
4'	7,32-7,34 (m)	130,2	-	162,8	-	159,6
5'	7,32-7,34 (m)	130,2	6,99-7,07 (m)	115,9	6,86 (d, 8,7)	114,3
6'	7,19-7,21 (m)	129,8	7,15-7,21 (m)	131,9	7,12 (d, 8,7)	131,3
1''	-	128,4	-	134,9	-	125,6
2''	7,95 (dd, 7,5 e 1,5)	132,1	7,95 (dd, 7,5 e 1,5)	128,8	7,95 (dd, 7,5 e 1,5)	128,4
3''	7,48 (t, 7,5)	129,0	7,48 (t, 7,5)	128,4	7,47 (t, 7,5)	128,7
4''	7,61 (tt, 7,5 e 1,5)	133,7	7,61 (tt, 7,5 e 1,5)	134,2	7,60 (tt, 7,5 e 1,5)	134,9
5''	7,48 (t, 7,5)	129,0	7,48 (t, 7,5)	128,4	7,47 (t, 7,5)	128,7
6''	7,95 (dd, 7,5 e 1,5)	132,1	7,95 (dd, 7,5 e 1,5)	128,8	7,95 (dd, 7,5 e 1,5)	128,4
					3,78 (s, OCH ₃)	55,4 (OCH ₃)

Figura I-17: Espectro de RMN ¹H (300MHz, CDCl₃) do composto 6a.

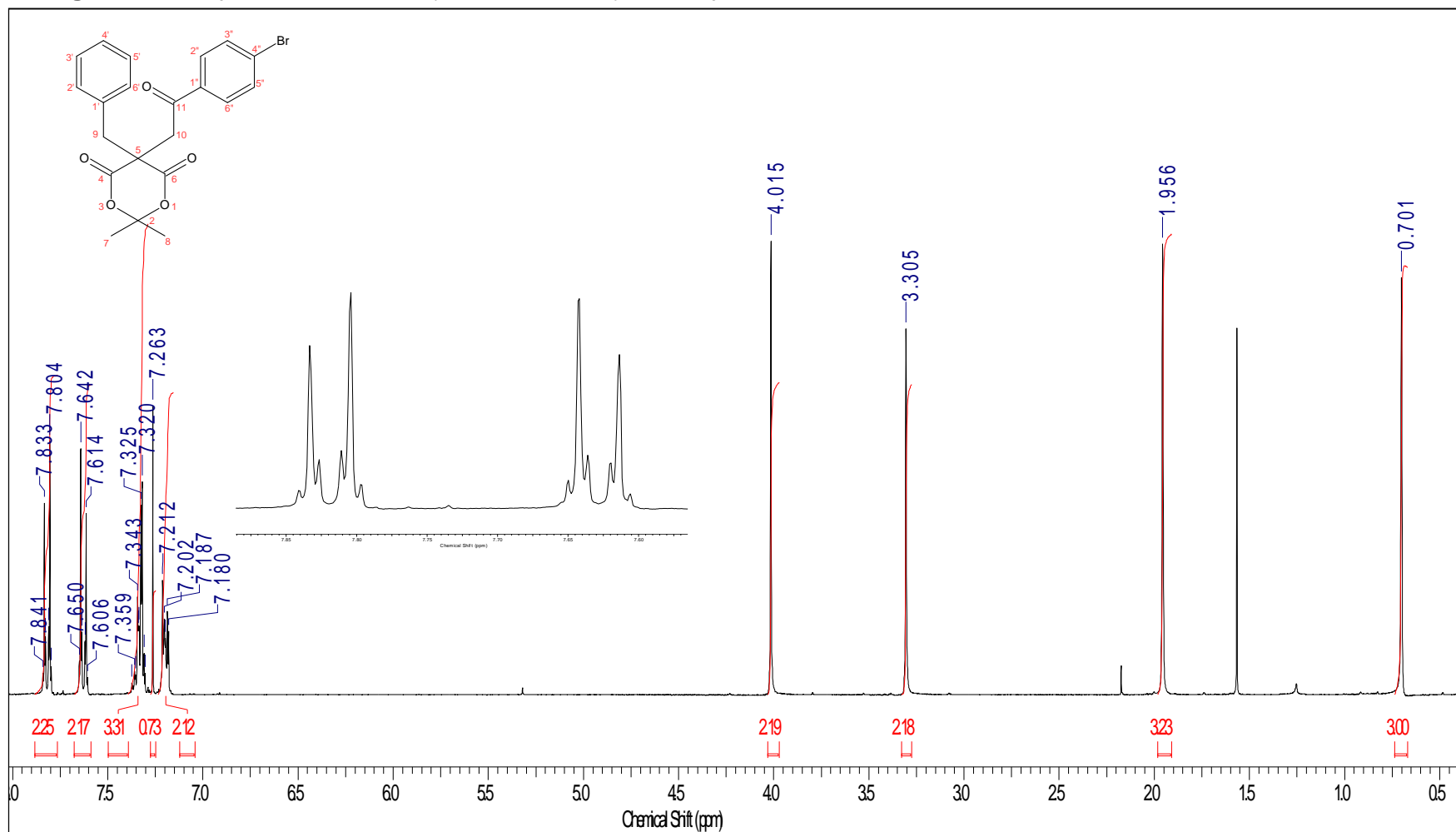


Figura I-18: Espectro de RMN ^{13}C (75,46 MHz, CDCl_3) do composto **6a**

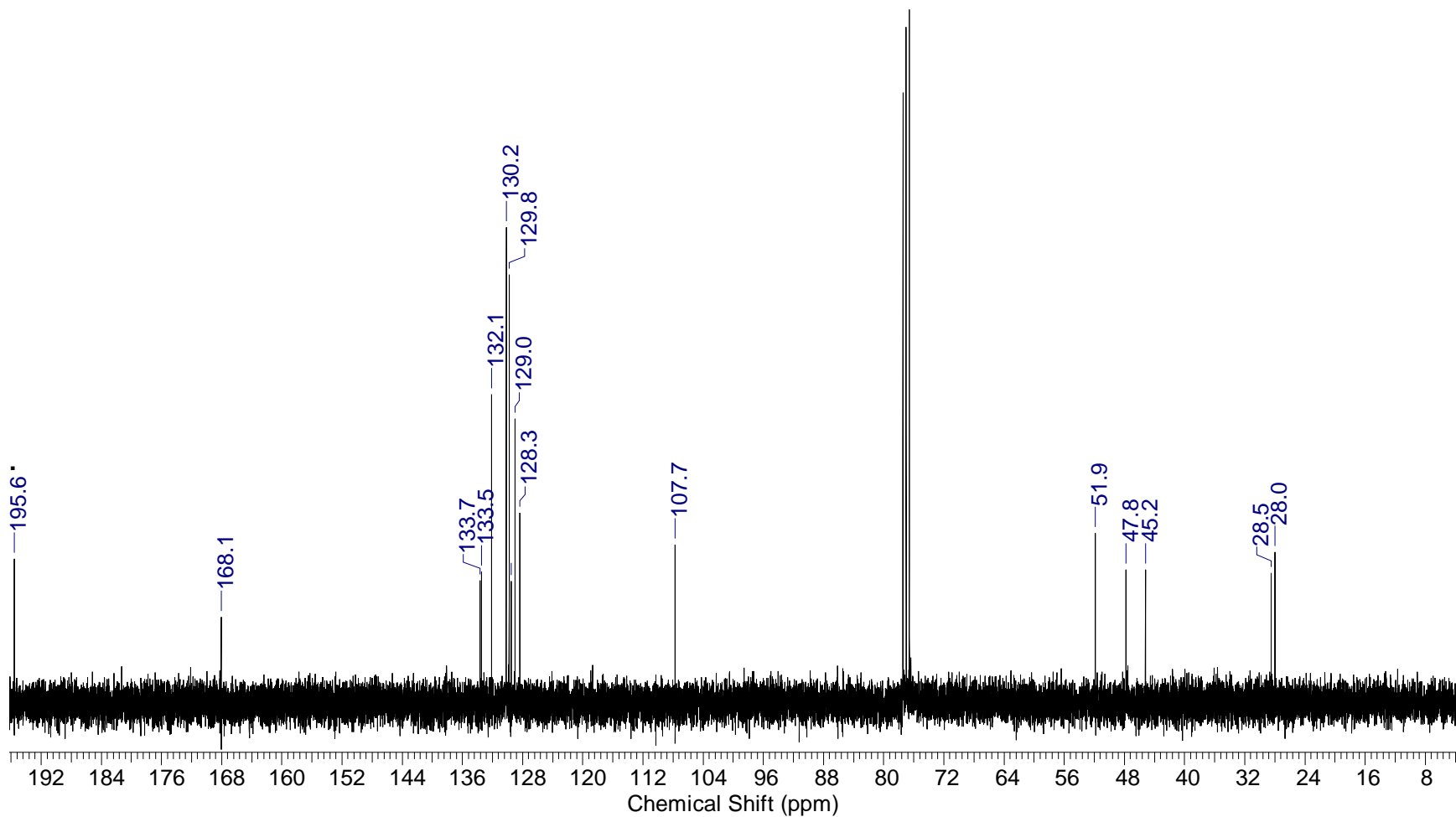
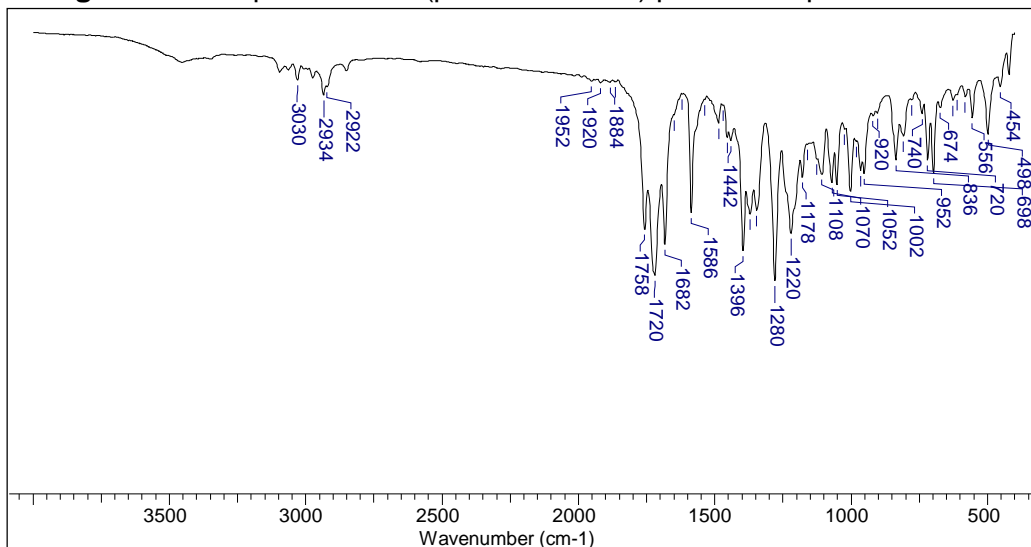
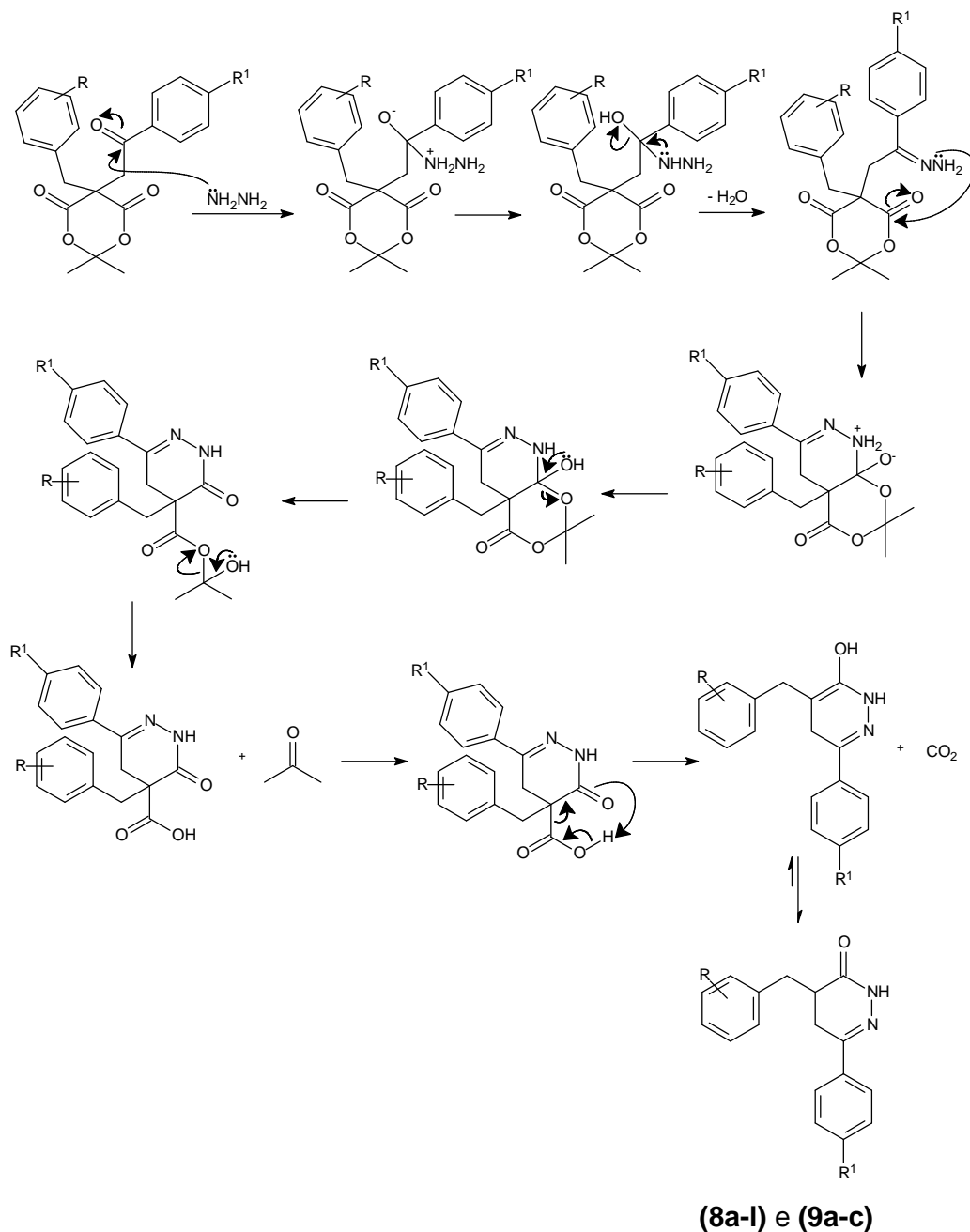


Figura I-19: Espectro de IV (pastilha de KBr) para o composto **6a**.



A reação dos derivados dialquilados (**6a-l**) e (**7a-c**) com hidrato de hidrazina em DMF, em temperatura ambiente por 24 horas, levou à formação das diidropiridazinonas (**8a-l**) e (**9a-c**). Esta reação ocorre pelo ataque da hidrazina no carbono carbonílico da cetona levando a hidrazona correspondente, a qual sofre ciclização do tipo 6-exo-trig através de um ataque nucleofílico intramolecular do nitrogênio da hidrazona a carbonila do ácido de Meldrum, seguido de eliminação de cetona e CO₂. O mecanismo está apresentado no **Esquema I-14**.

Esquema I-14 Mecanismo para formação das diidropiridazinonas **8a-l** e **9a-c**.



Os derivados **8m**, **8n** e **8o** foram obtidos a partir de reações de substituição nucleofílica na carbonila do grupo éster do derivado **8l** (**Esquema I-10**).

A formação dos derivados diidropiridazinônicos obtidos (**8a-o**) e (**9a-c**) foi confirmada pelos dados espectroscópicos de RMN de ^1H e ^{13}C e Infra-

vermelho (IV).

Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C apresentaram similaridade para todos os derivados diidropiridazinônicos (**Figuras 1-A a 32-A**) e as atribuições dos deslocamentos químicos estão apresentadas nas **Tabelas I-9, I-10 e I-11**.

Como exemplo, discutiremos os dados espectroscópicos do derivado **8a**. No espectro de RMN de ^1H do derivado **8a** (**Figura I-20**) observou-se multipletos em δ 2,55-2,70 e em δ 2,76-2,90 referentes aos hidrogênios H5 e aos hidrogênios benzílicos H7, respectivamente, duplo duplete em δ 3,10 ($J=4,5$ e $13,2$ Hz) atribuído ao H4 e um simpleto largo em δ 11,09, correspondente ao hidrogênio ligado ao átomo de nitrogênio. No espectro de RMN de ^{13}C para o derivado **8a** (**Figura I-21**) podemos destacar o sinal em δ 168,8, referente à carbonila (C3). Já no espectro de IV (**Figura-22**) ressaltamos as bandas de estiramento 3204 e 1668 cm^{-1} referentes a N-H e C=O, respectivamente.

Para a série de derivados **9a-c** que não apresentam bromo em R^1 , a principal diferença nos espectro de RMN de ^1H são os sinais correspondentes ao sistema aromático ligado à posição-6 do anel diidropiridazinônico, para estes compostos foi observado dois multipletos correspondentes aos hidrogênios $\text{H}2''/\text{H}6''$ na região de δ 7,60-7,64 e $\text{H}3''/\text{H}4''/\text{H}5''$ na região de δ 7,36-7,41, já para os derivados **8a-o** (com substituinte Br em R^1) apenas um multiplete foi observado na região de δ 7,19-7,59 correspondente aos hidrogênios $\text{H}2''/\text{H}3''/\text{H}5''/\text{H}6''$.

Tabela I-9 Dados de RMN ¹H, ¹³C (δ-ppm, 300,0/500,0* e 75,45/125,76*MHz, DMSO-d₆) para os compostos **8a-8f**.

	8a		8b*		8c*		8d		8e		8f	
C/H	δ _H (mult, J em Hz)	δ _C	δ _H (mult, J em Hz)	δ _C	δ _H (mult, J em Hz)	δ _C	δ _H (mult, J em Hz)	δ _C	δ _H (mult, J em Hz)	δ _C	δ _H (mult, J em Hz)	δ _C
3	-	168,8	-	169,2	-	169,4	-	168,3	-	168,5	-	168,8
4	2,55-2,90 (m)	36,4	2,77-2,83 (m)	36,8	2,71-2,77	37,1	2,55-2,94 (m)	35,8	2,55-2,91 (m)	36,1	2,55-2,90 (m)	36,1
5	2,55-2,90 (m)	26,1	2,56 (dd, 10,5 e 16,5); 2,88 (dd, 6,5 e 16,5)	26,6	2,55 (dd, 10,5 e 17,0); 2,86 (dd, 6,5 e 16,7)	26,5	2,55-2,94 (m)	26,3	2,55-2,91 (m)	26,0	2,55-2,90 (m)	26,5
6	-	148,2	-	148,8	-	149,3	-	-	-	-	-	149,9
7	2,55-2,90 (m) 3,10 (dd, 4.5 e 13.2)	34,7	2,71 (dd, 8,0 e 14,0); 3,07 (dd, 5,0 e 14,0)	34,3	2,63 (dd, 5,7 e 6,0); 3,01 (dd, 4,5 e 13,2)	34,3	2,55-2,94 (m) 3,21 (dd, 4.5 e 13.2)	34,4	2,55-2,91 (m) 3,08 (dd, 4.5 e 13.2)	33,8	2,55-2,90 (m) 3,01 (dd, 4.5 e 13.2)	32,3
1'	-	138,4	-	135,3 (d, 75,5)	-	-	-	147,2	-	130,9	2,83-2,90 (m)	No
2'	7,20-7,28 (m)	129,2	7,08-7,11 (m)	115,4 (d, 12,5)	7,12 (d, 8,5)	131,9	7,52 (d, 8,7)	131,4	7,34 (d, 8,4)	131,4	8,16 (d, 9,0)	131,9
3'	7,20-7,28 (m)	128,3	7,24-7,27 (m)	131,7 (d, 50,0)	6,84 (d, 8,5)	114,2	8,13 (d, 8,7)	123,2	7,26 (d, 8,4)	127,4	7,55 (d, 9,0)	114,2
4'	7,20-7,28 (m)	126,4	-	161,4 (d, 237,5)	-	158,3	-	146,1	-	130,9	-	157,7
5'	7,20-7,28 (m)	128,3	7,24-7,27 (m)	131,7 (d, 50,0)	6,84 (d, 8,5)	114,2	8,13 (d, 8,7)	123,2	7,26 (d, 8,4)	127,4	7,55 (d, 9,0)	114,2
6'	7,20-7,28 (m)	129,2	7,08-7,11 (m)	115,4 (d, 12,5)	7,12 (d, 8,5)	131,9	7,52 (d, 8,7)	131,4	7,34 (d, 8,4)	131,4	8,16 (d, 9,0)	131,9
1''	-	135,2	-	135,3	-	135,7	-	135,0	-	135,0	-	135,7
2''	7,54-7,62 (m)	131,5	7,56-7,61 (m)	131,7	7,56-7,61 (m)	130,6	7,57 (m)	130,4	7,59 (m)	130,9	7,56-7,61 (m)	130,6
3''	7,54-7,62 (m)	127,5	7,56-7,61 (m)	128,0	7,56-7,61 (m)	128,0	7,57 (m)	127,5	7,59 (m)	128,1	7,56-7,61 (m)	127,5
4''	-	122,7	-	123,1	-	123,1	-	122,6	-	122,6	-	123,7
5''	7,54-7,62 (m)	127,5	7,56-7,61 (m)	128,0	7,56-7,61 (m)	128,0	7,57 (m)	127,5	7,59 (m)	128,1	7,56-7,61 (m)	127,5
6''	7,54-7,62 (m)	131,5	7,56-7,61 (m)	131,7	7,56-7,61 (m)	130,6	7,57 (m)	130,4	7,59 (m)	130,9	7,56-7,61 (m)	130,6
NH	11,09	-	11,10 (s)	-	11,06	-	11,11	-	11,11	-	11,14	-
					3,78 (s, OCH ₃)	55,4 (OCH ₃)					2,24 (s, CH ₃)	21,00 (CH ₃)

Tabela I- 10 Dados de RMN ¹H, ¹³C (δ-ppm, 300,06 e 75,45MHz, DMSO-d₆) para os compostos **8g-8l**.

C/H	8g		8h		8i		8j		8k		8l	
	δ _H (mult, J em Hz)	δ _C	δ _H (mult, J em Hz)	δ _C	δ _H (mult, J em Hz)	δ _C	δ _H (mult, J em Hz)	δ _C	δ _H (mult, J em Hz)	δ _C	δ _H (mult, J em Hz)	δ _C
3	-	168,5	-	168,4	-	168,4	-	168,4	-	168,4	-	168,6
4	2,56-2,93 (m)	35,9	2,58-2,98 (m)	36,0	2,62-2,92 (m)	35,7	2,54-2,80 (m)	35,6	2,54-2,80 (m)	35,6	2,55-2,91 (m)	36,1
5	2,56-2,93 (m)	26,1	2,58-2,98 (m)	26,1	2,62-2,92 (m)	27,2	2,54-2,80 (m)	26,0	2,54-2,80 (m)	26,0	2,55-2,91 (m)	26,3
6	-	148,2	-	148,4	-	148,4	-	147,9	-	147,9	-	148,4
7	2,56-2,93 (m) 3,09 (dd, 4.5 e 13.2)	34,2	2,63-2,98 (m) 3,21 (dd, 4.5 e 13.2)	34,1	2,62-2,92 (m) 3,15 (dd, 4,0 e 13,6)	33,4	2,54-2,80 (m) 3,04 (dd, 4,5 e 13,2)	29,5	2,54-2,80 (m) 3,04 (dd, 4,5 e 13,2)	29,5	2,55-2,91 (m) 3,18 (dd, 4,5 e 13,2)	34,7
1'	-	141,3 (d, 7,2)	-	136,0	-	131,7	-	130,1	-	130,1	-	129,2
2'	7,04-7,08 (m)	115,7 (d, 21,0)	8,13 (t, 1,8)	129,5	-	160,7 (d, 241,0)	-	157,1	-	157,1	7,39 (d, 8,1)	122,7
3'	-	162,0 (d, 243,5)	-	147,6	7,26 (dd, 1,8 e 7,2)	115,2 (d, 22,6)	6,90 (d, 7,8)	110,5	6,90 (d, 7,8)	110,5	7,88 (d, 8,1)	131,5
4'	7,04-7,08 (m)	113,0 (d, 20,4)	8,09 (ddd, 0,9, 1,5 e 8,4)	123,8	7,30 (t, 7,2)	128,5	7,19 (ddd, 1,5, 7,2 e 9,9)	122,4	6,83 (td, 1,2 e 7,4)	122,4	-	144,5
5'	7,04-7,08 (m)	130,0	7,58 (t, 8,1)	121,3	7,10-7,17 (m)	125,2 (d, 15,0)	6,83 (td, 1,2 e 7,4)	120,1	7,19 (td, 1,5 e 7,4)	120,1	7,88 (d, 8,1)	131,5
6'	7,28-7,33 (m)	132,4	7,73 (dt, 1,5 e 7,5)	122,6	7,10-7,17 (m)	124,4	7,06 (dd, 1,5 e 7,6)	127,9	7,06 (dd, 1,5 e 7,6)	127,9	7,39 (d, 8,1)	122,7
1''	-	135,0	-	135,0	-	135,2	-	135,3	-	135,3	-	135,3
2''	7,55-7,62 (m)	131,3	7,59 (m)	131,3	7,59 (m)	131,5	7,49-7,59 (m)	131,3	7,56 (m)	131,3	7,58 (m)	129,6
3''	7,55-7,62 (m)	127,4	7,59 (m)	127,5	7,59 (m)	127,5	7,49-7,59 (m)	127,3	7,56 (m)	127,3	7,58 (m)	127,5
4''	-	149,9	-	140,9	-	-	-	125,8	-	125,8	-	-
5''	7,55-7,62 (m)	127,4	7,59 (m)	127,5	7,59 (m)	127,5	7,49-7,59 (m)	127,3	7,56 (m)	127,3	7,58 (m)	127,5
6''	7,55-7,62 (m)	131,3	7,59 (m)	131,3	7,59 (m)	131,5	7,49-7,59 (m)	131,3	7,56 (m)	131,3	7,58 (m)	129,6
NH	11,10	-	11,10	-	11,12	-	11,12 (s) 3,57 (s, OCH ₃)	- 54,9(OCH ₃)	11,12 (s)	-	11,10 (s) 3,84 (OCH ₃)	166,2 (CO) 52,1 (OCH ₃)

Tabela I-11 Dados de RMN ¹H, ¹³C (δ-ppm, 300,0/500,0 e 75,45/125,76 MHz, DMSO-d₆) para os compostos **8m-8o** e **9a-c**.

C/H	8m		8n		8o		9a*		9b		9c	
	δ _H (mult, J em Hz)	δ _c	δ _H (mult, J em Hz)	δ _c	δ _H (mult, J em Hz)	δ _c	δ _H (mult, J em Hz)	δ _c	δ _H (mult, J em Hz)	δ _c	δ _H (mult, J em Hz)	δ _c
3	-	168,6	-	168,7	-	168,6	-	169,4	-	168,8	-	168,8
4	2,54-2,90 (m)	36,2	2,55-2,91 (m)	36,2	2,56-2,90 (m)	36,1	2,75-2,81 (m)	35,6	2,54-2,90 (m)	36,8	2,55-2,90 (m)	36,5
5	2,54-2,90 (m)	26,3	2,55-2,91 (m)	26,2	2,56-2,90 (m)	26,3	2,57 (dd, 10,5 e 16,5); 2,86 (dd, 6,5 e 16,5)	26,8	2,54-2,90 (m)	26,3	2,55-2,90 (m)	26,3
6	-	148,4	-	148,4	-	148,4	-	149,7	-	149,1	-	149,3
7	2,54-2,90 (m) 3,15(dd, 4,5 e 13,0)	34,7	2,55-2,91 (m) 3,14 (dd, 4,5 e 13,2)	25,1	2,56-2,90 (m) 3,17 (dd, 4,2 e 13,2)	34,7	2,66 (dd, 9,0 e 13,5); 3,11 (dd, 4,5 e 13,2)	31,1	2,54-2,90 (m) 3,17 (dd, 4,2 e 13,2)	33,8	2,55-2,90 (m) 3,03 (dd, 4,2 e 13,2)	33,8
1'	-	129,4	-	129,1	-	127,5	-	139,0	-	136,0	-	No
2'	7,35 (d,8,1)	122,7	7,32 (d, 8,1)	122,7	7,38 (d, 8,4)	129,6	7,26-7,29 (m)	129,6	7,24 (dd, 5,4 e 9,0)	115,0	7,13 (d, 8,7)	130,0
3'	7,85 (d,8,1)		7,34 (d, 8,1)	135,2	7,87 (d, 8,1)	135,1	7,20-7,22 (m)	129,0	7,07 (t, 9,0)	130,0 (d, 7,5)	6,84 (d, 9,0)	113,6
4'	-	147,9	-	144,3	-	144,5	7,20-7,22 (m)	126,8	-	161,0 (d, 241,0)	-	157,7
5'	7,85 (d,8,1)		7,34 (d, 8,1)	135,2	7,87 (d, 8,1)	135,1	7,20-7,22 (m)	129,0	7,07 (t, 9,0)	130,0	6,84 (d, 9,0)	113,6
6'	7,35 (d,8,1)	122,7	7,32 (d, 8,1)	122,7	7,38 (d, 8,4)	129,6	7,26-7,29 (m)	129,6	7,24 (dd, 5,4 e 9,0)	115,0 (d, 15,0)	7,13 (d, 8,7)	130,0
1''	-	135,1	-	135,2	-	127,5	-	136,5	-	134,7	-	135,9
2''	7,58 (m)	131,5	7,58 (m)	131,5	7,58 (m)	135,2	7,60-7,62 (m)	125,9	7,60-7,63 (m)	125,5	7,61-7,64 (m)	125,3
3''	7,58 (m)	127,6	7,58 (m)	127,5	7,58 (m)	127,5	7,37-7,40 (m)	128,8	7,36-7,39 (m)	128,5	7,39-7,41 (m)	128,4
4''	-	125,8	-	127,7	-	-	7,37-7,40 (m)	129,7	7,36-7,39 (m)	129,3	7,39-7,41 (m)	129,2
5''	7,58 (m)	127,6	7,58 (m)	127,5	7,58 (m)	127,9	7,37-7,40 (m)	128,8	7,36-7,39 (m)	128,5	7,39-7,41 (m)	128,4
6''	7,58 (m)	131,5	7,58 (m)	131,5	7,58 (m)	131,5	7,60-7,62 (m)	125,9	7,60-7,63 (m)	125,5	7,61-7,64 (m)	125,3
NH	11,10 (s)	-	2,60 e 10,36 11,10 (s)	-	11,10 (s)	127,5	11,09	-	11,10 (s)	-	11,00 (s)	-
		167,3 (COOH)										

Figura I-20: Espectro de RMN ^1H (300MHz, DMSO- d_6) do composto **8a**.

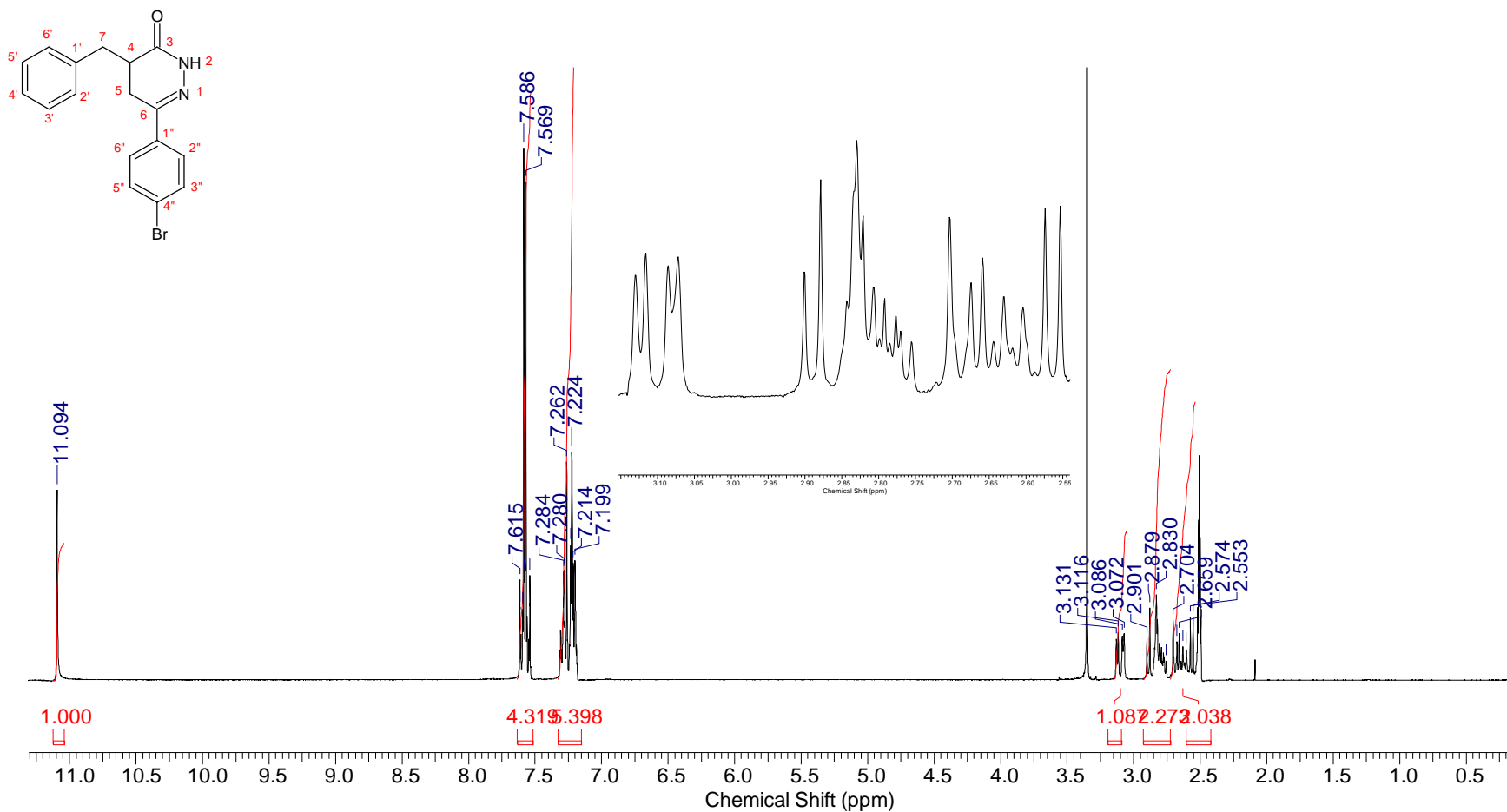


Figura I-21: Espectro de RMN ^{13}C (75,46 MHz, DMSO- d_6) do composto **8a**.

SA79-C13

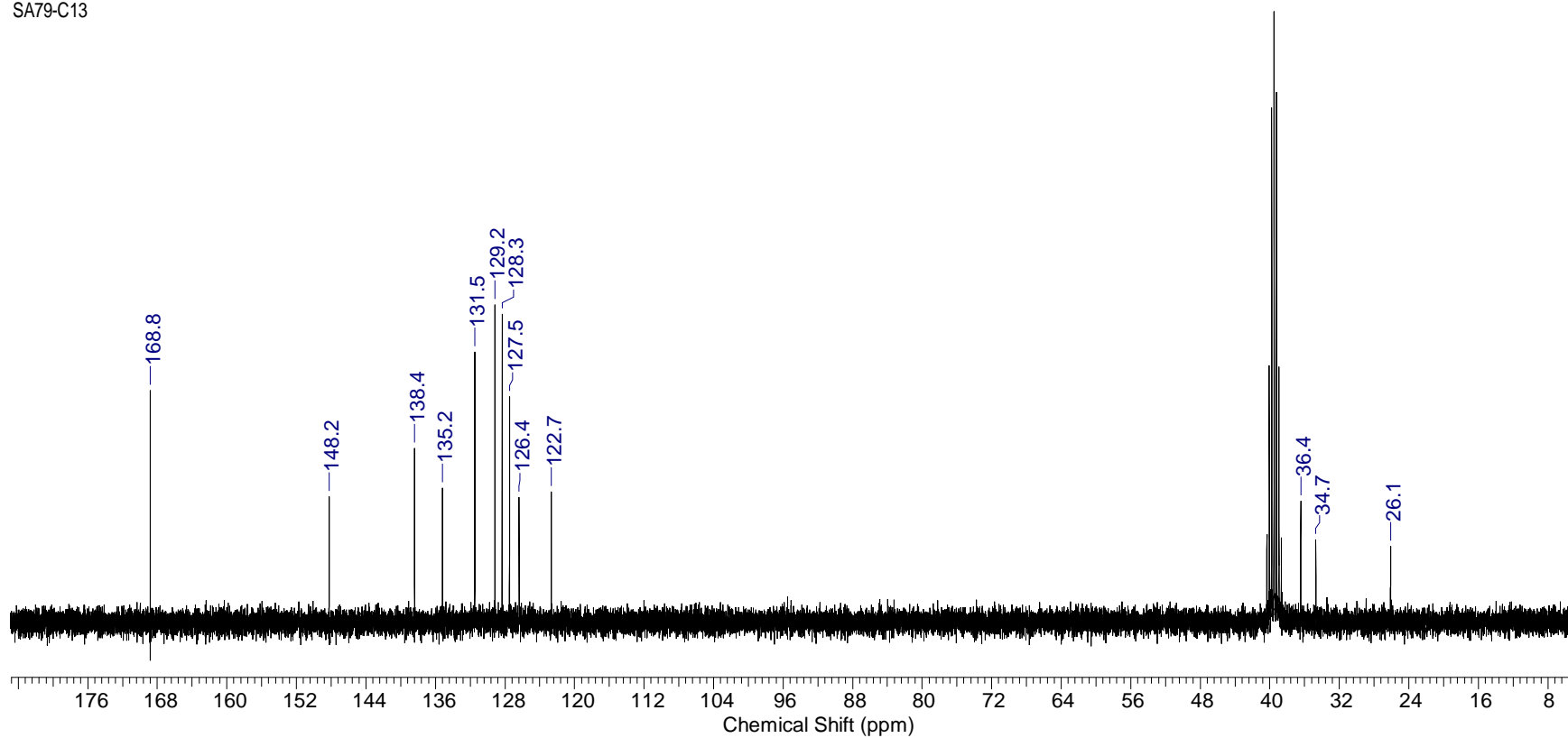
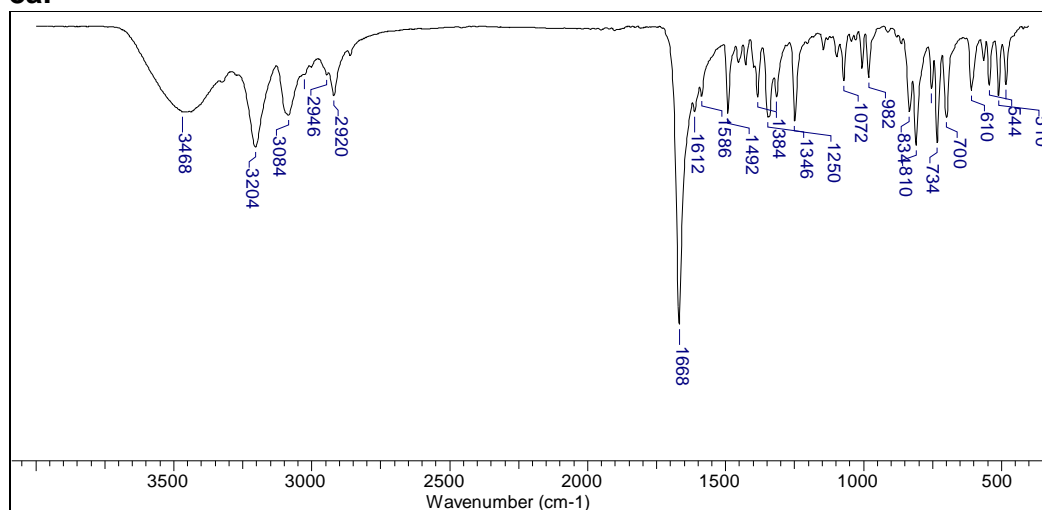


Figura I-22:Espectro de infravermelho pastilha de KBr para o composto **8a**.



1.3.2. Atividade Antiproliferativa

A avaliação da atividade antitumoral foi realizada na divisão de farmacologia e toxicologia do CPQBA (Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas) da Universidade Estadual de Campinas, sob responsabilidade das professoras doutoras Mary Ann Foglio e Ana Lúcia Tasca Gois Ruiz.

As 4,5-diidro-3(2*H*)-piridazinonas sintetizadas (**8a-o** e **9a-c**) foram submetidas à avaliação da atividade antiproliferativa frente a nove linhagens de células tumorais, U251 (glioma); UACC-62 (melanoma); MCF7 (mama); NCI-ADR/RES (ovário resistente a múltiplos fármacos); 786-0 (rim); NCI-H460 (pulmão, tipo não pequenas células); PC-3 (prostata); OVCAR-3 (ovário); HT29 (colorretal) e uma linhagem de células epiteliais humana HaCaT (queratinócitos).

Os dados de atividade antiproliferativa são apresentados na **Tabela I-12**. Considerando a avaliação da atividade antiproliferativa para a série de diidropiridazinonas (**8a-o**) com o grupo 4-bromofenil na posição-6, destacamos o derivado mais ativo **8e**, contendo o grupo 4-clorobenzil ligado ao C-4 do núcleo diidropiridazinônico, com valores de GI₅₀ na faixa de 2,0 a 17,5 μM para as células tumorais testadas. Dentre as células testadas, o

composto **8e** foi mais ativos para células tumorais de câncer de melanoma (UACC-62), rim (786-0) e colorretal (HT29) com valores de GI_{50} = 2,0, 8,3 e 8,3 μ M, respectivamente.

A comparação dos dados de GI_{50} revelaram que a introdução do cloro, na posição-*para* do anel aromático do grupo benzila da 6-(4-bromofenil)-4-(benzil)-4,5-diidro-2H-piridazin-3-ona (**8a**), resultou no derivado ativo (**8e**), mostrando a importância deste substituinte sobre a atividade antiproliferativa da série de derivados sintetizados.

A introdução do grupo nitro, retirador de densidade eletrônica, nas posições *meta* (**8h**) e *para* (**8d**), conferiu alta seletividade para linhagens de células de melanoma (UACC-62), com GI_{50} de 1,3 e 5,7 μ M.

A comparação da atividade antiproliferativa de **8a-c** e **9a-c** revelou que a presença do substituinte 4-bromo no grupo fenil ligado ao C-6 leva ao aumento da atividade, para os compostos **8b** e **8c**, em relação aos compostos **9b** e **9c**. O composto **8a** e **9a** que não apresentam substituinte no grupo benzila da posição-4 foram inativos, porém a ausência do grupo bromo em **9a** tornou este derivado seletivo frente a células de ovário resistente (NCI-ADR/RES) com GI_{50} de 26,7 μ M.

De forma geral, os resultados também indicaram elevada seletividade das diidropiridazinonas contra a linhagem de células de melanoma (UACC-62), em especial para os compostos **8h** e **9b** com valores de GI_{50} de 1,3 e 1,1 μ M, respectivamente, sendo inativos para as demais células.

Tabela I-12. Valores de GI₅₀* (µM) para as diidropiridazinona **8a-o** e **9a-c** frente a linhagens de células tumorais humanas.

			U251	UACC-62	MCF7	NCI/ADR- RES	786-0	NCI- H460	PC-3	OVCAR-3	HT29
8a	H	Br	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
8b	4-F	Br	67,2	nt	37,4	71,0	62,9	>100	73,8	nt	37,2
8c	4-OCH ₃	Br	60,1	nt	11,5	20,9	41,4	28,6	16,7	nt	16,5
8d	4-NO ₂	Br	81,7	5,7	>100	67,8	66,9	>100	68,7	68,1	>100
8e	4-Cl	Br	10,2	2,0	12,5	17,5	8,3	21,9	13,6	10,2	8,3
8g	3-F	Br	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
8h	3-NO ₂	Br	>100	1,3	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
8i	2-F	Br	>100	89,0	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
8j	2-OCH ₃	Br	>100	81,1	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
8k	2-NO ₂	Br	83,4	64,9	86,7	>100	>100	76,5	77,0	80,1	>100
8l	COOCH ₃	Br	>100	nt	>100	>100	>100	>100	>100	nt	>100
8m	COOH	Br	74,2	nt	70,1	73,7	>100	>100	66,8	nt	>100
8n	CONHNH ₂	Br	98,3	nt	85,6	37,6	>100	>100	21,1	nt	>100
8o	CONHOH	Br	>100	nt	>100	>100	>100	>100	>100	nt	>100
9a	H	H	98,8	nt	96,8	26,7	>100	>100	>100	nt	>100
9b	4-F	H	89,9	1,1	87,2	42,0	94,7	87,2	90,6	87,5	97,9
9c	4-OCH ₃	H	94,1	2,2	94,1	92,6	88,1	94,4	93,6	88,3	>100

*Concentração necessária para inibir 50 % do crescimento celular. U251 (glioma); UACC-62 (melanoma); MCF7 (mama); NCI-ADR/RES (ovário resistente a múltiplos fármacos); 786-0 (rím); NCI-H460 (pulmão, tipo não pequenas células); PC-3 (prostata); OVCAR-3 (ovário); HT29 (colorretal);

nt= não testado

1.3.3 Avaliação da interação dos derivados piridazinonas **8a** e **8h** com ctDNA empregando fluorescência molecular e UV-vis

A avaliação da interação das diidropiridazinonas **8a** e **8h** com ctDNA empregando fluorescência molecular e UV-vis foi realizada no Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, sob responsabilidade dos professores doutores Josué C. C. Santos e Isis M. Figueiredo.

Diante da atividade biológica apresentada por essas moléculas, avaliou-se a interação com o ctDNA, a fim de inferir sobre o principal mecanismo de ação das mesmas. Assim, como o composto **8h** apresentou-se mais ativo frente as linhagens de leucemia (K-562) e melanoma (UACC-62), esse foi utilizado como modelo para apresentação dos resultados. Os dados relativos ao composto **8a** constam no anexo.

Por apresentarem fluorescência intrínseca, os derivados diidropiridazinonas foram titulados com o ctDNA (**Figura I-23**) onde observou-se que, ao adicionar incrementos crescentes da macromolécula houve uma diminuição gradual no sinal analítico, indicando que está ocorrendo formação de um complexo supramolecular ctDNA-ligante (SIRAJUDDIN et al., 2013). Dessa forma, pode-se inferir que o ctDNA atua como uma molécula *quencher*, isto é, ao entrar em contato com o fluoróforo no estado excitado essa espécie o desativa inibindo a emissão de fluorescência (LAKOWICZ, 2006). Assim, segundo Rehman et al. (2015), o efeito quantitativo na presença de agentes supressores é estudado pela equação de Stern-Volmer:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV}[Q] \quad \text{Equação (1)}$$

onde F_0 e F representam as intensidades de fluorescência na ausência e presença de ctDNA, respectivamente; $[Q]$ é a concentração da espécie *quencher* (neste caso, ctDNA) e K_{SV} a constante de Stern-Volmer.

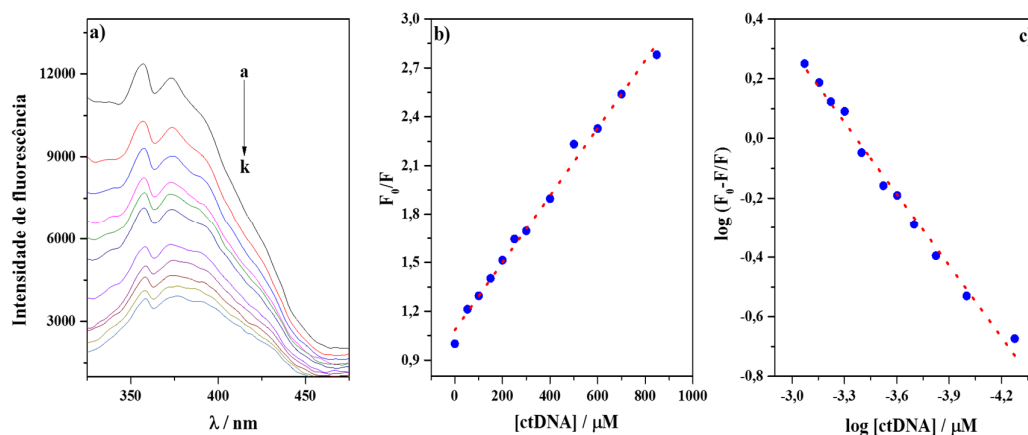
Tendo em vista a variação da intensidade de fluorescência do complexo com o aumento da concentração do DNA, é possível calcular a contante de ligação (K_b) do composto (ligante) com a macromolécula (ctDNA), bem como a

a estequiometria do complexo supramolecular formado (n) (CUI et al., 2012). Esses parâmetros foram calculados de acordo com a seguinte equação:

$$\log \frac{(F_0 - F)}{F} = \log K_b + n \log [Q] \quad \text{Equação (2)}$$

Os valores de K_b e n foram obtidos através da curva $\log[(F_0 - F) / F]$ vs $\log[\text{ctDNA}]$. As **Figuras I-23b e I-23c** apresentam a linearização das equações (1) e (2), respectivamente. O perfil espectral bem como as linearizações para o composto **8a** estão evidenciados na **Figura 82-A**.

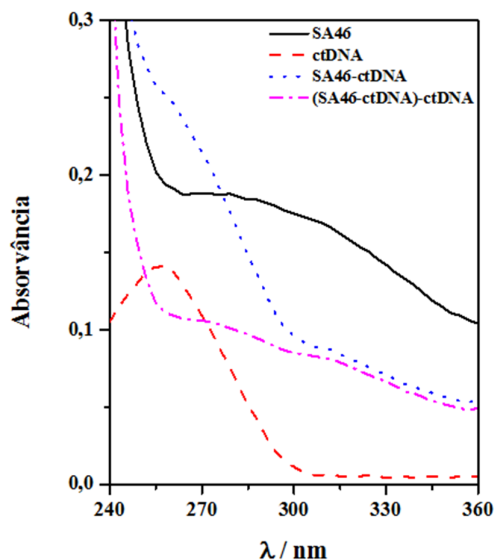
Figura I-23 a) Perfil espectral do composto **8h** (10 μM) com diferentes concentrações de ctDNA (53, 100, 150, 200, 250, 400, 500, 600, 700 e 848 μM , curvas a-k respectivamente); **b)** Gráfico de Stern–Volmer para o composto **8h** (processo de *quenching*); **c)** Curva logarítmica dupla para cálculo da constante de ligação do composto **8h** com o ctDNA. Condição: pH = 7.2 (Tris–HCl 50 mM e 100 mM NaCl) a 30°C.



Segundo Savariz et al. (2014), as mudanças espectrais observadas são um indicativo que está ocorrendo interação entre os compostos e a macromolécula. Entretanto, é fundamental que os ligantes transfiram energia para o ctDNA (SILVA et al., 2016). Assim, de acordo com a **Tabela I-13** pôde ser verificado que os valores de K_{SV} variaram de 2,00 a 2,18 $\times 10^3 \text{ L mol}^{-1}$ (a 30°C), sugerindo que ocorreu transferência de energia, e conseqüentemente que os derivados piridazinonas interagem com o modelo de DNA empregado.

Com base nessas informações, é de suma importância avaliar o mecanismo de *quenching* dominante, uma vez que este parâmetro fornece evidências acerca de interações moleculares (SHAHABADI et al., 2015). Assim, existem vários mecanismos relacionados ao processo de *quenching*, sendo os principais o *quenching* dinâmico (colisional) ou estático, porém em alguns casos, ambos os mecanismos podem ocorrer. Neste sentido, de acordo com Rehman et al. (2015), a avaliação do tipo de *quenching* pode ser realizada a partir do estudo por UV-vis ou por meio de experimentos em diferentes temperaturas, calculando-se os valores das constantes (K_{SV}), o qual será discutido posteriormente. Por UV-vis, avalia-se os espectros de absorção do ctDNA, do ligante livre e do complexo formado, onde se verifica as mudanças que ocorrem na presença e ausência do ctDNA, como mostrado na **Figura I-24**.

Figura I-24. Espectro de absorção do composto 8h(10 μ M), ctDNA (40 μ M) e 8h-ctDNA e (8h-ctDNA) – ctDNA. Condição: pH = 7,2 (Tris-HCl 50 mM com 100 mM NaCl) a 30°C.



Nota-se que ao adicionar ctDNA ao sistema contendo o ligante, ocorre um aumento na absorvância molar bem como um deslocamento para menores comprimentos de onda, caracterizando efeito hipercrômico e hipsocrômico, respectivamente. Esse fator sugere que ocorre interação entre os compostos

avaliados e o ctDNA (SIRAJUDDIN et al., 2013). Além disso, para confirmar ainda mais a ligação entre os derivados piridazinonas e o ctDNA, pôde-se observar na **Figura I-24** que o espectro da diferença do complexo e da macromolécula não é sobreponível ao espectro do composto livre, indicando que o mecanismo de *quenching* preferencial é o estático, visto que foram observadas mudanças nos perfis e na intensidade dos respectivos espectros (SAEIDIFAR et al., 2015). Caso o mecanismo de *quenching* fosse dinâmico não seriam esperadas modificações nos espectros de absorção do UV-vis em relação a diferença. Resultados semelhantes foram observados para o composto 8a (**Figura 83-A**).

Adicionalmente, por meio da titulação espectrofluorimétrica foram avaliados os valores de KSV em diferentes temperaturas. Verifica-se na **Tabela I-13**, que este valor diminui em função do aumento da temperatura para 8h e 8a, o que sugere a ocorrência de *quenching* estático para ambos os compostos, uma vez que desestabiliza o complexo DNA-ligante (GUO et al., 2007). Esses dados confirmam os resultados obtidos por UV-vis.

Tabela I-13. Parâmetros de interação do ctDNA com os compostos **8a** e **8h** em diferentes temperaturas.

Compostos	Temperatura (°C)	Constante Stern-Volmer		Parâmetros de ligação			Parâmetros Termodinâmicos		
		K_{SV} (10^3 L mol^{-1})	r	K_b (10^4 L mol^{-1})	n	r	ΔG (kJ mol^{-1})	ΔH (kJ mol^{-1})	ΔS (J mol^{-1})
8a	22	2,82 ± 0,05	0,9986	30,5 ± 0,1	0,91 ± 0,01	0,9990	-30,59		
	30	2,00 ± 0,05	0,9963	10,6 ± 0,1	0,80 ± 0,02	0,9953	-29,94	-54,67	-81,60
	38	1,92 ± 0,06	0,9950	9,77 ± 0,01	0,80 ± 0,02	0,9947	-29,29		
8h	22	2,34 ± 0,09	0,9947	0,12 ± 0,01	0,86 ± 0,03	0,9947	-17,42		
	30	2,18 ± 0,08	0,9956	0,11 ± 0,01	0,87 ± 0,02	0,9960	-17,58	-11,56	+19,86
	38	2,07 ± 0,09	0,9926	0,094 ± 0,001	0,87 ± 0,01	0,9991	-17,74		

Os valores das constantes de ligação (K_b) obtidos para os ligantes em estudo variaram de 0,11 a $10,6 \times 10^4$ L mol⁻¹ a 30°C (**Tabela I-13**), e desta forma sugere-se uma interação mais forte com a macromolécula para o derivado **8h** quando comparado com o **8a** (SILVA et al., 2016). Esses dados são concordantes com o trabalho proposto por Ahmadi et al. (2011) que estudaram derivados piridazinonas e obtiveram valores de constantes na ordem de 10^4 L mol⁻¹. Além disso, a partir da Tabela 1 verifica-se que o número de sítios de ligação é aproximadamente 1, isto é, a razão estequiométrica ctDNA:ligante é de 1:1.

Adicionalmente, objetivando avaliar as principais forças que regem esse processo de interação, determinou-se os parâmetros termodinâmicos (ΔH e ΔS), por meio da aplicação da equação de Van't Hoff (SHEN et al., 2011), apresentada abaixo:

$$\ln K_b = -\frac{\Delta H}{R} \cdot \left[\frac{1}{T} \right] + \frac{\Delta S}{R} \quad \text{Equação (3)}$$

onde K_b refere-se a constante de ligação, T é a temperatura em Kelvin e R é a constante dos gases ($8,314472$ J K⁻¹ mol⁻¹). Para avaliar a espontaneidade do processo, a partir dos dados de ΔH e ΔS , calculou-se a energia livre de Gibbs de acordo com a equação 4:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad \text{Equação (4)}$$

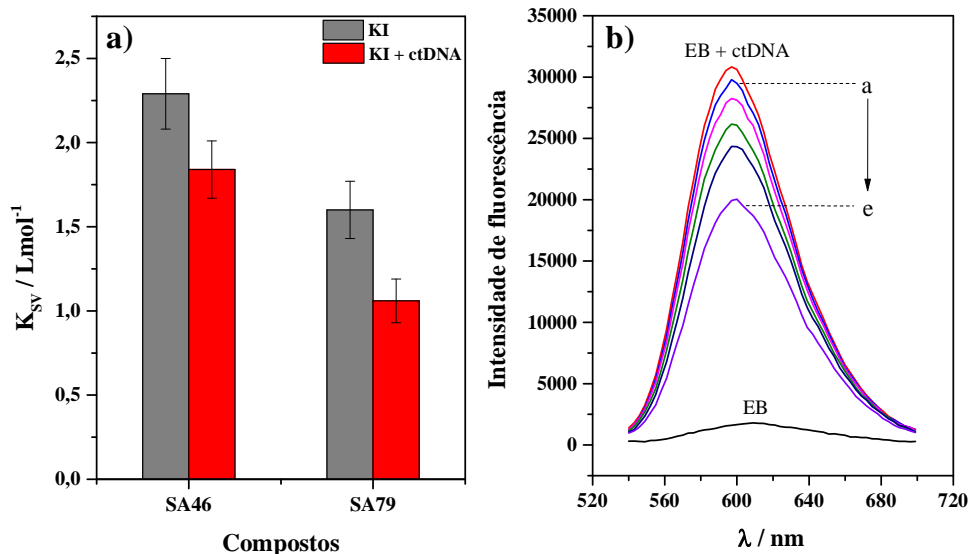
Segundo Yu e et al. (2015), as principais forças de interação entre ligantes e macromoléculas são as ligações de hidrogênio, forças de Van der Waals, interações hidrofóbicas e eletrostáticas. Assim, a partir da variação de entalpia (ΔH) e entropia (ΔS) no processo de interação, a determinação das principais forças segue o critério: (1) quando $\Delta H > 0$ e $\Delta S > 0$, as interações hidrofóbicas desempenham papel fundamental na ligação com o DNA; (2) quando $\Delta H < 0$ e $\Delta S < 0$, tem-se as forças de Van der Waals e ligações de hidrogênio como preferencias e (3) $\Delta H < 0$ e $\Delta S > 0$ as interações eletrostáticas são consideradas as principais forças (QIN et al., 2010).

Nesse contexto, pode-se inferir que as forças de Van der Waals e ligações de hidrogênio são essenciais para a ligação do composto **8h** com o ctDNA; e que as interações eletrostáticas são fundamentais na estabilidade do complexo formado entre o composto **8a** e a macromolécula em estudo. Além disso, verifica-se que todos os valores de ΔG são negativos, indicando que o processo de interação é espontâneo (SHI et al., 2015).

1.3.3.1 Avaliação do modo de ligação ctDNA-ligante

O modo de ligação dos derivados piridazinonas com o ctDNA foi proposto por meio da avaliação do efeito do quenching do KI e ensaios de competição com brometo de etídio (REHMAN et al., 2015). O íon iodeto é considerado uma molécula capaz de promover *quenching* dinâmico em moléculas fluorescentes, entretanto, é de fundamental importância que tais moléculas estejam acessíveis a esta espécie. Desta forma, avalia-se os valores das constantes de Stern-Volmer na ausência e presença de DNA, empregando a equação 1, onde [Q] corresponde a concentração da molécula *quencher*, ou seja, do iodeto de potássio (SAVARIZ et al., 2014). A **Figura I-25** apresenta os resultados para essa avaliação.

Figura I-25 a) Valores de K_{SV} dos compostos **8h** e **8a** (5,0 μM) por meio do quenching do KI na ausência e presença de ctDNA (50 μM). **b)** Decréscimo da intensidade de fluorescência do sistema BE-DNA por competição do composto **8h** (50, 100, 150, 200 e 275 μM, curvas a-e, respectivamente).



De acordo com a **Figura I-25a**, pôde-se observar que os valores de K_{SV} para os derivados **8h** e **8a** na presença do DNA foram sistematicamente menores que na ausência da macromolécula, indicando que o íon iodeto não conseguiu ter acesso à macromolécula, isto é, que os ligantes estavam protegidos entre os pares de bases, sugerindo como principal modo de ligação a intercalação (SHAHABADI et al., 2015).

Para confirmar esses resultados, realizou-se o ensaio de competição com o brometo de etídio, que de acordo com a literatura é um intercalante clássico que quando livre apresenta baixa fluorescência, porém quando ligado ao DNA seu sinal analítico aumenta consideravelmente (KABIR; KUMAR, 2014).

Através dos resultados da **Figura I-25b**, nota-se que ao adicionar quantidades crescentes do composto **8h** ocorreu redução gradual da fluorescência de 34,8% e 27,9 % para o **8a** (**Figura 84-A**), empregando um excesso de 27,5 vezes do ligante, indicando que os compostos competem pelo mesmo local de ligação do brometo de etídio, ou seja, deslocam a sonda

da macromolécula (DE et al., 2014). Esse resultado propõe a intercalação como modo de ligação preponderante destes compostos com o ctDNA, confirmando os dados obtidos pelo ensaio do KI. Vale ressaltar que já foi reportado na literatura que derivados piridazinonas, interagem também via intercalação (AHMADI et al., 2011; MEHD et al., 2009; BARLOCO et al., 1996), o que reforça a proposta sugerida nesse trabalho.

*1-3.4 Estudo do efeito das diidropiridazinonas **8a-e**, **8g-l**, **8n** e **8o** sobre o metabolismo hepático.*

A avaliação do efeito das diidropiridazinonas **8a-e**, **8g-l**, **8n** e **8o** sobre o metabolismo hepático foi realizada no Laboratório de Fisiologia do Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual de Maringá sob responsabilidade da professora doutora Vilma A. Ferreira de Godoi.

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Maringá (CEUA/UEM) em reunião de 05/02/2016, aprovou o projeto intitulado "Efeito das piridazinonas sobre os parâmetros hepáticos relacionados ao metabolismo energético do fígado de ratos Wistar não diabéticos e diabéticos tipo 1", protocolado sob o CEUA no 6420130116, sob a responsabilidade de Vilma Aparecida Ferreira de Godoi e equipe; por envolver a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA).

*1-3.4.1 Obtenção das micelas copoliméricas das diidropiridazinonas **8a-e**, **8g-l**, **8n** e **8o**.*

As diidropiridazinonas apresentam estrutura hidrofóbica. Por um lado, compostos hidrofóbicos oferecem maior interação com membranas celulares (PEETLA et al, 2009), por outro, em meio aquoso, estas espécies tendem a formar auto-agregados que podem provocar dor no ato da administração intravenosa ou ainda morte devido a obstrução de artérias por precipitados (SIMPLÍCIO et al, 2002). Para contornar os problemas de solubilidade,

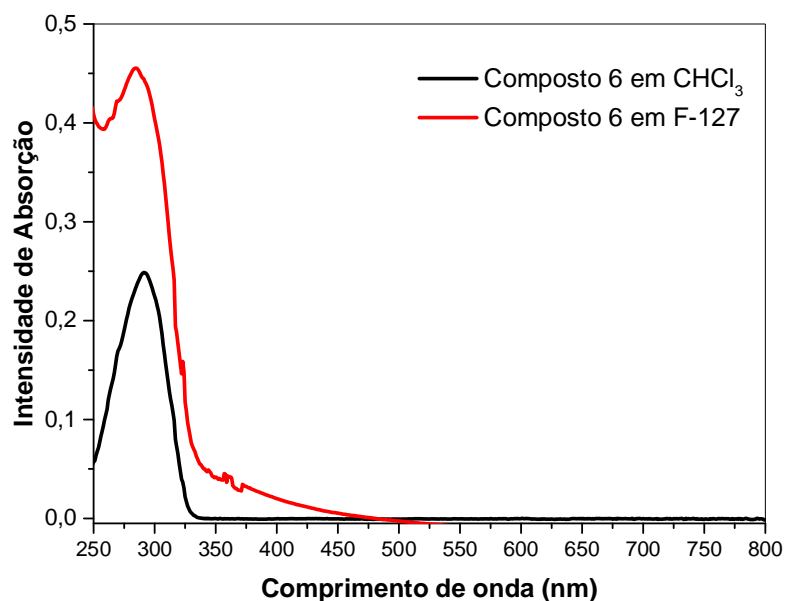
utilizou-se como sistema de formulação micelas copoliméricas da classe dos pluronics F-127 (CORNELUS e NOSTRUM, 2004). Para todos os derivados foi realizado a preparação de formulado com o copolímero F-127, e efetuada análise em espectro de absorção a fim de observar a incorporação nos copolímeros micelares.

A incorporação dos compostos **8a-e**, **8g-l**, **8n** e **8o** ($1,25 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$) no copolímero micelar F-127 (1% m/v; $2,4 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$) foi realizada pelo método de dispersão sólida (ZHANG et al, 1996), que consiste na co-solubilização do fármaco e do copolímero em um solvente de comum solubilidade (clorofórmio). A evaporação do solvente em evaporador rotativo permite a obtenção de uma matriz sólida, que após ser mantida por 12 horas em dessecador é hidratada com solução tamponante Krebs/Henseleit-bicarbonato, a 70°C, sob agitação vigorosa até total solubilização. O mesmo procedimento foi realizado sem a adição do fármaco, para se obter a referência (ou branco) nas medidas. Os formulados obtidos foram caracterizados por absorção eletrônica na região do UV-Vis e submetidos aos ensaios com hepatócitos e perfusão em fígado.

Os espectros de absorção apresentaram perfil semelhante, como exemplo a **Figura I-26** apresenta o perfil espectral do composto **8g** em clorofórmio e incorporada nos copolímeros micelares.

O espectro de absorção eletrônica do composto **8g** (**Figura I-26**) apresentou bandas na região compreendida entre 250 a 350 nm em CHCl_3 e em F-127. A efetivação da formação das micelas copoliméricas, resultando na maior disponibilidade do composto **8g** em solução aquosa, foi refletivo devido as baixas intensidades de absorção observadas em clorofórmio.

Figura I-26 Espectro de absorção do composto **8g** (composto 6) em clorofórmio e incorporada nos copolímeros micelares.



Em termos de constituição, as micelas poliméricas são formadas por um núcleo hidrofóbico, composto por segmentos de óxido de propileno (OP) que pode facilitar a solubilização de fármacos lipofílicos, envolto por uma camada exterior hidrofílica de grupos óxido de etileno (OE) (CORNELUS E NOSTRUM, 2004). A utilização de polímeros coloidais como biotransportadores de fármacos tem sido extensivamente estudada devido a algumas características específicas, como: *i*) tamanho das nanoesferas formadas (10-100nm), *ii*) longa circulação, sendo dificilmente reconhecidos e internalizados pelo sistema retículo endotelial, *iii*) capacidade de solubilizar drogas hidrofóbicas (LIU *et al*, 2008), *iv*) maior interação com as células com resistência a múltiplos fármacos (RMD), *v*) internalizados pelas células doentes exercem influência sobre a mitocôndria, causando a redução na produção de ATP e consumo de oxigênio e *vii*) Inibe a Glicoproteína-P, responsável pelo efluxo de drogas, permitindo maior acumulação do fármaco no meio intracelular (KABANOV *et al*, 2002).

1.3.4.2 Influência das diidropiridazinonas **8a-e**, **8g-l**, **8n** e **8o** no metabolismo hepático.

Existe uma associação entre o desenvolvimento e progressão de Diabetes *Mellitus* tipo 1 (DM1) e de suas complicações crônicas com o excesso de radicais livres, resultando em um quadro grande de estresse oxidativo por redução da capacidade antioxidante dos tecidos. A hiperglicemia (consequência da DM1) satura a via glicolítica, e a glicose é redirecionada para via do poliol, catalisada pela enzima aldose-redutase, que converte glicose em sorbitol. A atividade patofisiológica da aldose-redutase e da via do poliol desempenha papel chave no desenvolvimento de complicações diabéticas sistêmicas tais como vasculopatias e neuropatias.

O fígado é principal órgão controlador da glicemia e o mais afetado pela hiperglicemia. A avaliação da liberação de glicose, glicogenólise, glicólise e potencial redutor citoplasmático, pode ser realizada através de metodologias específicas (modelos em animais alimentados) que observam o fluxo destes substratos e o potencial redox em hepatócitos (células do fígado) e no fígado.

As técnicas de isolamento dos hepatócitos e de perfusão de fígado *in situ* permitem avaliar o comportamento metabólico das células individualmente e do órgão como um todo. Isto é importante porque células isoladas nos oferece parâmetros celulares que, apesar de importantes, podem sofrer processos de compensações metabólicas e serem modificadas quando a arquitetura do órgão é mantida. Como do ponto de vista do desenvolvimento de fármacos ambos são importantes, ambos foram utilizados nesta avaliação.

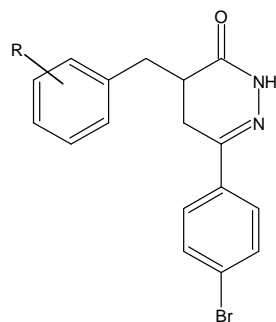
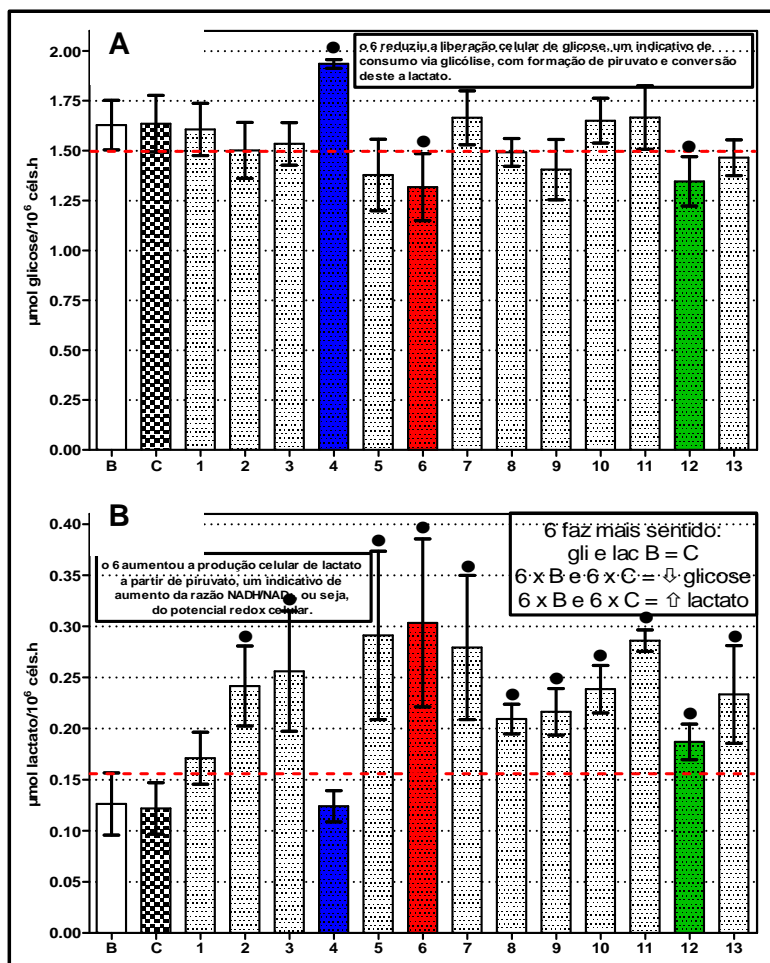
Foram utilizados nestes experimentos ratos machos Wistar não diabéticos e alimentados (obtidos do Biotério Central da UEM, mediante aprovação pelo comitê de ética CEUA/UEM) como ponto de partida para a avaliação dos efeitos dos diferentes tipos de diidropiridazinonas no metabolismo hepático da glicose. Essas avaliações podem apontar possibilidades de emprego em modelos animais diabéticos, metabolicamente descompensados e hiperglicêmicos.

Esses animais apresentam estoque completo de glicogênio hepático. Durante o processo de experimentação, as células e/ou o órgão são expostos a condições extracelulares de zero glicose, o que resulta na facilitação da degradação do glicogênio intracelular e direcionamento da glicose para a liberação para o meio extracelular ou para a glicólise intracelular. A glicólise

gera NADH a partir da redução do NAD⁺, elevando a razão NADH/NAD⁺; na sequência, o piruvato resultante pode ser direcionado para a mitocôndria e CAT ou ser reduzido a lactato consumindo o NADH produzido no processo. Ao medirmos a glicose, piruvato e lactato liberados pelas células e/ou órgão, é possível inferir se uma determinada molécula está atuando nesses processos e no potencial redox celular. Especificamente neste caso, a redução da razão NADH/NAD⁺, o aumento no fluxo glicolítico e na formação de lactato podem ser indícios de que a AR estaria *down-regulated*.

A técnica de hepatócitos isolados foi utilizada para avaliar esse potencial nas diidropiridazinonas **8a-e**, **8g-l**, **8n** e **8o** e determinar uma molécula de escolha para se testar no fígado íntegro (**Figura I-27**). Os experimentos com células isoladas nos mostraram que células isoladas incubadas sem precursores e células isoladas incubadas com a F-127 vazia apresentaram resultados semelhantes para glicose (**Figura I-27A**) e lactato (**Figura I-27B**), ou seja, em células isoladas a F-127 não altera o metabolismo celular avaliado. Os derivados de diidropiridazinonas testados apresentaram resultados relevantes para os compostos **8d**, **8g** e **8n** (**Figura I-27**).

Figura I-27 Produção de glicose (2A) e lactato (2B) por hepatócitos isolados ($\mu\text{mol}/10^6$ céls.h) de ratos Wistar NDM1 alimentados. As piridazinonas numeradas de 1 a 13, o F-127 (C) e o controle (B, somente céls) encontram-se representados na figura. As barras coloridas representam as piridazinonas que apresentaram o melhor resultado metabólico. Dados expressos como média \pm dp, n=8, ANOVA one-way, ●p<0,05 vs B e C.



	R		R
1	8a H	8	8i 2-F
2	8b 4-F	9	8j 2-OCH ₃
3	8c 4-OCH ₃	10	8k 2-NO ₂
4	8d 4-NO ₂	11	8l COOCH ₃
5	8e 4-Cl	12	8n CONHNH ₂
6	8g 3-F	13	8o CONHOH
7	8h 3-NO ₂		

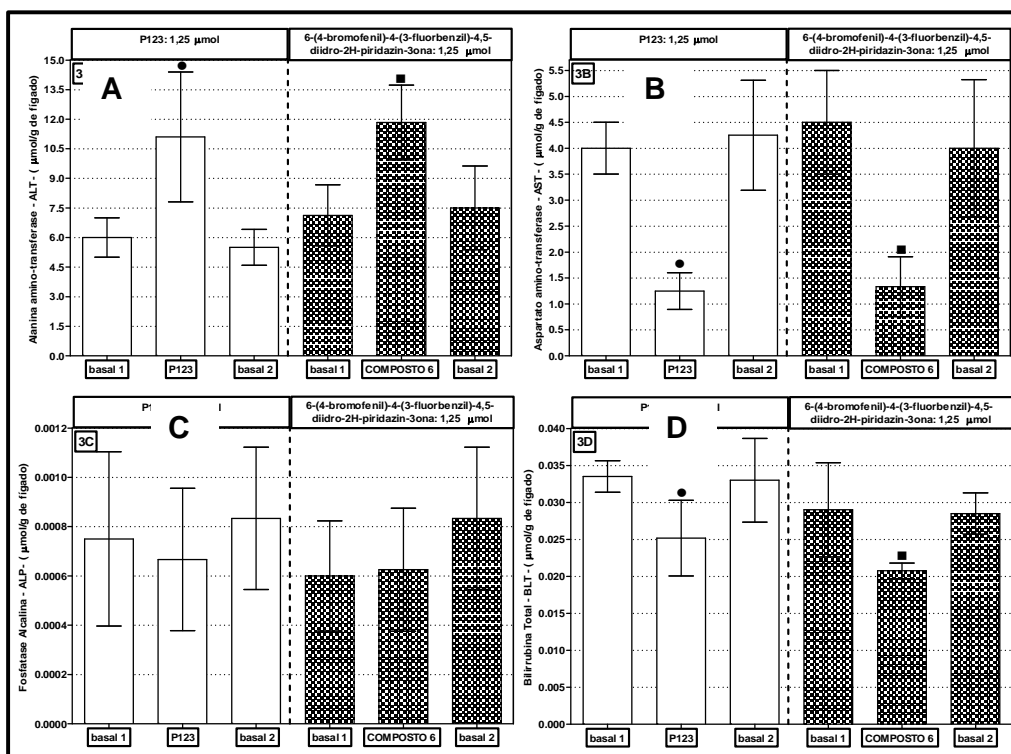
O derivado **8d** (grupo 4-NO₂ em R) promoveu aumento na liberação hepática de glicose (**Figura I-27A**) e possivelmente redução da glicólise já

que a formação de lactato (**Figura I-27B**) não foi alterada a partir do controle. Esse fator pode ser indesejável dentro da proposta deste estudo, pois parece antagonizar o efeito desejável que seria de inibir a aldose-redutase (AR). Ou seja, a AR altera o potencial redox celular e inibe a glicólise, e o desejável seria encontrar um composto que ao inibi-la tivesse efeito contrário. As moléculas **8g** (3-NO₂ em R) e **8n** (4-CONH₂ em R) apresentaram resultados similares, reduzem a liberação hepática de glicose, aumentam o consumo de glicose via glicólise com a formação de lactato, indicando ativação do fluxo glicolítico e reciclagem do NADH formado no processo. Dessa forma, ambas poderiam estar exercendo essa função por reduzir a atividade da AR, restabelecendo o estoque de NAD⁺ e permitindo que glicólise e formação de lactato possam acontecer. Como o efeito da molécula **8g** foi mais intenso que o da molécula **8n**, o derivado **8g** foi a molécula de escolha para os próximos experimentos de perfusão hepática.

Para avaliação da citotoxicidade do composto **8g** no fígado pode ser observado os resultados dos indicadores de lesão hepática. O aumento da concentração das enzimas fosfatase alcalina, alanina amino-transferase, aspartato amino-transferase e bilirrubina total podem indicar dano sensível ao fígado.

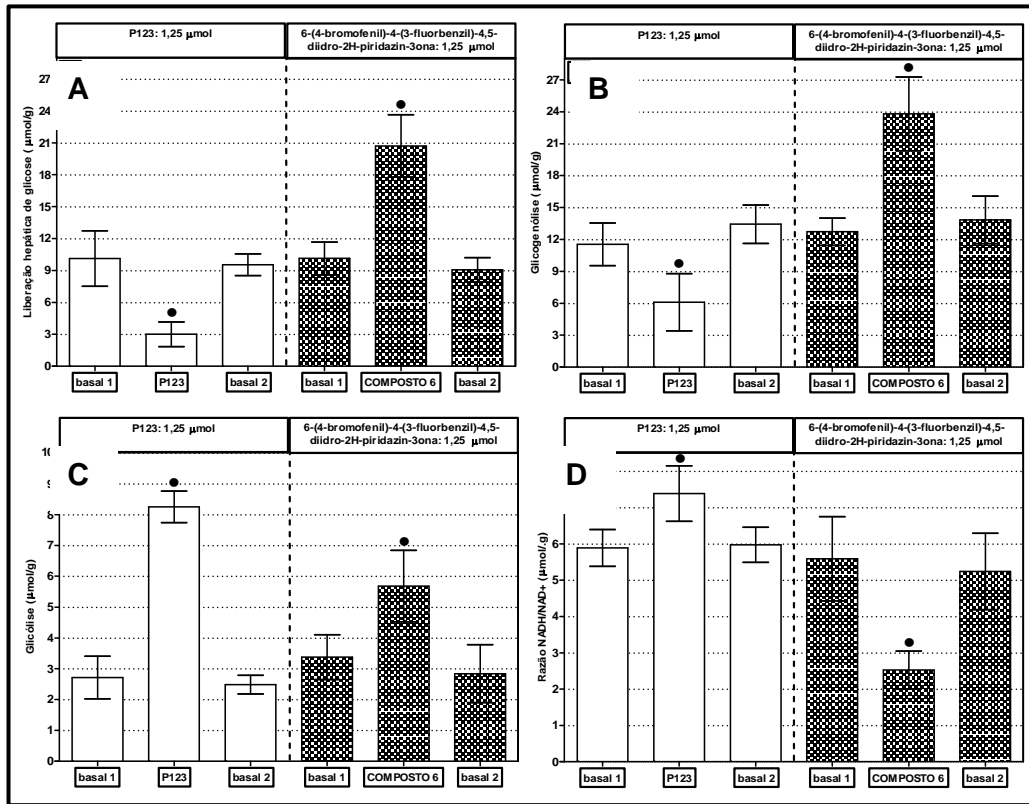
A **Figura I-28** mostra os resultados dos indicadores de lesão hepática obtidos a partir da avaliação do órgão inteiro. Tanto a F-127 quanto o composto **8g** alteraram três dos quatro parâmetros avaliados de forma similar. Um indicativo de que a cápsula vazia e não o composto foi o responsável pelas alterações. Somente a fosfatase alcalina (**Figura I-28C**) não foi alterada. Ambos aumentaram a alanina amino-transferase (**Figura I-28A**) mais reduziram a aspartato amino-transferase (**Figura I-28C**) e a bilirrubina total (**Figura I-28D**), ou seja, apresentaram um efeito hepatotóxico leve.

Figura I-28: Área sob a curva (AUC, $\mu\text{mol/g}$) da liberação hepática dos indicadores de lesão hepática: Alanina Amino-transferase (ALT, 3A), Aspartato Amino-transferase (AST, 3B), Fosfatase Alcalina (ALP, 3C) e Bilirrubina Total (BLT, 3D), em fígados perfundidos *in situ* de ratos Wistar NDM1 alimentados. A piridazinona 6 ou o F-127 vazio (1,25 μmol) foram utilizados na fase de estímulo. Dados expressos como média \pm dp, n=8, ANOVA one-way, ●p<0,05 vs basal 1 P123, ■p<0,05 vs basal 1 piridazinona 6.



Com relação aos parâmetros metabólicos do fígado íntegro, a resposta ao composto **8g** diferiu da resposta ao F-127, indicando um claro e específico efeito da molécula **8g**. A F-127 reduziu a glicogenólise (**Figura I-29B**) e a liberação hepática de glicose (**Figura I-29A**) mas aumentou a glicólise (**Figura I-29C**) e a razão NADH/NAD⁺ (**Figura I-29D**). O efeito claro da F-127 em reduzir a degradação do glicogênio e direcionar a glicose livre para a glicólise resultou na geração de NADH e aumento do potencial redox citosólico. O composto **8g** aumentou a glicogenólise (**Figura I-29B**) o que resultou em maior formação de glicose livre direcionada tanto para a liberação hepática de glicose (**Figura I-29A**) quanto para a glicólise (**Figura I-29C**). No entanto, houve redução da razão NADH/NAD⁺. Como a ativação da AR e a glicólise são geradoras de NADH, o fato do citosol estar mais oxidado pode ser indicativo de que a geração de NAD⁺ esteja sendo maior que do que a glicólise consegue consumir, o que pode apontar a AR como alvo do composto. A inibição ou redução da atividade da AR pelo composto poderia reduzir drasticamente a razão NADH/NAD⁺ e oxidar o citosol a um nível que a glicólise não consiga reverter. Apesar dos resultados serem preliminares, eles apontam o composto **8g** como alvo promissor no controle da AR. Dessa forma, a avaliação em modelos diabéticos com hiperglicemia estabelecida, próximo passo a ser avaliado, poderá subsidiar e fortalecer a hipótese de que o composto **8g** tem potencial de aplicabilidade no tratamento da hiperglicemia.

Figura I-29: Área sob a curva (AUC, $\mu\text{mol/g}$) da liberação hepática de glicose (4A), Glicogenólise (4B), Glicólise (4C) e Razão NADH/NAD⁺ (4D), em fígados perfundidos *in situ* de ratos Wistar NDM1 alimentados. A piridazinona 6 ou o F-127 vazio (1,25 μmol) foram utilizados na fase de estímulo. Dados expressos como média \pm dp, n=8, ANOVA one-way, ●p<0,05 vs basal 1 F-127, ■p<0,05 vs basal 1 piridazinona 6.



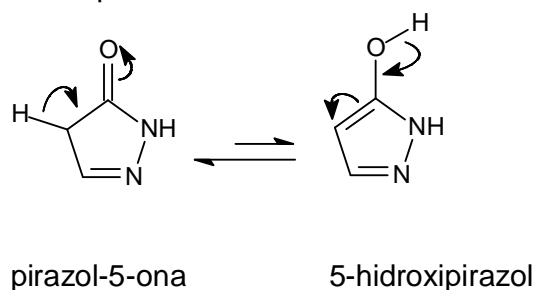
CAPÍTULO II

Síntese de pirazolonas e bis-pirazolóis.

II-1 Metodologias de Obtenção de pirazolonas- 3,4-dissubstituídas

O núcleo pirazolona, caracterizado como anel lactama de cinco membros contendo dois átomos de nitrogênio adjacentes, ou alternativamente um derivado de pirazol possuindo um grupo carbonila/hidroxila, pode ser representado pelos tautômeros, pirazol-5-ona e 5-hidroxipirazol (**Figura II-1**)(LUQUE et al., 1997).

Figura II-1 Tautômeros da pirazolona

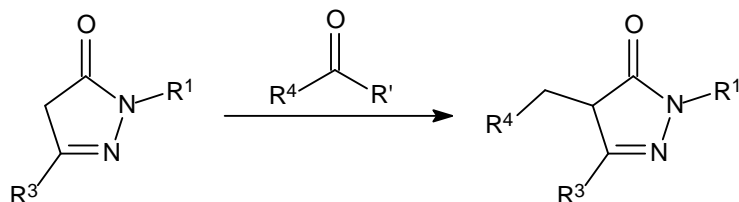


O tautomerismo ceto/enólico da pirazolona é de particular importância uma vez que envolve equilíbrios entre espécies químicas com dois átomos de nitrogênio vicinais. Vários estudos levaram à hipótese de que estes tautômeros com heteroátomos adjacentes são bastante desestabilizados e a influência do solvente, determinante para a estabilidade. (LUQUE et al., 1997; PAL, MAREDDY e DEVI, 2008).

As pirazolonas constituem intermediários chave na síntese orgânica devido à sua estrutura especial e propriedade nucleofílica ambidentada: C- α e Oxigênio nucleofílicos (TANG et al., 2014).

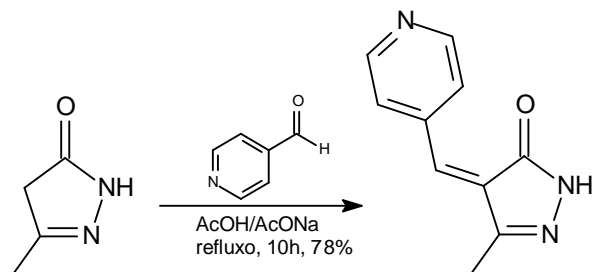
A partir de reações de adição de Michael uma variedade de derivados pirazolônicos foram sintetizados, empregando o carbono- α como nucleófilo. Em especial, derivados pirazolônicos-3,4-dissubstituídos são tradicionalmente preparados a partir de adição de Michael, pelo tratamento de 1,4-diidropirazol-3-onas com aldeídos ou cetonas em diferentes condições (**Esquema II-1**). Como exemplos do uso desta metodologia podemos destacar os trabalhos de Biradar e Sasidhar (2011), Kalkotwar, Saudagar e Jain (2012), Karale et al. (2002) Kumar et al., 2014, Mariappan et al. (2010), e Rao et al. (2012) que serão apresentados a seguir.

Esquema II-1 Metodologia convencional na obtenção de pirazolonas-3,4-dissubstituídas.

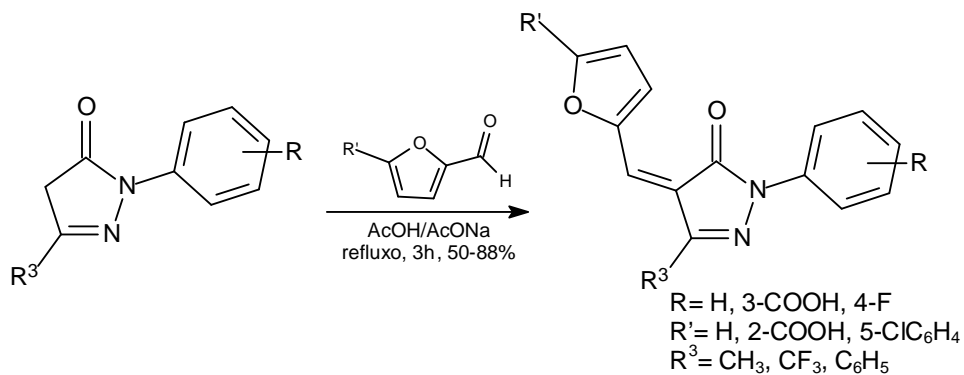


Através da utilização da metodologia convencional com ácido acético e acetato de sódio, sob refluxo de 3-10h, Rao et al. (2012) e Kumar et al. (2014) obtiveram derivados pirazolinônicos substituídos na posição-3 e 4 com rendimentos moderados, conforme **Esquemas II-2 e II-3**, respectivamente.

Esquema II-2 Esquema de síntese para obtenção do derivado 3-metil-4-((piridin-4-il)metileno)-1*H*-pirazol-5(4*H*)-ona por Rao et al. (2012).

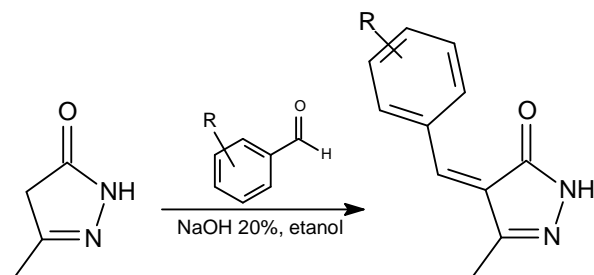


Esquema II-3 Método utilizado por Kumar et al. (2014) na obtenção de uma série de derivados pirazolinônicos.



Mariappan et al. (2010) e Dube et al. (2014) obtiveram derivados arilidenopirazolônicos, através da condensação da pirazolona com acetaldeído ou aldeídos aromáticos, em solução alcohólica 20% de NaOH, por até 8 horas, com rendimentos de 56-84% e 64-88% respectivamente (**Esquema II-4**).

Esquema II-4 Obtenção das séries de arilidenopirazolonas utilizando solução alcoólica de NaOH 20%.

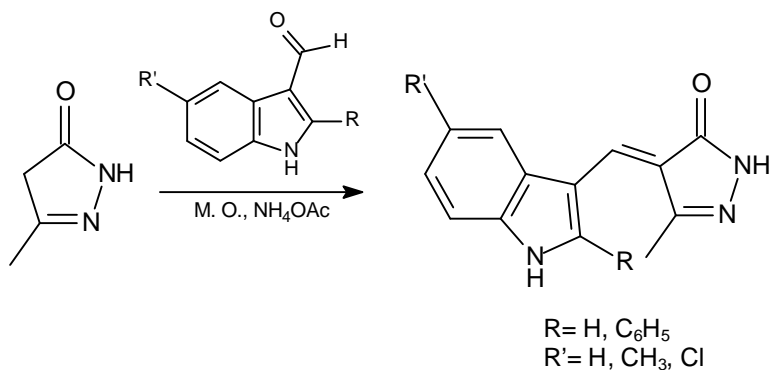


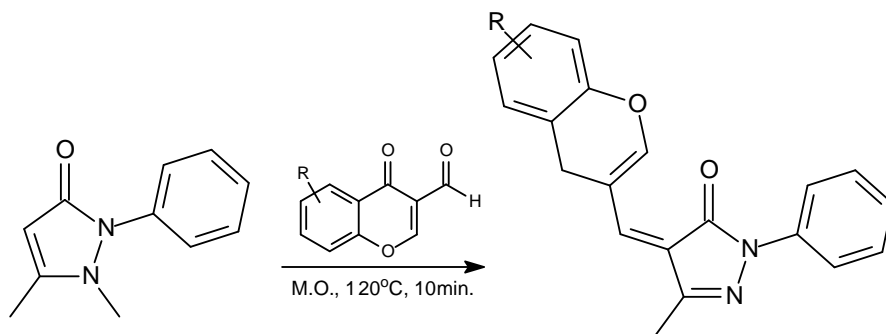
R= H, 2-Cl, 4-Cl, 4-F, 4-OCH₃, 4-OH, 2,6-diCl, 2,3-diOCH₃, 3,4-diOCH₃, 2,5-diOCH₃
(MARIAPPAN et al., 2010)

R= H, 3-Cl, 3-OCH₃, 4-OCH₃, 4-OH, 4-CH₃, 3-NO₂, 4-N(CH₃)₂ e 4-CH=CHC₆H₅ (DUBE et al., 2014)

Empregando irradiação por micro-ondas (M.O.), Karale et al. (2002) e Biradar e Sasidhar (2011)(**Esquema II-5**) prepararam pirazolonas 3,4-dissubstituídas a partir do tratamento da 3-metilpirazol-5-ona com aldeídos: livre de solvente a 120°C por 10min. e com acetato amônio por 5-10min.

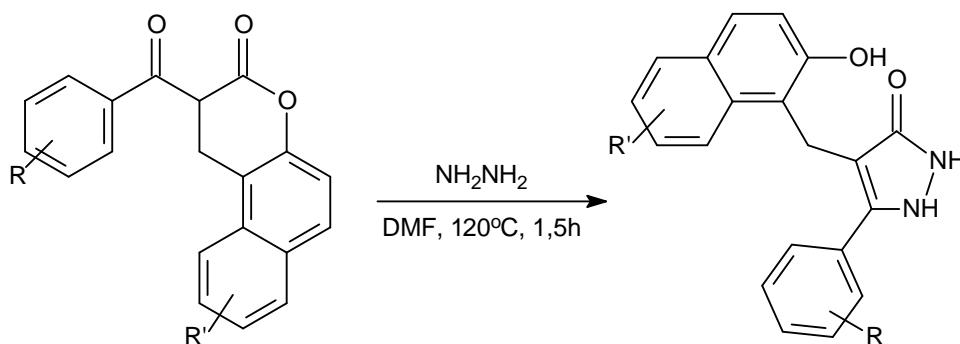
Esquema II-5 Metodologias descritas na obtenção de pirazolonas 3,4-dissubstituídas sob irradiação por micro-ondas.





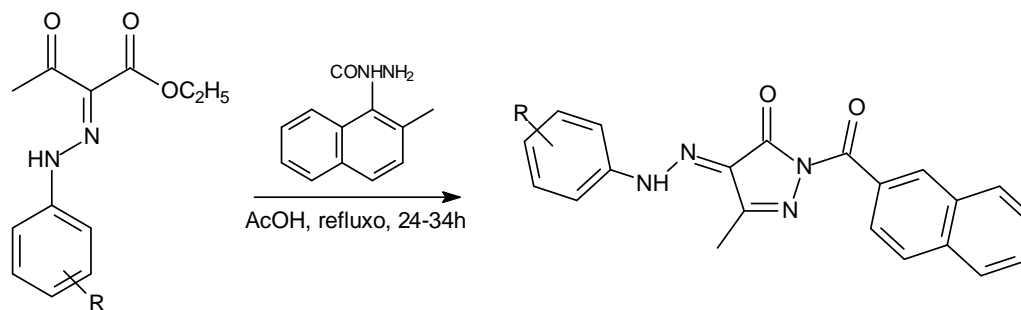
O método convencionalmente empregado é restrito à preparação de pirazonas substituídas na posição-3. Outros métodos foram desenvolvidos visando modificações principalmente nesta posição do núcleo pirazolônico. Com este enfoque, Mahajan et al. (2014) obteve pirazonas com diferentes substituintes na posição-3 (**Esquema II-6**); em comum com o trabalho de Vijay e Revanasiddappa (2016) (**Esquema II-7**) está a preparação de pirazonas a partir da ciclocondensação de β -cetoesteres com hidrazina em DMF a 120°C por 1,5h, ou em refluxo de ácido acético, respectivamente.

Esquema II-6 Síntese de uma série de pirazonas com diferentes substituintes na posição-3.



R= H, 3-Br, 3-OCH₃, 6-C₂H₅, 6-Br, 7-Br, 6-C₆H₅, 6-OCH₃, 6-CN e 6-CH₃
 R'= H, 3-Br, 4-Br, 4-CH₃, 4-F e 4-OCH₃

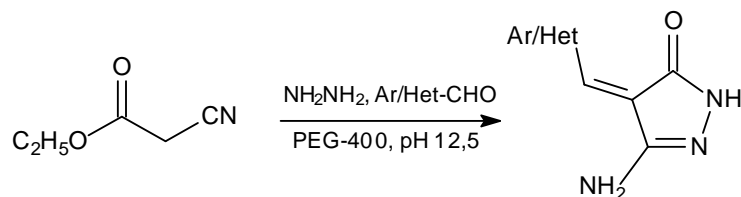
Esquema II-7 Metodologia para obtenção de uma série de 4-hidrazono-pirazol-5-onas.



R= 4-Br, 3,4-diCH₃, 4-NO₂, 4-Cl, 3,4-diCl e 2-CH₃-3-Cl.

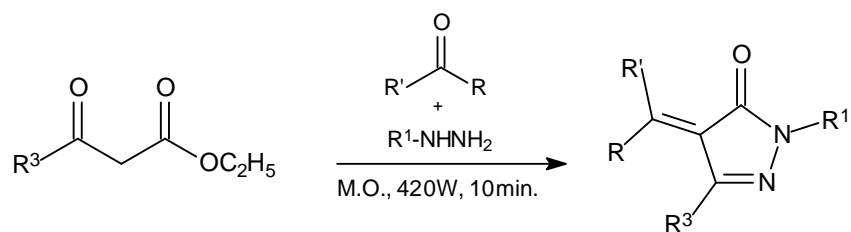
Metodologias *one pot* foram apresentadas visando maior agilidade para obtenção desses derivados pirazolônicos (**Esquemas II-8, II-9 e II-10**). Desta forma, Kadam et al. (2014) sintetizou pirazolonas através do tratamento de acetato de etilciano, hidrazina hidratada (99%) e aldeídos/heteroaldeídos aromáticos, utilizando polietileno glicol (PEG-400) como suporte sólido em pH 12,5 (**Esquema II-8**).

Esquema II-8 Metodologia *one pot* utilizando PEG-400 como suporte sólido, aplicada na obtenção de pirazolonas.



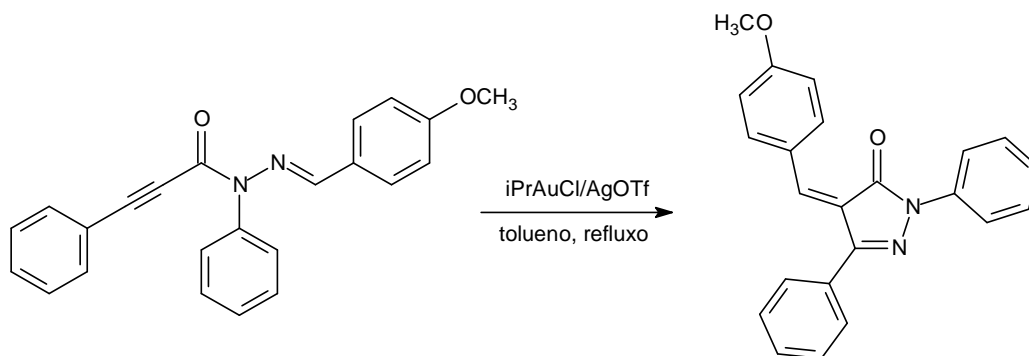
Huang et al. (2012) apresentou um método *one pot* utilizando irradiação por micro-ondas, a partir da reação de β -cetoésteres, hidrazinas e aldeídos em micro-ondas doméstico, potencia de 420W, por 10 min (**Esquema II-9**).

Esquema II-9 Metodologia *one pot* utilizando irradiação de micro-ondas, aplicada na obtenção de pirazolonas.



Ding et al. (2015) realizou um estudo catalítico para obtenção de arilidenopirazolonas (**Esquema II-10**) a partir da reação de N-propioloil hidrazonas em refluxo de tolueno com diversos catalisadores metálicos. O método mais eficiente foi através a utilização de 5% mol de *i*PrAuCl/AgOTf (cloro[1,3-bis(2,6-diisopropilfenil)imidazol-2-ilideno]ouro(I)/trifluormetano sulfonato de prata), obtendo rendimento de 83%.

Esquema II-10 Obtenção de arilidenopirazolonas através de catálise de ouro.



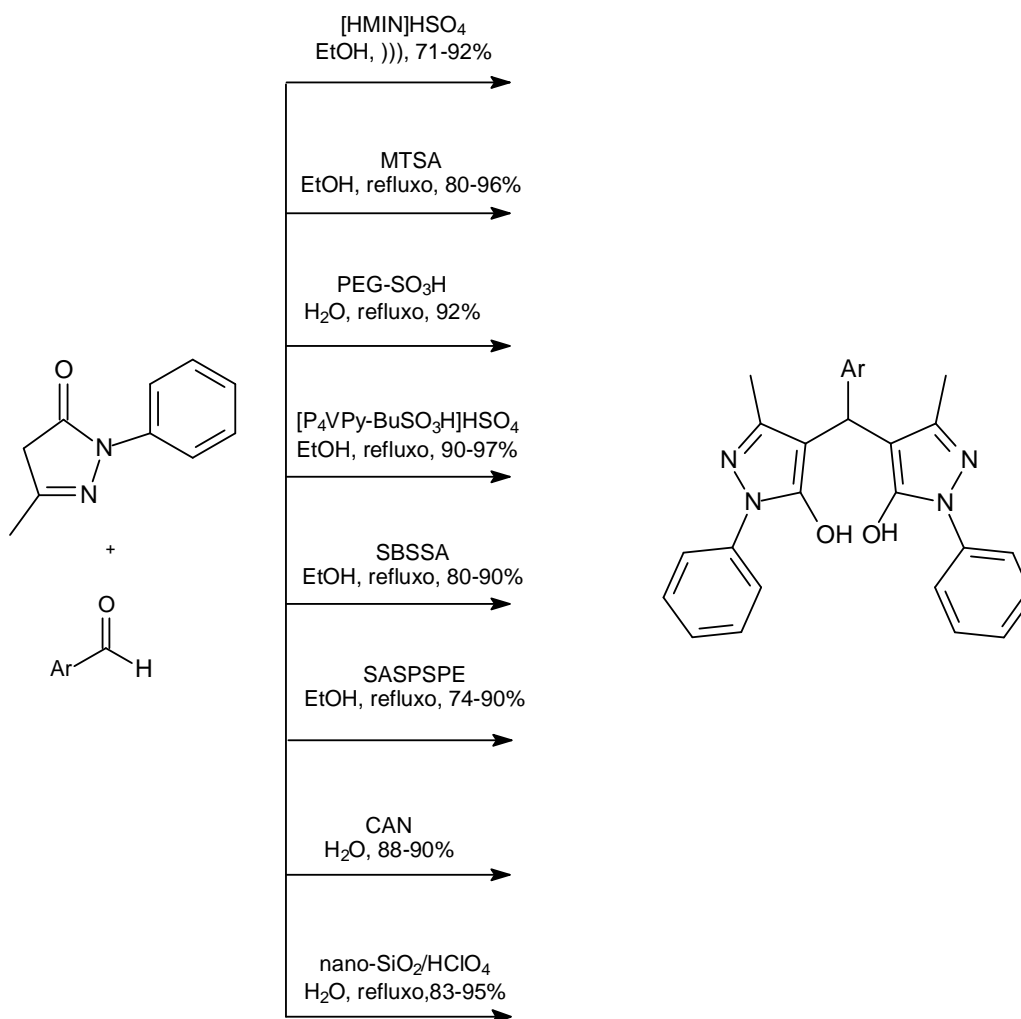
II-1.2 Metodologia para obtenção de Bis-pirazolóis.

Pirazolonas são uma importante classe de compostos heterocíclicos com propriedades proeminentes. Entre esta classe de compostos, 1,4-diidro-pirazol-5-onas tem um largo espectro de atividade biológica. Além disso, eles também são intermediários importantes na síntese orgânica como apresentado no tópico II-1 (Zang et al., 2011).

Outra utilidade sintética para as 1,4-diidro-pirazol-5-ona é a obtenção de bis-pirazolóis via condensação com aldeídos. O emprego deste método, utilizando especificamente 1-fenil-3-metil-pirazol-5-ona e aldeídos aromáticos

para obtenção de derivados 4-(arilmetileno)-bis-(3-metil-pirazol-5-óis), foi extensivamente relatado sob diferentes condições reacionais, conforme mostrado no **Esquema II-11**.

Esquema II-11 Diferentes condições reacionais para obtenção de 4-(arilmetileno)-bis-(3-metil-pirazol-5-óis).



Dentre as condições utilizadas para obtenção de 4-(arilmetileno)-bis-(3-metil-pirazol-5-óis) temos os trabalhos de Zang et al. (2011) e Boroujeni e Shojaei (2013) que aplicaram líquidos iônicos na preparação destes derivados. Zang et al. (2011) utilizou irradiação por ultrassom com 1-metilimidazolil hidrogenossulfato ([HMIM]HSO₄) em etanol, a temperatura ambiente, obtendo rendimento de 71-92%. Já Boroujeni e Shojaei (2013) utilizaram poli(4-

vinilpiridina-co-1-sulfônico ácido butil-4-vinilpiridinil) hidrogenossulfato ([P4 VPy-BuSO₃H]HSO₄) sob refluxo de etanol, obtendo rendimentos de 90-97%.

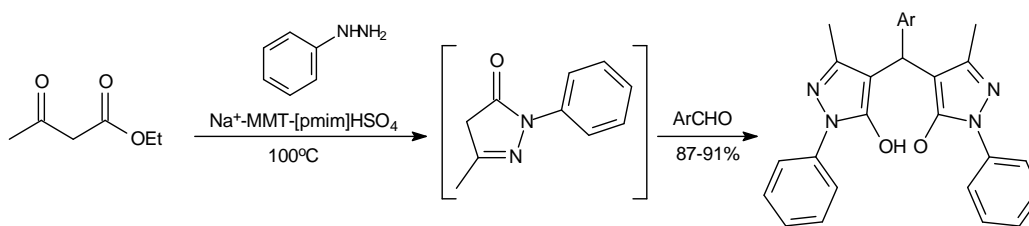
Diferentes suportes sólidos foram utilizados na preparação de 4-(arilmetileno)-bis-(3-metil-pirazol-5-óis). Nikmam et al. (2010) utilizou sílica suportada com ácido S-sulfônico (SBSSA), em refluxo de etanol com 80-90% de rendimento. Tayebi et al. (2011) empregou ácido sulfúrico [3-(3-silicapropil)sulfanil]propil)ester (SASPSPE), também sob refluxo de etanol obtendo os derivados com 74-90% de rendimento. Sadeghi et al. (2014) obteve esses derivados utilizando suporte de nano-sílica/ácido perclórico em água com 83 a 95% de rendimento. Já, Hasaninejad et al. (2011) propôs o uso do polímero polietileno glicol acidificado (PEG-SO₃H) em água para obtenção de bis-pirazolóis obtendo 92% de rendimento.

Aplicando o uso de nitrato de amônio cérico (CAN) como catalisador na síntese de 4-(arilmetileno)-bis-(3-metil-pirazol-5-óis) em meio aquoso, Sujatha et al. (2009) obteve rendimentos que variaram de 88 a 94%.

Iravani et al. (2013) utilizou catalise com melamina ácido trissulfônico sob refluxo de etanol, na obtenção dos derivados bis-pirazolóis com 80-96% de rendimento.

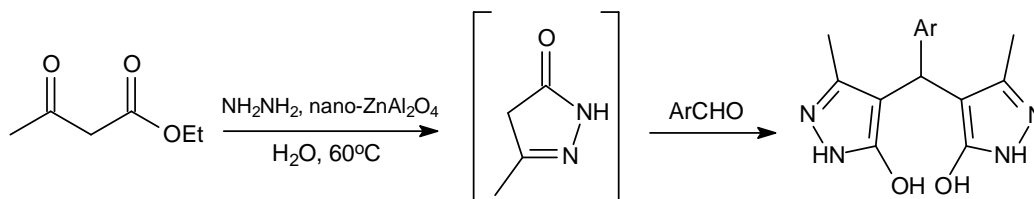
Outra forma rápida e versátil na obtenção de bis-pirazolóis é utilizando metodologias *one pot*, a partir do tratamento de etilacetoacetato, hidrazina e posterior adição de aldeídos conforme **Esquema II-12**. Este método foi descrito por Shirini et al. (2015) que empregou líquido iônico Na⁺-MMT-[pmim]HSO₄ (1-metil-3-(trimetóxisililpropil)-imidazolil hidrogenossulfato suportado em montmorillonita de sódio) na temperatura de 100°C, com rendimento de 87-91% (**Esquema II-12**).

Esquema II-12 Metodologia *one pot* empregando liquid iônico na obtenção de derivados 4-(arilmetileno)-bis-(3-metil-pirazol-5-óis).



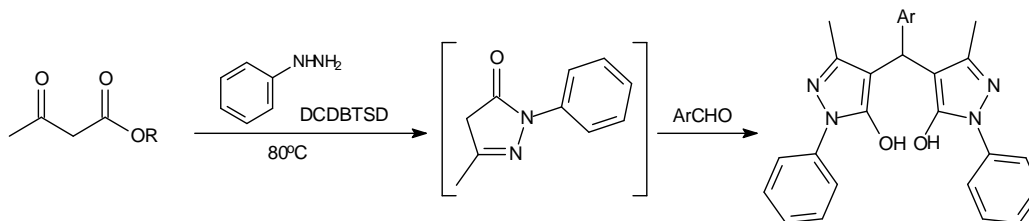
Ghomi, Koopaei e Alavi (2014) utilizou esse método *one pot*, com catalise de nanopartícula de óxido de alumínio e zinco ($ZnAl_2O_4$) em meio aquoso à 60°C, para obtenção dos seus derivados com 83-92% de rendimento.

Esquema II-13 Metodologia *one pot* aplicando catalise de nanopartícula de óxido de alumínio e zinco na obtenção de derivados 4-(arilmetileno)-bis-(3-metil-pirazol-5-óis)



Método *one pot* também foi apresentado por Khazaei, Abbasi e Zare (2014) para obtenção desses derivados de bis-pirazolóis, aplicando catálise com *N*-bromo sulfonamida (DCDBTSD- *N*,2-dibromo-6-cloro-3,4-diidro-2*H*-benzo[e][1,2,4] tiadiazina-7-sulfonamida-1,1-dióxido) com 73-85% de rendimento.

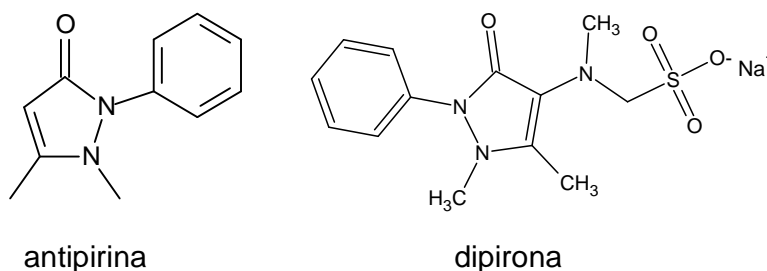
Esquema II-14 Metodologias *one pot* aplicando catálise com *N*-bromo sulfonamida na obtenção de derivados 4-(arilmetileno)-bis-(3-metil-pirazol-5-óis).



II-2 Atividade Biológica

Pirazolonas constituem um grupo de compostos orgânicos que têm sido extensivamente estudados devido às suas propriedades e aplicações. A primeira desta classe a ser obtida sinteticamente em 1883 por Knorr e utilizada clinicamente em 1884, como analgésico e anti-inflamatório, foi a antipirina (CASAS et al., 2007). Desde a introdução da antipirina, o desenvolvimento de fármacos para uso como analgésicos e anti-inflamatórios durante o século XIX concentrou-se nos derivados da pirazolona (KUÇUKGUZEL e SENKARDES, 2015). Como resultado, um grande número de pirazolonas foram obtidas e algumas adquiriram aplicação a nível clínico, como a dipirona um dos analgésicos e antitérmicos mais utilizados mundialmente.

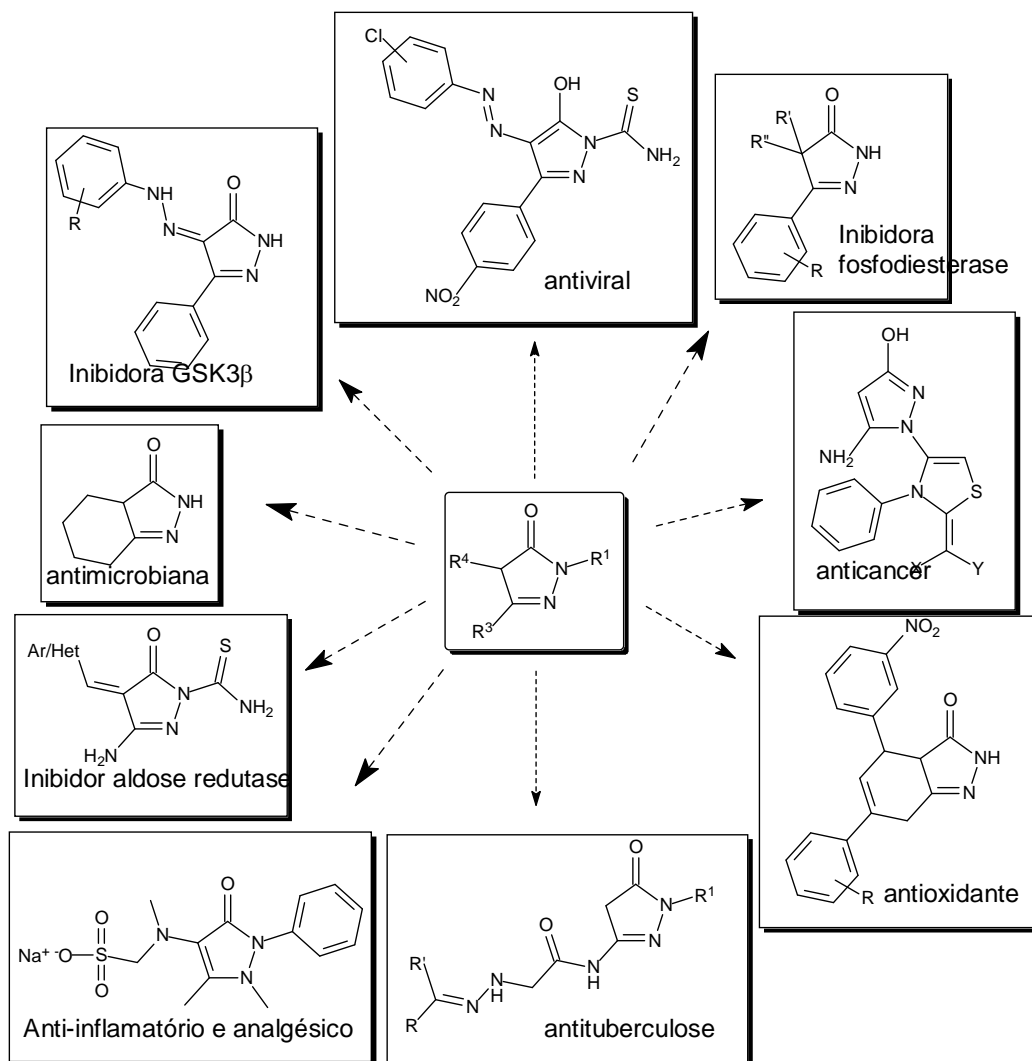
Figura II-2 Estrutura da antipirina e da dipirona



Além da atividade analgésica, anti -inflamatória e antitérmica (EL-HAWASHA et al., 2006; KALKOTWAR, SAUDAGAR e JAIN, 2012; MARIAPPAN et al., 2010; 2011) as pirazolonas se destacam por apresentar atividades: antitumoral (ANTRE et al., 2012; BRANA et al., 2006; KIM et al., 2005; MOHAREB et al., 2012), antiviral (IYER et al., 2014; KUMAR et al., 2014), antioxidante (BIRADAR e SASIDHAR, 2011; MAZIMBA et al., 2014), antimicrobiana (RAGAVAN et al., 2013), inibidora da aldose redutase (KADAM et al., 2014) utilizada no tratamento da diabetes, inibidora de fosfodiesterase (ALLCOCK et al., 2011; SIRCAR et al., 1987) que são utilizados nos tratamentos de asma e inflamação, potencial inibidor da enzima GSK3 (ARNOST et al., 2010) identificada como potencial alvo terapêutico para algumas doenças como transtorno bipolar, esquizofrenia, Alzheimer, doenças cardíacas e diabetes.

No **Esquema II-15** podemos observar a estrutura de pirazonas com diferentes atividades.

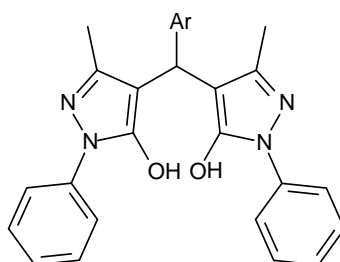
Esquema II-15 Estruturas de pirazonas com diferentes atividades biológicas.



A atividade biológica de bis-pirazolóis, apesar de promissora, é pouco relatada na literatura. Estes derivados são descritos como pesticidas (LONDERSHAUSEN, 1996), fungicidas (YAKESHI, 1977), antioxidantes (XIAOHUI et al., 2012) e antivirais (SUJATHA et al., 2009). Outra característica importante é a utilização destes compostos como quelantes, formando complexos com diferentes metais (GARNOVSKII, URAEV e MINKIN, 2004; TARIGHAT, SHAHBAZI e NIKMNAM, 2013; UZOUKWU et al., 1993; YANG, JIN e LIN, 2000).

A atividade antiviral foi descrita para uma série de 4,4-(arilmetileno)-bis-(1*H*-pirazol-5-óis) (**Figura II-3**) em linhagens de células Vero contaminadas com vírus PPRV (vírus peste de pequenos ruminantes), sendo que o efeito antiviral destes compostos contra PPRV pode ser estendido para outros vírus também. O composto que apresenta o grupo 2-furfurila substituído em Ar exibiu maior atividade antiviral contra PPRV, sendo mais potente que o fármaco padrão utilizado, ribavirina.

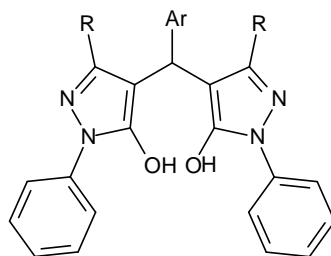
Figura II- 3 Bis-pirazolóis com atividade antiviral



Ar= C₆H₅, 3-CH₃C₆H₄, 4-CH₃C₆H₄, 4-OCH₃C₆H₄, 4-F C₆H₄, 4-NO₂C₆H₄, 3,4-(OCH₃)₂C₆H₃, 3-OCH₃-4-OHC₆H₃, 2-furfuril, 2-piridil.

A atividade antioxidante de bis-pirazolóis foi relatada por Xiaohui et al. (2012). Os derivados **XIXa** e **XIXb** (**Figura II-4**) foram avaliados através dos métodos colorimétricos com DPPH (1,1-difenil-2- picrilhidrazila) e ABTS [sal de amônio do ácido 2,2'-azinobis(3-etilbenzenotiazolina-6-sulfônico)], que verificam a habilidade dos compostos em neutralizar radicais. Todos os derivados apresentaram potencial habilidade de inibir radicais livres, porém os derivados **XIXa** e **XIXb** foram mais ativos, devido a introdução do grupo metóxila em R fator que mostrou ser determinante para o aumento da atividade antioxidante.

Figura II-4 Bis-pirazolóis com atividade antioxidante

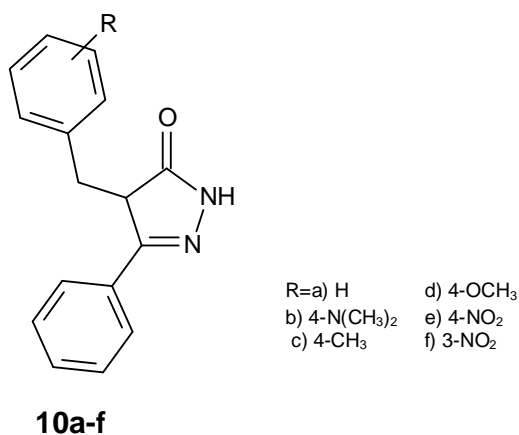


XIXa R= H; **XIXb** R= OCH₃

II-3 Resultados e Discussão

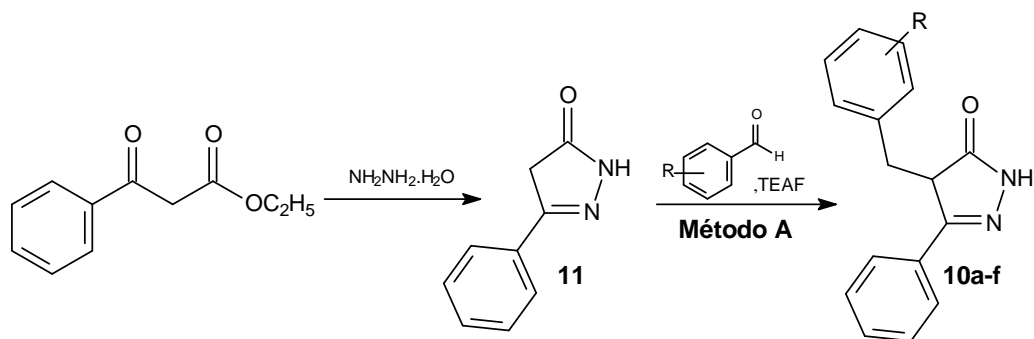
Tendo em mente o interesse na busca de novos agentes anticancer e diante dos bons resultados apresentados para as diidropiridazinonas **8a-o** e **9a-c**, foi proposta a síntese e avaliação da atividade das pirazolonas 4,5-dissubstituídas análogas (**10a-f**, **Figura II-5**), visando avaliar o efeito da substituição do núcleo piridazinônico pelo núcleo pirazolônico.

Figura II-5. Pirazolonas 4,5-dissubstituídas **12a-f**



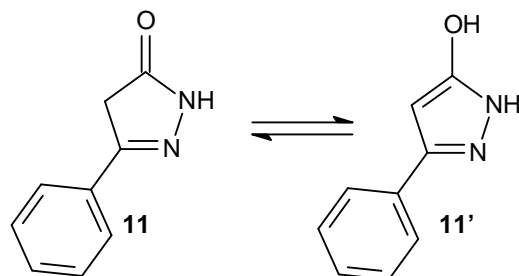
Para obtenção dos derivados **10a-f**, visualizamos como primeira proposta a preparação destes a partir da reação da 3-fenilpirazol-5-ona com aldeído aromáticos em formiato de trietilamônio (TEAF), (Método A), conforme demonstrado no **Esquema II-14**. Esta metodologia foi aplicada neste trabalho na obtenção dos derivados monoalquilados do ácido de Meldrum **3a-I** (Etapa 1 para obtenção das diidropiridazinonas, **Esquema II-16**). A 3-fenilpirazol-5-ona (**11**) foi obtida a partir do tratamento do benzoil acetato de etila com solução de hidrazina 51% à 50°C por 5h, com rendimento de 89%.

Esquema II-16 Método A para obtenção dos derivados **10a-f**.



A formação da 3-fenilpirazol-5-ona (**11**) foi confirmada pelas análises dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C , no qual observou-se a presença do tautômero na forma enol (3-fenil-5-hidroxipirazol **11'**, **Figura II-6**). A identificação do 3-fenil-5-hidroxipirazol no espectro de RMN de ^1H (**Figura II-7**), foi possível pela presença de simpleto em δ 5,89 correspondente ao H4 (característico do enol), já no espectro de RMN de ^{13}C (**Figura II-8**), observou-se sinal correspondente ao carbono ligado a hidroxila em δ 161,4, e em δ 143,8 e 87,3 sinais referentes a C3 e C4, além dos sinais correspondentes ao anel aromático em δ_{H} 7,30 (tt, $J=7,5$ e $1,5$, H4'), 7,40 (t, $J=7,5$, H3'/5'), 7,67 (dd, $J=7,5$ e $1,5$, H2'/6') e δ_{C} 125,2; 128,2; 129,2 e 130,9 respectivamente para C3'/5', C4', C2'/6' e C1'.

Figura II-6 Tautomerismo 3-fenilpirazol-5-ona (**11**) e 3-fenil-5-hidroxipirazol (**11'**)



A obtenção exclusiva da forma enol nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C em DMSO- d_6 , é explicada pelo fato do equilíbrio tautomérico entre as estruturas hidroxí e ceto ser modulada pela combinação de três fatores. Primeiro, normalmente as espécies ceto apresentam maior estabilidade, segundo que

devido a presença de dois nitrogênios pirrol vicinais como nos tautômeros 3-fenilpirazol-5-ona (**11**) e 3-fenil-5-hidroxipirazolol (**11'**), a tendência é a diminuição da estabilidade do tautômero ceto, e terceiro, o efeito do solvente sobre o tautomerismo ceto-enol, que conforme estimativas experimentais indicam a predominância da forma ceto em solução de clorofórmio, e em dimetilsulfóxido (DMSO) esta forma não é observada (LUQUE et al., 1997; RISITANO et al., 1996). A tentativa de realização do espectro de RMN de ^1H e ^{13}C para o composto **11** em clorofórmio (CDCl_3) foi impossibilitada devido a insolubilidade do mesmo neste solvente.

Figura II-7 Espectro de RMN ^1H (300MHz, DMSO- d_6) do composto **11**.

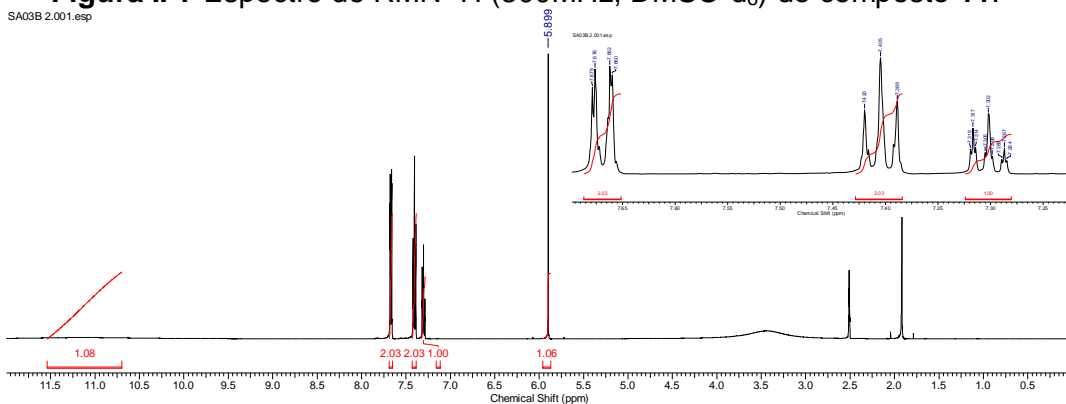
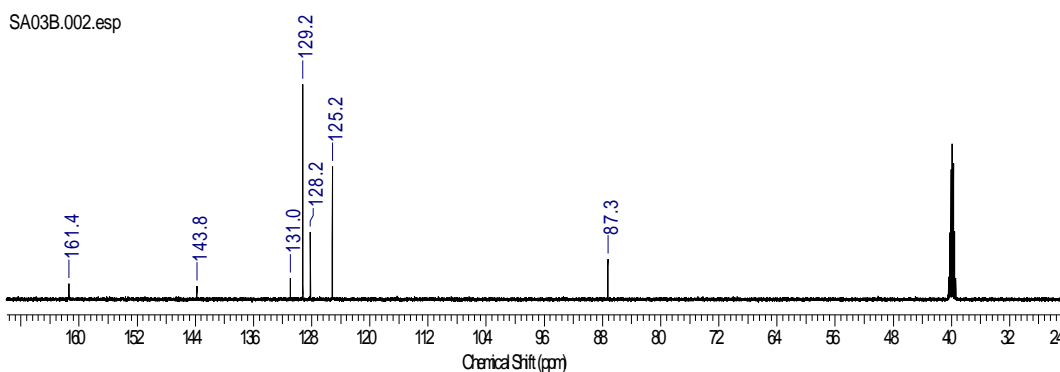


Figura II- 8 Espectro de RMN ^{13}C (75,46 MHz, DMSO- d_6) do composto **11**.



Na metodologia A empregada para preparação dos derivados **10a-f** mostrada no (**Esquema II-16**), uma solução de 3-fenilpirazol-5-ona **11** em formiato de trietilmônio, a 50°C , foi tratada com um equivalente dos respectivos aldeídos (**12a-f**). O tratamento da mistura reacional forneceu um produto bruto,

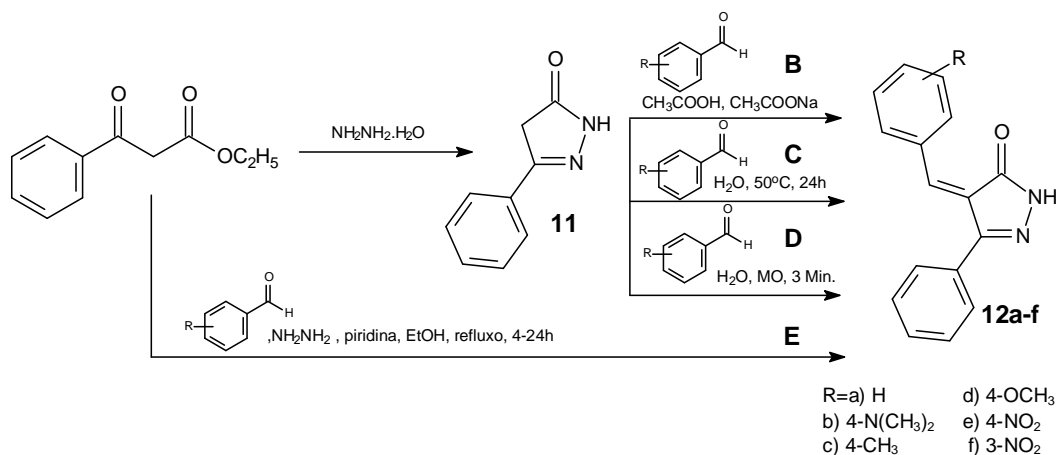
cujos espectros de RMN ^1H e ^{13}C , em DMSO-d_6 , revelaram a presença de sinais correspondentes ao 3-fenil-5-hidroxipirazolol (**11'**), além de sinais adicionais na região de hidrogênios e carbonos aromáticos e um sinal em δ_{H} 5,03 (singlete) e em δ_{C} 33,0, sinal este em região diferente das esperadas para os compostos **10a-f**.

Desta forma, outra rota foi proposta como alternativa para a síntese dos derivados **10a-f**. Nesta rota, propôs-se a obtenção dos intermediários arilideno-pirazolônicos (**12a-f**) e posterior redução da dupla α, β -insaturada destes intermediários (**Esquema II-17**). Na obtenção dos derivados arilideno-pirazolônicos (**12a-f**) foram testados três métodos, a partir reação da 3-fenilpirazol-5-ona com aldeídos em diferentes condições, sendo estes:

Método B: em CH_3COOH , CH_3COONa , refluxo por 10h, conforme metodologia de Rao et al. (2012); **Método C:** utilização de H_2O como solvente, a temperatura ambiente, 24h, conforme metodologia de Le et al. (2013); **Método D:** utilização de H_2O como solvente, sob irradiação de micro-ondas doméstico, 3-5 min., Pot. 10%, de acordo com as metodologias de Karale et al. (2002) e Mojtahedi et al. (2006).

A partir do emprego do **Método B** foi obtida uma mistura de difícil purificação. Para os métodos **C** e **D**, mesmo após purificação dos produtos, a análise de RMN de ^1H e ^{13}C revelou a formação de mistura, na qual não identificamos sinais característicos do produto arilideno esperado, mas observou-se mais uma vez sinais em δ_{H} 5,03 e em δ_{C} 33,0.

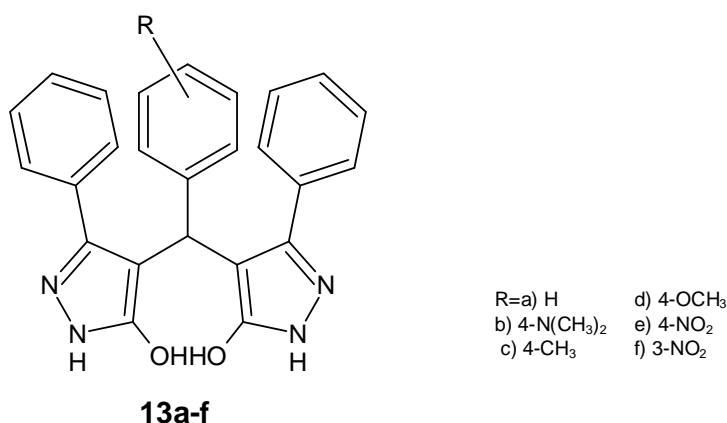
Esquema II-17 Procedimentos realizados para obtenção dos derivados **12a-f**.



Em virtude da não obtenção das arilidenopirazononas **12a-f** pelas metodologias **A** a **D**, anteriormente discutidas, optou-se pelo emprego da metodologia **E (Esquema II-17)**, utilizada por Abjalan et al. (2011) na preparação de isoxazolonas análogas as arilidenopirazononas **12a-f**. Visto que diversas metodologias utilizadas na preparação de isoxazolonas também são aplicadas na preparação de derivados pirazolônicos (MAHAJAN et al., 2014; RISITANO et al. 1996), esta chamou nossa atenção por ser um método *one pot* com catálise básica, que até então não havíamos testado.

Neste método *one pot*, utilizamos o benzoil acetato de etila, hidrazina e piridina em meio etanólico, seguido da adição dos aldeídos aromáticos (**a-f**) sob refluxo de 4 a 24h. As reações apresentaram com a formação de um único produto em bons rendimentos (71 a 97%), de fácil purificação por recristalização. No entanto, os dados espectroscópicos de RMN dos produtos puros obtidos, não foram concordantes com os esperados para os derivados arilidênicos **12a-f**. A partir da análise dos dados espectroscópicos e caracterização dos produtos formados (mostrada no tópico II.3.2), verificou-se que os derivados obtidos foram bis-pirazolóis **13a-f (Figura II-9)**, também formados nas misturas obtidas nos métodos **A, C e D**.

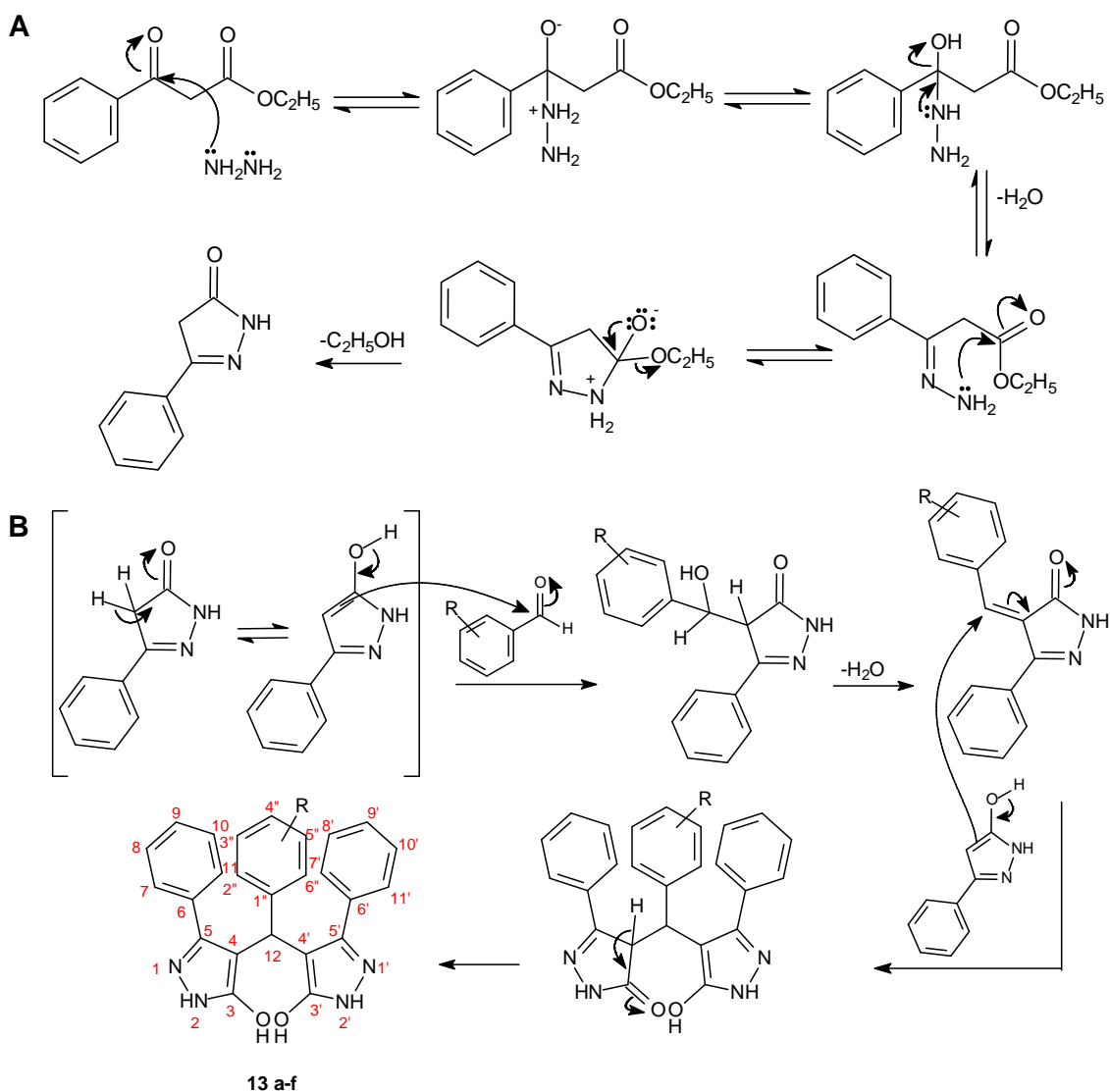
Figura II-9 Bis-pirazolóis **13a-f**



A obtenção de bis-pirazolóis pode ser explicada devido à adição de Michael de uma segunda molécula de 3-fenilpirazol-5-ona (**11**) aos intermediários arilideno-pirazolônicos **12a-f**.

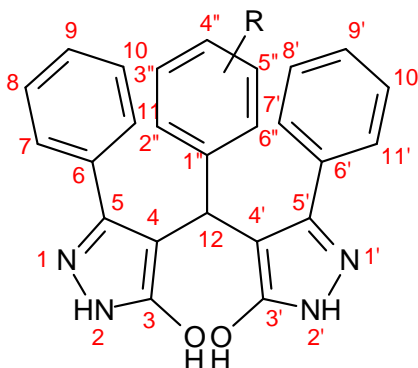
O mecanismo proposto para a síntese dos bis-pirazolóis (**Esquema II-18**) envolve inicialmente a formação dos intermediários arilideno-pirazolônicos **12a-f**, pelo ataque da hidrazina à carbonila da cetona do benzoil acetato de etila, seguido de um ataque nucleofílico intramolecular do nitrogênio da hidrazona à carbonila do éster e eliminação de etanol (etapa A). A adição nucleofítica de 5-fenilpirazol-3-ona (**11**) com aldeídos aromáticos, seguido de desidratação leva à formação das arilideno-pirazolonas **12a-f**. E por fim, a adição de Michael de uma segunda molécula de 5-fenilpirazol-3-ona (**11**) aos intermediários **12a-f** resulta os respectivos bis-pirazolóis **13a-f** (etapa B) **Esquema II-18**.

Esquema II-18. Mecanismo proposto para formação dos bis-pirazolóis **13a-f**.



Os trabalhos reportados para esta classe apresenta substituinte em *N*-2. O método comum de síntese de bis-pirazolóis baseia-se na condensação de aldeídos aromáticos com dois equivalentes de pirazol-5-ona, este método foi reportado de diversas formas, utilizando: meio aquoso, etanol (TAYEBI et al., 2011), suporte sólido (SADEGHI et al., 2014, NIKNAM et al., 2010; SHIRINI et al., 2015) catalisadores como: ácidos (IRAVANI et al., 2013), bases (SINGH et al., 1984), polímeros (HASANINEJAD et al., 2011), líquidos iônicos (SHIRINI et al., 2015; ZANG et al., 2011; BOROUJENI et al., 2013) e reagentes N-halo (KHAZAEI et al., 2014) conforme apresentado anteriormente no item II-1.2. Porém, estes processos são limitados devido a moderados rendimentos e tempo de reação extenso. O método que utilizamos na preparação dos bis-pirazolóis é relatado para a preparação de isoxazolonas (ABLAJAN et al., 2011), e apresentou a vantagem de ser *one pot* (adição do β-cetoéster, hidrazina e aldeído em etanol e piridina) fácil purificação, com rendimentos que variaram de 71-97% e tempo reacional moderado (24h).

II-2.1 Caracterização dos 4-(arilmetileno)-bis-(5-fenil-1H-pirazol-3-óis) **13a-f**.



No espectro de RMN de ^1H para o 4-(fenilmetileno)-bis-(3-fenilpirazol-5-óis) **13a** (Figura II-10) observou-se um singlete em δ 5,11 e multiplete na região de δ 7,06-7,45 correspondente ao H12 e aos hidrogênios aromáticos, respectivamente. No espectro de RMN de ^{13}C para o derivado **13a** (Figura II-11), destacamos o sinal em 33,15 ppm correspondente ao C12, sinal em 143,2 ppm atribuído ao C5/C5' do anel pirazolônico, além dos sinais de carbonos aromáticos na região de 127,5 a 129,2 ppm. No mapa de contornos HMBC (Figura II-12) podemos observar principalmente a correlação do H12 com

C3/C3' (162,5 ppm), C4/C4' (104,5 ppm), C5/C5' (143,2 ppm) e com carbonos aromáticos C2'' e C6'' (128,4 ppm). No mapa de contorno NOESY (**Figura II-13**), observamos as correlações entre H12 com os hidrogênios aromáticos (H2'' e H6'').

Os hidrogênios do anel aromático ligado ao C5/C5' apresentam o mesmo padrão para todos os compostos (**13b-13f**), exceto para **13a**. Os hidrogênios H7/H11, acoplam com H8/H10 resultando em dupletos (d), sendo observados entre δ_H 6,82-7,43 (4H, d, J entre 7,0-7,5Hz). Já os hidrogênios H8/H10 e H9 são observados na região de δ_H 6,97-7,21 (4H, t, J =7,5-8,0Hz) e δ_H 7,34-7,37 (2H, t, J = 6,9-7,8Hz) como tripletos (t), devido ao acoplamento com H7/H11/H9 e H8/H10, respectivamente.

Os dados espectroscópicos uni e bidimensionais para os bispirazolóis *para*-substituídos (**13b-13e**) e *meta*-substituído (**13f**) são similares aos do 4-(fenilmetileno)-bis-(3-fenilpirazol-5-ols) (**13a**) (**Tabela II-1**), exceto em suas porções referente ao grupo fenil ligado ao C12, que variam de acordo com o substituinte na posição *para* ou *meta* do anel aromático. Portanto, para estes compostos serão discutidos apenas os dados referentes aos seus respectivos sistemas aromáticos.

Nos espectros de RMN de 1H para os bis-pirazolóis *para*-substituídos (**13b-13e**) (**Figuras 37-A, 41-A, 43-A e 47-A**), foram observados padrões de sinais semelhantes entre eles; os hidrogênios dos sistemas aromáticos *para*-substituído H2''/H6'' que acoplam com H3''/H5'' resultando normalmente em dupletos (d), com constantes de acoplamento entre 7,5-9,0 Hz. Grupos doadores de densidade eletrônica do anel aromático (compostos **13b-N(CH₃)₂**, **13c-CH₃** e **13d-OCH₃**) promovem a blindagem dos hidrogênios do sistema aromático que foram observados entre δ_H 6,62-6,82 (H3''/H5'', 2H, d, J=9,0/7,5/8,5Hz) e entre δ_H 6,87-7,05 (H2''/H6'', 2H, d, J=8,4/8,0/8,5Hz), enquanto o grupo retirador de densidade eletrônica (compostos **13e-NO₂**) desblinda estes hidrogênios que foram observados em δ_H 8,16 (H3''/H5'', 2H, d, J= 9,0 Hz) e δ_H 7,34 (H2''/H6'', 2H, d, J= 9,0 Hz).

A diferença nos espectros de RMN 1H dos compostos **13b**, **13c** e **13d** foi observada apenas no grupo ligado ao C4'', onde observou-se o sinal de grupo dimetilamina em δ_H 2,81 (s, 6H) no composto **13b**; metila em δ_H 2,25 (s, 3H) no

composto **13c**, e de grupo metoxila em $\delta_{\text{H}}3,71$ (s,3H) no composto **13d**.

Nos espectros de RMN de ^{13}C (**Figuras 38-A, 42-A, 43-A e 47-A**) para os derivados *para*-substituídos, podemos destacar os sinais dos carbonos aromáticos C2"/C6", C3"/C5" e C4" entre δ_{C} 128,2-129,1, 112,9-127,4 e 135,2-149,2, respectivamente.

No espectro de RMN de ^1H para o bis-pirazolol *meta* nitro-substituído (**13f**) (**Figura 51-A**) os hidrogênios aromáticos H2", H4", H5" e H6" foram observados em δ_{H} 7,92 (1H, s), 8,07 (1H, td, J=0.9, 1,2 e 7,8Hz), 7,59 (1H, t, J=7,8Hz) e 7,51 (1H, d, J=8,4Hz), respectivamente.

Nos espectros de RMN de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ para o composto **13f** (**Figura 52-A**) destacam-se os sinais dos carbonos aromáticos do anel *meta* substituído, em δ_{C} 121,7 (C5", CH), 122,0 (C2", CH), 130,2 (C14", CH) e 134,6 (C6", CH).

Tabela II-1 Dados de RMN de ^1H , ^{13}C (δ -ppm, 300,06 e 75,45MHz, DMSO- d_6) para os compostos **13a-f**.

C/H	13a		13b		13c		13d		13e		13f	
	δ_{H} (mult, J em Hz)	δ_{C}	δ_{H} (mult, J em Hz)	δ_{C}	δ_{H} (mult, J em Hz)	δ_{C}	δ_{H} (mult, J em Hz)	δ_{C}	δ_{H} (mult, J em Hz)	δ_{C}	δ_{H} (mult, J em Hz)	δ_{C}
3/3'	-	161,8*	-	161,8*	-	no	-	162,1*	-	161,6*	-	161,7*
4/4'	-	104,5*	-	105,2*	-	no	-	104,5*	-	103,4*	-	103,5*
5/5'	-	143,2	-	144,4*	-	140,1	-	143,7*	-	144,9*	-	145,6
6/6'	-	no	-	no	-	135,2	-	no	-	no	-	no
7/7'	7,06-7,45 (m)	129,2	7,13 (d, 7,2)	130,7	7,13 (d, 7,0)	129,2	7,13 (d, 7,0)	129,1	7,43 (d, 7,0)	129,2	7,15 (d, 7,2)	129,3
8/8'	7,06-7,45 (m)	128,2	7,19 (t, 7,7)	128,2	7,19 (t, 8,0)	128,2	7,20 (t, 7,5)	128,2	7,21 (t, 7,5)	128,2	7,20 (t, 7,2)	128,3
9/9'	7,06-7,45 (m)	129,1	7,34 (t, 7,0)	129,1	7,35 (t, 7,0)	-	7,35 (t, 7,0)	-	7,36 (t, 7,0)	no	7,37 (t, 7,2)	no
10/10'	7,06-7,45 (m)	128,2	7,19 (t, 7,7)	128,0	7,19 (t, 7,5)	128,2	7,20 (t, 7,5)	128,2	7,21 (t, 7,5)	128,2	7,20 (t, 7,2)	128,3
11/11'	7,06-7,45 (m)	129,2	7,13 (d, 7,2)	130,7	7,13 (d, 7,0)	129,2	7,13 (d, 7,0)	129,1	7,43 (d, 7,0)	129,2	7,15 (d, 7,2)	129,3
12	5,11 (s)	33,2	5,04 (s)	32,3	5,05 (s)	33,0	5,05 (s)	32,6	5,15 (s)	33,9	5,17 (s)	33,5
1''	-	no	-	no	-	-	-	135,2	-	146,4	-	no
2''	7,06-7,45 (m)	128,4	6,87 (d, 8,4)	128,2	7,05 (d, 8,0)	129,1	6,97 (d, 8,5)	128,5	7,34 (d, 9,0)	123,9	7,92 (s)	134,6
3''	7,06-7,45 (m)	127,5	6,62 (d, 9,0)	112,9	6,95 (d, 7,5)	121,0	6,82 (d, 8,5)	114,0	8,16 (d, 9,0)	128,9	-	148,3
4''	7,06-7,45 (m)	128,6	-	149,2	-	-	-	157,9	-	151,4	8,07 (dt, 1,2 e 7,8)	130,2
5''	7,06-7,45 (m)	127,5	6,62 (d, 9,0)	112,9	6,95 (d, 7,5)	127,4	6,82 (d, 8,5)	114,0	8,16 (d, 9,0)	128,9	7,59 (t, 7,8)	121,7
6''	7,06-7,45 (m)	128,4	6,87 (d, 8,4)	128,2	7,05 (d, 8,0)	129,1	6,97 (d, 8,5)	128,5	7,34 (d, 9,0)	123,9	7,51 (d, 8,4)	122,0
1''	-	-	2,81 (s)	40,8	2,25 (s)	21,0	3,78 (s)	55,4	12,3(sl)	-	12,28 (sl)	-
2''	-	-	12,08 (sl)	-	12,11(sl)	-	12,20 (sl)	-	-	-	-	-

Figura II-10: Espectro de RMN ^1H (300MHz, DMSO- d_6) do composto 13a.

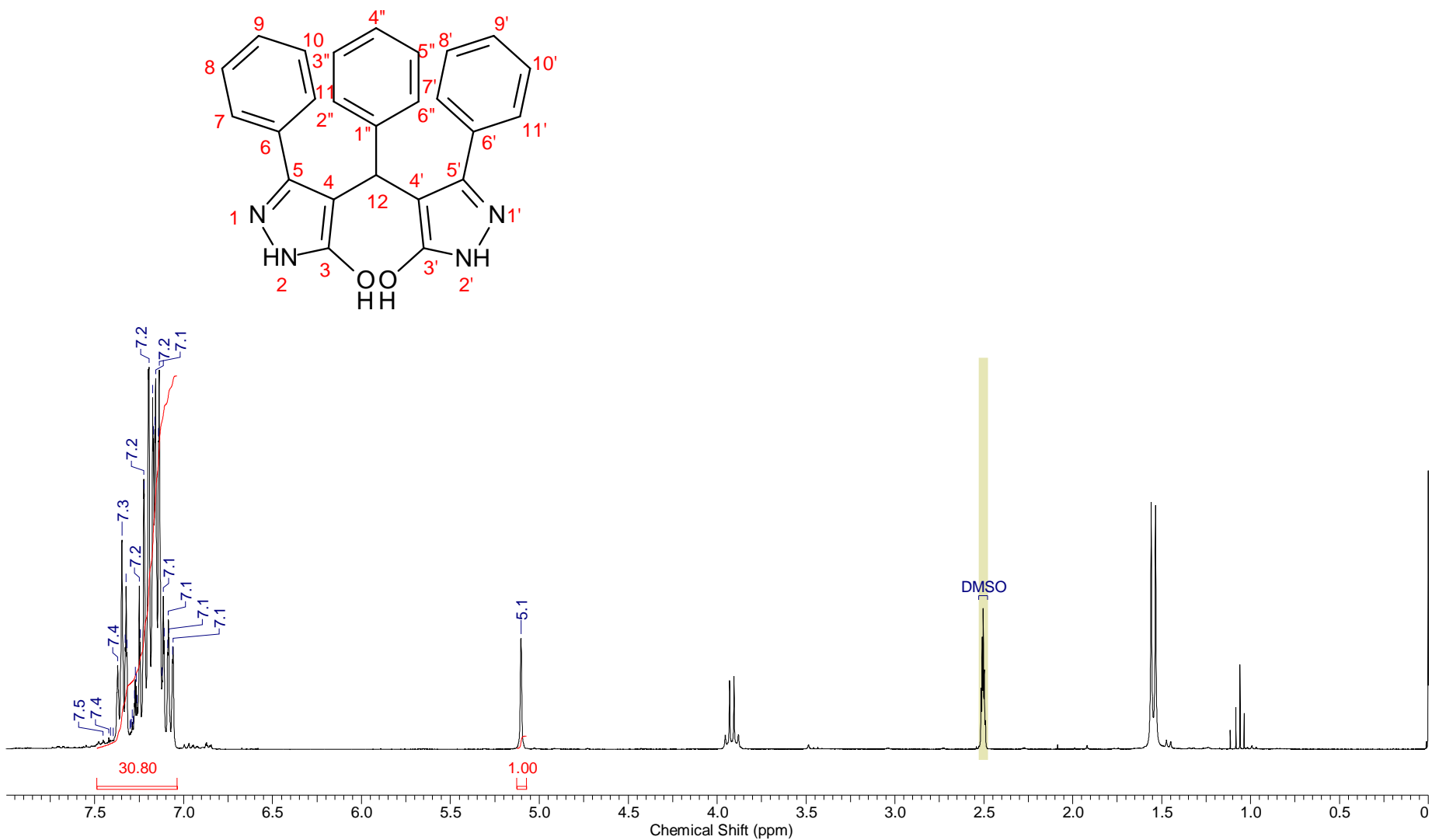


Figura II-11: Espectro de RMN ^{13}C (75,46MHz, DMSO- d_6) do composto **13a**.

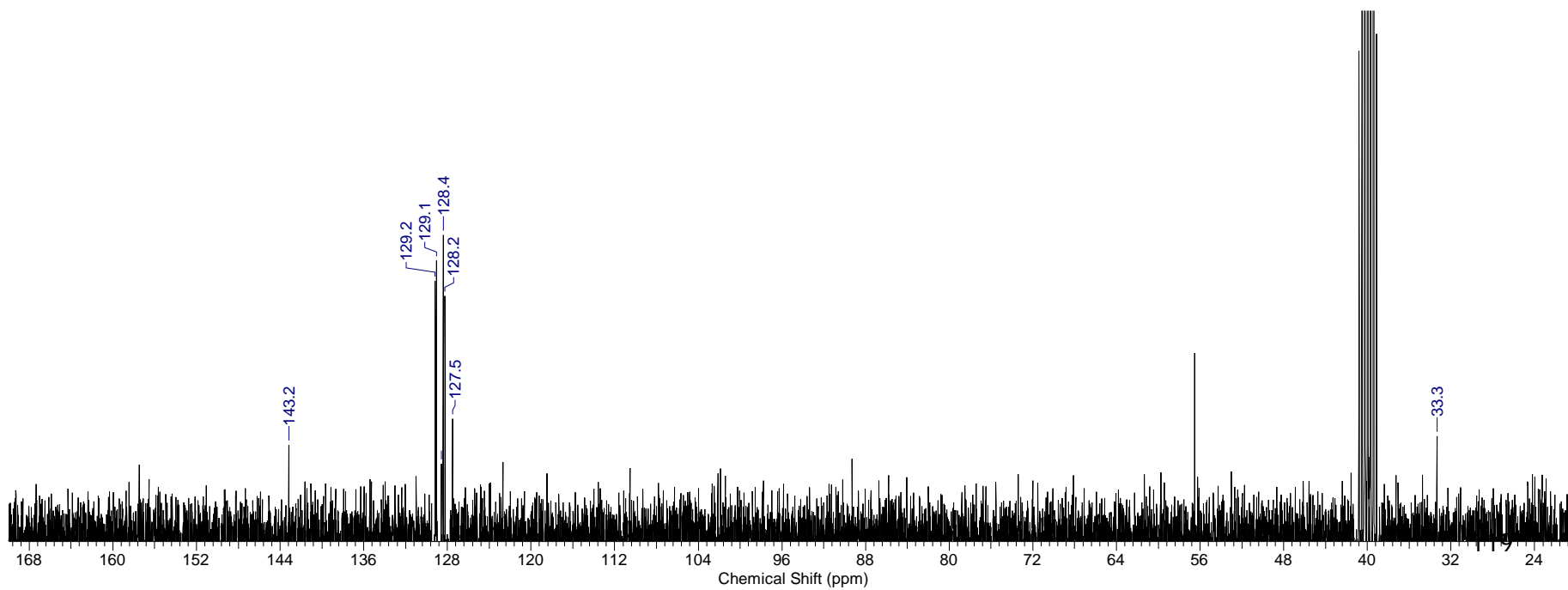
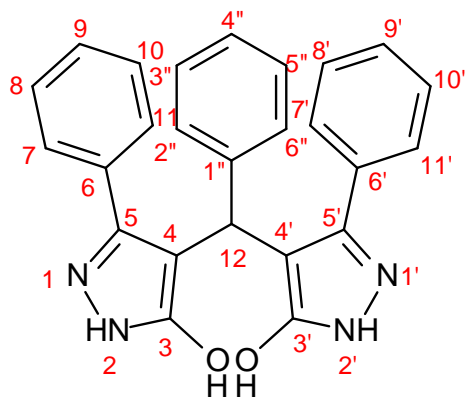


Figura II-12: Mapa de contornos H-C HMBC (300,0/75,5 MHz, DMSO-d₆) para o composto 13a.

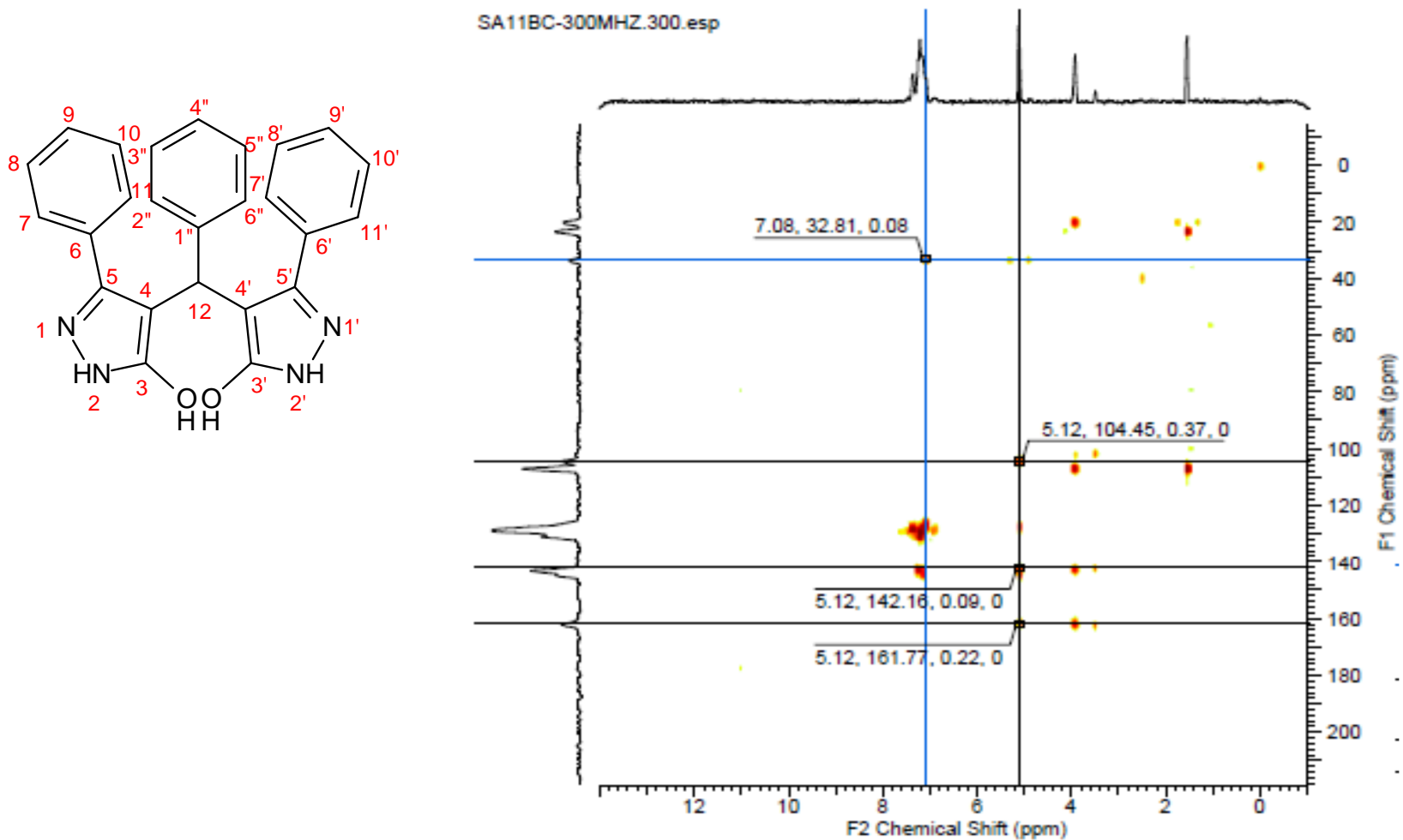
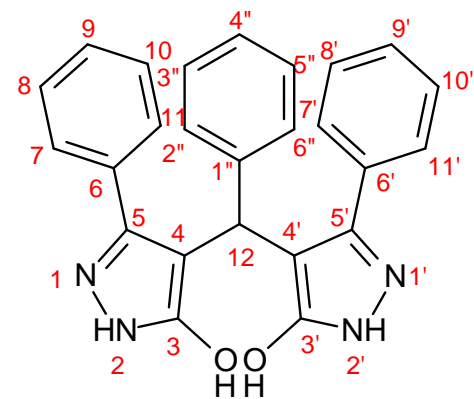
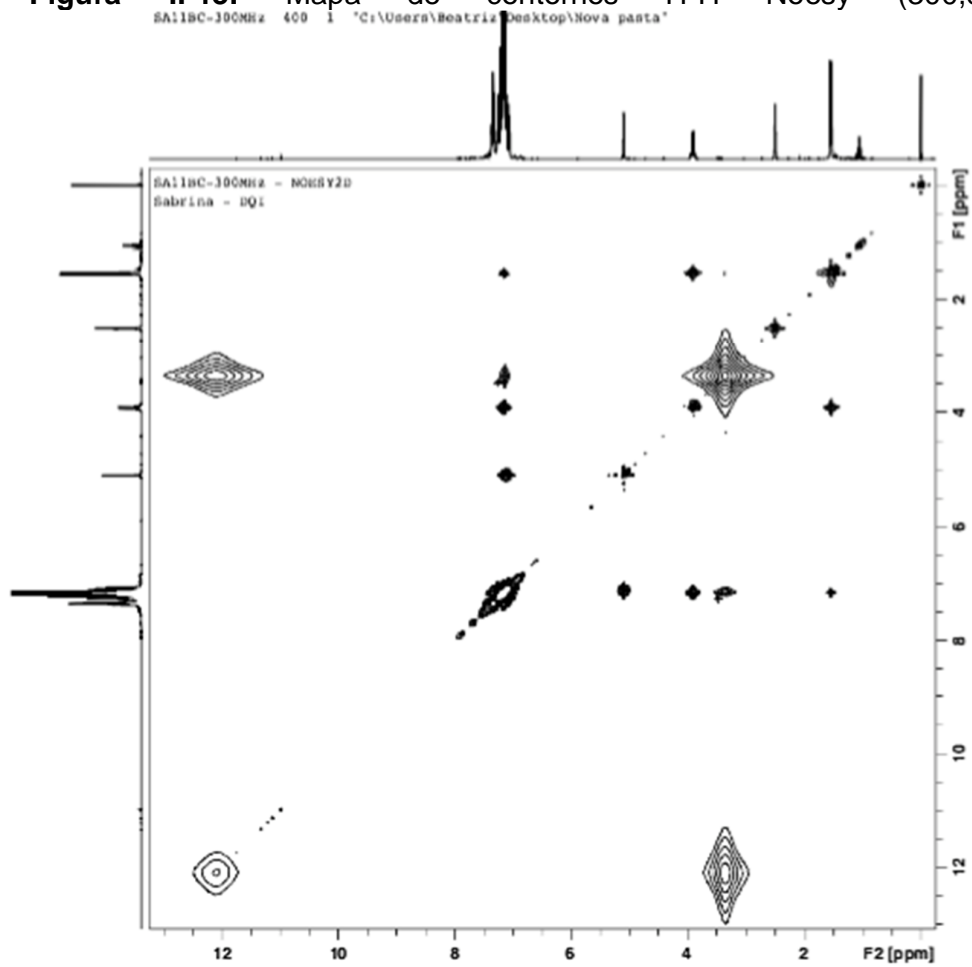


Figura II-13: Mapa de contornos H-H Noesy (300,0 MHz, DMSO-d₆) para o composto **13a**.



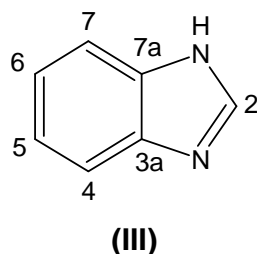
CAPÍTULO III

**Síntese e avaliação da atividade antitumoral de
derivados benzimidazólicos**

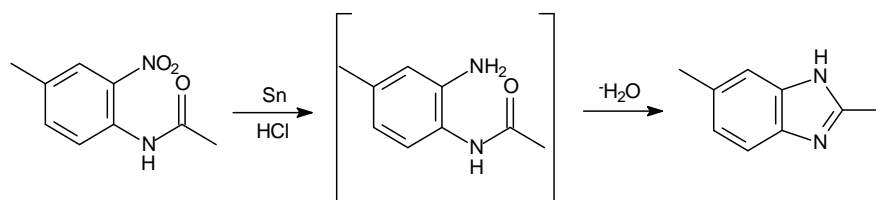
III-1. Metodologia de síntese de benzimidazóis.

O benzimidazol (**III**) (**Figura III-1**) é um dos heterociclos nitrogenados mais antigos, foi sintetizado pela primeira vez por Hoebrecke em 1972, através da redução do grupo nitro da 2-nitro-4-metilacetanilida em meio ácido, utilizando estanho como agente redutor, seguido da ciclização intramolecular do tipo 5-exo-trig, com ataque nucleofílico do nitrogênio da amina à carbonila e desidratação, para a formação do 2,6-dimetilbenzimidazol (WRIGHT et al., 1951), conforme **Esquema III-1**.

Figura III-1 Núcleo benzimidazol

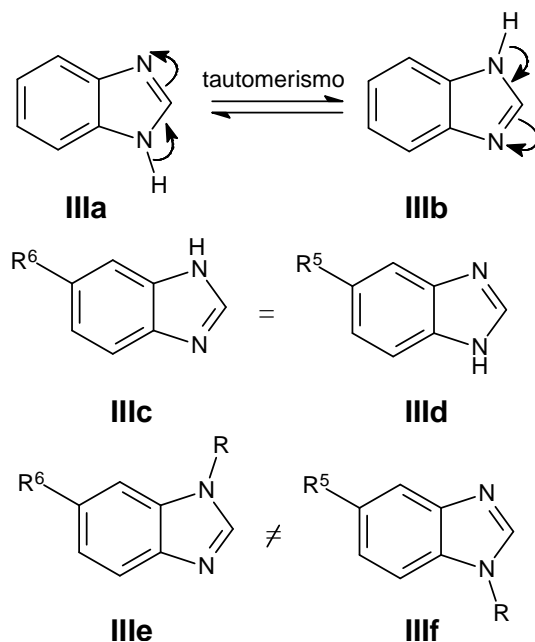


Esquema III-1 Primeira metodologia utilizada na obtenção de derivados benzimidazólicos.



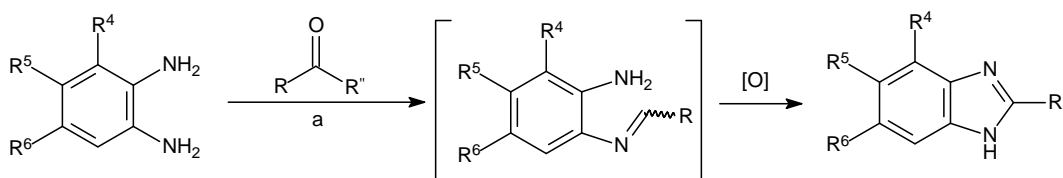
O sistema em que o anel benzênico está fundido na posição-4,5 do núcleo imidazólico é completamente planar e descrito como tautômeros (**IIIa**) e (**IIIb**) (**Figura III-2**). O tautomerismo ocorre, quer através de um processo intermolecular que envolvam duas ou mais moléculas de benzimidazol ou de interações com um solvente prótico, como a água, tornando as posições-5 e 6, quimicamente equivalentes, independente do substituinte (Figura 2, derivados **IIIc** e **IIId**). Em benzimidazóis N-substituídos (**Figura III-2**, derivados **IIIe** e **IIIf**), não ocorre tautomerismo, desta forma, os isômeros obtidos são distintos podendo ser isolados e caracterizados (KERI et al., 2015).

Figura III-2 Tautomerismo do benzimidazol.

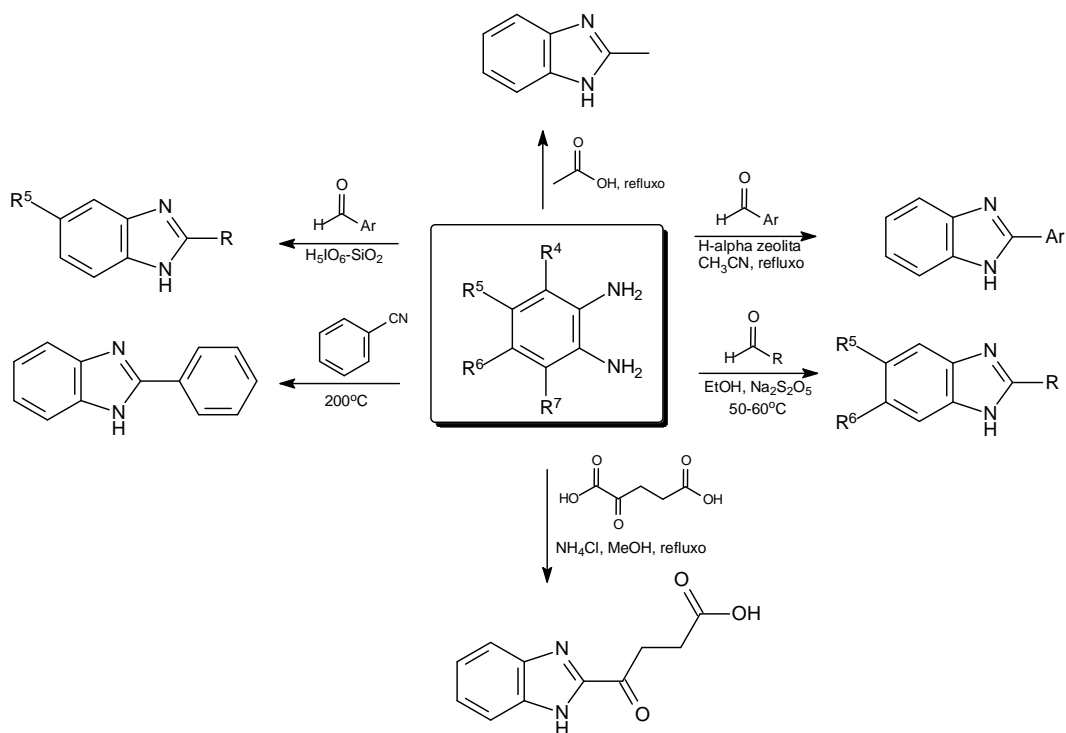


Para a obtenção de derivados benzimidazólicos substituídos na posição-2, a metodologia geral (**Esquema III-2**) envolve a reação de 1,2-diaminas aromáticas com compostos carbonílicos, em diversas condições como mostrado no **Esquema III-3**. (DUBEY et al., 2007; KAMAL et al., 2015; RASHID et al., 2015; REDDY et al., 2015; SINGLA et al., 2015; SONTAKKE et al., 2015; 2016; REDDY et al., 2016; GABALLAH et al., 2016).

Esquema III-2 Metodologia geral para obtenção de derivados benzimidazólicos substituídos na posição-2.



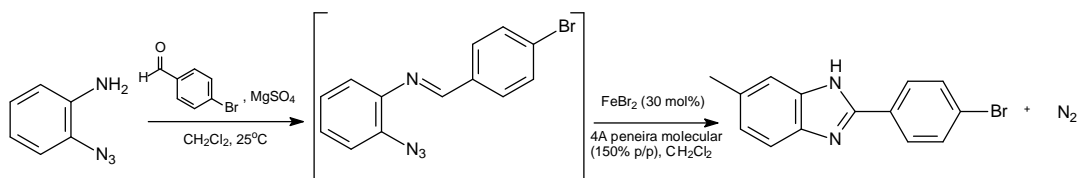
Esquema III-3 Algumas das metodologias mais utilizadas na obtenção de derivados benzimidazólicos substituídos na posição-2.



Outras aminas como azido-anilina ou bromoanilina, foram propostas como adaptação do método usual, apresentadas a seguir nos trabalhos de Shen e Driver (2008) e Behrouz (2016).

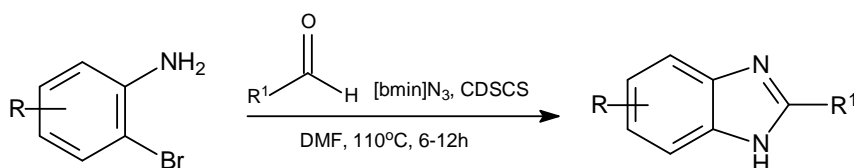
Shen e Driver (2008) sintetizaram uma série de 2-aryl-benzimidazois a partir da reação da 2-azido-anilina com aldeídos aromáticos, via a formação de um intermediário imínico, o qual sofre ciclização intramolecular na presença de brometo ferroso como catalisador e peneira molecular (**Esquema III-4**).

Esquema III-4 Benzimidazol obtido por Shen e Driver (2008)



Behrouz (2016) desenvolveu um método “one-pot” eficiente na obtenção de derivados benzimidazólicos substituídos na posição-2, a partir do tratamento de diversas 2-bromoanilinas com aldeídos, utilizando o líquido iônico [bmim]N₃ (azeto de 1-butil-3-metilimidazólio), em DMF a 110°C, na presença sulfato de sílica cuproso dopado com cobre (CDSCS), como um nano-catalisador heterogêneo (**Esquema III-5**). Os derivados foram obtidos em ótimos rendimentos que variaram de 80 a 91%.

Esquema III-5 Método “one-pot” na obtenção de derivados benzimidazólicos substituídos na posição-2



R = H, Me, Cl, CO₂Me ; R = alquil, aril

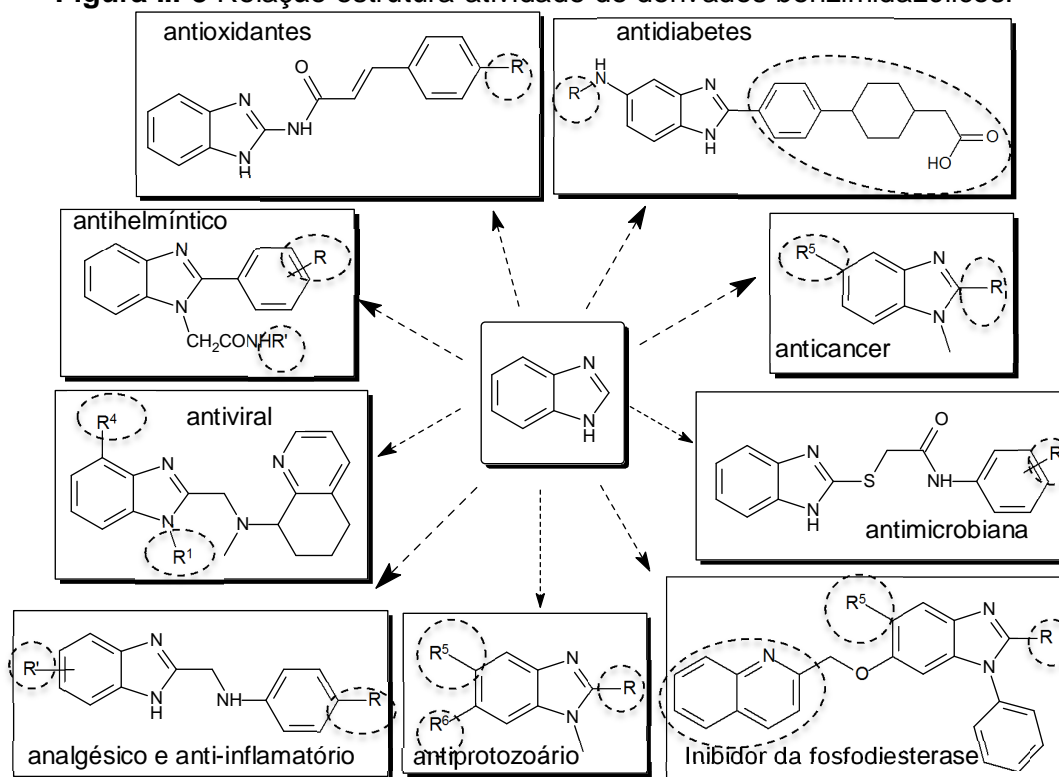
III-2. Atividade Biológica de Benzimidazóis

O núcleo benzimidazólico é um componente chave em várias moléculas biologicamente importantes, abrangendo um amplo espectro de atividades como antiviral (TONELLI et al., 2010), antimicrobiana (JOSHI e PARIKH, 2014; WUBULIKASIMU et al., 2013), antidiabetes (KWAK et al., 2013), inibidora da fosfodiesterase (HAMAGUCHI et al., 2013), analgésico e anti-inflamatório (EL-NEZHAWY et al., 2013), cardiovascular (GUNGOR et al., 1992), antiprotozoário (SKEDEL et al., 2011), (VALDEZ-PADILHA et al., 2009), anti-helmíntico (SAWANT e KAWADE, 2011), inibidora da secreção gástrica (SIH et al., 2010) e atividade antitumoral (GANDHI e BURGER, 2009; REDDY et al., 2015; 2016; SINGLA, LUXAMI E PAUL, 2015) que será apresentada com detalhes no tópico III.2.1.

Um estudo de relação estrutura-atividade apresentado por Yadav e Ganguly (2015) na forma de revisão, cita as principais modificações que caracterizam o perfil biológico que os derivados benzimidazólicos apresentam. A

presença de grupo ligante na posição-4 e -2 e a substituição em N-1 definem o perfil dos principais derivados que apresentaram atividade antiviral, enquanto que, substituintes nas posições-2 e -6 foram comuns para contribuir para a atividade antidiabetes. Outros efeitos de modificações estruturais no núcleo benzimidazólico comum em derivados com a mesma atividade biológica é mostrado na **Figura III-3**.

Figura III-3 Relação estrutura-atividade de derivados benzimidazólicos.



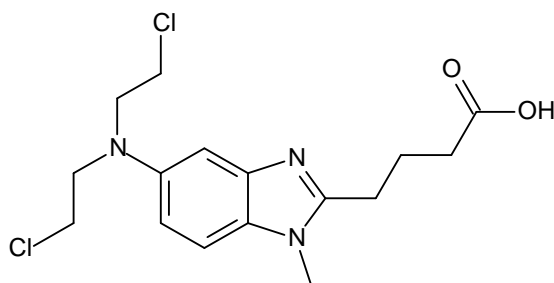
III.2.1 Atividade antitumoral

Como citado, a busca por novos medicamentos com potencial antitumoral é crescente visto a proporção que esta doença vem alcançando. Com este propósito, diversos derivados contendo o núcleo benzimidazólico foram sintetizados e avaliados frente a linhagens de células cancerígenas. (GANDHI e BURGER, 2009; REDDY et al., 2015; 2016; SINGLA, LUXAMI E PAUL, 2015).

A bendamustina, é o quimioterápico mais importante contendo o núcleo benzimidazol (**Figura III-4**). Tem ação alquilante interferindo no DNA da célula

(LISSITCHKOV et al, 2006; GANDHI e BURGER, 2009). Este quimioterápico é utilizado no tratamento de leucemia linfocítica crônica (LLC), o qual tem sido comercializado na Europa desde 2009 e nos Estados Unidos desde 2010 (WHO, 2015), e está inserido na lista de medicamentos essenciais da medicina pela Organização Mundial da Saúde (OMS). No Brasil, a Anvisa estuda a liberação deste quimioterápico para o tratamento de LLC (Anvisa, 2016). O núcleo central da bendamustina é um anel heterocíclico de benzimidazol tendo uma cadeia lateral bis(2-cloroetil)amina na posição-5, substituinte ácido butírico na posição-2 e grupo N-metil.

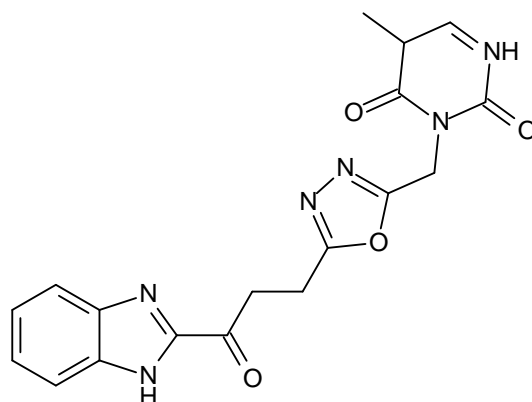
Figura III.4 Estrutura da bendamustina



Com o advento da bendamustina, os estudos na busca de agentes antitumorais contendo o núcleo benzimidazol foram intensificados. Em uma revisão publicada por Keri et al. (2015) foram relatados 47 trabalhos (2008-2013) contendo derivados benzimidazólicos com diferentes substituintes e atividade antitumoral. Os principais trabalhos desenvolvidos nos últimos anos serão apresentados a seguir e revelam a diversidade e a potencialidade do núcleo benzimidazol na atividade antiproliferativa, frente a diversas células de câncer.

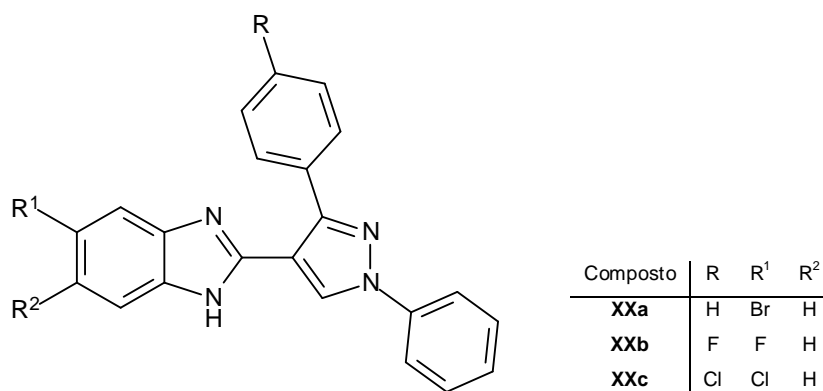
Com base no núcleo heterocíclico da bendamustina, Rashid et al. (2015) obteve três séries de derivados do benzimidazol. Para o desenho da molécula alvo, o anel benzimidazólico da bendamustina foi mantido e o grupo bis(2-cloroetil)amina ou o ácido butanóico foram substituídos com vários núcleos biologicamente ativos, tais como oxadiazol, tiadiazol, e triazolotiadiazina, no intuito de obter novos agentes citotóxicos com maior eficácia e segurança. O derivado apresentando o anel oxadiazol (**Figura III-5**) foi o mais ativo com GI_{50} na faixa de 0,09-16,2 μ M para todas as linhagens de células testadas.

Figura III-5 Derivado mais ativo obtido por Rashid et al. (2015).



O efeito da hibridização do núcleo benzimidazólico com diferentes núcleos heterocíclicos foi também explorada com sucesso em vários estudos relatados na literatura. Benzimidazóis contendo o núcleo pirazoil, por exemplo, foram obtidos por Reddy et al. (2015) e avaliados quanto ao seu potencial antiproliferativo contra três linhagens de células tumorais humanas - pulmão (A549), mama (MCF-7), e cervical (HeLa). Dentre a série dos quarenta compostos sintetizados, três deles (**XXa**, **XXb**, e **XXc**, **Figura III-6**) mostraram potente inibição de crescimento contra todas as linhagens de células testadas, com valores de IC_{50} na faixa de 0,83 a 1,81 μ M.

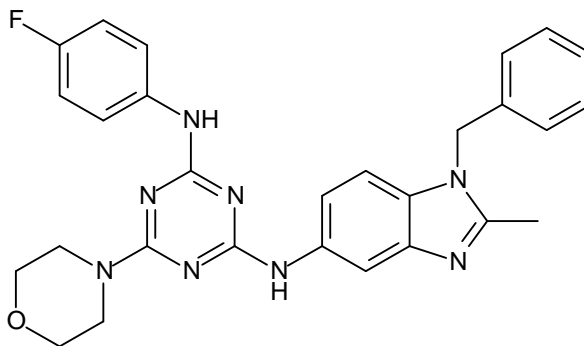
Figura III-6 Derivados mais ativos da série obtida por Reddy et al. (2015)



Dentro deste enfoque, Singla, Luxami e Paul (2015) sintetizaram derivados benzimidazólicos contendo o núcleo triazina, com rendimentos de 26 a 96%, os quais foram avaliados quanto a atividade antiproliferativa frente a mais

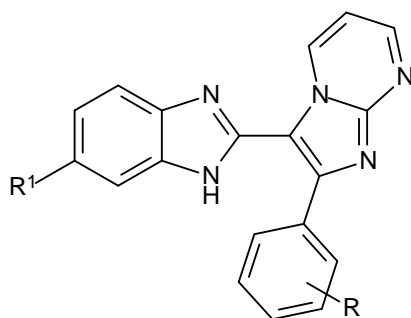
de 60 linhas de células humanas de câncer. O derivado mais ativo, cuja estrutura está mostrada na **Figura III-7**, apresentou valores de GI₅₀ inferiores a 3,71 μM frente a 9 linhagens de células. Estudos de mecanismo de ação indicaram que os compostos sintetizados apresentam fortes propriedades de interação com o DNA.

Figura III-7 Derivado mais ativo sintetizado por Singla, Luxami e Paul (2015)



Uma série de imidazopirimidina-benzimidazóis (**Figura III-8**) sintetizados no trabalho de Kamal et al. (2015) apresentaram de moderada a excelente atividade citotóxica contra as linhagens celulares de câncer cervical (HeLa), pulmão (A549), próstata (DU-145) e melanoma (B-16). Dentre os derivados testados, os compostos **XXIa** e **XXIb** foram os mais ativos com IC₅₀ de 2,57 (HeLa); 1,48 (A549); 7,08 (DU-145); 3,63 μM (B-16) e 2,25 (HeLa); 1,92 (A549); 2,34 (DU-145) e 10,47 μM (B-16) respectivamente.

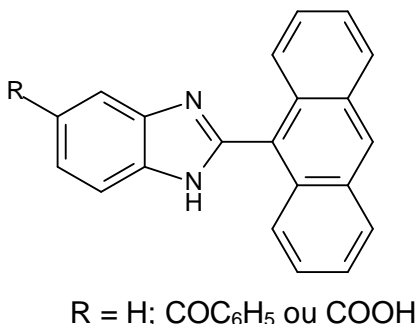
Figura III-8 Derivados mais ativos contra as linhagens celulares de câncer cervical (HeLa), pulmão (A549), próstata (DU-145) e melanoma (B-16) obtidos por Kamal et al. (2015).



Composto	R	R ¹
XXIa	4-OCH ₃	CH ₃
XXIb	H	H

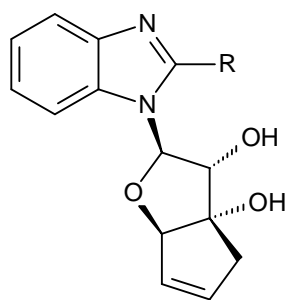
Com o propósito de avaliar o efeito de substituintes na atividade antitumoral, Sontakke et al. (2015) sintetizaram 2-antril benzimidazóis (5-7, **Figura III-9**) sem substituinte e com os substituintes carboxila e benzoíla na posição-5. Os derivados sintetizados apresentaram atividade antiproliferativa contra células MCF-7 (câncer de mama) e HL-60 (leucemia promielocítica aguda), exibindo IC_{50} na faixa de 15,15 a 23,23 μ M. Através dos estudos de interação com DNA, utilizando ensaio de intercalação de brometo de etídio, foi proposto que os compostos com R = H; COC_6H_5 ou $COOH$ (**Figura III-9**) interagem com o DNA através da superfície de ligação e não interagem através da intercalação. Este modo de interação se deve à planaridade da molécula, podendo ocorrer impedimento na intercalação de um anel de antraceno com as bases de DNA.

Figura III-9 Derivados 2-antrilbenzimidazóis ativos obtidos por Sontakke et al. (2015)



Dando continuidade ao trabalho anterior na busca por derivados benzimidazólicos com maior atividade antitumoral, Sontakke et al. (2016) realizaram a síntese de nucleosídeos bicíclicos de benzimidazol derivados da D-glucose. A atividade antiproliferativa destes nucleosídeos foi testada contra linhagens de células de câncer de mama (MCF-7 e MDA-MB-231), sendo que os valores de IC_{50} observados para os compostos com os grupos R= H; Cl ou CH_3 (**Figura III-10**) foram menores que os observados para a doxorrubicina, quimioterápico padrão, sugerindo uma potente atividade para estas moléculas.

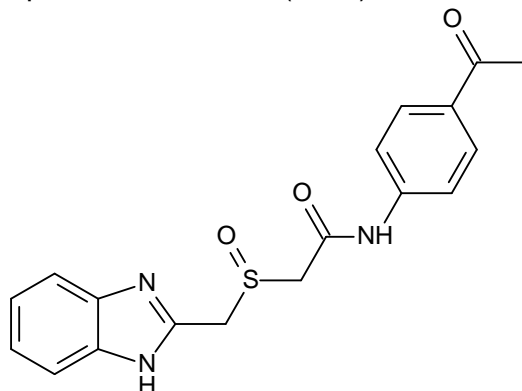
Figura III-10 Derivados de nucleosídeos benzimidazólicos obtidos por Sontakke et al. (2016).



R= H; Cl ou CH₃

Uma nova série de sulfureto e sulfóxido derivados do benzimidazol foram relatados por Gaballah et al. (2016). O composto mostrado na **Figura III-11**, apresentou potência semelhante à doxorrubicina (quimioterápico padrão) com IC₅₀ de 4,1, 4,1 e 5,0 µg.mL⁻¹ contra IC₅₀ de 4,2, 4,9 e 6,1 µg.mL⁻¹ do padrão, frente as linhagens de células HepG2 (câncer de fígado) , MCF-7 (câncer de mama), e A549 (câncer de pulmão), respectivamente. Em contraste, nenhum dos compostos mostrou atividade contra células de câncer da próstata (PC3). A análise da relação estrutura-atividade indicou que os derivados de sulfóxido foram mais potentes do que os sulfuretos correspondentes.

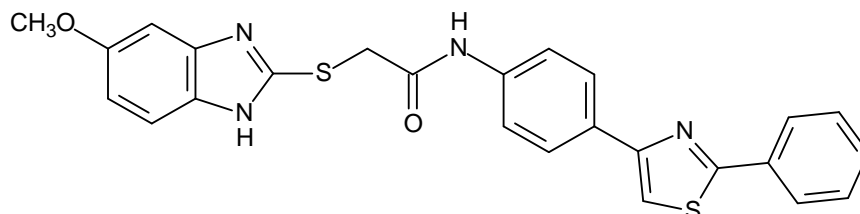
Figura III-11 Derivado mais potente frente as linhagens de células HepG2 MCF-7 e A549, obtido por Gaballah et al. (2016).



Ozkay et al. (2016) demonstraram em seu trabalho que derivados 2-[(5-substituído-1H-benzimidazol-2-il)tio]-N-[4-[2-feniltiazol-4-il]fenil]acetamida exibiram atividade citotóxica significativa frente a células de câncer de pulmão (A549, células não pequenas) e adenocarcinoma colorretal (Caco2). O composto

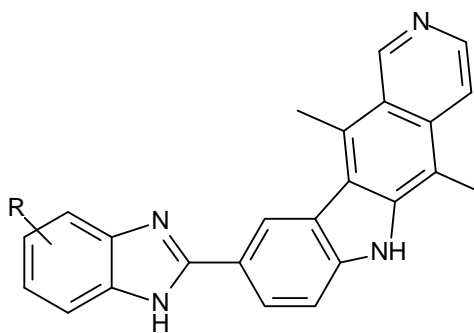
com o grupo metóxila na posição-5 do núcleo benzimidazol (**Figura III-12**) exibiu citotoxicidade seletiva para ambas as células de câncer, sendo o derivado mais ativo da série.

Figura III-12 Composto mais ativo da série de Ozkay et al. (2016)



No trabalho recentemente relatado por Reddy et al. (2016), derivados benzimidazólicos substituídos na posição-2 pela elipticina (alcalóide pirido[4,3-b]carbazólicos) e com diferentes substituições na posição-5 ou 6 (**Figura III-13**) foram avaliados frente a linhagens de células de câncer de mama (ZR-75-1 e MCF-7), cervical (HeLa) e pulmão (A-549). Observou-se que todos os compostos sintetizados **XXIIa-j** (**Figura III-13**) mostraram atividade antiproliferativa significativa com valores de GI₅₀ de 0,1-34,6 μM.

Figura III-13 Série de derivados obtidos por Reddy et al. (2016) com atividade antiproliferativa.



Composto	R	Composto	R	Composto	R
XXIIa	H	XXIIe	5-Cl	XXIli	5,6-Cl
XXIIb	5-OCH ₃	XXIIf	5-NO ₂	XXIIj	5,6-NO ₂
XXIIc	5,6-OCH ₃	XXIIg	5-F		
XXIId	5-CF ₃	XXIIh	5-Br		

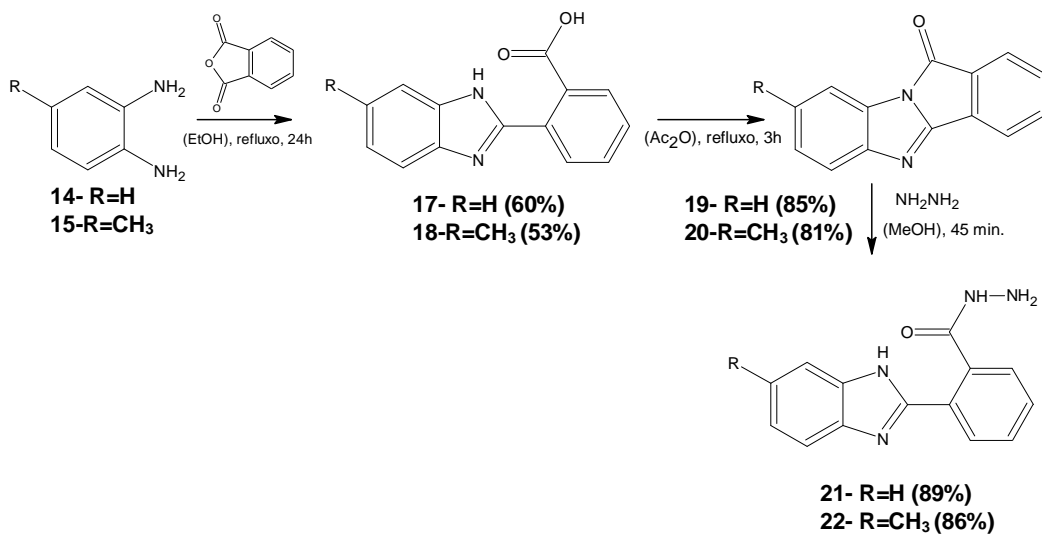
III-3 Resultados e Discussão

III-3.1 Otimização dos rendimentos dos derivados 2-arylidenocarboidrazida-benzimidazólicos 24a-e e 25a-e.

No trabalho realizado anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa (TANABE, 2012) foram sintetizados os derivados benzimidazólicos **24a-e** e **25a-e**, cujas estruturas estão apresentadas no **Esquema III-6**. A metodologia utilizada levou à obtenção dos compostos desejados, no entanto, a mesma não exibiu bons rendimentos na última etapa da rota sintética empregada. Assim, neste trabalho realizamos estudos visando melhorar os rendimentos desta etapa, de forma a viabilizar a obtenção de maior quantidade de material para efetivação de novos estudos de atividade biológica.

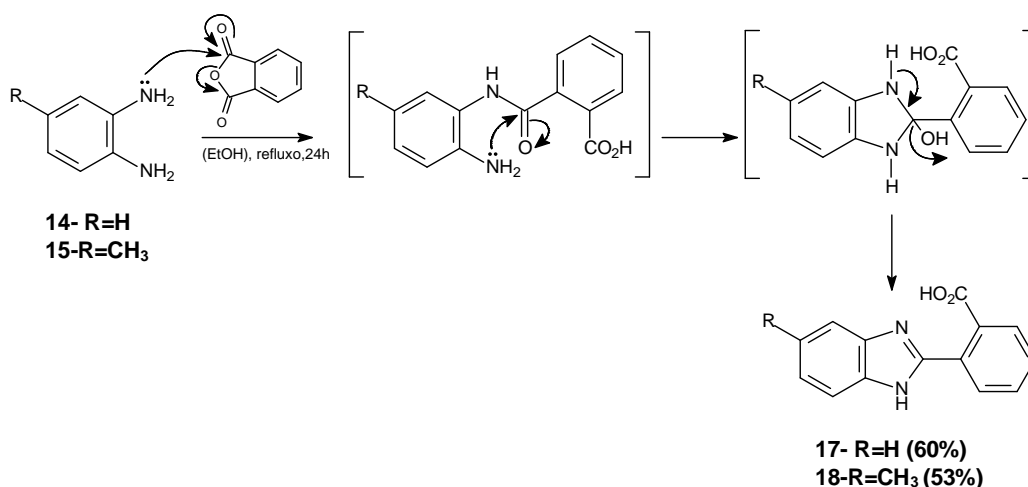
Desta forma, repetimos a rota sintética estabelecida no trabalho de Tanabe (2012) até a etapa de síntese dos intermediários benzoidrazidas (**21** e **22**). Discutiremos inicialmente a síntese dos intermediários **17** a **22** cuja rota está apresentada no **Esquema III-6**. Na sequência será apresentada a comparação entre as metodologias A e B, para obtenção dos derivados (**24a-e** e **25a-e**) contendo o grupo arilidenocarboidrazida na posição-2 do benzimidazol (**Tabela III-1**).

Esquema III-6 Rota de síntese para obtenção dos derivados benzimidazólicos **21** e **22**.



Para a síntese das 2-(1'*H*-benzimidazol-2'-il) benzoidrazidas (**21** e **22**) inicialmente, a 2-fenilenodiamina (**14**) ou 4-metil-2-fenilenodiamina (**15**) foram tratadas com anidrido ftálico (**16**) em etanol sob refluxo por 24 horas, via ataque nucleofílico da amina sobre a carbonila do anidrido ftálico seguida de ciclodesidratação (**Esquema III-7**), fornecendo os respectivos benzimidazóis (**17** e **18**) com 60 e 53% de rendimento, respectivamente.

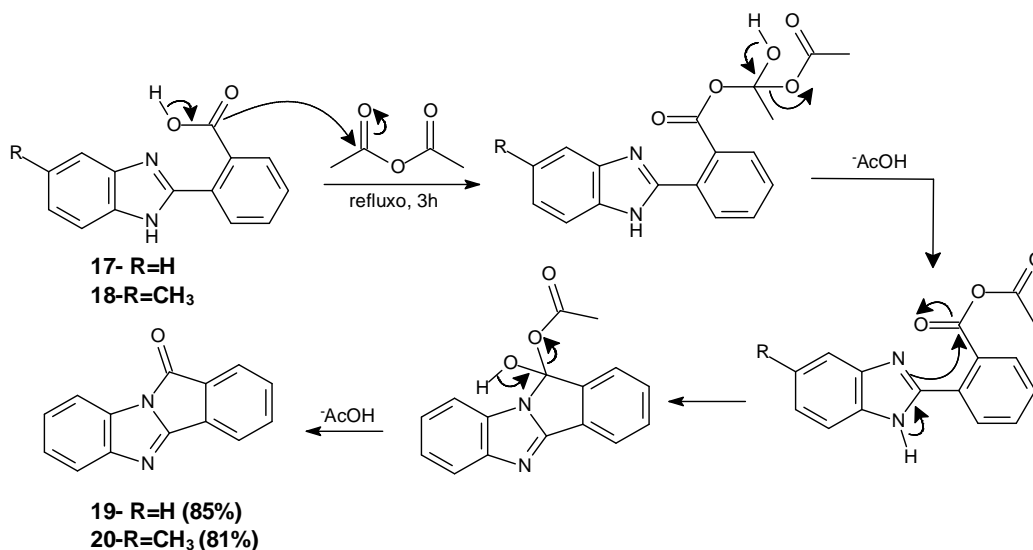
Esquema III-7 Mecanismo proposto para obtenção dos derivados **17** e **18**.



Para a obtenção das hidrazidas **21** e **22** foi necessário ativar o grupo carboxila dos benzimidazóis **17** e **18** devido a baixa reatividade do grupo carboxílico frente a reações de substituição nucleofílica, no caso com a hidrazina. O hidrogênio ligado a N-1 do núcleo benzimidazólico tem caráter ácido, este fato torna especial a tentativa de ativação do grupo carboxílico.

Desta forma, foi proposta a ativação do grupo carboxílico com concomitante auto-proteção do nitrogênio imidazólico, a partir da acilação intramolecular do nitrogênio imidazólico com o grupo ácido carboxílico, método descrito por Meyer (2003) e utilizado com sucesso por Tanabe (2012). Empregando esta metodologia foi possível preparar os derivados **19** e **20**, pelo tratamento de **17** e **18** com anidrido acético por 3h, sob refluxo (110°C), via ciclização seguida de desidratação do tipo 5-exo-trig (**Esquema III-8**), com rendimentos de 85 e 81%, respectivamente.

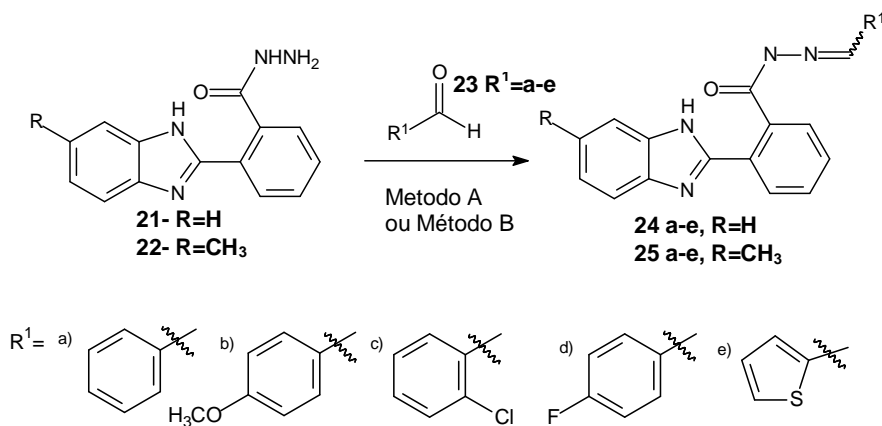
Esquema III-8 Mecanismo proposto para obtenção dos derivados 19 e 20.



As benzoidrazidas (**21** e **22**) foram obtidas pelo tratamento dos derivados **19** e **20** com uma solução de hidrazina hidratada 51% a temperatura ambiente com rendimento de 89 e 86% respectivamente.

A obtenção dos produtos finais, derivados 2-arylidenocarboidrazida-benzimidazólicos (**24a-e** e **25a-e**), foi possível a partir do tratamento das benzoidrazidas **21** e **22** com os respectivos aldeídos através de duas metodologias (A e B), que serão apresentadas a seguir (**Esquema III-9**).

Esquema III-9 Rota de síntese para obtenção dos derivados 2-arylidenocarboidrazida-benzimidazólicos



O método A foi aplicado no trabalho de Tanabe (2012) no qual as arilidenocarboidrazidas (**24a-e** e **25a-e**) foram obtidas pelo tratamento das 2-(1'*H*-benzimidazol-2'-il) benzoidrazidas (**21** e **22**) com excesso de aldeído de (1,5 a 4,0 equivalentes), em DMF, sob catálise de ácido acético e irradiação em micro-ondas doméstico.

Como descrito anteriormente, com o objetivo de compararmos a metodologia em micro-ondas com o método convencional utilizado pelo nosso grupo na síntese de β -carbolina N-(substituídasbenzilideno)carboidrazidas (BARBOSA et al., 2011), no presente trabalho preparamos estes compostos por meio do tratamento das hidrazidas (**21** e **22**) com 1,1 equivalentes de aldeído em etanol, sob catálise de H₂SO₄ e refluxo (Método B).

Em comparação com a metodologia em micro-ondas utilizada por Tanabe (2012), que apresentou um tempo reacional de 4-8 min. e rendimentos que variaram de 14-78% (**Tabela 05**), observamos uma maior eficiência do método utilizado neste trabalho (Método B), que forneceu rendimentos superiores (75-97%), em um tempo reacional médio de 1h, utilizando apenas 1,1 equivalente do aldeído.

Tabela III-1. Dados de rendimento e tempo reacional para os derivados 2-arilidenocarboidrazida-benzimidazólicos preparados pela Metodologia A e Metodologia B.

Composto	R	Met. A*		Met. B**	
		Rendimento (%)	Tempo (min.)	Rendimento (%)	Tempo (min.)
24a	H	46	6	85	75
24b	H	78	6	87	120
24c	H	76	4	79	40
24d	H	67	4	76	40
24e	H	62	6	86	40
25a	CH ₃	45	6	90	60
25b	CH ₃	29	6	84	60
25c	CH ₃	24	4	97	60
25d	CH ₃	14	4	75	60
25e	CH ₃	23	8	97	60

* (1.5 a 4.0 eq de aldeído; DMF; AcOH; MO); ** (1.1 eq de aldeído; EtOH; H₂SO₄; refluxo)

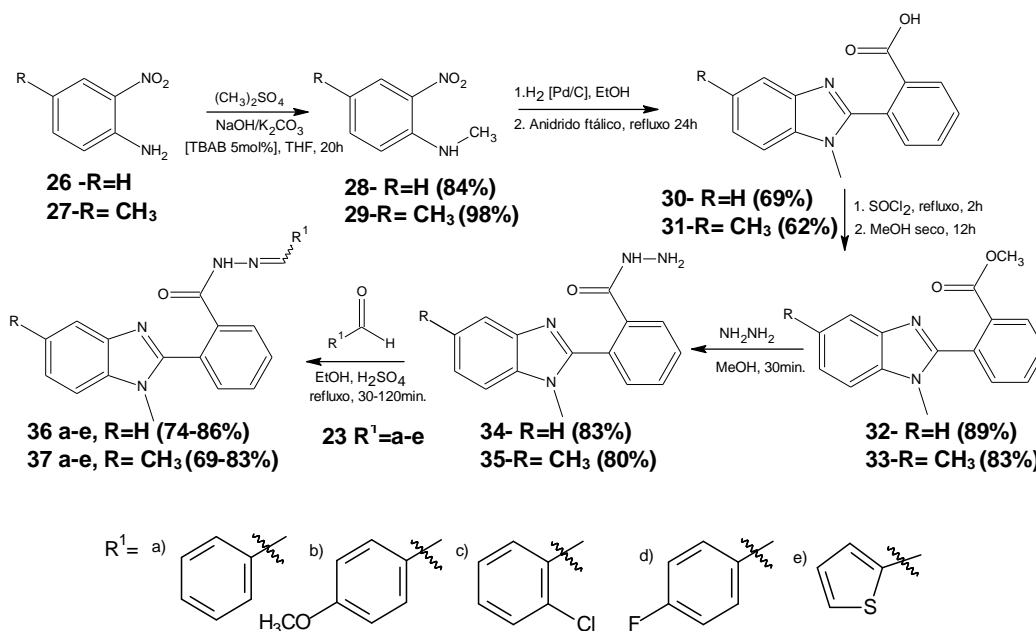
Nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C para os derivados **24a-e** e **25a-e**, foi observado a duplicidade dos picos devido à formação de isômeros geométricos, o que dificultou a atribuição de todos os deslocamentos químicos de hidrogênios e carbonos destes produtos. Apesar disso, foi possível confirmar que as reações ocorreram, devido ao acompanhamento realizado via CCD (Hexano/AcOEt 80:20), e nos espectros de RMN de ^1H , pela ausência dos sinais correspondentes aos hidrogênio do NH_2 da hidrazida, presença de sinais do hidrogênio imínico em δ 8,12 e 8,65 ppm, presença de sinais correspondente ao carbono imínico em δ 142,4 e 146,9 ppm e o pico da carbonila no RMN de ^{13}C das benzoidrazidas (**21** e **22**) que estava em δ 168,5 ppm deslocou-se para δ 170,0 ppm e δ 164,0 ppm (dois picos devido formação de isômeros).

III-3.2 Síntese e caracterização dos novos derivados 2-arilidenocarbohidrazida-benzimidazólicos 36a-e e 37a-e.

Os novos derivados preparados neste trabalho diferem dos sintetizados previamente por Tanabe (2012) (**Esquema III-9**, séries **24a-e** e **25a-e**), pela presença de um grupo metila em N-1, sendo nomeados da série V com grupo metila na posição-1 do núcleo benzimidazólico (**36a-e**) e da série VI com grupo metila nas posições-1 e -6 do núcleo benzimidazólico (**37a-e**).

A rota sintética empregada na síntese destes compostos encontra-se ilustrada no **Esquema III-10**.

Esquema III-10 Rota de síntese para obtenção dos derivados benzimidazólicos **36a-e** e **37a-e**, contendo o grupo arilidenocarboidrazida na posição-2.



Para a alquilação do nitrogênio dos derivados de anilina utilizamos uma metodologia baseada em um trabalho publicado por Ramrao et al. (1991), que descreve a monoalquilação de aminoantraquinonas através de um processo de transferência de fase (sólido-líquido). Dessa forma, o tratamento de 2-nitroanilina (**26**) ou 4-metil-2-nitroanilina (**27**) com (CH₃)₂SO₄ em THF na presença de TBAB (brometo de tetra-butilamônio) como catalisador de transferência de fase (5 mol% em relação à anilina) e de NaOH e K₂CO₃ como bases, forneceu exclusivamente os produtos monoalquilados **28** e **29** com 84 e 98% de rendimento.

Os derivados benzimidazólicos **30** e **31**, com o grupo ácido benzóico ligado ao C-2, foram obtidos através da redução, por hidrogenação catalítica, do grupo nitro dos compostos **28** e **29**, respectivamente, e posterior tratamento dos intermediários reduzidos com anidrido ftálico. O mecanismo desta reação é similar ao proposto para a síntese dos derivados **17** e **18** (**Esquema III-7**) e envolve o ataque nucleofílico do grupo amino, dos intermediários reduzidos, à carbonila do anidrido ftálico, seguido de ciclização intramolecular e desidratação.

A formação do núcleo benzimidazólico em **30** e **31** foi confirmada pela presença dos sinais dos hidrogênios aromáticos entre δ 7,20 e 7,28 ppm e sinal em δ 151,2 ppm característico do carbono C-2 do núcleo benzimidazólico, nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C respectivamente.

A baixa reatividade do grupo carboxila dos derivados benzimidazólicos **30** e **31** frente substituição nucleofílica para a obtenção das hidrazidas **34** e **35**, problema também relatado para obtenção das séries obtidas por Tanabe (2012), foi contornado com maior facilidade, devido a presença do grupo metila em N-1, realizando a esterificação destes derivados (**30** e **31**) com SOCl_2 , em metanol, fornecendo os respectivos ésteres **32** e **33** com 89 e 83% de rendimento.

No espectro de RMN de ^1H para o composto **32** (**Figura III-14**) observamos, os sinais em δ 3,61 característicos de hidrogênios do grupo metoxila. No espectro de RMN ^{13}C (**Figura III-15**) destacamos o sinal da carbonila de éster em δ 166,39 e do grupo metoxila em δ 52,8. Além dos sinais que evidenciaram a formação do derivado éster, podemos observar os sinais correspondentes aos H e C aromáticos na região de δ_{H} 7,24-8,04 e / δ_{C} 105,6-136,1 e do grupo metila em δ_{H} 3,58 e / δ_{C} 30,9.

Figura III-14: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) do composto **32**.

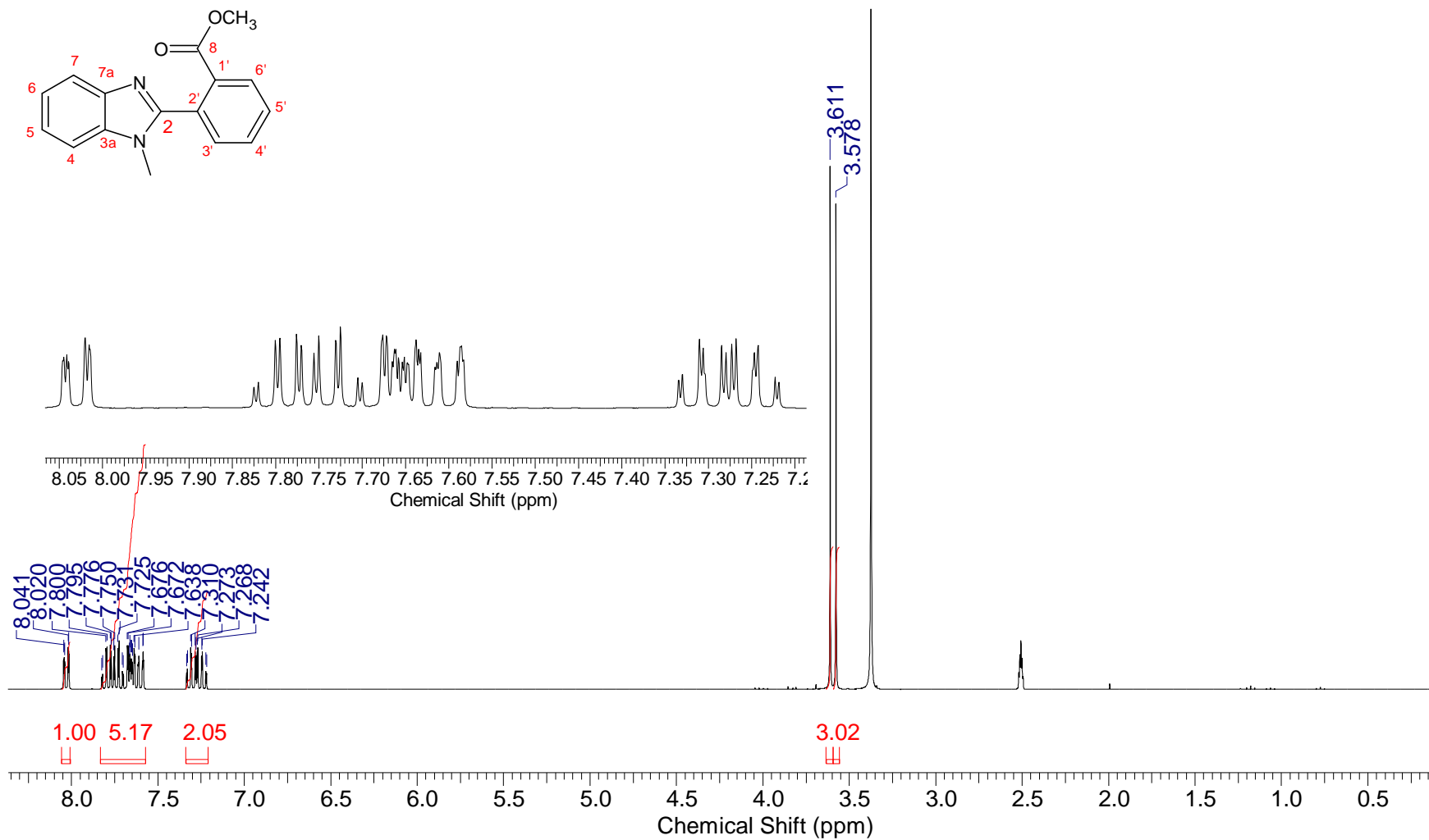
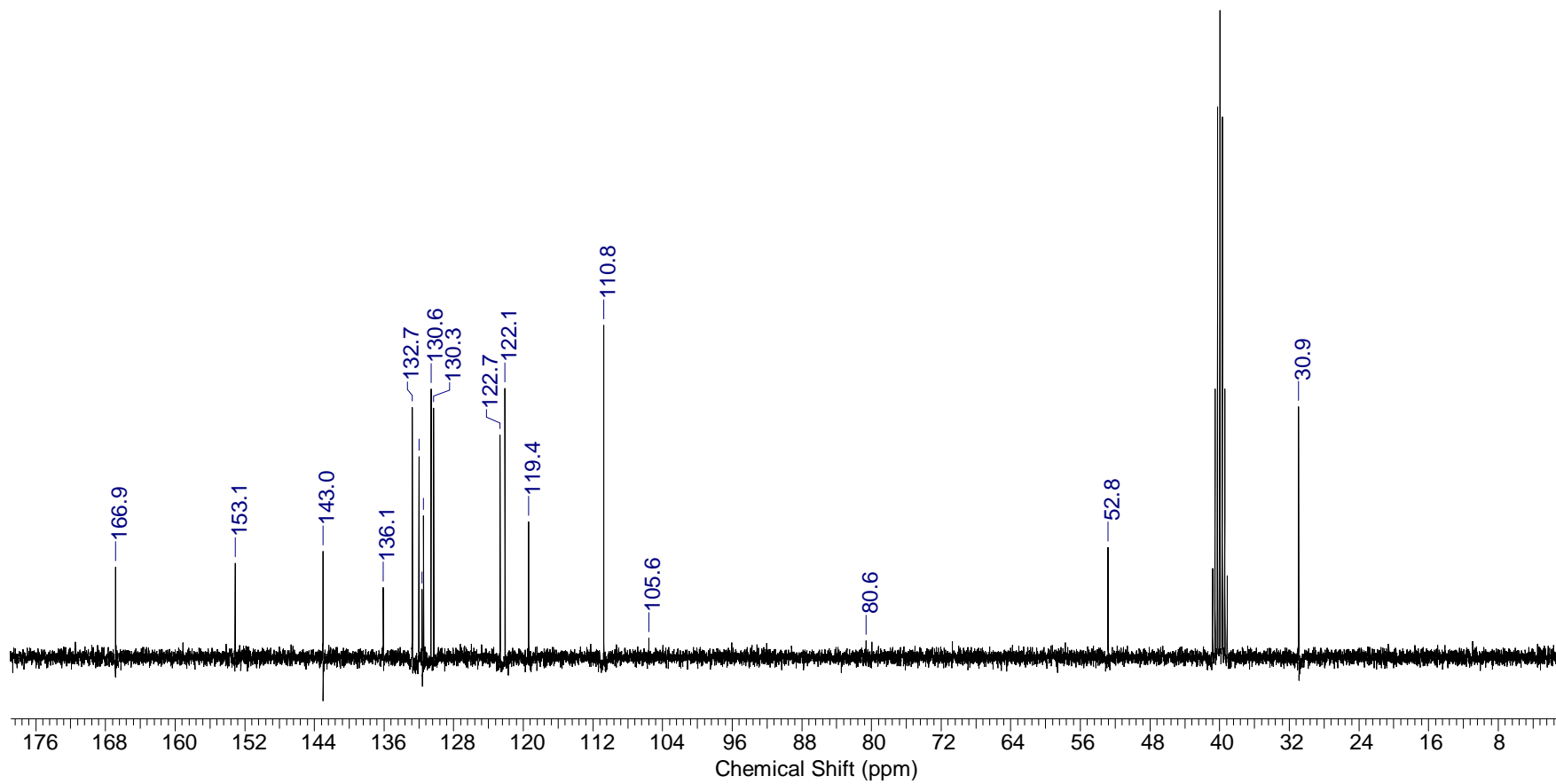


Figura III-15: Espectro de RMN ^{13}C (75,46MHz, DMSO- d_6) do composto **32**.



A preparação das carboidrazidas **34** e **35** ocorreu através do tratamento dos ésteres **32** e **33** com hidrazina monoidratada, em metanol, a temperatura ambiente, por 30 minutos via reação de substituição nucleofílica, com 83 e 80% de rendimento.

Através dos espectros de RMN de ^1H (**Figura III-17**) dos compostos **34** e **35** podemos constatar a obtenção dos mesmos, a partir da presença de simpletos largos correspondentes aos hidrogênios do grupo hidrazida em δ 4,34 (NH_2) e em δ 9,69 (NH). Nos espectros de IV para o composto **34** (**Figura III-16**), as bandas mais importantes são as do estiramento de N-H, na região de 3329-2856 cm^{-1} , e de C-O, de carbonila da hidrazida em 1662 cm^{-1} .

Figura III-16: Espectro de IV (pastilha de KBr) para o composto **34**.

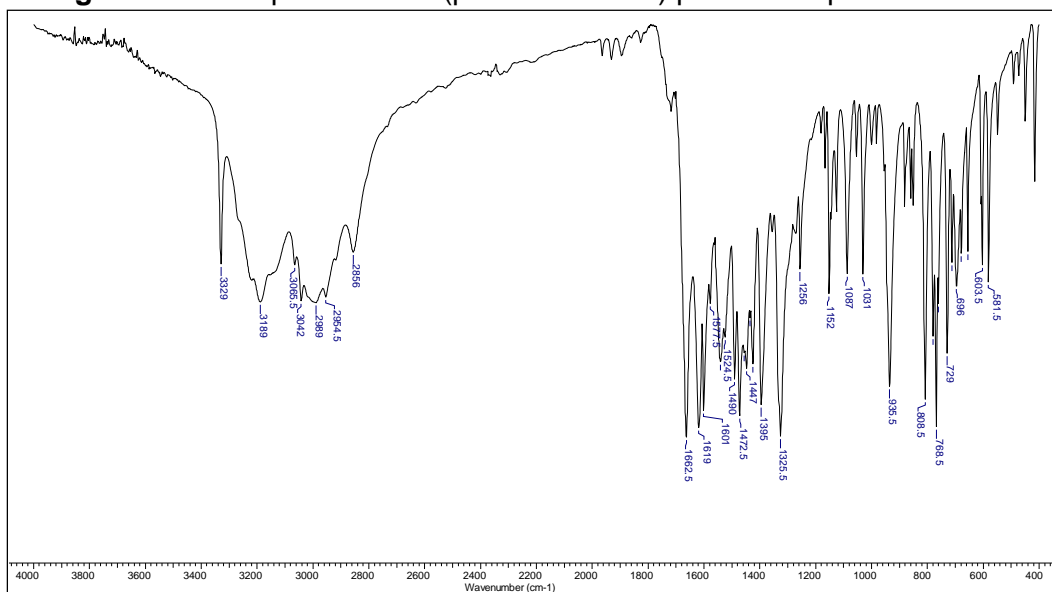
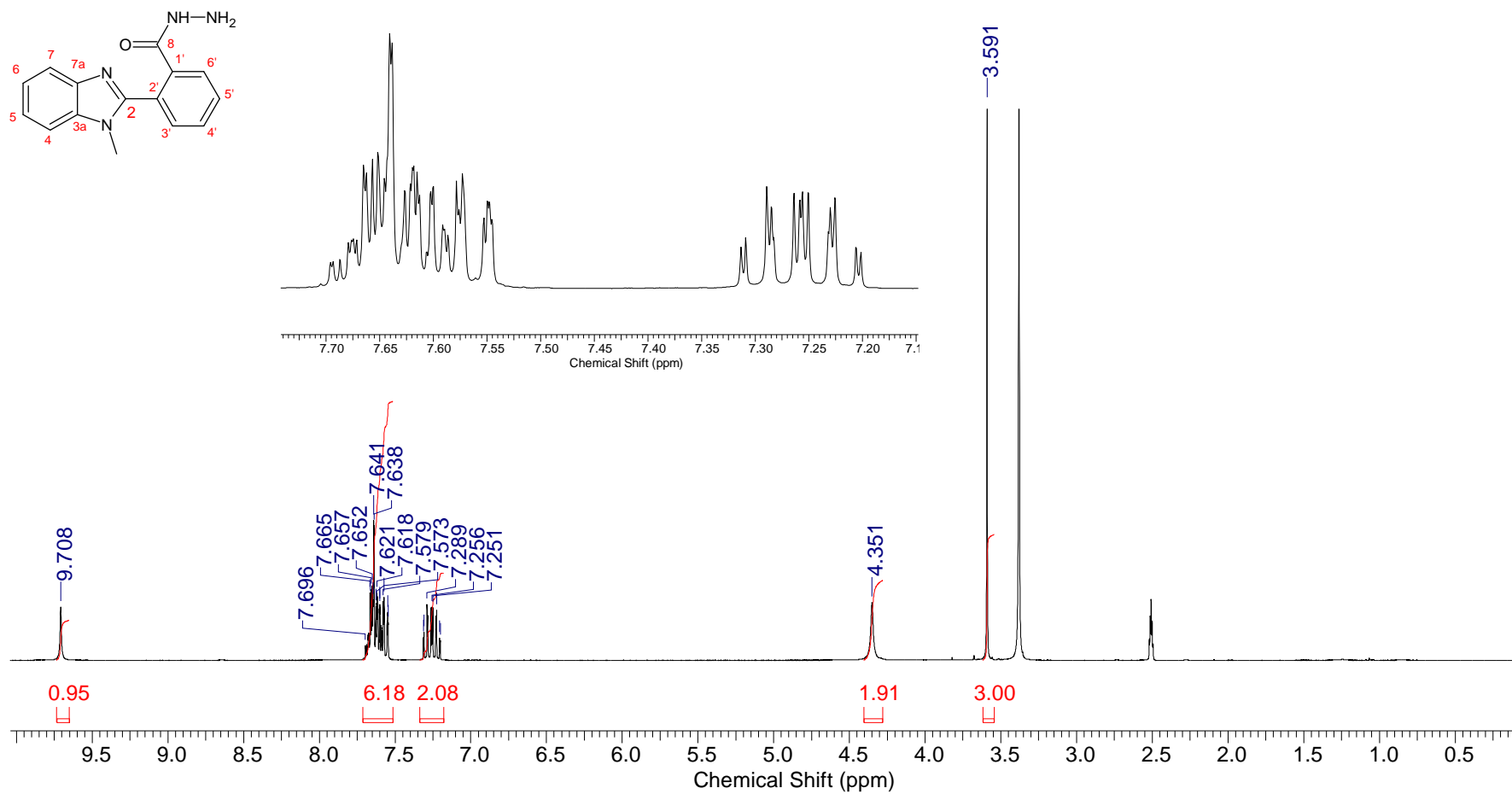


Figura III-17: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) do composto **34**.



Os derivados arilidênicos *N*-metilados (**36a-e** e **37a-e**) foram obtidos através da adaptação da metodologia utilizada por Ozkay et al. (2010) na síntese de derivados 4-arilidenocarboidrazida-benzimidazólicos, a partir do tratamento dos precursores **34** e **35** com os aldeídos apropriados (**23a-e**) em etanol, sob catálise ácida (Método B), este método demonstrou ser mais eficiente obtendo bons rendimentos 69-86%

Nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C para os derivados **36a-e** e **37a-e**, podemos observar a duplicação dos sinais, indicando a formação dos isômeros geométricos *E* e *Z* numa proporção aproximada de 7:3 em relação aos sinais do hidrogênio ligado ao nitrogênio, que confere com os sinais dos hidrogênios imínicos, porém estes por serem mais desblindados são observados numa região incomum e de fácil identificação.

A formação de isômeros na síntese de arilidenos também foi observada em outras moléculas análogas já preparadas pelo nosso grupo de pesquisa TANABE et al., 2012; ALMEIDA et al., 2015), o que tornou difícil a atribuição dos deslocamentos para todos H e C dos anéis aromáticos, fato que não interferiu na certeza da formação das moléculas alvo. A maior obtenção do isômero *E* em relação ao isômero *Z*, também observada nos trabalhos de Tanabe (2012) e Almeida (2015), é devido ao impedimento estérico ocasionado pela proximidade do grupos de maior prioridade visto no isômero *Z*.

De forma geral, os produtos obtidos (**36a-e** e **37a-e**) apresentaram padrões de sinais semelhantes nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C , estes espectros estão apresentados no anexo. Tomando como exemplo o derivado **36a**, verificou-se no espectro de RMN de ^1H (**Figura III-19**), o desaparecimento do sinal referente aos hidrogênios da hidrazida (δ 4,30) e o aparecimento dos simpletos em δ 7,80 e 8,31 correspondentes aos hidrogênios imínicos dos isômeros *Z* e *E*, respectivamente. No espectro de RMN de ^{13}C para o composto **36a** (**Figura III-20**) destacamos os sinais de δ 143,9 e 148,2 atribuídos aos carbonos imínicos dos isômeros *Z* e *E* respectivamente, sinal em δ 152,5 e 153,0 correspondente ao C-2 do núcleo benzimidazol, além do sinal da carbonila da hidrazida em δ 164,1 e 170,2. Nos espectros de IV (**Figura III-18**), observamos a banda de estiramento N-H na região de 3329-2856 cm^{-1} e C=O de carbonila da hidrazona em 1676 cm^{-1} .

Figura III-18: Espectro de Infravermelho pastilha de KBr para o composto **36a**.

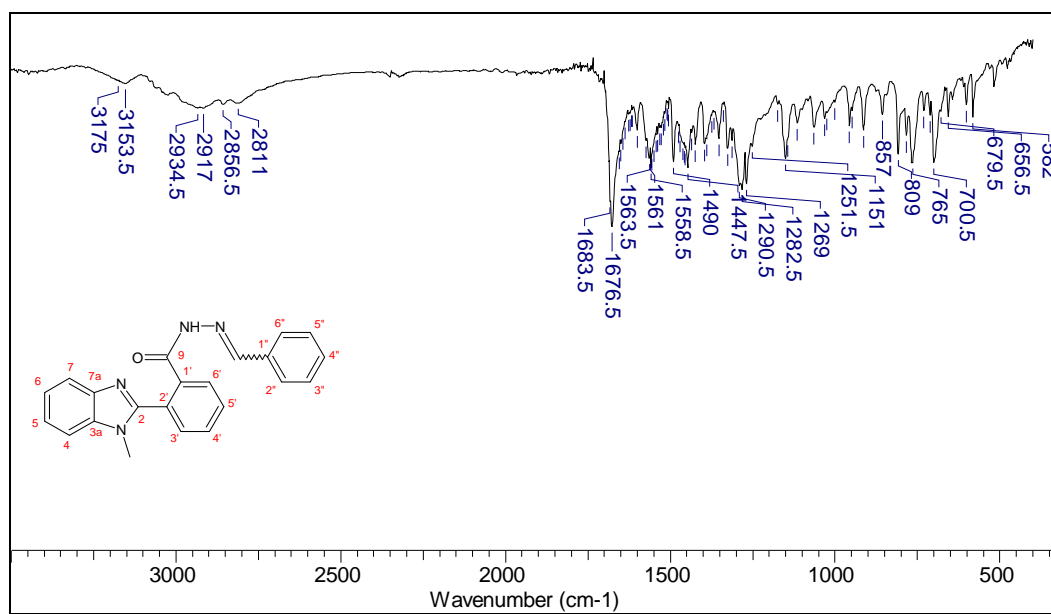


Figura III-19: Espectro de RMN ^1H (300MHz, DMSO- d_6) do composto **36a**.

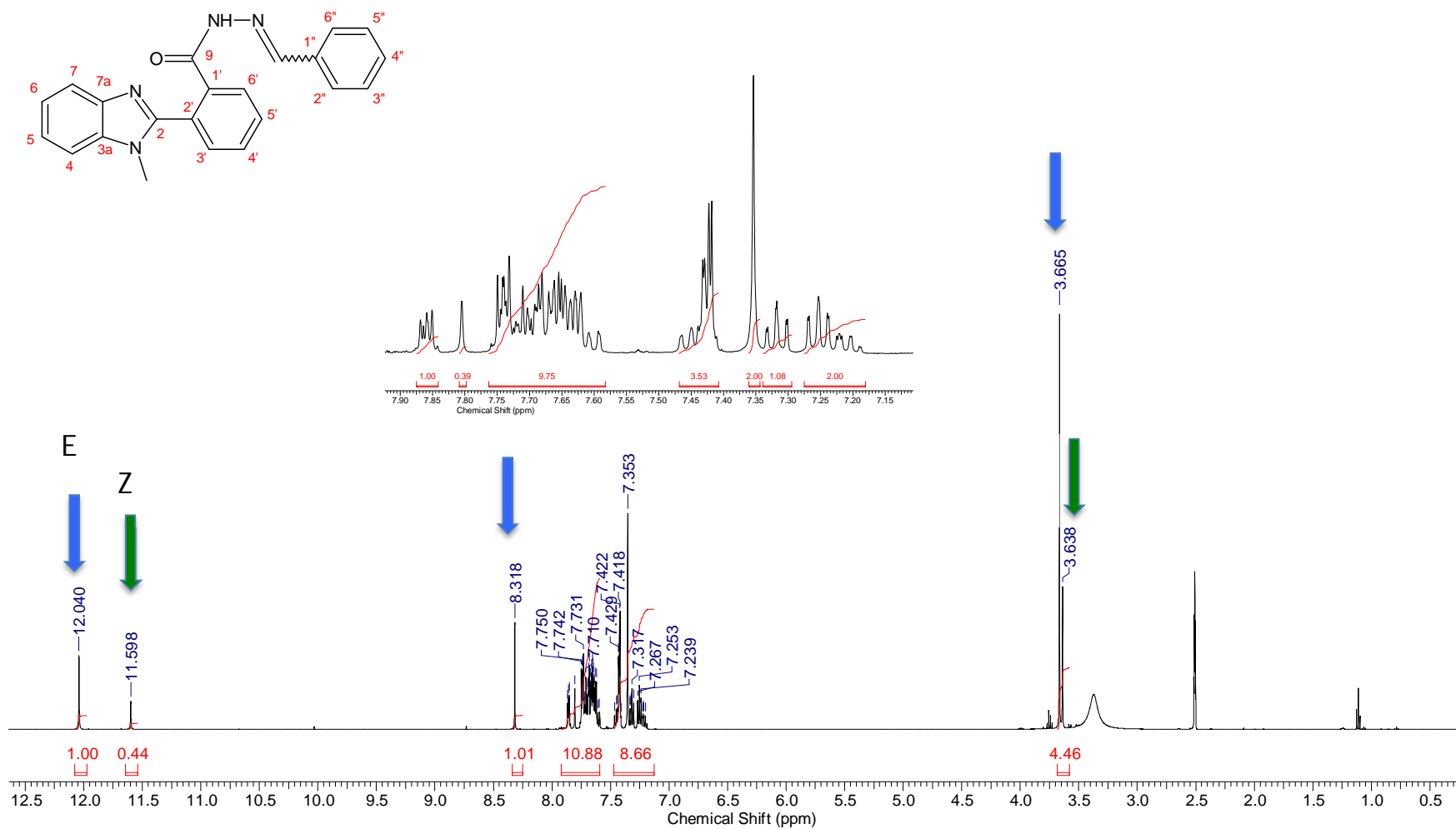
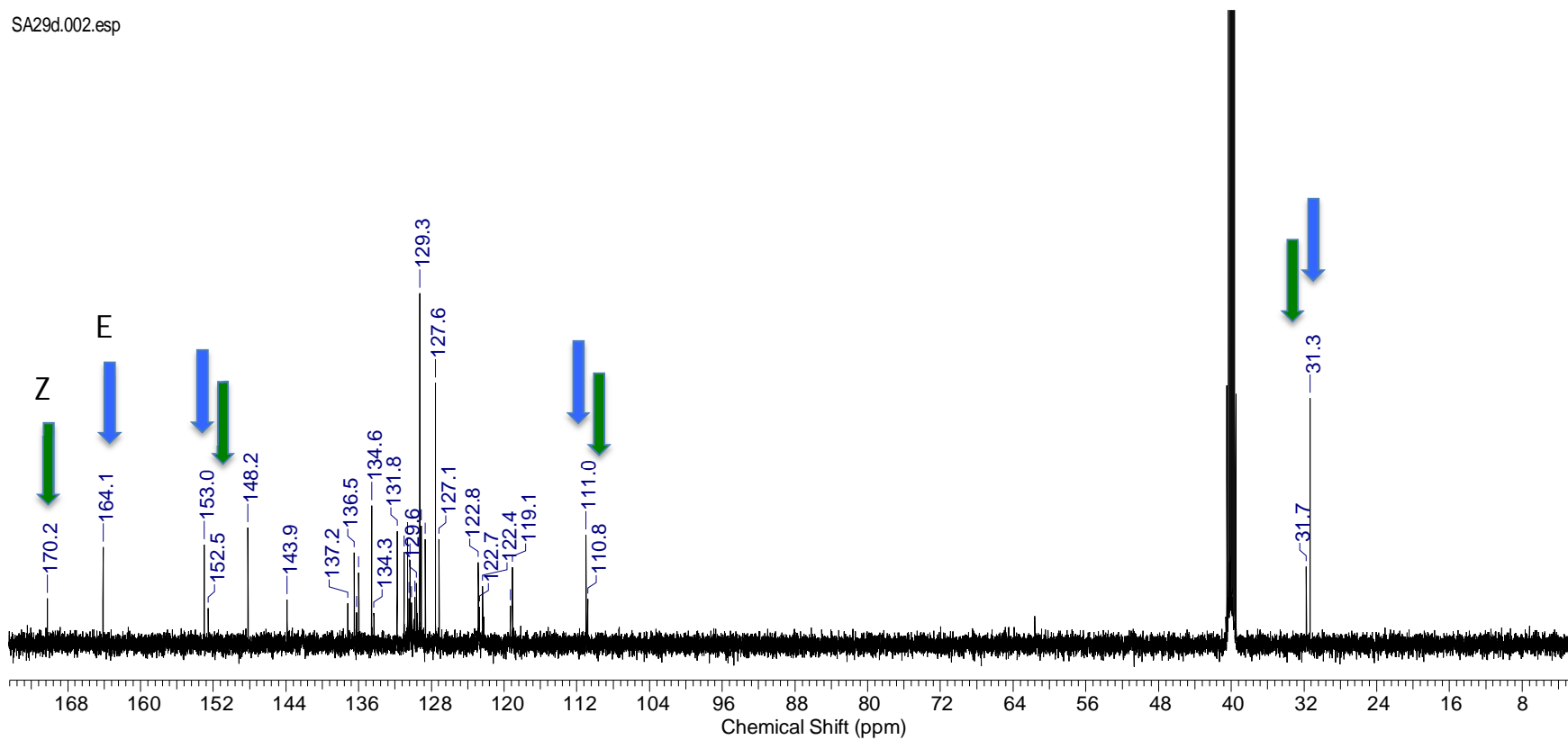


Figura III-20: Espectro de RMN ^{13}C (75,46MHz, DMSO- d_6) do composto **36a**.

SA29d.002.esp



III-3.3 Atividade Antitumoral

Os dados de GI_{50} para os novos derivados arilidênicos *N*-metilados sintetizados (**36a-e** e **37a-e**) estão mostrados na **Tabela III-2**.

A análise dos resultados da avaliação da atividade antitumoral apresentados na **Tabela III-2** revelou que para a série dos derivados arilidênicos *N*-metilados sem substituinte na posição-6 do núcleo benzimidazol (**36a-e**), os compostos **36b** e **36c** com os grupos 4-metóxfenil e 2-clorofenil ligados ao carbono imínico da porção arilidênica, respectivamente, foram ativos contra células tumorais de melanoma (UACC-62), mama (MCF7) e ovário (OVCAR-03) com $GI_{50} < 8,0 \mu\text{M}$. O derivado **36a** (grupo fenil em R^1) apresentou atividade frente à células de melanoma (UACC-62) e mama (MCF7) com GI_{50} de 10,0 e 8,7 μM , respectivamente. Os derivados **36d** (grupo 4-fluorfenil em R^1) e **36e** (grupo 2-tienil em R^1) foram ativos e seletivos para uma única linhagem celular: melanoma (UACC-62) e mama (MCF7), respectivamente, com GI_{50} de 13,4 μM e 21,8 μM e $GI_{50} > 65,9 \mu\text{M}$ para as demais linhagens de células.

Para a série dos derivados arilidênicos *N*-metilados com substituinte metila na posição-6 do núcleo benzimidazol (**37a-e**), a presença do grupo metila não influenciou na ordem da atividade em relação aos grupos funcionais. Os derivados contendo os grupos 2-clorofenil (**37c**) e 4-metóxfenil (**37b**) foram também os mais ativos com GI_{50} de 3,2; 8,6 μM e 0,3; 3,9 μM , respectivamente, frente a linhagens de células de melanoma (UACC-62) e mama (MCF7).

Em uma análise geral, os resultados revelaram que a presença dos grupos fenil, 2-clorofenil, 4-fluorfenil e 2-tienil em R^1 e da metila na posição-6 exercem efeito positivo, aumentando a atividade frente a maioria das linhagens de células testadas.

De uma maneira geral, o grupo 2-clorofenil contribui para uma melhor atividade quando comparado com os demais e a presença do grupo metila na posição-6 do núcleo benzimidazol favoreceu a atividade antitumoral.

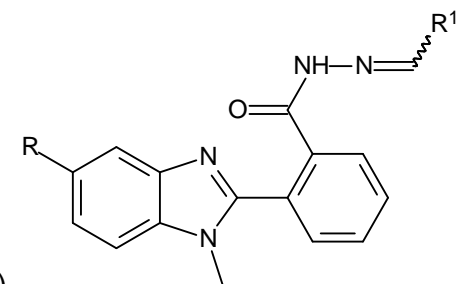


Tabela III-2 Dados de GI₅₀ (μM) para os derivados 2-arilidênocarboidrazidas (**36a-e** e **37a-e**)

Composto	Linhagens de células tumorais humanas											
	R	R ¹	U251	UACC-62	MCF-7	NCI-ADR/RES	786-0	NCI-H460	PC-3	OVCA R-03	K562	HT-29
36a	H	C ₆ H ₅	>100	10,0	8,7	>100	>100	>100	51,4	70,6	>100	>100
36b	H	4-OCHC ₆ H ₄	38,9	2,0	7,2	68,0	>100	42,7	40,5	7,9	32,7	52,2
36c	H	2-ClC ₆ H ₄	63,9	2,8	0,9	68,9	68,5	16,1	70,1	2,7	64,6	80,1
36d	H	4-FC ₆ H ₄	74,4	69,8	21,8	73,2	79,7	76,1	>100	65,9	77,4	82,2
36e	H	2-tienil	72,9	13,4	67,6	74,4	75,2	73,3	71,4	66,5	78,6	>100
37a	CH ₃	C ₆ H ₅	89,0	73,2	23,2	73,1	75,2	72,4	68,2	69,2	93,9	>100
37b	CH ₃	4-OCHC ₆ H ₄	>100	3,2	8,6	>100	37,8	99,6	>100	70,2	0,9	>100
37c	CH ₃	2-ClC ₆ H ₄	15,7	0,3	3,9	66,2	12,9	61,8	90,9	9,9	0,4	72,7
37d	CH ₃	4-FC ₆ H ₄	58,0	30,5	10,3	19,1	64,6	57,7	29,7	26,6	22,6	34,8
37e	CH ₃	2-tienil	29,4	29,8	64,5	64,7	69,7	35,9	59,6	15,5	19,9	57,8
Doxorrubicina			2,5.10⁻²	5,6.10⁻⁵	9,9.10⁻⁴	4,0.10⁻²	6,4.10⁻⁵	1,8.10⁻³	3,1.10⁻²	1,1.10⁻²	1,1.10⁻²	1,8.10⁻²

Os compostos **36c** e **37c**, contendo 2-clorofenil ligado ao carbono imínico da porção arilidênica e, respectivamente, o anel benzênico do benzimidazol não substituído ou com um grupo metila na posição-6, foram os mais ativos. O derivado **36c** apresentou GI_{50} na faixa de 0,9 a 2,7 μM , frente à linhagem de células tumorais de melanoma (UACC-62), mama (MCF7) e ovário (OVCAR-03) (**Figura III-21**). Já o derivado **37c**, com maior espectro de atividade, apresentou GI_{50} de 0,3 a 15,7 μM frente à linhagem de células tumorais de melanoma (UACC-62), mama (MCF7), ovário (OVCAR-03), rim (786-0) e glioma (U251) (**Figura III-22**).

Figura III-21 Gráfico de porcentagem de crescimento das linhagens tumorais *versus* concentração ($\mu\text{g/mL}$) para o derivado **36c** após 48h de exposição.

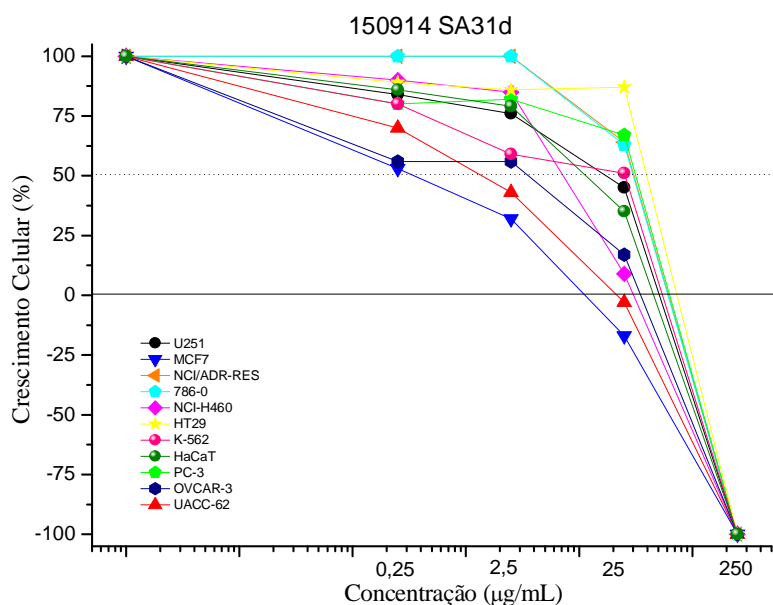
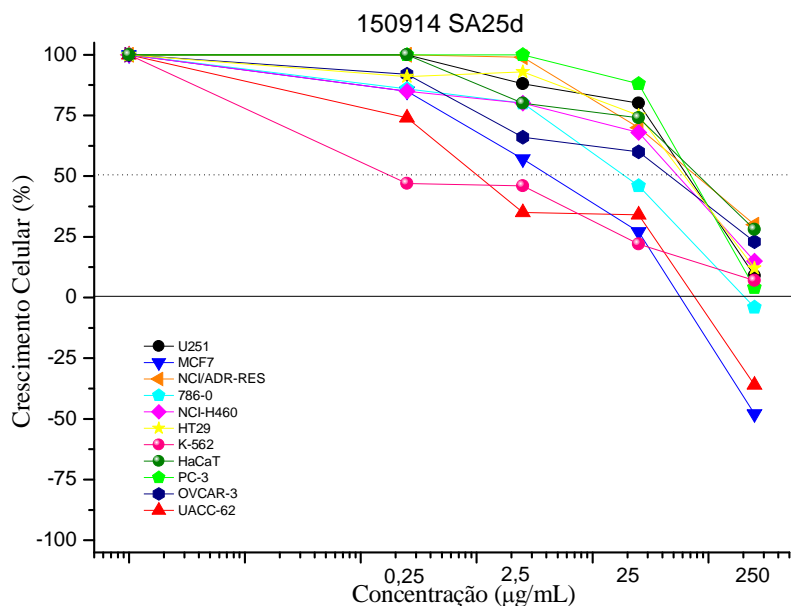


Figura III-22 Gráfico de porcentagem de crescimento das linhagens tumorais versus concentração ($\mu\text{g/mL}$) para o derivado **37c** após 48h de exposição.



Como mencionado anteriormente, um dos propósitos do presente trabalho é observar a influência do substituinte metila em N-1 do núcleo benzimidazol derivados **36a-e** e **37a-e** a partir da comparação com os derivados que não apresentam substituinte em N-1 **24a-e** e **25a-e**, obtidos por Tanabe (2012).

Tanabe (2012) avaliou a atividade antitumoral para os derivados 2-arilidênocarboidrazida (**24a-e** e **25a-e**) que não apresentam substituinte no nitrogênio do núcleo benzimidazol (**Tabela III-3**).

Assim, comparando-se os resultados obtidos por Tanabe (2012) compostos (**24a-e** e **25a-e**) com os dados que obtivemos para os derivados N-substituídos (**36a-e** e **37a-e**), **Tabela III-3**, verificamos que os compostos mais ativos nas 4 séries foram os derivados contendo o grupo 2-clorofenil em R¹ com valores de GI₅₀ na faixa de 7,2-10,8 μM (**24c**), 1,7-13,6 μM (**25c**), 0,9-70,1 μM (**36c**) e 0,3-90,3 μM (**37c**) para as linhagens de células testadas.

Os derivados **24c** e **25c** foram mais ativos, GI₅₀ < 13,6 μM para todas as linhagens de células testadas. Já os derivados **36c** e **37c** (N-metilados) apresentaram alta seletividade frente as linhagens de células de melanoma (UACC-62), mama (MCF-7) e ovário (OVCAR-03) com GI₅₀ de 2,8; 0,9 e 2,7 μM (**36c**) e 0,3; 3,9 e 9,9 μM (**37c**), respectivamente.

Analisando o efeito da presença do grupo metila ligado ao nitrogênio do núcleo benzimidazólico, séries **24a-e** (sem substituinte em N-1) e **36a-e** (com substituinte em N-1), em relação ao derivado benzimidazólico mais ativo (**24c**), descrito anteriormente por Tanabe (2012), observou-se que a introdução do grupo metila no nitrogênio do núcleo benzimidazólico, resultou no geral, em decréscimo da atividade para **36c**, exceto para as células de mama (MCF-7) e ovário (OVCAR-03).

E ainda, todos derivados N-metilados **36a-e** apresentaram maior atividade que os análogos não-metilados **24a-e**, frente as linhagens de célula de mama (MCF-7) e ovário (OVCAR-03).

Na análise das séries de derivados contendo grupo metila na posição-6 do núcleo benzimidazólico, comparando o efeito da presença do grupo metila no nitrogênio do núcleo benzimidazólico, séries **25a-e** (sem substituinte em N) e **37a-e** (N-metilado), de forma geral, não há um padrão de relação estrutura-atividade. Em relação aos derivados mais ativos para estas duas séries **25c** e **37c**, podemos notar que a presença do grupo metila em N-1 resultou em decréscimo da atividade frente a todas as células testadas.

Para os demais compostos, a presença do grupo metila em N-1 promoveu o aumento da atividade e seletividade dos derivados **37a**, **37b**, **37d** e **37e** em frente a células de câncer de mama (MCF-7) em comparação com seu análogos sem substituinte em N-1 (**25a**, **25b**, **25d** e **25e**).

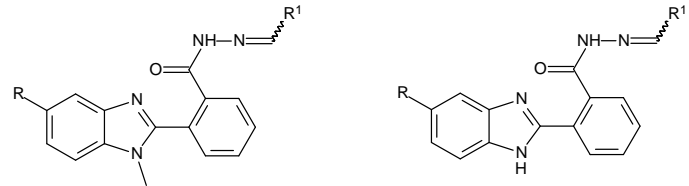


Tabela III-3 Dados de GI₅₀ (μM) para os derivados 2-arilindênocarbohidrazidas (**24a-e**; **25a-e**; **36a-e** e **37a-e**)

	R	N	R ¹	U251	UACC-62	MCF-7	NCI-ADR/RES	786-0	NCI-H460	PC-3	OVCAR-03	K562	HT-29	HaCat
24a	H	H	C ₆ H ₅	81,5	nt	93,3	89,3	95,3	79,7	nt	74,6	74,2	95,3	>100
36a	H	CH ₃	C ₆ H ₅	>100	10,0	8,7	>100	>100	>100	51,4	70,6	>100	>100	>100
24b	H	H	4-OCH ₃ C ₆ H ₄	>100	nt	>100	>100	>100	>100	nt	40,1	41,5	>100	>100
36b	H	CH ₃	4-OCH ₃ C ₆ H ₄	38,9	2,0	7,2	68,0	>100	42,7	40,5	7,9	32,7	52,2	49,7
24c	H	H	2-ClC ₆ H ₄	8,7	nt	7,3	8,1	7,2	10,8	nt	7,9	7,5	8,7	12,4
36c	H	CH ₃	2-ClC ₆ H ₄	63,9	2,8	0,9	68,9	68,5	16,1	70,1	2,7	64,6	80,1	59,4
24d	H	H	4-FC ₆ H ₄	>100	nt	>100	>100	>100	>100	nt	75,6	>100	40,8	>100
36d	H	CH ₃	4-FC ₆ H ₄	74,4	69,8	21,8	73,2	79,7	76,1	>100	65,9	77,4	82,2	74,4
24e	H	H	2-tienil	>100	nt	>100	>100	>100	>100	nt	>100	85,8	>100	>100
36e	H	CH ₃	2-tienil	72,9	13,4	67,6	74,4	75,2	73,3	71,4	66,5	78,6	109,3	78,1
25a	CH ₃	H	C ₆ H ₅	75,0	nt	83,9	71,3	>100	>100	nt	28,8	0,45	>100	>100
37a	CH ₃	CH ₃	C ₆ H ₅	89,0	73,2	23,2	73,1	75,2	72,4	68,2	69,2	93,9	>100	67,9
25b	CH ₃	H	4-OCH ₃ C ₆ H ₄	47,6	nt	76,7	66,6	>100	>100	nt	26,1	0,78	>100	>100
37b	CH ₃	CH ₃	4-OCH ₃ C ₆ H ₄	>100	3,2	8,6	>100	37,8	99,6	>100	70,2	0,9	>100	>100
25c	CH ₃	H	2-ClC ₆ H ₄	7,4	nt	1,7	6,4	13,6	8,2	nt	6,7	0,3	7,3	8,1
37c	CH ₃	CH ₃	2-ClC ₆ H ₄	15,7	0,3	3,9	66,2	12,9	61,8	90,9	9,9	0,4	72,7	70,4
25d	CH ₃	H	4-FC ₆ H ₄	20,3	nt	70,6	16,2	>100	>100	nt	8,3	6,5	72,6	92,4
37d	CH ₃	CH ₃	4-FC ₆ H ₄	58,0	30,5	10,3	19,1	64,6	57,7	29,7	26,6	22,6	34,8	18,9
25e	CH ₃	H	2-tienil	72,5	nt	82,0	33,6	>100	>100	nt	21,5	26,3	>100	>100
37e	CH ₃	CH ₃	2-tienil	29,4	29,8	64,5	64,7	69,7	35,9	59,6	15,5	19,9	57,8	36,6
	Doxorrubicina*			0,0672	nt	0,14	2,14	0,44	0,0038	nt	0,52	0,0596	0,50	0,0606

nt= não testado para esta células; * droga padrão.

4. Conclusão

A partir dos resultados obtidos no presente trabalho podemos concluir que:

A condensação redutiva do ácido de Meldrum com aldeídos aromáticos, promovida por formiato de trietilamônio, seguida da alquilação dos substratos monoalquilados com brometos de fenacila e reação dos substratos dialquilados com hidrazina, constituiu uma metodologia eficaz para a síntese das 4,5-diidro-3(2*H*)-piridazinonas (**8a-l**) e (**9a-c**).

A utilização de irradiação de microondas nas etapas de preparação dos precursores monoalquilados e dialquilados do Ácido de Meldrum possibilitou a síntese de (**8a-l**) e (**9a-c**), a partir de metodologia mais eficiente, visto a diminuição considerável do tempo reacional e melhores rendimentos que os métodos convencionalmente empregados.

Os resultados dos ensaios de atividade antiproliferativa para as diidropiridazinonas, de forma geral, resultou com elevada seletividade destes compostos contra a linhagem de células de melanoma (UACC-62).

Os derivados **8c** e **8e**, contendo os grupos 4-metoxibenzil e 4-clorobenzil, respectivamente, ligados ao C-4 do núcleo diidropiridazinônico, apresentaram potente atividade para as células tumorais testadas, com valores de GI₅₀ na faixa de 2,0 a 22,4 µM.

A presença do substituinte 4-bromo no grupo fenil ligado ao C-6 indicou um aumento da atividade, para os compostos **8b** e **8c**, em relação aos compostos **9b** e **9c**.

Os estudos da interação dos derivados **8a** e **8h** com ctDNA, revelou que estes derivados apresentam interação com o modelo de DNA empregado, por meio da formação de um complexo supramolecular não fluorescente, baseado em *quenching* estático, podendo-se propor um provável mecanismo de ação antitumoral via intercalação com DNA.

Os estudos do efeito das diidropiridazinonas **8a-e**, **8g-l**, **8n** e **8o**, sobre o metabolismo hepático, mostraram um efeito hepatotóxico leve devido a redução da liberação de indicadores de lesão hepática. Os resultados obtidos nos experimentos de perfusão hepática permitiram apontar o derivado **8g**

como alvo promissor no controle da aldose redutase, com potencial aplicabilidade no tratamento da hiperglicemia crônica.

A reação da 3-fenilpirazol-5-ona com aldeídos aromáticos em formiato de trietilamônio (TEAF) não levou à síntese das pirazonas **10a-f** propostas. A rota sintética alternativa visualizada para síntese de **10a-f**, ou seja, a preparação das arilideno-pirazonas (**12a-f**) e posterior redução da dupla insaturada, não pode ser concretizada, uma vez que as metodologias empregadas não foram eficazes para a preparação das arilideno-pirazonas (**12a-f**).

A tentativa de preparação das arilideno-pirazonas (**12a-f**), empregando a reação *one pot* entre o benzoil acetato de etila, hidrazina e aldeídos aromático, em piridina e meio etanólico, levou a obtenção de uma série dos bis-pirazolóis **13a-f**, constituindo uma nova e eficiente metodologia na preparação desta classe de compostos.

A síntese dos derivados 2-arilidenocarboidrazida-benzimidazólicos (**24a-e** e **25a-e**) foi possível a partir do tratamento das 2-(1'*H*-benzimidazol-2'-il) benzoidrazidas (**21** e **22**) com aldeídos aromático em etanol, sob catálise de H₂SO₄. A aplicação da metodologia clássica nesta síntese forneceu rendimentos superiores aos obtidos em trabalhos anteriores utilizando irradiação por micro-ondas, além de emprego de menor quantidade de aldeído.

Os novos derivados arilidenoidrazida-benzimidazólicos *N*-metilados (**36a-e** e **37a-e**) foram obtidos, em bons rendimentos (69-86%), a partir do tratamento dos precursores **34** e **35** com os aldeídos apropriados (**23a-e**) em etanol, sob catálise ácida.

Os resultados dos ensaios de atividade antiproliferativa para os derivados benzimidazólicos *N*-metilados **36a-e** e **37a-e** mostraram que a presença do grupo 2-clorofenil ligado ao carbono imínico da porção arilidênica, bem como, a presença do grupo metila na posição-6 do núcleo benzimidazol favorecem a atividade antitumoral.

A comparação dos resultados atividade antitumoral dos compostos (**24a-e** e **25a-e**), obtidos anteriormente pelo grupo, com os dados do presente trabalho para os derivados (**36a-e**) e (**37a-e**), mostrou que **24c** e **25c** foram

mais ativos, com $GI_{50} < 13,6 \mu\text{M}$ para todas as linhagens de células testadas. Já os derivados obtidos em nosso trabalho **36c** e **37c** (N-metilados) apresentaram alta seletividade frente as linhagens de células de melanoma (UACC-62), mama (MCF-7) e ovário (OVCAR-03) com GI_{50} de 2,8; 0,9 e 2,7 μM (**36c**) e 0,3; 3,9 e 9,9 μM (**37c**), respectivamente.

Como conclusão geral, este trabalho resultou na síntese de novos diaza-heterociclos com os núcleos 4,5-diidro-3(2*H*)-piridazinônico, bis-pirazolólico e benzimidazólico, sendo alguns dos derivados obtidos candidatos a agentes antitumorais ou, alvos promissores no controle da aldose redutase, com potencial aplicabilidade no tratamento da hiperglicemia crônica.

5. PARTE EXPERIMENTAL

5.1 Instrumentação

Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C foram obtidos no espectrômetro de RMN Bruker, modelo AVANCE III HD 300 MHz, frequência do núcleo ^1H a 300 MHz e do núcleo de ^{13}C a 75,5 MHz, e no espectrômetro de RMN Bruker, modelo AVANCE III HD 500 MHz, frequência do núcleo ^1H a 500 MHz e do núcleo de ^{13}C a 125 MHz equipados com sondas de 5mm. Os solventes utilizados foram DMSO- d_6 e CDCl_3 . Como referência interna foram utilizados o solvente em que a amostra foi preparada ou TMS. A interpretação dos dados foi realizada com auxílio das técnicas de bidimensionais de HMBC, HSQC e COSY.

As análises de IV foram realizadas em um espectrofotômetro de infravermelho PerkinElmer, modelo Spectrum Two. As amostras foram preparadas em pastilhas de KBr, e os espectros foram obtidos no modo de transmitância, na região de 400 a 4000 cm^{-1} .

As reações sob micro-ondas foram realizadas em micro-ondas laboratorial da marca CEM modelo Discovery-SP W/Activent ou em micro-ondas doméstico da marca Consul modelo CMS25ABHNA.

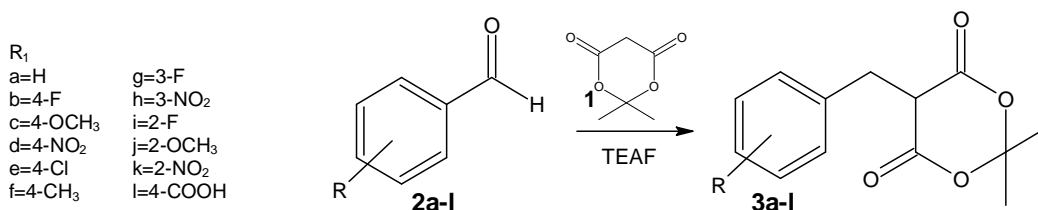
5.2 Materiais e Métodos

As cromatografias em camada delgada analítica (CCDA) foram realizadas com placas de sílica gel (Kieselgel 60F 254-Merck), com observações sob luz ultravioleta (254nm). Todas as reações foram acompanhadas com CCDA. Os pontos de fusão dos compostos sintetizados foram determinados em um aparelho Buchi modelo M-560 e não foram corrigidos.

5.3 Procedimento para a síntese dos compostos

5.3.1 Derivados Monoalquilados do Ácido de Meldrum

Procedimento para a síntese da série de 5-Arilmetil-2,2-dimetil-1,3-dioxano-4,6-diona 3a-l.



Método Convencional: A uma solução de aldeído (5 mmol) em formiato de trietilamônio (10 mL) adicionou-se ácido de Meldrum (5 mmol). A mistura foi mantida sob agitação à temperatura ambiente até que a evolução de CO₂ cessasse, ou diminuísse significativamente (3-4 dias). A mistura reacional foi, então vertida em H₂O/gelo (50 mL) e acidificada até pH 2 com HCl 6N. O sólido que precipitou foi filtrado, lavado com água gelada e recristalizado em acetona/ H₂O.

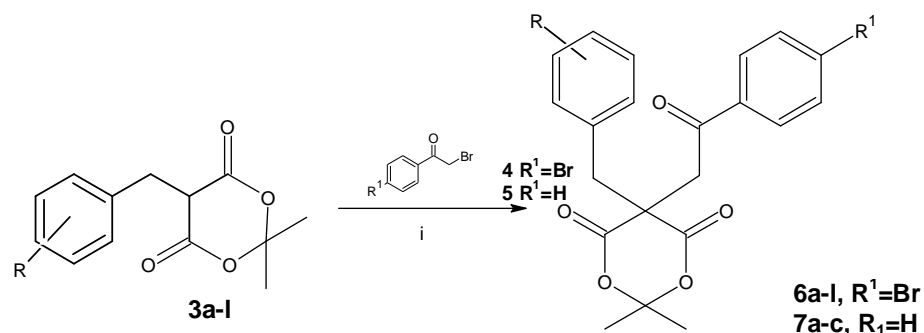
Método com irradiação de micro-ondas: A uma solução de aldeído (5 mmol) em formiato de trietilamônio (10 mL) adicionou-se ácido de Meldrum (5 mmol). A mistura foi irradiada com micro-ondas (50W a 80°C) com tempo médio de 2 minutos. Após o consumo total dos reagentes via CCD (hexano/AcOEt 80:20), a mistura reacional foi, então vertida em H₂O/gelo (50 mL) e acidificada até pH 2 com HCl 6N. O sólido que precipitou foi filtrado, lavado com água gelada e recristalizado em acetona/ H₂O.

Tabela 1: Rendimentos e faixas de fusão dos compostos 3a-l

Composto	Rendimento (%)	Ponto de fusão (°C)
3a	69	80,7-81,4
3b	68	114,2-115,9
3c	54	74,7-75,8
3d	75	137,6-139,3
3e	71	135,9-137,9
3f	50	110,7-113,4
3g	73	119,7-121,5
3h	70	149,1-151,9
3i	66	119,7-121,5
3j	51	92,5-93,6
3k	71	119,1-120,0
3l	67	154,1-156,9

5.3.2 Derivados dialquilados do Ácido de Meldrum

Procedimento para síntese da série de 2,2-dimetil-1,3-dioxano-4,6-dionas-5,5-dissubstituídas 6a-l e 7a-c.



Método A: A uma solução do derivado monoalquilado do ácido de Meldrum (**3a-l**) (3,58 mmol) em DMF seco (15 ml), adicionou-se acetato de sódio anidro (3,76 mmol), ácido acético (50 µL) e brometo de 4-bromofenacila (**4**) ou brometo de fenacila (**5**) (3,76 mmol). A mistura foi mantida sob agitação a temperatura ambiente por 24 h, sendo então vertida em uma mistura de água/gelo (10 g) e solução aquosa saturada de Na₂CO₃ (20 mL).

O sólido que precipitou foi filtrado, lavado com água gelada, seco sob vácuo e recristalizado em AcOEt/hexano.

Método B: A uma solução do derivado monoalquilado do ácido de Meldrum (**3a-I**) (3,58 mmol) em acetona (5 ml), adicionou-se carbonato de potássio anidro (3,58 mmol) e brometo de 4-bromofenacila (**4**) ou brometo de fenacila (**5**) (3,58mmol). A mistura foi irradiada com micro-ondas (50W a 80°C) com tempo médio de 4 minutos. Após o consumo total dos reagentes via CCD (hexano/AcOEt 80:20), a solução foi vertida em uma mistura de água/gelo (10 g). O sólido que precipitou foi filtrado, lavado com água gelada, seco sob vácuo e recristalizado em acetona/água.

Tabela 2: Rendimentos e faixas de fusão dos compostos **6a-l** e **7a-c**

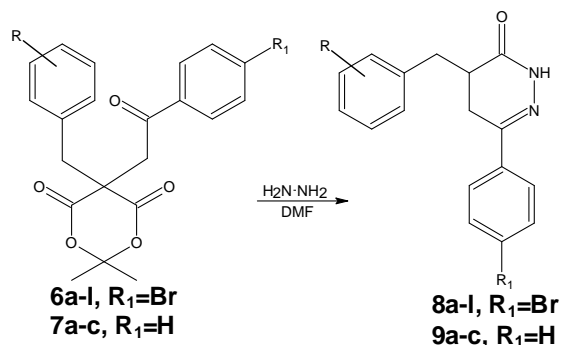
Composto	Rendimento (%)	Ponto de fusão (°C)
6a	65 ^a /85 ^b	222,8-224,6
6b	86 ^b	150,4-155,0
6c	70 ^b	180,1-182,6
6d	72 ^a /72 ^b	202,9-205,1
6e	70 ^a /68 ^b	193,5-195,4
6f	62 ^b	195,2-197,4
6g	63 ^a /70 ^b	199,8-203,2
6h	62 ^a /56 ^b	184,3-187,8
6i	46 ^a /79 ^b	150,3-152,6
6j	47 ^a /53 ^b	160,7-163,5
6k	64 ^a /65 ^b	167,9-170,9
6l	94 ^a	201,5-203,6
7a	80 ^b	194,3-196,5
7b	70 ^a	176,7-179,3
7c	65 ^a	174,3-175,5

^a Método A

^b Método B

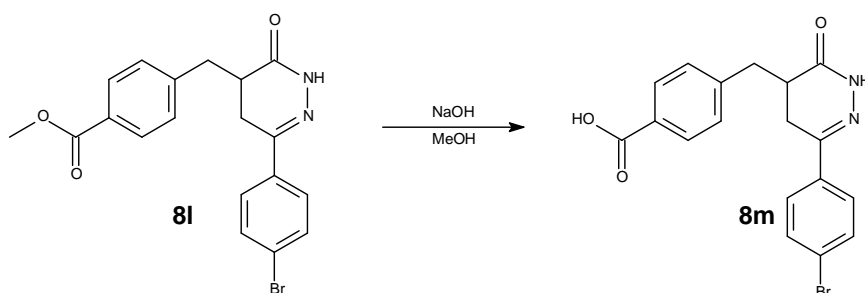
5.3.3 Diidropiridazinonas

Procedimento para síntese de derivados 4,5-diidro-3(2H)-piridazinonas **8a-l** e **9a-c**



A uma solução resfriada em banho de gelo/água do derivado dialquilado de ácido de Meldrum (2,10 mmol) em DMF (10 mL) adicionou-se, gota a gota, $\text{NH}_2\text{NH}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (8,4 mmol). O banho refrigerante foi então removido, e a mistura mantida sob agitação à temperatura ambiente por 24 h. A mistura foi vertida em gelo/água de tal maneira a não adicionar a hidrazona derivada da acetona que se forma (a mesma fica, normalmente, presa ao fundo do balão reacional) e o pH ajustado a 4-5 com HCl 6 N. O sólido que se separou foi filtrado, lavado com água e recristalizado em acetona/ H_2O para fornecer o produto.

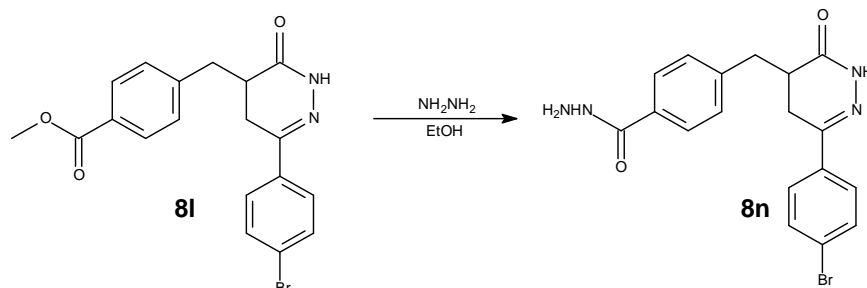
Procedimento para síntese do derivado 4,5-Diidro-3(2H)-piridazinona **8m**



A solução do composto **8l** (0,33 mmol) em metanol (10 mL) adicionou-se uma solução de NaOH (0,99 mmol) em H_2O (1 mL), e a mistura resultante foi agitada à temperatura ambiente por 14h. Os solventes foram removidos

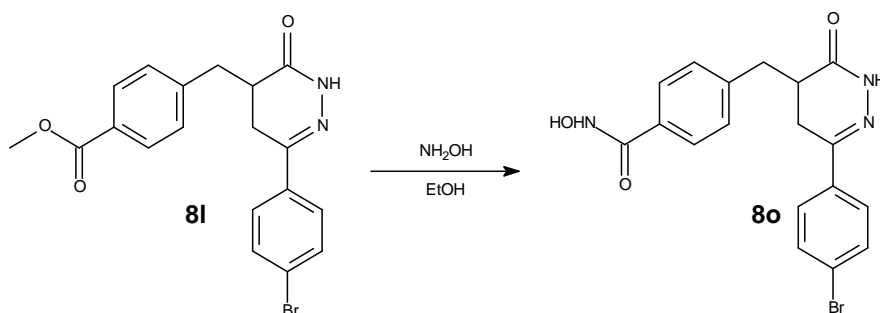
sob vácuo, o resíduo foi redissolvido em água e acidificado com HCl 0,5 N até pH 4. O precipitado obtido foi filtrado, lavado com água e seco sob vácuo.

*Procedimento para síntese do derivado 4,5-Diidro-3(2H)-piridazinona **8n***



A solução do composto **8l** (0,5 mmol) em etanol (5 mL) adicionou-se uma solução de NH_2NH_2 50% (7 mL), e a mistura resultante foi agitada à 50°C por 24h. O precipitado branco obtido foi filtrado, lavado com água e recristalizado em acetona/ H_2O para fornecer o produto **8n**.

*Procedimento para síntese do derivado 4,5-Diidro-3(2H)-piridazinona **8o**.*



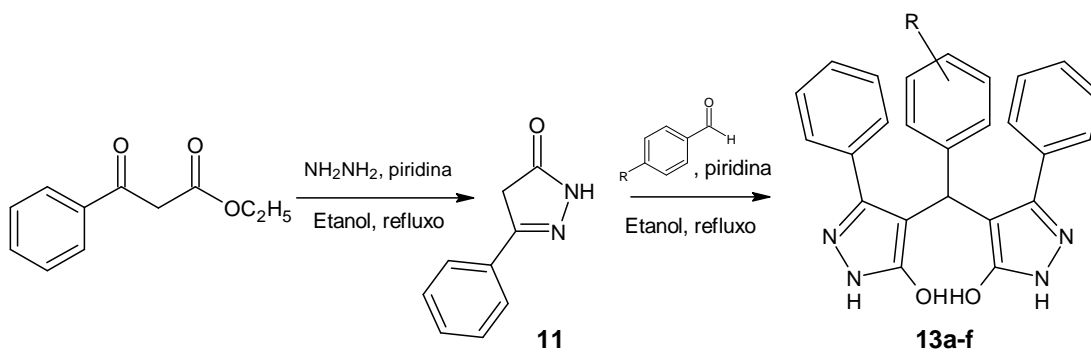
A uma solução do composto **8l** (0,5 mmol) em etanol (5 mL) adicionou-se uma solução de $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ (0,55 mmol) e NaHCO_3 (0,55 mmol), e a mistura resultante foi agitada à 40°C por 5h. O precipitado branco obtido foi filtrado, lavado com água e recristalizado em acetona/ H_2O para fornecer o produto **8o**.

Tabela 3: Rendimentos e faixas de fusão dos compostos **8a-o** e **9a-c**

Composto	Rendimento (%)	Ponto de fusão (°C)
8a	57	178,6-180,8
8b	47	198,2-201,4
8c	49	192,3-193,5
8d	64	202,9-205,1
8e	85	174,3-175,5
8f	81	178,5-180,1
8g	85	174,0-174,8
8h	82	184,9-185,5
8i	84	193,5-195,4
8j	72	160,1-160,8
8k	27	167,9-170,9
8l	54	213,5-215,2
8m	80	236,6-238,4
8n	81	>250
8o	92	203,6-204,6

5.3.4 Bis-pirazolóis 13a-f

Metodologia direta para preparação de pirazolonas 4,5 dissustituída 13a-f.



R= a)H; b) 4-N(CH₃)₂; c)4-CH₃; d) 4-OCH₃; e) 4-NO₂; f) 3-NO₂.

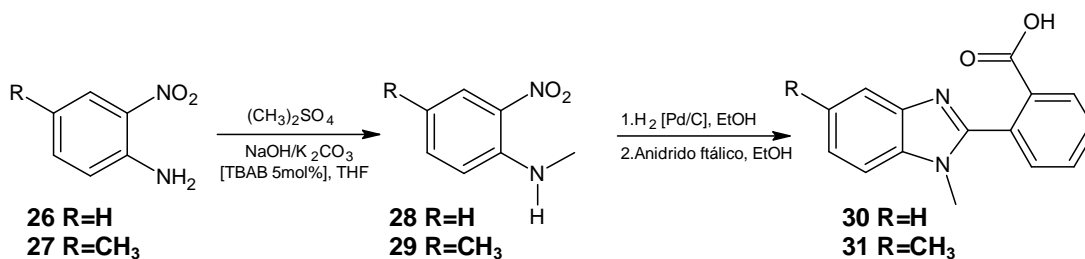
Uma mistura de benzoil acetato de etila (4 mmol), hidrazina (8 mmol) e piridina (4 mmol) em etanol (10 mL) foi refluxada por 1 hora. Em seguida adicionou-se o correspondente aldeído aromático (4 mmol). Esta mistura foi refluxada de 4 a 24 horas até completa reação. A mistura reacional foi resfriada, o precipitado foi filtrado e lavado com etanol, resultando nos produtos **13a-f**

Tabela 4: Rendimentos e faixas de fusão dos compostos **11 e 13a-f**

Composto	Rendimento (%)	Ponto de fusão (°C)
11	88	245,2-246,1
13a	71	247,5-249,1
13b	82	222,8-224,2
13c	84	>250
13d	97	>250
13e	74	>250
13f	77	>250

5.3.5 Derivados Benzimidazólicos

Procedimento para síntese do ácido 2-(1-metil-benzimidazol-2-il)benzóico e do ácido 2-(1,5-dimetil-benzimidazol-2-il)benzóico

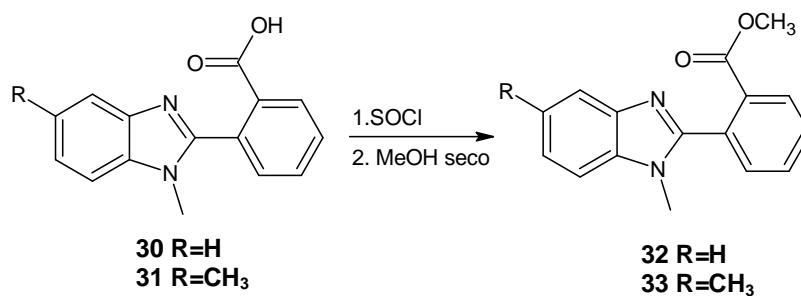


Etapa A: A uma solução de THF (100,0 mL) e 2-nitroanilina (5,00g, 36,2 mmol) ou 4-metil-2-nitroanilina (5,50 g, 36,2 mmol) foi adicionado NaOH (5,8 g, 1,6 mmol), K₂CO₃ (4,54 g, 36,2 mmol) e TBAB (573 mg, 1,6 mmol), deixando sob agitação durante 1 hora. Em seguida foram adicionados gota a gota 3,26 mL (36,2 mmol) de (CH₃)₂SO₄. A solução foi deixada sob forte agitação por uma noite. Os sólidos inorgânicos foram filtrados e o solvente foi

evaporado sob vácuo.

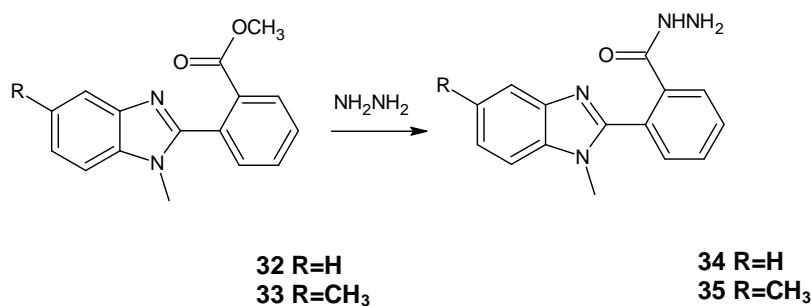
Etapa B: Uma mistura de N-metil-2-nitroanilina (3,65 g; 24,07 mmol) ou 4,N-dimetil-2-nitroanilina (4,00 g; 24,07), 10% Pd/C (200 mg) em etanol (50 mL) foi colocada sob uma atmosfera de H₂ (40 psi) por 2 horas (a mistura inicialmente vermelha tornou-se incolor). O catalisador foi filtrado em cama de celite e o solvente removido sob vácuo. O óleo resultante inicialmente incolor tornou-se, em contato com o ar, rapidamente escuro. O material foi redissolvido em etanol (40 mL), e à solução adicionou-se anidrido ftálico (3,56 g; 24,07 mmol). A mistura foi, então, refluxada por 24 horas. O sólido formado foi filtrado, lavado com etanol gelado e seco ao ar.

*Procedimento para síntese do éster metil 2-(1-metil-benzimidazol-2-il)benzoato **32** e do éster metil 2-(1,5-dimetil-benzimidazol-2-il)benzoato **33**.*



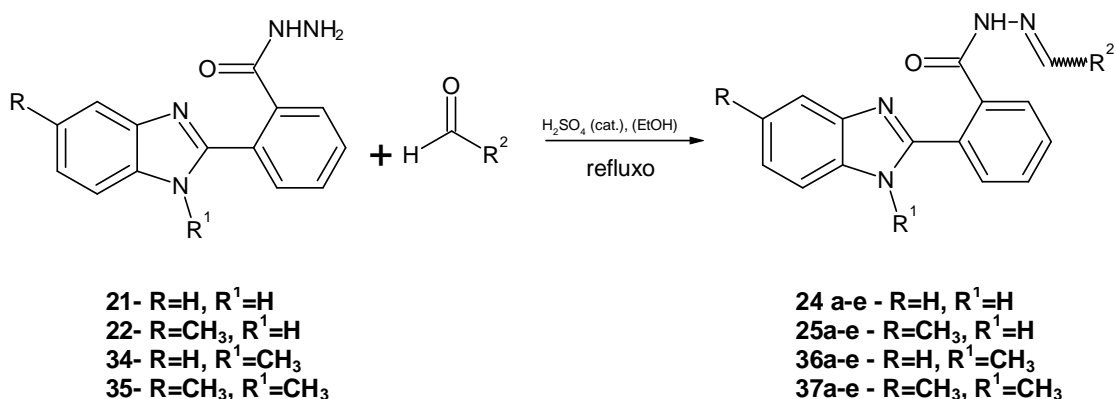
Uma mistura do ácido 2-(1-metil-benzimidazol-2-il)benzoico **30** (2,37 g; 9,39 mmol) ou do ácido 2-(1,5-dimetil-benzimidazol-2-il)benzoico (2,50 g; 9,39 mmol) **31** em SOCl₂ (6 mL) foi refluxada por 2 horas. O excesso de SOCl₂ foi removido por destilação, e ao sólido resultante adicionou-se metanol seco (20 mL). A solução foi mantida sob agitação à temperatura ambiente por uma noite. O solvente foi removido sob vácuo e o sólido obtido foi redissolvido em acetato de etila (30 mL). A fase orgânica foi lavada com H₂O (3x10 mL), com solução aquosa saturada de NaHCO₃ (3x 10 mL) e com solução aquosa saturada de NaCl (2x 10 mL) e então seca sobre Na₂SO₄. O solvente foi removido sob vácuo.

Procedimento geral para a síntese das benzoidrazidas 34 e 35.



A uma suspensão do éster metil 2-(1-metil-benzimidazol-2-il)benzoato **32** (2,83 g; 10,63 mmol) ou do éster metil 2-(1,5-dimetil-benzimidazol-2-il)benzoato **33** (2,98 g; 10,63 mmol) em metanol (40 mL) adicionou-se hidrazina monohidratada (1,08 g; 21,26 mmol). A mistura foi agitada por 30 minutos a temperatura ambiente (após 7 minutos de reação a suspensão amarela torna-se uma suspensão branca). O sólido foi filtrado e lavado abundantemente com água e seco ao ar.

Procedimento geral para a síntese das arilideno-carboidrazidas 24a-e, 25a-e, 36a-e e 37a-e.



A uma solução da respectiva benzoidrazida (0,100 g) e o aldeído apropriado (1,1 equivalente) em etanol (4 mL) adicionou-se uma gota de H₂SO₄ concentrado. A mistura foi refluxada até a observação do consumo total da hidrazida (30 a 120 minutos) via CCD (fase móvel AcOEt). A solução foi então vertida em água gelada (30 mL), basificada com uma solução de

Na₂CO₃ 10% até pH 10 formando um precipitado. O precipitado foi lavado com água gelada, seco e posteriormente lavado com hexano para remoção do excesso de aldeído.

Tabela 5: Rendimentos e faixas de fusão dos compostos **32-35 e 36a-e e 37a-e**

Composto	Rendimento (%)	Ponto de fusão (°C)
32	89	125,4-126,8
33	83	124,7-126,1
34	83	168,7-169,9
35	79	144,0-146,2
36a	74	188,2-190,4
36b	84	121,8-123,8
36c	86	193,4-195,2
36d	80	147,7-150,1
36e	82	140,9-143,3
37a	75	214,4-216,5
37b	83	109,7-112,1
37c	76	220,6-222,0
37d	69	147,7-150,1
37e	83	209,5-211,3

5.4 Determinação da Atividade Antitumoral

5.4.1 Procedimento dos ensaios para a determinação da atividade antiproliferativa

Foram plaqueados 100 µL/compartimento das células tumorais, nas suas respectivas densidades de inoculação, nos compartimento das placas de 96 compartimentos, em meio de cultura RPMI-1640 suplementando com 5% de soro fetal bovino (SFB) e penicilina: estreptomicina (meio RPMI/SFB/pen:strep). Estas placas foram incubadas por 24 horas, a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ e 100% de umidade. Para cada linhagem foi

utilizado um número estipulado de placas, além da placa T₀ (placa controle), dependendo da quantidade de células obtidas na contagem.

5.4.2 Diluição das amostras

As amostras foram diluídas em dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração de 0,1g/mL resultando em soluções estoques. Estas soluções foram diluídas 40 vezes em meio RPMI/SFB/pen:strep. Foram adicionadas 100 µL/compartimento da solução dos compostos nos compartimento das placas de 96 compartimentos, exceto na T₀, nas concentrações de 0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL. Neste mesmo momento foi realizada a fixação da placa T₀, determinando-se assim a quantidade de células presentes no momento em que os compostos foram colocados. As demais placas foram incubadas por 48 horas, nas mesmas condições já descritas. Após este período, foram realizadas as leituras pelo ensaio da Sulforrodamina B (SRB).

5.4.3 Ensaio de crescimento das linhagens de células tumorais com Sulforrodamina B

As células foram fixadas com 50 µL/compartimento de ácido tricloroacético a 50% (ATC) em cada compartimento. Para completar a fixação celular, as placas foram incubadas por 1 hora a 4°C. Após esse tempo, foram submetidas a quatro lavagens consecutivas com água destilada para a remoção dos resíduos de ATC, meio, SFB e metabólitos secundários. Estas placas foram mantidas a temperatura ambiente até a secagem completa. Em seguida, as células foram coradas pela adição de 50 µL/compartimento de SRB a 0,4% (peso/volume), dissolvido em ácido acético a 1%. Após 30 minutos à temperatura ambiente, as placas foram lavadas por 4 vezes consecutivas com uma solução de ácido acético 1%. O resíduo da solução de lavagem foi removido e as placas foram novamente secas à temperatura ambiente. O corante ligado às proteínas celulares foi solubilizado com uma solução de Trizma Base, na concentração de 10 µM e pH 10,5. A leitura espectrofotométrica da absorbância foi realizada em 560 nm em um leitor de microplacas.

5.4.4 Análise dos resultados

Foram calculadas as médias das absorvâncias descontadas de seus respectivos brancos e através das fórmulas seguintes, foi determinado o crescimento celular.

Se $T > C$ a substância estimulou o crescimento.

Se $C > T \geq T_0$, a substância foi citostática:

$$\text{Cresc.(\%)} = 100 * [(T - T_0) / (C - T_0)].$$

Se $T \leq T_0$ a substância foi citocida, $\text{Cresc.(\%)} = 100 * [(T - T_0) / (T_0)]$;

Onde: T é a média da absorvância da célula tratada;

C é o controle de célula;

T_0 é o controle das células no dia da adição das substâncias.

Foram gerados gráficos de crescimento (em porcentagem) em função da concentração da amostra testada, para cada uma das linhagens testadas. Uma concentração efetiva denominada GI_{50} (do inglês *growth inhibition*, concentração necessária para que ocorra a inibição de 50% do crescimento celular) foi calculada por regressão não linear, tipo sigmoidal, utilizando-se software ORIGIN (OriginLab Corporation), versão 8.0.

5.5 Determinação da interação dos derivados piridazinonas 8a e 8h com ctDNA empregando fluorescência molecular e UV-vis.

5.5.1 Reagentes e soluções

Nos estudos de interação com os derivados piridazinonas foi empregado DNA *Calf thymus* tipo I (Sigma), onde sua solução estoque foi preparada pela dissolução de uma quantidade apropriada de ctDNA em tampão Tris-HCl (50 mM, pH = 7,20 ± 0,10 contendo 100 mM de NaCl) e armazenado à 4°C. Sua concentração foi determinada por absorção no UV em 260 nm, utilizando coeficiente de extinção molar $\epsilon_{260} = 6600 \text{ L mol}^{-1}$ a 25°C, e sua pureza foi avaliada pela razão dos valores de absorvância em 260 e 280 nm, sendo que valores obtidos entre 1,8 e 1,9, indicam uma solução livre de contaminação por proteína (Basu e Kumar, 2013). As soluções estoque dos compostos avaliados foram preparadas pela dissolução em DMSO e posterior diluição em tampão Tris-HCl.

Nos estudos para a avaliação do modo de ligação entre os compostos e ctDNA, utilizou-se uma solução estoque de iodeto de potássio (0,4 M) contendo 5,0 mM de Na₂S₂O₃. Nos ensaios de competição, foi utilizado uma solução de brometo de etído (BE, 10 µM) contendo ctDNA (100 µM).

5.5.2 Aparato

As titulações espectrofluorimétricas foram realizadas em espectrofluorímetro RF-5301 (Shimadzu, Japan) equipado com uma lâmpada de xenônio (150 W) utilizando cubetas de quartzo de 10 mm de caminho óptico. Nos ensaios de competição, as medidas de fluorescência foram realizadas no espectrofluorímetro (EnSpire[®] leitor de microplacas, Perkin Elmer, Germany) equipado com uma lâmpada de xenônio, utilizando um leitor de microplacas contendo 96 poços e um volume total de 200 µL em todo o experimento. O espectro no UV-vis foi realizado em espectrofotômetro de duplo feixe AJX-6100PC (Micronal S.A., Brazil).

*5.6 Determinação do efeito das diidropiridazinonas **8a-e**, **8g-l**, **8n** e **8o** sobre os parâmetros hepáticos relacionados ao metabolismo energético do fígado.*

*5.6.1 Formulação das 4,5-diidropiridazinonas **8a-e**, **8g-l**, **8n** e **8o** incorporadas em nanocarreadores de Poloxâmeros[®]*

Os formulados foram obtidos a partir da solubilização da matriz sólida surfactante F-127 (1% m/v; $2,4 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹) juntamente com uma das diidropiridazinonas **8a-e**, **8g-l**, **8n** e **8o** ($1,25 \times 10^{-6}$ mol.L⁻¹) em clorofórmio. A solução foi evaporada em evaporador rotativo, mantida por 12 horas em dessecador e hidratada com solução tamponante Krebs, a 70°C, sob agitação vigorosa até total solubilização. O mesmo procedimento foi realizado sem a adição do fármaco, para se obter a referência (ou branco) nas medidas.

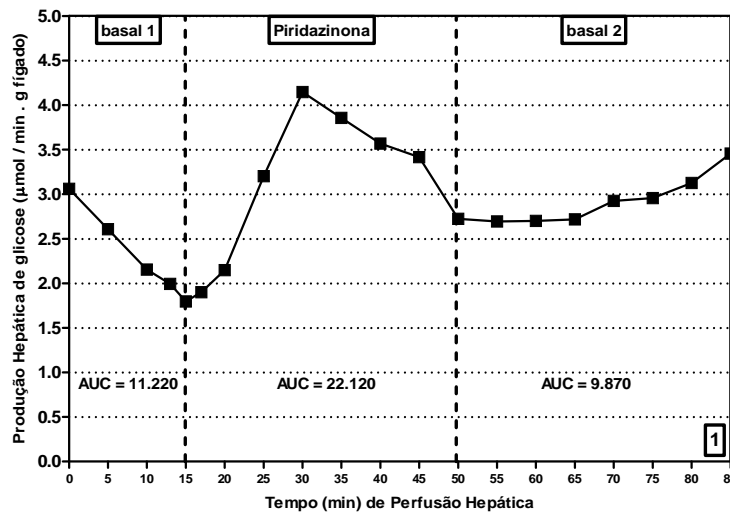
5.6.2 *Perfusão de fígado in situ*

Os animais alimentados foram anestesiados (Tiopental 40 mg + Lidocaína 10 mg/Kg, i.p., 0,6 mL/100 pc), colocados em mesa cirúrgica e submetidos à laparotomia mediana, com exposição do fígado. A seguir, uma ligadura frouxa foi colocada ao redor da veia cava inferior para posterior canulação, enquanto outra ligadura frouxa foi colocada ao redor da veia porta, para introdução da cânula. A cânula portal foi introduzida sob fluxo de aproximadamente $1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ de fígado. A eutanásia ocorreu por choque hipovolêmico. Uma vez canulado, o fígado foi perfundido com tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato (KH). Logo após a introdução da cânula, os vasos abdominais abaixo do fígado foram seccionados para o completo dessangramento do órgão. Uma 2ª cânula foi introduzida na veia cava inferior (porção abdominal) e o fluxo elevado para valores que permitam oxigenação adequada ($4 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ de fígado). Em seguida o tórax foi aberto para-esternalmente e, através de uma ligadura, a veia cava acima do diafragma foi isolada.

O sistema de perfusão é formado por uma bomba de perfusão e um oxigenador de membrana acoplado a um banho-maria com bomba de circulação externa de água aquecida e um cilindro contendo mistura de O_2/CO_2 (95/5%). O oxigenador de membrana é formado por um cilindro duplo de alumínio, ao redor do qual estão enrolados 15 m de tubos de borracha silicone. A câmara interna do cilindro de alumínio é termostatizada pelo banho-maria através da bomba de circulação externa de água aquecida. O cilindro de alumínio está isolado do meio ambiente por uma cobertura cilíndrica de acrílico transparente, mantendo-se no seu interior uma atmosfera de $\text{O}_2:\text{CO}_2$ (95%:5%). O sistema ainda contém um dispositivo que impede a entrada de bolhas de ar no fígado (capta-bolhas). O líquido de perfusão utilizado é impulsionado pela bomba de perfusão em direção ao oxigenador. Neste local, ocorre simultaneamente a oxigenação e o aquecimento a 37°C . A entrada de CO_2 também diminui o pH de 7,6 para 7,4. O líquido entra no fígado pela veia porta e deixa-o pela veia cava. Após os 15 minutos iniciais de perfusão, para a estabilização da preparação, amostras de

perfusado foram coletadas para determinações bioquímicas (GARCIA *et al.*, 2007, 2008). Durante este período (**Figura 8**), a perfusão do fígado foi realizada do seguinte modo: 0-15 min com KH (basal anterior, basal 1), 15-50 min com o tampão KH mais substância teste (piridazinona de escolha ou o P123, estímulo) e 50-85 min com KH (basal posterior, basal 2).

Figura 8: Protocolo demonstrativo do experimento de perfusão de fígado *in situ* de ratos Wistar NDM1 alimentados. Representa a concentração de glicose ($\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{g}$ fígado) em função do tempo (min) de perfusão inicial (basal 1=0-15 min); estimulado (15-50 min); e final (basal 2=50-85 min). A piridazinona de escolha foi utilizada na fase de estímulo. Foi realizado o cálculo da área sob a curva (AUC) para cada parte do protocolo de perfusão e para cada grupo, de forma que os resultados dos experimentos estão apresentados na forma de AUC ($\mu\text{mol}/\text{g}$).



O líquido coletado foi utilizado para avaliação da concentração de glicose, lactato e piruvato no perfusado (BERGMEYER & BERNT, 1974; CZOK & LAMPRECHT, 1974; GUTMANN & WAHLEFELD, 1974; GUTMANN & BERGMEYER, 1974), que permitiu o cálculo da glicogenólise ($\text{GG} = \text{glicose} + (\text{lactato} + \text{piruvato}/2)$), glicólise ($\text{Gc} = \text{lactato} + \text{piruvato}/2$) e razão NADH/NAD^+ citoplasmática ($\text{lactato} \div \text{piruvato}$). A razão NADH/NAD^+ é uma ferramenta que pode indicar a prevalência da glicogenólise (GG) ou glicólise (Gc) pelo fígado num dado momento metabólico. A elevada razão indica o citosol reduzido pela intensificação da Gc, enquanto a baixa razão indica citosol

oxidado e reduzida Gc. Os resultados obtidos nas dosagens em cada período da perfusão foram convertidos em área sob a curva (AUC) pelo programa Graph Pad Prism 5.0 (**Figura 8**).

Também foi feita a avaliação de lesão hepática através da determinação da concentração de bilirrubina total (BLT), aspartato transaminase (AST), alanina transaminase (ALT) e fosfatase alcalina (ALP) com auxílio de kits laboratoriais Gold Analisa[®] Diagnóstica Ltda, Minas Gerais – Brasil.

5.6.3 Isolamento de hepatócitos

Os animais destinados à técnica de isolamento de hepatócitos, no estado alimentado, foram anestesiados (Tiopental 40 mg + Lidocaína 10 mg/Kg, i.p., 0,6 mL/100 pc) e submetidos à laparotomia mediana. A eutanásia ocorreu por choque hipovolêmico. O fígado dos animais foi perfundido com tampão Krebs-Henseleit-Bicarbonato (KH), saturado com O₂/CO₂ (95/5%) contendo colagenase 3%. O fluido de perfusão foi bombeado através do oxigenador de membrana e aquecido a 37°C antes de entrar no fígado pela veia porta. A perfusão de fígado descrita acima foi utilizada para isolar hepatócitos, complementada pela técnica descrita por Berry & Friend (1969) e modificada por Bazotte *et al.*(1991). Os hepatócitos (1x10⁶ céls/mL) com viabilidade acima de 75% foram incubados (KH saturado com O₂/CO₂ 95/5%) a 37°C, sob agitação constante, durante 1 hora na ausência (controle) ou presença das substâncias teste (13 piridazinonas diferentes e P123).

Após esse período, as amostras foram centrifugadas e a fração solúvel coletada para determinação de glicose, L-lactato e piruvato (BERGMEYER & BERNT, 1974; CZOK & LAMPRECHT, 1974; GUTMANN & WAHLEFELD, 1974; GUTMANN & BERGMEYER, 1974). A diferença entre a concentração dos mesmos nos frascos controle e nos frascos testes representou a quantidade produzida pelos hepatócitos (μmol/10⁶ céls.h).

5.6.4 Análise Estatística

Os dados foram submetidos ao teste Kolmogorov-Smirnov (K-S) para verificação da normalidade. Para comparação dos grupos foi utilizada análise

de variância (ANOVA) one way com pós-teste de Tukey ou teste “t” de student, prefixando-se o nível de significância em 95% ($p < 0,05$) com o auxílio do programa GraphPad Prism – versão 5.0.

6. REFERÊNCIAS

ABDOU, I. M.; SALEH, A. M.; ZOHDI, H. F. Synthesis and Antitumor Activity of 5-Trifluoromethyl-2,4- dihydropyrazol-3-one Nucleosides. **Molecules**, 9, p.109-116, 2004.

ABLAJAN, K.; XIAMUXI, H. The convenient synthesis of 4-arylmethylidene-4,5- dihydro-3-phenylisoxazol-5-ones. **Chinese Chemical Letters**, v. 22, p. 151-154, 2011.

AHMADI, F.; JAMALI, N.; JAHANGARD-YEKTA, S.; JAFARI, B.; NOURI, S.; NAJAFI, F.; RAHIMI-NASRABADI, M. The experimental and theoretical QM/MM study of interaction of chloridazon herbicide with ds-DNA. **Spectrochimica Acta, Part A**, 79, p.1004-1112, 2011.

ALEX, K.; TILLACK, A.; SCHWARZ, N.; BELLER, M. · First synthesis of 4,5-dihydro-3(2H)-pyridazinones via Zn-mediated hydrohydrazination. **Tetrahedron Letters**, 49 ,p. 460-4609, 2008.

ALLCOCK, R. W.; BLAKLI, H.; JIANG, Z.; JOHNSTON, K. A.; MORGAN, K. M. Phosphodiesterase inhibitors. Part 1: Synthesis and structure–activity relationships of pyrazolopyridine–pyridazinone PDE inhibitors developed from ibudilast. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 21, p. 3307-3312, 2011.

ALMEIDA, D. D. Síntese e atividade antiproliferativa de novos benzimidazóis polissubstituídos. Dissertação-Universidade Estadual de Maringá. Maringá-Paraná. 2015.

ANTRE, R. V.; CENDILKUMAR, A.; NAGARAJAN, R.; GOLI, D.; OSWAL, R. J. Synthesis, Antitumor and Antimicrobial Activities of Some Novel 1-(Substituted)-3-Methyl-1H-Pyrazol-5(4H)-One. **Journal of Scientific Research**, p. 183-192, 2012.

ANVISA-AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Registro de oncológicos. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/noticias//asset/publisher/>> Acesso 14 de junho de 2016.

ARNOST, M.; PIERCE, A.; TER HAAR, E.; LAUFFER, D.; MADDEN, J.; TANNER, K.; GREEN, J. 3-Aryl-4-(arylhydrazono)-1H-pyrazol-5-ones: Highly ligand efficient. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, p. 1661-1664, 2010.

BACON, E. R.; BAILEY, T. R.; BECKNELL, N. C.; CHATTERJEE, S.; DUNN, D.; HOSTETLER, G. A.; HUDKINS, R. L.; JOSEF, K. A.; KNUSTSEN, L. J. S.; TAO, M.; ZUELI, A. L. Pyrazones derivatives, US2010/0273779.

BANSAL, R.; KUMAR, D.; CARRON, R.; DE LA CALLE, C. Synthesis and vasodilatory activity of some amide derivatives of 6-(4-carboxymethoxyphenyl)-4,5-dihydro-3(2H)-pyridazinone. **European Journal of Medicinal Chemistry** 44, p. 4441–4447, 2009.

BARBOSA, V. A.; FORMAGIO, A. S. N.; SAVARIZ, F. C.; FOGGIO, M. A.; SPINDOLA, H. M.; CARVALHO, J. E.; MEYER, E.; SARRAGIOTTO, M. H. Synthesis and antitumor activity of b-carboline 3-(substituted-carbohydrazide) derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 19, p.6400–6408, 2011.

BARLOCCO, D.; BERGOMI, M.; MENTA, E.; PALUMBO, M.; CIGNARELLA, G. Tricyclic idenopyridazine derivatives: synthesis, cytotoxic activity and DNA-binding properties. **Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas**, 115, p.25-30, 1996.

BASU, A.; KUMAR, G.S. Biophysical studies on curcumin–deoxyribonucleic acid interaction: Spectroscopic and calorimetric approach. **International Journal of Biological Macromolecules**, 62, p.257-264, 2013

BEHROUZ, S. Copper-doped silica cuprous sulfate: A highly efficient heterogeneous nano- catalyst for one-pot three-component synthesis of 1-*H*-2-substituted benzimidazoles from 2-bromoanilines, aldehydes, and [bmim]N₃. **Journal of Saudi Chemical Society** doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jscs>. 2016.

BERGMEYER H. U.; BERNT E. Determination of glucose with glucose-oxidase and peroxidase. In: BERGMEYER H. U. *Methods of enzymatic analysis* (ed.). Academic Press: Weinhein-London. p. 1205-15, 1974.

BIRADAR, J. S.; SASIDHAR, B. S. Solvent-free, microwave assisted Knoevenagel condensation of novel 2,5-disubstituted indole analogues and their biological evaluation. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 2011. 6112-6118.

BOROUJENI, K. P. AND SHOJAEI, P. Poly(4-vinylpyridine)-supported dual acidic ionic liquid: an environmentally friendly heterogeneous catalyst for the one-pot synthesis of 4,4'-(arylmethylene)-bis-(3-meyhyl-1-phenyl-1H-pyrazol-5-ols). **Turkish Journal of Chemistry**, v. 756-764, 2013.

BRANA, M. F.; GRADILLAS, A.; OVALLES, A. G.; LOPEZ, B.; ACERO, N. Synthesis and biological activity of N,N-dialkylaminoalkyl substituted bisindolyl and diphenyl pyrazolone derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 14, p. 9-16, 2006.

CASAS, J. S.; TASENDE, M. S. G.; SÁNCHEZ, A.; SORDO, J.; TOUCEDA, A. Coordination modes of 5-pyrazolones: A solid-state overview. **Coordination Chemistry Reviews**, p.1561–1589, 2007.

CHABNER, B. A.; AMREIN, P. C.; DRUKER, B. J.; MICHAELSON, M. D.; MITSIADES, C. S.; GOSS, P. E.; RYAN, D. P.; RAMACHANDRA, S.; RICHARDSON, P. G.; SUPKO, J. G.; WILSON, W. H. **Chemotherapy of Neoplastic Diseases**. In: BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L., eds. Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. 11.ed. Nova Iorque: McGraw-Hill, 2006, cap. 51.

CORNELIUS, F.; NOSTRUM, V. Polymeric micelles to deliver photosensitizers for photodynamic therapy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 56, p. 9-16, 2004.

COSTA JUNIOR, A. L.; COUTINHO, S. M. G. O câncer: algumas informações, crenças e atitudes. Universidade de Brasília & Hospital de Apoio de Brasília, 2013 SBPO.

COSTANTINO, L.; RASTELLI, G.; CIGNARELLA, G.; BARLOCCO, D. Synthesis and aldose reductase inhibitory activity of a new series of benzo[h]cinnolinone derivatives. **Il Farmaco**, p. 544-552, 2000.

COTRAN, S. R. ; KUMAR, V. ; ROBBINS, S. L. Pâncreas. Patologia básica. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1994. Cap. 17.

CZOK, R.; LAMPRECHT, W. Pyruvate, phosphoenolpyruvate and D-glycerate-2-phosphate. In: BERGMEYER, H. U. Methods of Enzymatic Analysis (eds.). Academic Press: Weinheim-London. p. 1446-51, 1974.

DANDU, E. R.; GRUNER, J. A.; MATHIASSEN, J. R.; AIMONE, L. D.; HOSTETLER, G.; BENFIELD, C.; BENDESKY, R. J.; MARCY, V. R.; RADDATZ, R.; HUDKINS, R. L. Synthesis and evaluation of pyridazinone-phenethylamine derivatives as selective and orally bioavailable histamine H3 receptor antagonists with robust wake-promoting activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 21, p. 6362-6365, 2011.

DE LA FUENTE, T.; MARTÍN-FONTECHA, M.; SALLANDER, J.; BENHAMÚ, B.; CAMPILLO, M.; MEDINA, R. A.; PELLISSIER, L. P.; CLAEYSEN, S.; DUMUIS, A.; PARDO, L.; LÓPEZ-RODRÍGUEZ, M. L. Benzimidazole derivatives as new serotonin 5-HT6 receptor antagonists. Molecular Mechanisms of receptor inactivation. **Journal Of Medicinal Chemistry**, v. 53, p. 1357-136, 2010.

DE VISSER, K. E.; JONKERS, J. Towards understanding the role of cancer-associated inflammation in chemoresistance. **Current Pharmaceutical Design**, v. 15, n. 16, p. 1844-1853, 2009.

DE, S.; KUNDU, R.; GHORAI, A.; MANDAL, R.P.; GHOSH, U. Green synthesis of gold nanoparticles for staining human cervical cancer cells and DNA binding assay. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, 140, p.130-139, 2014.

DUBE, P. N.; BULE, S. S.; USHIR, Y. V.; KUMBHARE, M. R.; DIGHE, P. R. Synthesis of novel 5-methyl pyrazol-3-one derivatives and their in vitro cytotoxic evaluation. **Medicinal Chemistry Research**, 2014. DOI 10.1007/s00044-014-1201-z

DUBEY, S.; BHOSLE, P. A.; Pyridazinone: an important element of pharmacophore possessing broad spectrum of activity. **Medicinal Chemistry Research**, 24, p.3579–3598, 2015.

DUBEY, R.; MOORTHY, N. S.; Comparative studies on conventional and microwave assisted synthesis of benzimidazoles and their 2-substituted derivative with the effect of salt form of reactant. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, 55, p. 115-117, 2007.

ECKSTEIN, J.W. Cdc25 as a potential target of anticancer agents. **Investigational New Drugs** 18, 149–156, 2000.

EL-GHAFFAR, N. F. A.; MOHAMED, M. K.; KADAH, M. S.; RADWAN, A. M.; SAID, G. H.; ABD el AL, S. N. Synthesis and anti-tumor activities of some new pyridazinones containing the 2-phenyl-1*H*-indolyl moiety. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, 3, p. 248-259, 2011.

EL-HAWASHA, S. A. M.; BADAWEYA, E. A. M.; EL-ASHMAWEY, I. M. Nonsteroidal antiinflammatory agents—part 2 antiinflammatory, analgesic and antipyretic activity of some substituted 3-pyrazolin-5-ones and 1,2,4,5,6,7-3*H*-hexahydroindazol-3-ones. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 41, p. 155-165, 2006.

EL-NEZHAWY, A.O.; BIUOMY, A.R.; HASSAN, F.S.; ISMAIEL, A.K.; OMAR, H.A. Design synthesis and pharmacological evaluation of omeprazole-like agents with anti-inflammatory activity, **Bioorganic Medicinal Chemistry**, 21 p.1661-1670, 2013.

FIRST-SYMPOM. Cancer. Disponível em: <<http://www.first-symptom.com/pt/cancer1.html>> Acesso em: 02 de agosto de 2016.

GABALLAH, S. T.; EL-NEZHAWY, A. O. H.; AMER, H.; ALI, M. M.; MAHMOUD, A. E. E.; HOFINGER-HORVATH, A. Synthesis and Antiproliferative Activities of Benzimidazole-Based Sulfide and Sulfoxide Derivatives. **Scientia Pharmaceutica** 84, p. 1–18, 2016.

GANDHI, V., BURGER, J.A., Bendamustine in B-cell malignancies: the new 46-year-old, kid on the block. **Clinical Cancer Research**, 15, 7456– 7461, 2009.

GARNOVSKII, A. D.; URAEV, A. I.; MINKIN, V. I. Metal complexes from aryl and hetarylazocompounds. **Archive for Organic Chemistry**, p. 29-41, 2004.

GILMAM, A. G.; RALL, T.W.; NIES, A. S.; TAYLOR, P.; *Goodman & Gilman - As Bases Farmacológicas da Terapêutica*, 8a ed., Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 1991.

GHOMI, J. S.; KOOPAEI, B. K.; ALAVI, H. S.; Pseudo five-component process for the synthesis of 4,4-(arylmethylene)bis(3-methyl-1H-pyrazol-5-ol) derivatives using ZnAl₂O₄ nanoparticles in aqueous media. **Royal Society of Chemistry Advances**, 4, p. 46106–46113, 2014.

GUNGOR, T.; FOUQUET, A.; TEULON, J. M.; PROVOST, D.; CAZES, M.; CLOAREC, A. Cardiotonic agents. Synthesis and cardiovascular properties of novel 2-arylbenzimidazoles and azabenzimidazoles. **Journal of medicinal chemistry**, 35, p. 4455–4463, 1992.

GUO, L.; QIU, B.; CHEN, G. Synthesis and investigation on the interaction with calf thymus deoxyribonucleic acid of a novel fluorescent probe 7-oxobenzo[b][1,10]phenanthroline-12(7H)-sulfonic acid. **Analytica Chimica Acta**, 588, p.123-130, 2007.

GUTMANN, I; BERGMAYER, H. U. Determination of urea, indicator with phenol and hypochloride. In: BERGMAYER, H. U. Methods of enzymatic analysis. New York: Academic Press, p. 1790-1798 1974.

GUTMANN, I.; WAHLEFELD, A. W. L-(+)-Lactate. Determination with lactate dehydrogenase and NAD. In: BERGMAYER, H. U. Methods of Enzymatic Analysis, (eds.). Academic Press: Weinhein-London. p. 1464-68, 1974.

HAMAGUCHI, W.; MASUDA, N.; ISOMURA, M.; MIYAMOTO, S.; KIKUCHI, S.; AMANO, Y.; HONBOU, K.; MIHARA, T.; WATANABE, T. Design and synthesis of novel benzimidazole derivatives as phosphodiesterase 10A inhibitors with reduced CYP1A2 inhibition. **Bioorganic Medicinal Chemistry**, 21, p.7612-7623, 2013.

HARRIS, R.; BLACK, L.; SURAPANENI, S.; KOLASA, T.; MAJEST, S. [2-(3,4-Difluorophenyl)-4(3-hydroxy-3-methylbutoxy)-5-(4-methanesulphonylphenyl)-2H-pyridazin-3-one], a highly potent and selective disubstituted pyridazinone cyclooxygenase-2 inhibitor. **Journal Pharmacology and Experimental Therapeutics**, p.904–912, 2004.

HASANINEJAD, A.; SHEKOUHY, M.; ZARE, A.; GHATTALI, S. M. S. H.; GOLZAR, N. PEG-SO₃H as a new, highly efficient and homogeneous polymeric catalyst for the synthesis of bis(indolyl)methanes and 4, 4'-(Arylmethylene)-bis-(3-methyl-1-phenyl-1H-pyrazol-5-ol)s in water. **Journal of the Iranian Chemical Society**, p. 411-423, 2011.

HAUGWITZ, R. D.; MAURER, B. V.; JACOBS, G. A.; NARAYANAN, V. L.; CRUTHERS, L.; SZANTO, J. Antiparasitic agents. 3. Synthesis and anthelmintic activities of novel 2-pyridinyl-5-isothiocyanatobenzimidazoles. **Journal of medicinal chemistry**, 22, p. 1113–1118, 1979.

HUANG, H.; YU, Y.; GAO, Z.; ZHANG, Y.; LI, C.; XU, X.; JIN, H.; YAN, W.; MA, R.; ZHU, J.; SHEN, X.; JIANG, H.; CHEN, L.; LI, J. Discovery and Optimization of 1,3,4-Trisubstituted-pyrazolone Derivatives as Novel, Potent, and Nonsteroidal Farnesoid X Receptor (FXR) Selective Antagonists. **Journal Medicinal Chemistry**. 55, p. 7037–705 , 2012.

HUDKINS, R. L.; AIMONE, L. D.; BAILEY, T. R.; BENDESKY, R. J.; DANDU, R. R.; DUNN, D.; GRUNER, J. A.; JOSEF, K. A.; LIN, Y. G.; LYONS, J.; MARCY, V. R.; MATHIASSEN, J. R.; SUNDAR, B. G.; TAO, M.; ZULLI, A. L.; RADDATZ, R.; BACON, E. R. Identification of pyridazin-3-one derivatives as potent, selective histamine H₃ receptor inverse agonists with robust wake activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters** 21, p. 5493–5497, 2011.

HUDKINS, R. L.; AIMONE, L. D.; DANDU, R. R.; DUNN, D.; GRUNER, J. A.; HUANG, Z.; JOSEF, K. A.; LYONS, J. A.; MATHIASSEN, J. R.; TAO, M.; ZULLI, A. L.; RADDATZ, R. 4, 5-Dihydropyridazin-3-one derivatives as histamine H₃ receptor inverse agonists. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 22, p. 194–198, 2012.

HUDKINS, R. L.; ZULLI, A. L.; DANDU, R. R.; TAO, M.; JOSEF, K. A.; AIMONE, L. D.; HALTIWANGER, R. C.; HUANG, Z.; LYONS, J. A.; MATHIASSEN, J. R.; RADDATZ, R.; GRUNER, J. A. 4-Phenoxypiperidine pyridazin-3-one histamine H₃ receptor inverse agonists demonstrating potent and robust wake promoting activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 22, p.1504–1509, 2012.

IDF-INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. About Diabetes. Disponível em: < <http://www.idf.org/about-diabetes> > Acesso em 18 Junho.

INCA-INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Números. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/wcm/dmdc/2015/numeros.asp>> Acesso em: 28 de maio de 2016.

IRAVANI, N.; ALBADI, J.; MOMTAZAN, H.; BAGHERNEJAD, M. Melanime Trisulfonic Acid: an Efficient and Recyclable Solid Acid Catalyst for the Synthesis of 4, 4'-(Arylmethylene)-bis-(1H-pyrazol-5-ols). **Journal of the Chinese Chemical Society**, p. 418-424, 2013.

IYER, P. C.; ZHAO, J.; EMERT-SEDLAK, L. A.; MOORE, K. K.; SMITHGALL, T. E.; DAY, B. W. Synthesis and structure–activity analysis of diphenylpyrazolodiazene inhibitors of the HIV-1 Nef virulence factor. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 24, p.1702–1706, 2014.

JACOBSON, J. O.; POLOVICH, M.; MCNIFF, K. K.; CUMMINGS, C.; GALIOTO, M.; BONELLI, K. R.; MCCORKLE, M. R. American Society of Clinical Oncology/Oncology Nursing Society Chemotherapy Administration Safety Standards. **Journal of Clinical Oncology**, v. 99, p. 1-7, 2009.

JOSHI, D.; PARIKH, K. Synthesis and evaluation of novel benzimidazole derivatives as antimicrobial agents. **Medicinal Chemistry Research**, 23, p.1290-1299, 2014. □

KABANOV, A. V.; BATRAKOVA, E. V.; ALAKHOV, V. Y. Pluronic block copolymers for overcoming drug resistance in cancer. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 54, p. 759–779, 2002.

KABIR, A.; KUMAR, G.S. Probing the interaction of spermine and 1-naphthyl acetyl spermine with DNA polynucleotides: a comparative biophysical and thermodynamic investigation. **Molecular BioSystems**, 10, p.1172-1183, 2014.

KADAM, A.; DAWANE, B.; PAWAR, M.; SHEGOKAR, H.; PATIL, K.; MESHARAM, R.; GACCHE, R. Development of novel pyrazolone derivatives as inhibitors of aldose reductase: An eco-friendly one-pot synthesis, experimental screening and in silico analysis. **Bioorganic Chemistry**, 67-74, 2014.

KALKOTWAR, R. S.; SAUDAGAR, R. B.; JAIN, D. A. Microwave assisted Synthesis and Evaluation of Novel 3-methyl-1,4-dihydropyrazol-5-one derivatives as Anti-inflammatory agents. **Der Chemica Sinica**, p. 1325-1328, 2012.

KAMAL, A.; KUMAR, G. B.; NAYAK, V. L.; REDDY, V. S.; SHAIK, A. B.; RAJENDER; REDDY, M. K. Design, synthesis and biological evaluation of imidazopyridine/imidazopyrimidine-benzimidazole conjugates as potential anticancer agents. **Medicinal Chemical Communications**, 6, p. 606–612, 2015.

KARALE, B. K.; CHAVAN, V. P.; MANE, A. S.; HANGARGE, R. V.; GILL, C. H.; SHINGARE, M. S. Microwave induced synthesis of 3-methyl-4-[(chromon-3-yl)-methylene]-1-phenyl pyrazolin-5-(4H)-ones with alumina support and in solvent free conditions. **Synthetic Communications**, 497-503, 2002.

KERI, R. S.; HIREMATHAD, A.; BUDAGUMPI, S.; NAGARAJA, B. M. Comprehensive Review in Current Developments of Benzimidazole-Based

Medicinal Chemistry. **Chemical Biology & Drug Design**, 86, p.19–65, 2015.

KHAZAEI, A.; ABBASI, F.; MOOSAVI-ZARE, A. R. Tandem cyclocondensation-Knoevenagel-Michael reaction of phenyl hydrazine, acetylacetonate derivatives and arylaldehydes. **New Journal Chemical**, p. 5287-5292, 2014.

KIM, K. R.; KWON, J. L.; KIM, J. S.; NO, Z.; KIM, H. R.; CHEON, H. G. EK-6136 (3-methyl-4-(O-methyl-oximino)-1-phenylpyrazolin-5-one): A novel Cdc25B inhibitor with antiproliferative activity. **European Journal of Pharmacology**, p. 37-42, 2005.

KOJIMA, A.; KOHNO, K. A mild and efficient synthesis of a chiral pyridazinone derivative. **Tetrahedron** 69, p.1658-1662, 2013.

KUMAR, R.; SINGH, P.; GAURAV, A.; YADAV, P.; KHANNA, R.; TEWARI, A.S. Synthesis of Diphenyl Pyridazinone-based flexible system for conformational studies through weak noncovalent interactions: Application in DNA binding. **Journal Chemical Science**. (Amritsar, India), 128, 555-564, 2016.

KÜÇÜKGÜZEL S. G.; SENKARDES, S. Recent advances in bioactive pyrazoles. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 97, p. 786-815, 2015.

KUMAR, V.; CHANG, C. K.; TAN, K. P.; JUNG, Y. S.; CHEN, S. H.; CHENG, Y. S. E.; LIANG, P. H.; Identification, Synthesis, and Evaluation of New Neuraminidase Inhibitors. **Organic Letters**, 16, p.5060–5063, 2014.

KWAK, H.J.; PYUN, Y.M.; KIM, J.Y.; PAGIRE, H.S.; KIM, K.Y.; KIM, K.R.; RHEE, S.D.; JUNG, W.H.; SONG, J.S.; BAE, M.A.; LEE, D.H.; AHN, J.H. Synthesis and biological evaluation of aminobenzimidazole derivatives with a phenylcyclohexyl acetic acid group as anti-obesity and anti-diabetic agents, **Bioorganic Medicinal Chemistry Letter**, 23, p.4713-4718, 2013.

LAKOWICZ, J.R. Principles of fluorescence spectroscopy. 3.ed. Baltimore: Springer, 2006.

LE, W. J.; LU, H. F.; ZHOU, J. T.; CHENG, H. L.; GAO, Y. H. Synthesis of a new urea derivative: a dual-functional organocatalyst for Knoevenagel condensation in water. **Tetrahedron Letters**, 54, p.5370–5373, 2013.

LEIGHL, N. B.; DENT, S.; CLEMONS, M.; VANDENBERG, T. A.; TOZER, R.; WARR, D. G.; CRUMP, R. M.; HEDLEY, D.; POND, G. R.; DANCEY, J. E.; MOORE, M. A Phase 2 study of perifosine in advanced or metastatic breast cancer. **Breast Cancer Research And Treatment**, v. 108, n. 1, p. 87-92,

2008.

LI, X.; GAI, K.; YUAN, Z.; WU, J.; LIN, A.; YAO, H. Organocatalyzed Formal [4+2] Cycloaddition of in situ Generated Azoalkenes with Arylacetic Acids: An Efficient Approach to the Synthesis of 4,5-Dihydropyridazin-3(2H)-ones. **Advanced Synthesis & Catalysis** 357, 3479 – 3484, 2015.

LISSITCHKOV, T., ARNAUDOV, G., PEYTCHEV, D., MERKLE, K.J. Phase-I/II study to evaluate dose limiting toxicity, maximum tolerated dose, and tolerability of bendamustine HCl in pre-treated patients with B-chronic lymphocytic leukaemia (Binet stages B and C) requiring therapy. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, 132, 99–104, 2006.

LIU, P.; WANG, B.; QIAO, W. Multi-anticancer drugs encapsulated in the micelle: A novel chemotherapy to cancer. **Go to Medical Hypotheses**, 71, p. 379–381, 2008.

LONDERSHAUSEN, M. Approaches to New Parasiticides. *Pesticide Science*, p. 269-292, 1996.

LUQUE, F. J.; LÓPEZ-BES, J. M.; CEMELI, J.; AROZTEGUI, M.; OROZCO, M. Solvent effects on tautomerism equilibria in heterocycles. **Theoretical Chemistry Accounts**, 96, p. 105-113, 1997.

MAHAJAN, S. S.; SCIAN, M.; SRIPATHY, S.; POSAKONY, J.; LAO, U.; LOE, T. K.; LEKO, VID.; THALHOFER, A.; SCHULER, A. D.; BEDALOV, A.; SIMON, J.A. Development of Pyrazolone and Isoxazol-5-one Cambinol Analogues as Sirtuin Inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**,. 3283-3294, 2014.

MALINKA, W.; REDZICKA, A.; LOZACH, O. New derivatives of pyrrolo[3,4-d]pyridazinone and their anticancer effects. **IL FARMACO**, v. 59, p. 457-462, 2004.

MAO, J. H.; WANG, Z. T.; WANG, Z. Y.; CHENG, Y. N-Heterocyclic Carbene-Catalyzed Oxidative Annulations of α,β -Unsaturated Aldehydes with Hydrazones: Selective Synthesis of Optically Active 4,5-Dihydropyridazin-3-ones and Pyridazin-3-ones. **Journal Organic Chemistry**, 80, p.6350–6359, 2015.

MARIAPPAN, G.; SAHA, B. P.; SUTHARSON, L.; HALDAR, A. Synthesis and bioactivity evaluation of pyrazolone derivatives. **Indian Journal of Chemistry**, 1671-1674, 2010.

MARIAPPAN, G.; SAHA, B. P.; SUTHARSON, L.; SINGH, A.; GARG, S.; PANDEY, L.; KUMAR, D. Analgesic, anti-inflammatory, antipyretic and toxicological evaluation of some newer 3-methyl pyrazolone derivatives. **Saudi Pharmaceutical Journal** 19, p.115–122, 2011.

MAZIMBA, O.; WALE, K.; LOETO, D.; KWAPE, T. Antioxidant and antimicrobial studies on fused-ring pyrazolones. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 22, p. 6564-6569, 2014.

MEHD, K.M.; SOHEILA, K.; HAMIDEH, R.; HOSSEIN, P. DNA binding studies of Chloridazon. *New Biotechnology*, 25, p.366-367, 2005.

MEYER, E. Síntese de novos potenciais antagonistas dos receptores da angiotensina II contendo unidades heterocíclicas. Tese de Doutorado em Química Orgânica - Universidade Federal de Santa Catarina. Santa Catarina, p. 302. 2003.

MEYER, E.; JOUSSEF, A. C.; GALLARDO, H.; DE SOUZA L. B. P. Synthesis of New 4,5-Dihydro-3(2H)-pyridazinone Derivatives. *Synthetic Communications*, p. 783–793, 2004.

MEYERS, C. A. How chemotherapy damages the central nervous system. *Journal of Biology* v. 7, n. 11, p. 1-3, 2008.

MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. O Câncer de Mama no Brasil: Situação Epidemiológica e Rastreamento. (Apresentação no Encontro Anual sobre Rastreamento do Câncer de Mama, 17 de Abril de 2009).

MOHAREB, R. M.; EL-SAYED, N. N. E.; ABDELAZIZ, M. A. Uses of Cyanoacetylhydrazine in Heterocyclic Synthesis: Novel Synthesis of Pyrazole Derivatives with Anti-tumor Activities. *Molecules* 17, p.8449-8463, 2012.

MOJTAHEDI, M. M.; JALALI, M. R.; ABAEE, M. S.; BOLOURTCHIAN, M. Microwave-assisted synthesis of substituted pyrazolones , under solvent-free conditions. *Heterocyclic Communication*, 225-228, 2006.

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

MONKS, A.; SCUDIERO, D.; SKEHAN, P.; SHOEMAKER, R.; PAULL, K.; VISTICA, D.; HOSE, C.; LANGLEY, J.; CRONISE, P.; VAIGRO-WOLFF, A.; GRAY-GOODRICH, M.; CAMPBELL, H.; MAYO, J.; BOYD, M. Feasibility of a High-Flux Anticancer Drug Screen Using a Diverse Panel of Cultured Human Tumor Cell Lines. *Journal National Cancer Institute* 83, p. 757-766, 1991.

MURTY, M. S. R.; RAO, B. R.; RAM, K. R.; YADAV, J. S.; ANTONY, J.; ANTO, R. J. Synthesis and preliminary evaluation activity studies of novel 4-(aryl/heteroaryl-2-ylmethyl)-6-phenyl-2-[3-(4-substitutedpiperazine-1-yl)propyl]pyridazin-3(2H)-one derivatives as anticancer agents. *Medicinal Chemistry Research*, p. 3161–3169, 2012.

MYLARI B. L., ARMENTO S. J., BEEBE D. A., CONN E. L., COUTCHER J. B., DINA M. S., O'GORMAN M. T., LINHARES M. C., MARTIN W. H., OATES P. J., TESS D. A., WITHBROE G. J., ZEMBROWSKI W. J. A Novel Series of Non-Carboxylic Acid, Non-Hydantoin Inhibitors of Aldose Reductase with Potent Oral Activity in Diabetic Rat Models: 6-(5-Chloro-3-methylbenzofuran-2-sulfonyl)-2H-pyridazin-3-one and Congeners. **Journal of Medicinal Chemistry**, p. 6326-6339, 2005.

MYLARI, B. L.; ARMENTO, S. J.; BEEBE, D. A.; CONN, E. L.; COUTCHER, J. B.; DINA, M. S.; O'GORMAN, M. T.; LINHARES, M. C.; MARTIN, W. H.; OATES, P. J.; TESS, D. A.; WITHBROE, G. J.; ZEMBROWSKI W. J. A Highly Selective, Non-Hydantoin, Non-Carboxylic Acid Inhibitor of Aldose Reductase with Potent Oral Activity in Diabetic Rat Models: 6-(5-Chloro-3-methylbenzofuran-2-sulfonyl)-2-H-pyridazin-3-one. **Journal of Medicinal Chemistry**, p. 2283-2286, 2003.

NIKNAM, K.; SABERI, D.; SADEGHEYAN, M.; DERIS, A. Silica-bonded S-sulfonic acid: an efficient and recyclable solid acid catalyst for the synthesis of 4, 4'-(arylmethylene)bis(1H-pyrazol-5-ols). **Tetrahedron Letters**, p. 692-694, 2010.

OCHIAI, K.; ANDO, N.; IWASE, K.; KISHI, T.; FUKUCHI, K.; OHINATA, A.; ZUSHI, H.; YASUE, T.; ADAMS, D. R.; KOHNO, Y. Phosphodiesterase inhibitors. Part 2: Design, synthesis, and structure–activity relationships of dual PDE3/4-inhibitory pyrazolo[1,5-a]pyridines with anti-inflammatory and bronchodilatory activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 21, p.5451–5456, 2011.

OCHIAI, K.; TAKITA, S.; EIRAKU, T.; KOJIMA, A.; IWASE, K.; KISHI, T.; FUKUCHI, K.; YASUE, T.; ADAMS, D. R.; ALLCOCK, R. W.; JIANG, Z.; KOHNO, Y. Phosphodiesterase inhibitors. Part 3: Design, synthesis and structure–activity relationships of dual PDE3/4-inhibitory fused bicyclic heteroaromatic-dihydropyridazinones with anti-inflammatory and bronchodilatory activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 20, p.1644–1658, 2012.

OCHIAI, K.; TAKITA, S.; KOJIMA, A.; EIRAKU, T.; IWASE, K.; KISHI, T.; OHINATA, A.; YAGETA, Y.; YASUE, T.; ADAMS, D. R.; KOHNO, Y. Phosphodiesterase inhibitors. Part 5: Hybrid PDE3/4 inhibitors as dual bronchorelaxant/anti-inflammatory agents for inhaled administration. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 23, p.375–381, 2013.

OVAIS, S.; JAVED, K.; YASEEN, S.; BASHIR, R.; RATHORE, P.; YASEEN, R.; HAMEED, A. D.; SAMIM, M. Synthesis, antiproliferative and anti-inflammatory activities of some novel 6-aryl-2-(p-(methanesulfonyl)phenyl)-

4,5-dihydropyridazi-3(2H)-ones. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 67, p. 352-358, 2013.

ÖZKAY, Y.; YURTTAŞ, L.; DIKMEN, M.; ENGÜR, S. Synthesis and antiproliferative activity evaluation of new thiazole–benzimidazole derivatives using real-time cell analysis (RTCA DP). **Medicinal Chemistry Research**, 25, p.482–493, 2016.

PAL, S.; MAREDDY, J.; DEVI, N. S. High Speed Synthesis of Pyrazolones using Microwave-Assisted Neat Reaction Technology. **Journal Brazilian Chemistry Society**, 19, p.1207-1214, 2008.

PEETLA, C.; STINE, A.; LABHASETWAR, V. Biophysical interactions with model lipid membranes: applications in drug discovery and drug delivery. **Molecular Pharmaceutics**, 6, p. 1269-1276, 2009.

PINNA, G.A.; CURZU, M. M.; BARLOCCO, D.; CIGNARELLA, G.; CAVALLETTI, E.; GERMINI, M.; BERGER, K. Synthesis and pharmacological study of 5-aryl- 6-methyl-4,5-dihydro-pyridazin-3(2H)ones and related 5-aryl-6- methyl-pyridazin-3(2H)ones. **Farmaco Science**, 43 (6), p.539–549,1988.

PRASAD, S.; SAJJA, R. K.; NAIK, P.; CUCULLO, L. Diabetes Mellitus and Blood-Brain Barrier Dysfunction: An Overview. **Journal of Pharmacovigilance**, 2, p.125, 2014.

PRESTON, P. N. Synthesis, Reactions, and Spectroscopic Properties of Benzimidazoles. **Chemical Reviews**, v. 74, p. 274-314, 1974.

PUROHIT, A.; RADEKE, H.; AZURE, M.; HANSON, K.; BENETTI, R.; SU, F.; YALAMANCHILI, P.; YU, M.; HAYES, M.; GUARALDI, M.; KAGAN, M.; ROBINSON, S.; CASEBIER, D. Synthesis and Biological Evaluation of Pyridazinone Analogues as Potential Cardiac Positron Emission Tomography Tracers. **Journal of Medicinal Chemistry**, p. 2954-2970, 2008.

QIN, Y.; ZHANG, Y.; YAN, S.; YE, L. A comparison study on the interaction of hyperoside and bovine serum albumin with Tachiya model and Stern–Volmer equation. **Spectrochimica Acta, Part A**, 75, p.1506-1510, 2010.

RAGAVAN, R. V.; KUMAR, K. M.; VIJAYAKUMAR, V.; SARVESWARI, S.; RAMAIAH, S.; ANBARASU, A.; KARTHIKEYAN, S.; GIRIDHARAN, P.; KUMARI, N. S. β -Keto esters from ketones and ethyl a rapid, general, efficient synthesis of pyrazolones and their antimicrobial, in silico and in vitro cytotoxicity studies. **Organic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 3, p. 2-15, 2013.

RAMRAO, K. U.; RAMKUMAR, C. A.; ANANT, N. A.; RAMANUJA, A. N. Phase Transfer Catalyzed *N*-Monoalkylation of Amino Anthraquinones.

Synthetic Communication, 21, p. 1129-1135, 1991. □

RAO, R. M.; SREERAMULU, J.; RAVINDRANATH, L. K.; REDDY, G. N.; HANUMANTHURAYUDU, K.; REDDY, G. N.; JAYARAJU, A.; MADHUSUDHAN, P. Synthesis and biological screening of some pyridine and pyrrol derivatives of pyrazolo[3-4-c] pyrazoles. **Journal of chemical and pharmaceutical research**, 2012. 271-278.

RASHID, M.; HUSAIN, A.; MISHRA, R.; KARIM, S.; KHAN, S.; AHMAD, M.; AL-WABEL, N.; HUSAIN, A.; AHMAD, A.; KHAN, S. A. Design and synthesis of benzimidazoles containing substituted oxadiazole, thiadiazole and triazolothiadiazines as a source of new anticancer agents. **Arabian Journal of Chemistry**, 2015, <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2015.08.019>

RASTELLI, G.; VIANELLO, P.; BARLOCCO, D.; COSTANTINO, L.; CORSO, A. D.; MURA, U. Structure-based design of an inhibitor modeled at the substrate active site of aldose reductase. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, p. 1897-190, 1997.

RATISH, I. G.; JAVED, K.; AHMAD, S.; BANO, S.; ALAM, M. S.; AKHTER, M.; PILLAI, K. K.; OVAIS, S.; SAMIM, M. Synthesis and evaluation of anticancer activity of some novel 6-aryl-2-(p-sulfamylphenyl)-pyridazin-3(2H)-ones. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 49, 304-309, 2012.

REDDY, N. B.; BURRA, V. R.; RAVINDRANATH, L. K.; KUMAR, V. N.; SREENIVASULU, R.; SADANANDAM, P. Synthesis and biological evaluation of benzimidazole fused ellipticine derivatives as anticancer agents. **Monatshefte für Chemie**, 147, p.599–604, 2016.

REDDY, R. S.; SARAVANAN, K.; KUMAR, P. An Efficient Approach to γ -Alkylidene γ -Butyrolactones : Application to the Syntheses of Pyridazinones and Diazocinones. **Tetrahedron**, v. 54, p. 6553-6564, 1998.

REDDY, T. S.; KULHARI, H.; REDDY, V. G.; BANSAL, V.; KAMAL, A.; SHUKLA, R. S. Design, synthesis and biological evaluation of 1,3-diphenyl-1H- pyrazole derivatives containing benzimidazole skeleton as potential anticancer and apoptosis inducing agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 101, 790-805, 2015.

REHMAN, S. U.; SARWAR, T.; HUSAIN, M. A.; ISHQI, H.M.; TABISH, M. Studying non-covalent drug–DNA interactions. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 576, p.49-60, 2015.

RISITANO, F.; GRASSI, G.; CARUSO, F.; FOTI, F. C,C- and C,N-linked Dimers and 4-Arylmethyl derivatives from 4-Arylmethylene pyrazol-S-ones and isoxazol-5-ones with 2-Arylbenzimidazolines. **Tetrahedron**, v. 52, p. 1443-1450, 1996. □

SADEGHI, B.; RAD, M. G. Synthesis of 4,4'-(arylmethylene)bis(1H-pyrazol-5-ols) catalyzed by nanosilica supported perchloric acid in water. **Iranian Journal of Catalysis**, 67-70, 2014.

SAEIDIFAR, M., MANSOURI-TORSHIZI, H., AKBAR SABOURY, A. Biophysical study on the interaction between two palladium(II) complexes and human serum albumin by Multispectroscopic methods. **Journal of Luminescence**, 167, p.391–398, 2015.

SALLAM, M. S.; EL-HASHASH, M. A.; GUIRGUIS, D. B. Synthesis and antimicrobial activity of some novel substituted pyridazin-3(2H)-ones containing 1,3,4-thiadiazole moiety, **Medicinal Chemistry Research**, 25, p.369–380, 2016.

SAVARIZ, F. C.; FOGLIO, M. A.; RUIZ, A. L. T.; COSTA, W. F.; SILVA, M. M.; SANTOS, J. C. C.; FIGUEIREDO, I. M.; MEYER, E.; CARVALHO, J. E.; SARRAGIOTTO, M. H. Synthesis and antitumor activity of novel 1-substituted phenyl 3-(2-oxo-1,3,4-oxadiazol-5-yl) β -carboline and their Mannich bases. **Bioorganic Medicinal Chemistry**, 22, p.6867-6875, 2014.

SAWANT, R.; KAWADE, D. Synthesis and biological evaluation of some novel 2- phenyl benzimidazole-1-acetamide derivatives as potential anthelmintic agents, **Acta Pharmaceutica**, 61, 353-361, 2011. □

SBD-SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Diretrizes 2015/2016. Disponível em: < <http://www.diabetes.org.br/sbdonline/images/docs/DIRETRIZES-SBD-2015-2016.pdf>> Acesso em 18 de Junho.

SBPO- SOCIEDADE BRASILEIRA DE PSICO-ONCOLOGIA. Câncer. Disponível em : < <http://sbpo.org.br/tipos/artigos/>> Acesso em 29 de maio 2016.

SHAHABADI, N., HADIDI, S., GHASEMIAN, Z., TAHERPOUR, A. Racemic R,S-venlafaxine hydrochloride–DNA interaction: Experimental and computational evidence. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, 145, p.540–552, 2015.

SHEN, H.; SHAO, X.; XU, H.; LI, J. PAN, S. In Vitro Study of DNA Interaction with Trichlorobenzenes by Spectroscopic and Voltammetric Techniques. **International Journal of Electrochemical Science**, 6, 532-547, 2011.

SHEN, M.; DRIVER, T. G. Iron (II) Bromide-Catalyzed Synthesis of Benzimidazoles from Aryl Azide. **Organica Letters**, v.10, p. 3367-3370, 2008.

SHI, J.-H., LIU, T.-T., JIANG, M., CHEN, J., WANG, Q. Characterization of interaction of calf thymus DNA with gefitinib: Spectroscopic methods and

molecular docking. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, 147, 47–55, 2015.

SHIRINI, F.; SEDDIGHI, M.; MAZLOUMI, M.; MAKHSOUS, M.; ABEDINI, M. One-pot synthesis of 4,4-(arylmethylene)-bis-(3-methyl-1-phenyl-1H-pyrazol-5-ols) catalyzed by Bronsted acidic ionic liquid supported on nanoporous Na⁺-montmorillonite. **Journal of Molecular Liquids**, p. 291-297, 2015.

SIDDIQUI, A. A.; MISHRA, R.; SHAHARYAR, M. Synthesis, characterization and antihypertensive activity of pyridazinone derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, p. 2283-2290, 2010.

SIH, J. C.; IM, W.; ROBERT, A.; GRABER, D. R.; BLAKEMAN, D. P. Studies on (H⁺-K⁺)-ATPase inhibitors of gastric acid secretion. Prodrugs of 2-[(2-pyridinylmethyl)sulfinyl]benzimidazole proton-pump inhibitors. **Journal of medicinal Chemistry**, v. 34, p. 1049-1062, 2010.

SILVA, M.M., SAVARIZ, F.C., SILVA-JÚNIOR, E.F., AQUINO, T.M. DE, SARRAGIOTTO, M.H., SANTOS, J.C.C., FIGUEIREDO, I.M. Interaction of β -Carbolines with DNA: Spectroscopic Studies, Correlation with Biological Activity and Molecular Docking. **Journal Brazilian Chemical Society**, *in press*, 2016. doi:10.5935/0103-5053.20160035.

SIMPLÍCIO, F. I.; MAIONCHI, F.; HIOKA, N. Terapia fotodinâmica: Aspectos farmacológicos, aplicações e avanços recentes no desenvolvimento de medicamentos. **Química Nova**, 25, p. 801-807, 2002.

SINGH, D. AND SINGH D. Syntheses of 1,3-Disubstituted 4-Arylidene-pyrazolin-5-ones and the keto and enol forms of 4,4'-arylidenebis(1,3-disubstituted-pyrazolin-5-ones). **Journal of Chemical and Engineering Data**, p. 355-356, 1984.

SINGLA, P.; LUXAMI, V.; PAUL, K. Triazine-benzimidazole hybrids: Anticancer activity, DNA interaction and dihydrofolate reductase inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 23, p. 1691–17, 2015.

SIRAJUDDIN, M., ALI, S., BADSHAH, A. Drug-DNA interactions and their study by UV-visible, fluorescence spectroscopies and cyclic voltametry. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, 124, p.1–19, 2013.

SIRCAR, I.; MORRISON, G. C.; BURKE, S. E.; SKEEAN, R.; WEISHAAR, R. E. Cardiotonic Agents. 6. Synthesis and Inotropic Activity of Synthesis And Inotropic Activity Of 2,4-Dihydro-5-[4-(1H-Imidazol-1-Yl)Phenyl]-3H-Pyrazol-3-Ones: Ring Contracted Analogues Of Imazodan. **Journal of Medicinal Chemistry**, p. 1724-1728, 1987.

SKEDELJ, V.; TOMASIC, T.; MASIC, L. P.; ZEGA, A. ATP-Binding Site of Bacterial Enzymes as a Target for Antibacterial Drug Design. **Journal of medicinal chemistry**, v. 54, p. 915-929, 2011.

SONTAKKE, V. A.; LAWANDE, P. P.; KATE, A. N.; KHAN, A.; JOSHI, R.; ANUPA A. KUMBHAR, A. A.; SHINDE, V. S. Antiproliferative activity of bicyclic benzimidazole nucleosides: synthesis, DNA-binding and cell cycle analysis. **Organic & Biomolecular Chemistry**, 14, p.4136, 2016.

SONTAKKE, V. A.; KATE, A. N.; GHOSH, S.; MORE, P.; GONNADE, R.; KUMBHAR, N. M.; KUMBHAR, A. A.; CHOPADE, B. A.; SHINDE, V. S. Synthesis, DNA interaction and anticancer activity of 2-anthryl substituted benzimidazole derivatives. **New Journal Chemistry**, 39, p.4882, 2015.

STEUBER, H.; ZENTGRAF, M.; PODJARNY, A.; HEINE, A.; KLEBE, G. High-resolution Crystal Structure of Aldose Reductase Complexed with the Novel Sulfonyl-pyridazinone Inhibitor Exhibiting an Alternative Active Site Anchoring Group. **Journal of Molecular Biology**, p. 45-56, 2006.

SUBASTRI, A., DURGA, A., HARIKRISHNA, K., SURESHKUMAR, M., JEEVARATNAM, K., GIRISH, K.S., THIRUNAVUKKARASU, C.. Exploration of disulfiram dealings with calf thymus DNA using spectroscopic, electrochemical and molecular docking techniques. **Journal of Luminescence**, 170, p.255–261, 2016.

SUJATHA, K.; SHANTHI, G.; SELVAM, N. P.; MANOHARAN, S.; PERUMAL, P. T.; RAJENDRAN, M. Synthesis and antiviral activity of 4,4'-(arylmethylene)bis(1H-pyrazol-5-ols) against peste des petits ruminant virus (PPRV). **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, p. 4501-4503, 2009.

SUNDAR, B. G.; BAILEY, T.; BACON, E.; AIMONE, L.; HUANG, Z.; LYONS, J.; RADDATZ, R.; HUDKINS, R. Amine-constrained pyridazinone histamine H₃ receptor antagonists. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters** 21, p. 5543–5546, 2011.

TANABE, E. Síntese de derivados benzimidazólicos contendo grupos benzamidas e N'-ilidenos substituídos-benzimidazóis ligados na posição-2' do benzimidazol como novos potenciais agentes antitumorais. Dissertação-Universidade Estadual de Maringá. Maringá-Paraná. 2012.

TANG, J.; HUANG, X. Novel and efficient solid-phase synthesis of 4,6-disubstituted 4,5-dihydro-3(2H)-pyridazinones. **Journal of Chemical Research**, p. 599-600, 2003.

TANG, X.; CHANG, J.; LIU, C.; ZHANG, B.; Base initiated aromatization/CAO bond formation: a new entry to O-pyrazole polyfluoroarylated ethers. **Tetrahedron Letters**, 55, p.6534–6537, 2014.

TAO, M.; AIMONE, L. D.; HUANG, Z.; MATHIASSEN, J.; RADDATZ, R.; LYONS, J.; HUDKINS, R. L. Optimization of 5-Pyridazin-3-one Phenoxypropylamines as Potent, Selective Histamine H₃ Receptor Antagonists with Potent Cognition Enhancing Activity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, p. 414-423, 2012.

TARIGHAT, M. A.; SHAHBAZI, E.; NIKNAM, K. Simultaneous determination of Mn²⁺ and Fe³⁺ as 4,4'[(4-chlorophenyl)methylene]bis(3-methyl-1-phenyl-1H-pyrazol-5-ol) complexes in some foods, vegetable and water samples by artificial neural network. **Food Chemistry**, p. 991-997, 2013.

TAVARES, M.; ANDRADE, A. C.; ALEXANDRE MEBAZAA, A. Levosimendan use in several scenarios of acute heart failure. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v. 90, p. 231-235, 2008.

TAYEBI, S.; BAGHERNEJAD, M.; SABERI, D.; NIKNAM, K. Sulfuric Acid ([3-(3-Silicapropyl)sulfanyl]propyl)ester as a Recyclable catalyst for the synthesis of 4,4'-(arylmethylene)bis(1H-pyrazol-5-ols). **Chinese Journal of Catalysis**, v. 1477-1483, 2011.

THOMSON, A. B. R. Are the Orally Administered Proton Pump inhibitors Equivalent? A Comparison Lansoprazole, Omeprazole, Pantoprazole, and Rabeprazole. **Current Gastroenterology Reports**. v.2, p. 482-49, 2000.

TONG, Y.; BOUSKA, J. J.; ELLIS, P. A.; JOHNSON, E. F.; LEVERSON, J.; LIU, X.; MARCOTTE, P. A.; OLSON, A. M.; OSTERLING, D. J.; PRZYTULINSKA, M.; RODRIGUEZ, L. E.; SHI, Y.; SONI, N.; STAVROPOULOS, J.; THOMAS, S. Synthesis and Evaluation of a New Generation of Orally Efficacious Benzimidazole-Based Poly(ADP-ribose) Polymerase-1 (PARP-1) Inhibitors as Anticancer Agents. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 52, p. 6803-6813, 2009.

TONELLI, M.; SIMONE, M.; TASSO, B.; NOVELLI, F.; BOIDO, V.; SPARATORE, F.; PAGLIETTI, G.; PRICI, S.; GILIBERTI, G.; BLOIS, S.; IBBA, C.; SANNA, G.; LADDO, R. COLLA, P.L. Antiviral activity of benzimidazole derivatives II antiviral activity of 2-phenylbenzimidazole derivatives, **Bioorganic Medicinal Chemistry**, 18, p. 2937-2953, 2010. □

TÓTH, G.; KÓVER, K. E. Simple, Safe, Large Scale Synthesis Of 5-Arylmethyl-2,2-Dimethyl-1,3-Dioxane-4,6-Diones And 3-Aryl-Propanoic Acids. **Synthetic Communication**, v. 35, p. 3067-3074, 1995.

TÓTH, G.; MOLNAR, S.; TAMAS, T.; BORBÉLY, I. An Efficient Synthesis Of 4,5-Dihydro-3(2h)-Pyridazinone Derivatives. **Synthetic Communication**, v. 27, p. 3513-3523, 1997.

UZOUKWU, A. B.; AL-JUAID, A. S.; HITCHCOCK, P. B.; SMITH, J. D. The Synthesis and crystal structures of 1-phenyl-3-methyl-4-butanoylpyrazol-5-

one and of two pyrazolonato complexes of iron. **Polyhedron**, p. 2719-2724, 1993.

VALDEZ-PADILLA, D.; RODRÍGUEZ-MORALES, S.; HERNANDEZ-CAMPOS, A.; HERNANDEZ- LUIS, F.; PEZ-MULIA, L. Y.; TAPIA-CONTRERAS, A.; CASTILLO, R. Synthesis and anti- protozoal activity of novel 1-methylbenzimidazole derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 17, p. 1724-1730, 2009.

WANG, T.; DONG, Y.; WANG, L. C.;_CHEN, Z. Synthesis and Bioactivity of 6-Phenyl-4,5-dihydro-3(2H)-pyridazinone Derivatives. **Arzneimittelforschung**, 57(10), p. 641-646, 2007.

WEXLER, R. R. et al. Nonpeptide Angiotensin II Receptor Antagonist: The Next Generation in Antihypertensive Therapy. **Journal medicinal Chemistry**, v. 39, p. 625-656, 1996.

WHITE, A. W.; CURTIN, N. J.; EASTMAN, B. W.; GOLDING, B. T.; HOSTOMSKY, Z.; KYLE, S.; LI, J.; MAEGLEY, K. A.; SKALITZKY, D. J.; WEBBER, S. E.; YU, X. H.; GRIFFIN, R. J. Potentiation of cytotoxic drug activity in human tumour cell lines, by amine-substituted 2-arylbenzimidazole-4-carboxamide PARP-1 inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 14, p. 2433-2437, 2004.

WHO-World Health Organization. Essential Medicines. Disponível em: <http://www.who.int/medicines/publications/essentialmedicines/EML2015_8-May-15.pdf?ua=1> Acesso em 29 de maio de 2016.

WRIGHT, J. B. The Chemistry of the Benzimidazoles. **Chemical Reviews**, v. 48. p. 397-541, 1951

WUBULIKASIMU, R.; YANG, Y.; XUE, F.; LUO, X.; SHAO, D.; LI, Y.; YE, W. Synthesis and biological evaluation of novel benzimidazole derivatives bearing a heterocyclic ring at 4/5 position, Bull. **Korean Chemical Society**, 34, p.2297-2304, 2013. □

XIAOHUI, Y.; PINGHU, Z.; YONGHONG, Z.; JUNSONG, W.; HONGJUN, L. Synthesis and Antioxidant Activities of Novel 4,4'-Arylmethylene-bis(1H-pyrazole-5-ol)s Lignin. **Chinese Journal of Chemistry**, p. 670-674, 2012.

YADAV, G.; GANGULY, S. Structure activity relationship (SAR) study of benzimidazole scaffold for different biological activities: A mini-review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 97, p. 419-443, 2015.

YAKESHI, G. A. M. U. Fungicidal composition for agriculture and gardening use. JPS5251025, 1977.

YANG, L.; JIN, W.; LIN, J. Synthesis, crystal structure and magnetic properties of novel dinuclear complexes of manganese, cobalt and nickel with 4-acetylpyrazolone. **Polyhedron**, p. 93-98, 2000.

YU, X.; JIANG, B.; LIAO, Z.; JIAO, Y. YI, P. Study on the interaction between Besifloxacin and bovine sérum albumin by spectroscopic techniques. **Spectrochimica Acta, Part A**, 149, 116-121, 2015.

ZANG, H.; SU, Q.; MO, Y.; CHENG, B. Ionic liquid under ultrasonic irradiation towards a facile synthesis of pyrazolone derivatives. **Ultrasonics Sonochemistry**, p. 68-72, 2011.

ZHANG, X.; JACKSON, J. K.; BURT, H .M. Development of amphiphilic diblock copolymers as micelar carriersoftaxol. **International Journal of Pharmaceutics**, 132, p.195–206, 1996.

ZHAO, W.; XU, J.; CHEN, H. Photoelectrochemical DNA Biosensors. **Chemical Review**, 114, p.7421-7441, 2014.

ANEXOS

Derivados 4,5-Diidro-3(2H)-piridazinona

6-(4-Bromofenil)-4-(benzil)-4,5-diidro-2H-piridazin-3-ona (8a)

Figura 1-A: Espectro de RMN ¹H (300MHz, DMSO-d₆) do composto 8a.

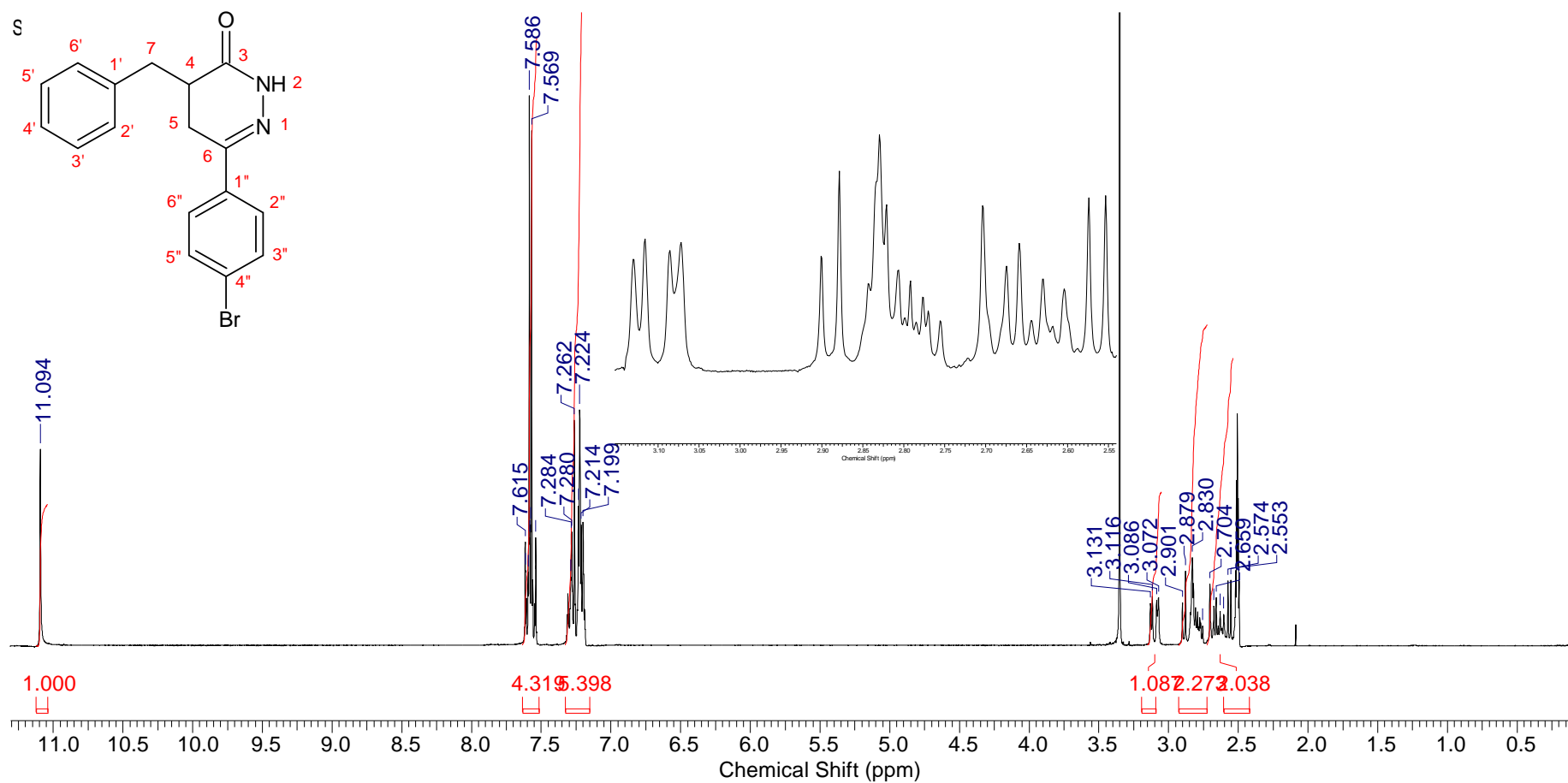
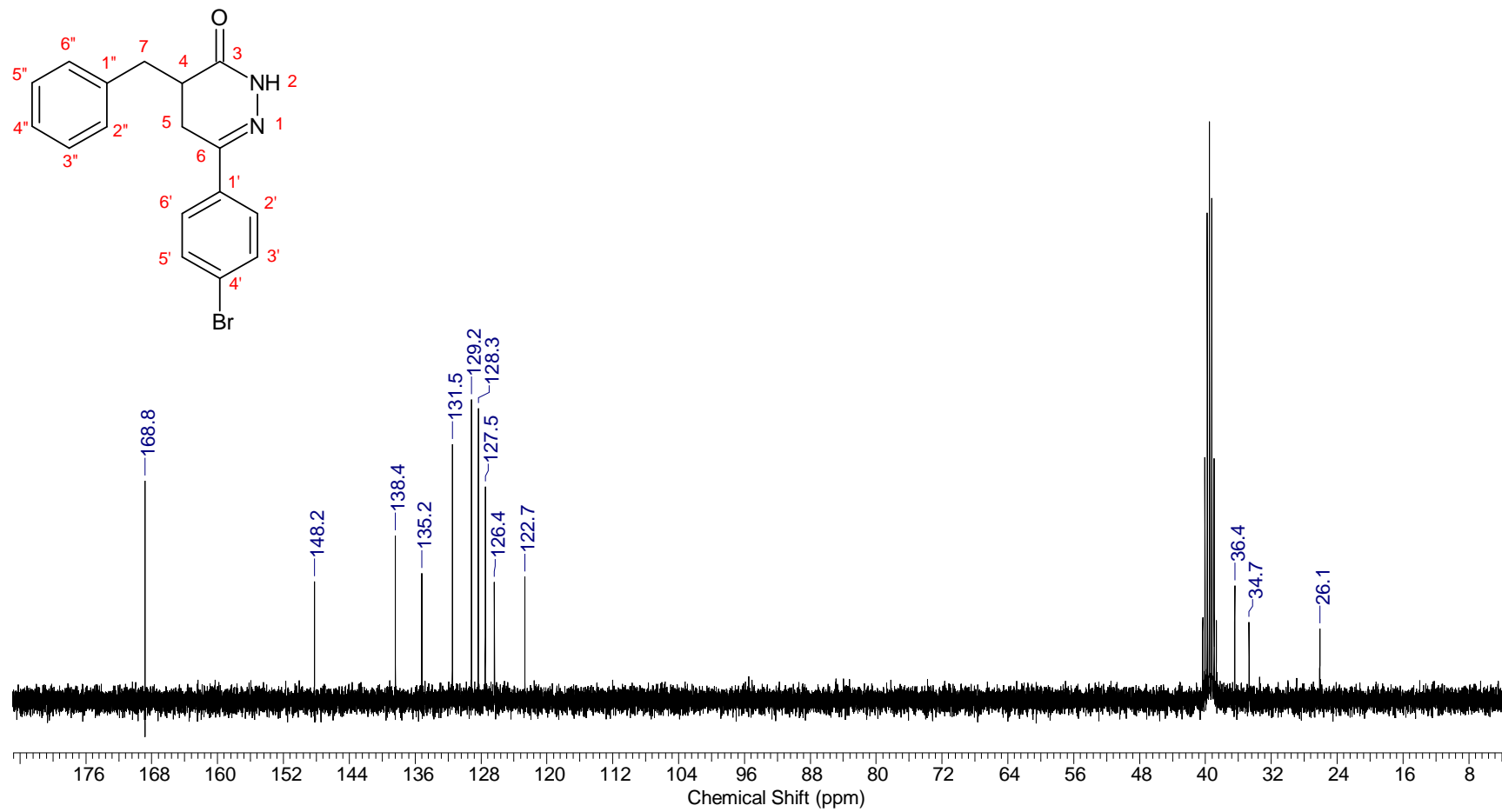


Figura 2-A: Espectro de RMN ^{13}C (75,46 MHz, DMSO- d_6) do composto **8a**.



6-(4-Bromofenil)-4-(4-fluorobenzil)-4,5-diidro-2H-piridazin-3-ona (8b)
Figura 3-A: Espectro de RMN ¹H (500MHz, DMSO-d₆) do composto **8b**.

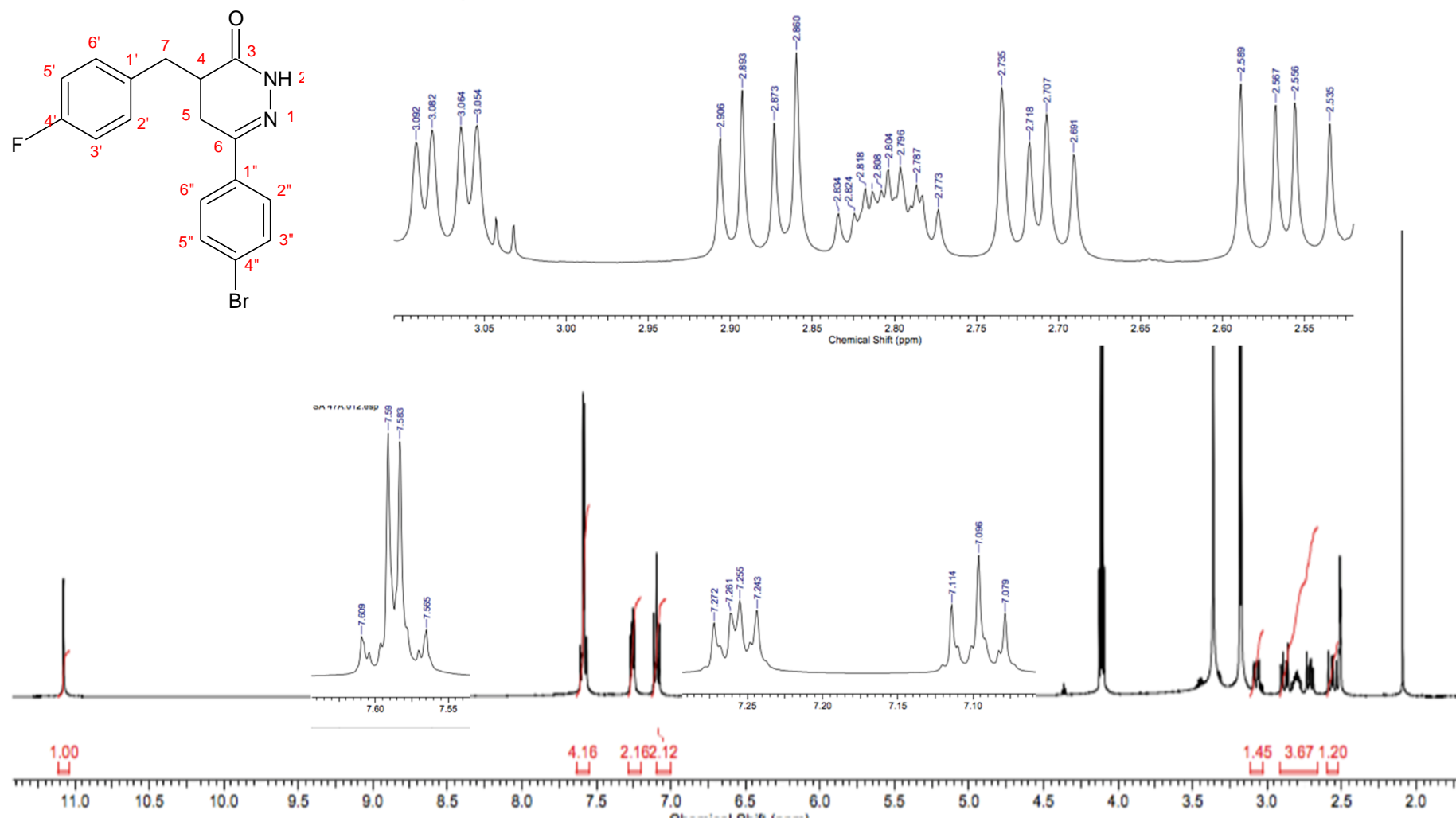
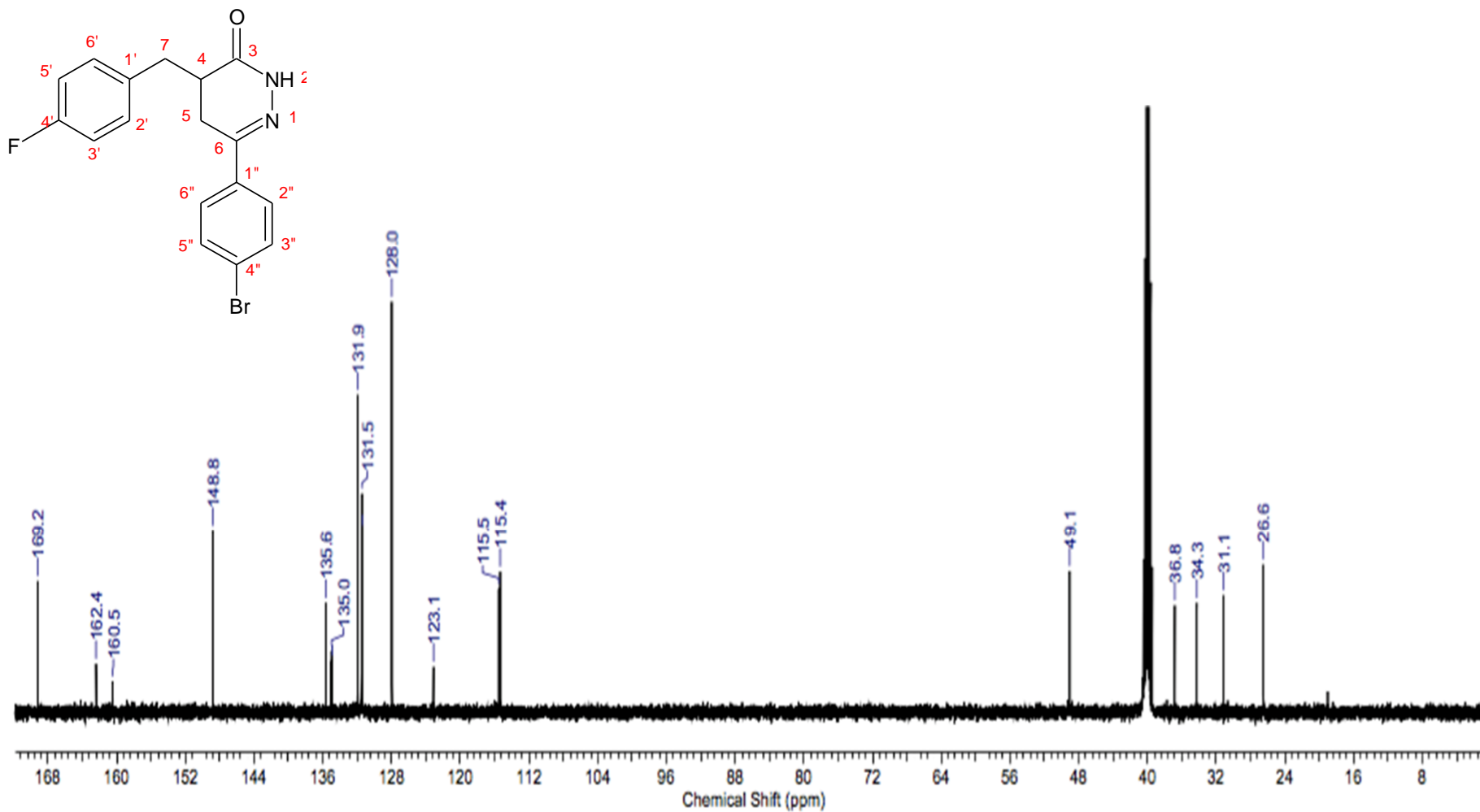


Figura 4-A: Espectro de RMN ^{13}C (125,76 MHz, DMSO- d_6) do composto 8b.



6-(4-Bromofenil)-4-(4-metóxibenzil)-4,5-didro-2H-piridazin-3-ona (8c)
Figura 5-A: Espectro de RMN ¹H (500MHz, DMSO-d₆) do composto **8c**.

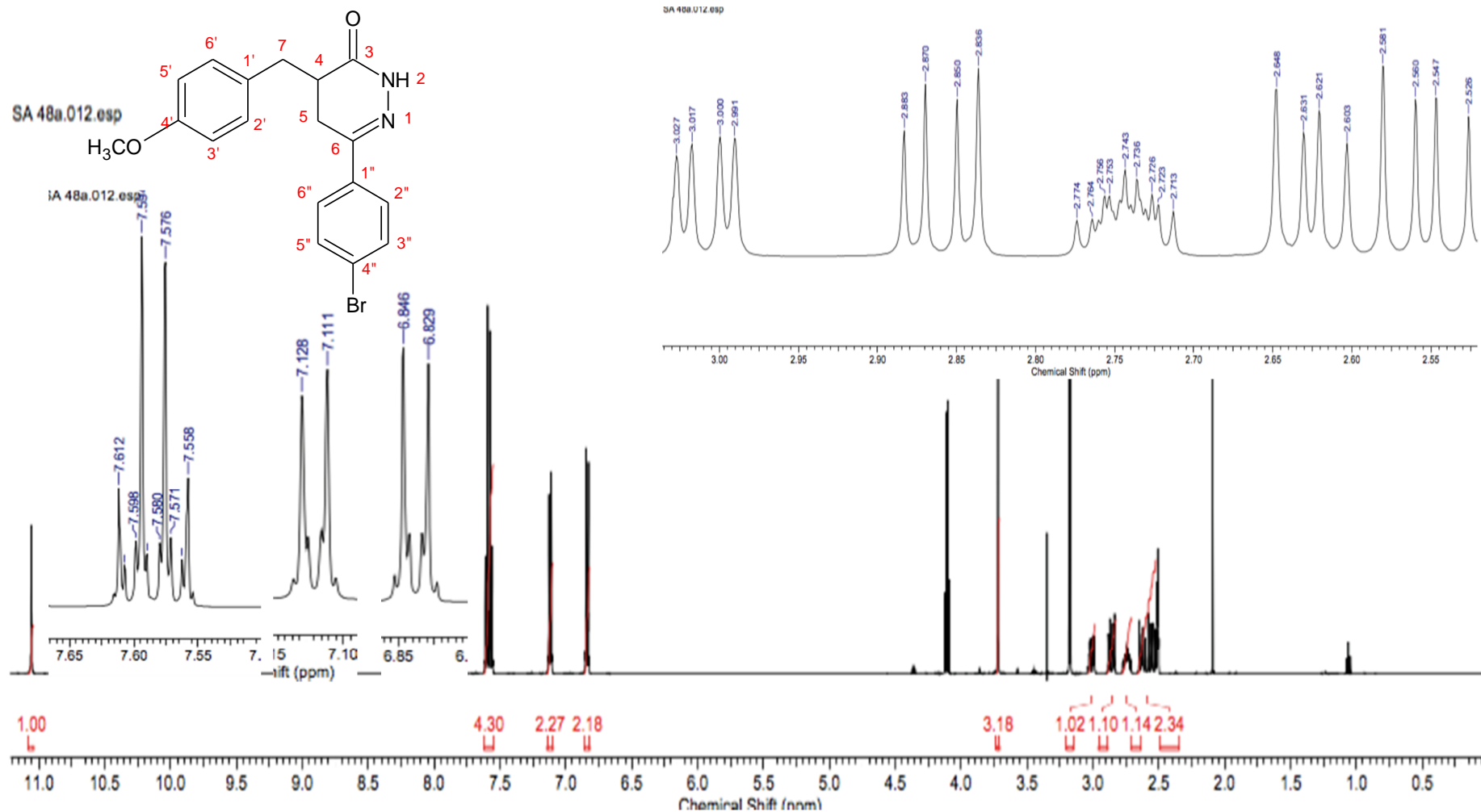
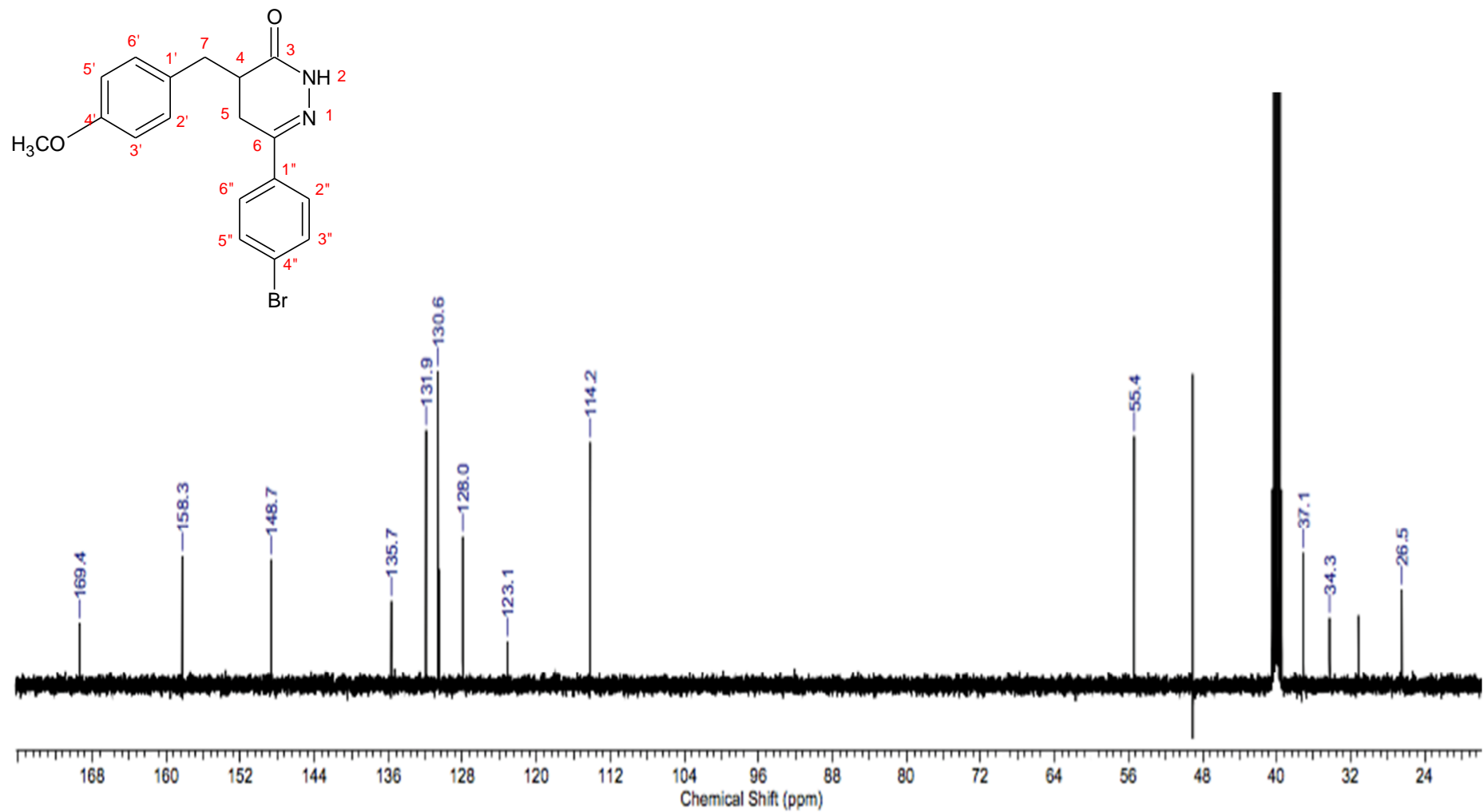


Figura 6-A: Espectro de RMN ^{13}C (125,76 MHz, DMSO- d_6) do composto **8c**.



6-(4-Bromofenil)-4-(4-nitrobenzil)-4,5-dihidro-2H-piridazin-3-ona (8d)
 Figura 7-A: Espectro de RMN ¹H (300MHz, DMSO-d₆) do composto 8d.

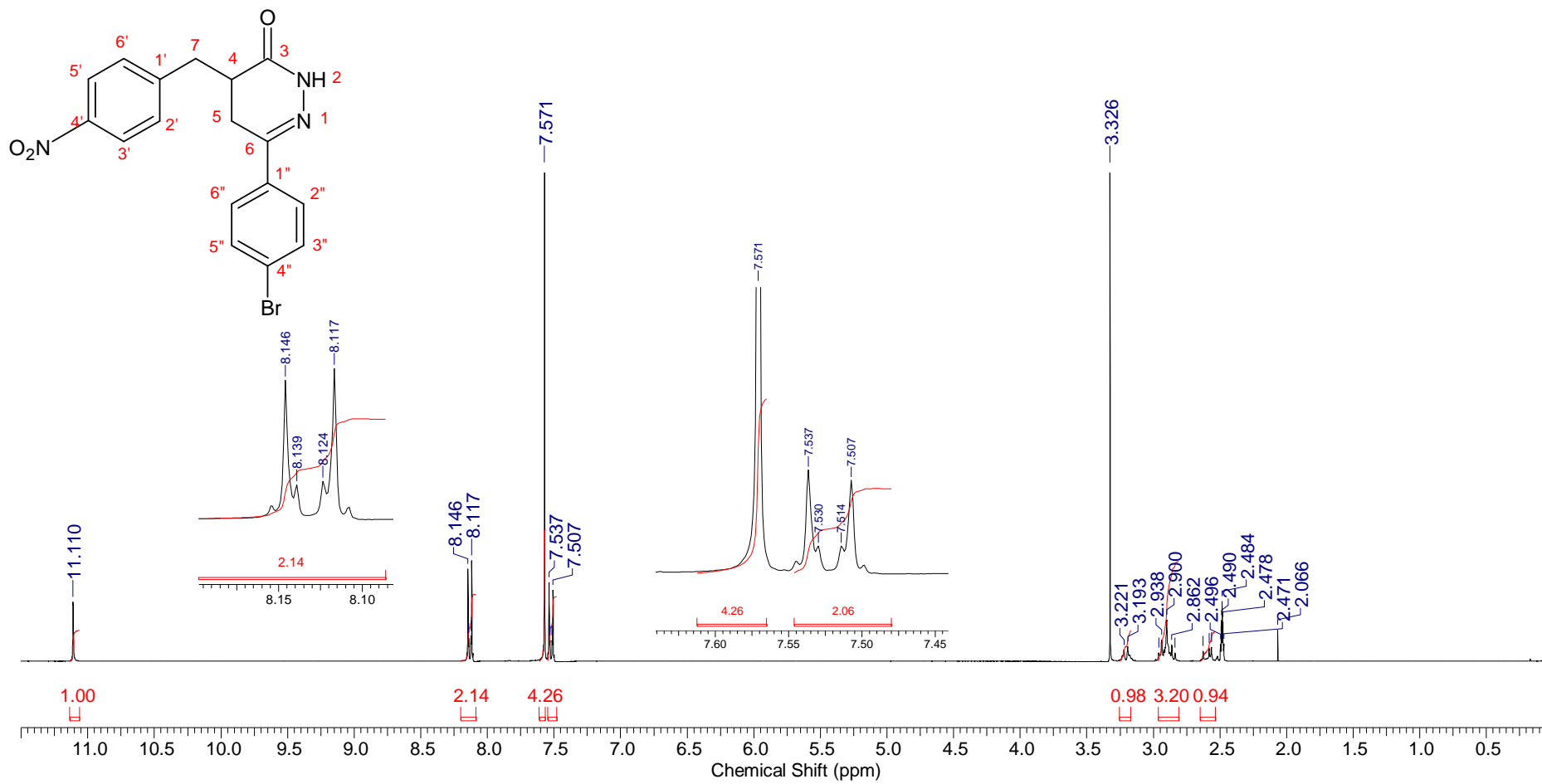
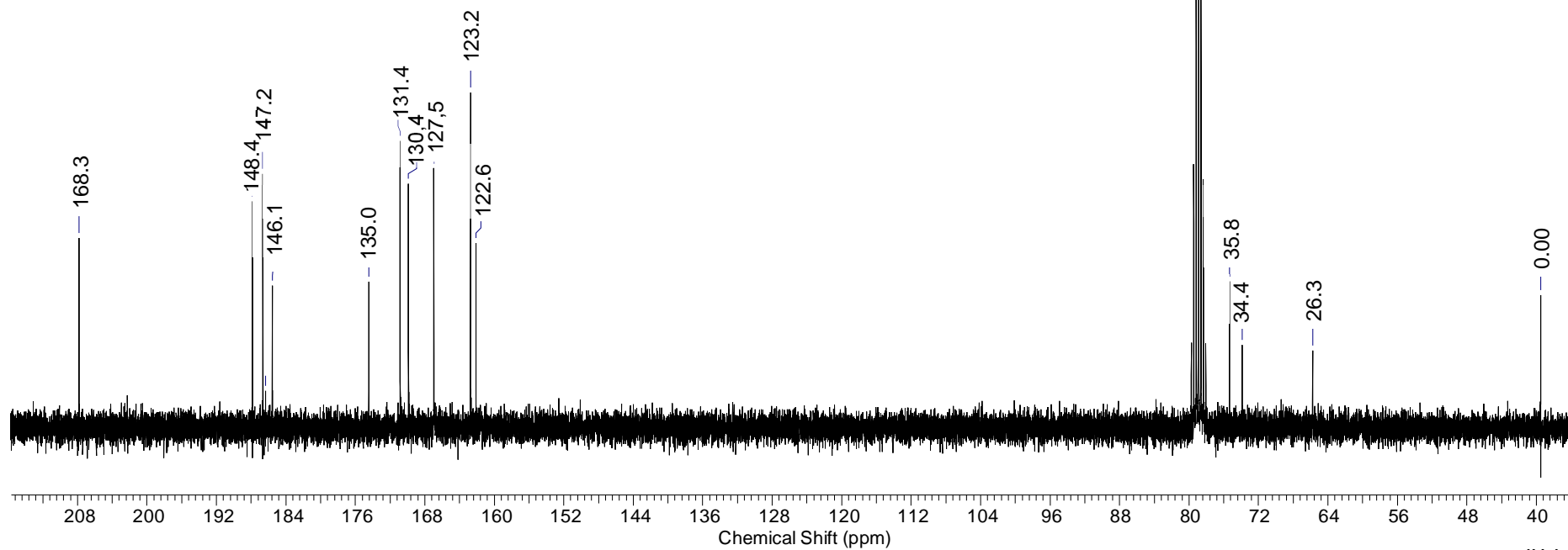
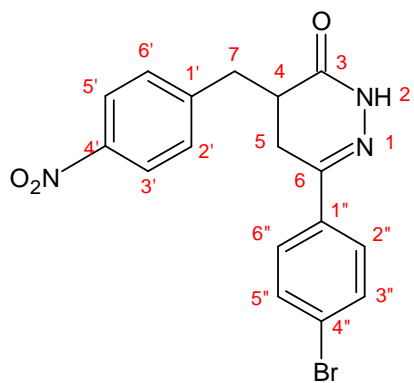


Figura 8-A: Espectro de RMN ^{13}C (75,46 MHz, DMSO- d_6) do composto **8d**.



6-(4-Bromofenil)-4-(4-clorobenzil)-4,5-diidro-2H-piridazin-3-ona (8e)

Figura 9-A: Espectro de RMN ¹H (300MHz, DMSO-d₆) do composto **8e**.

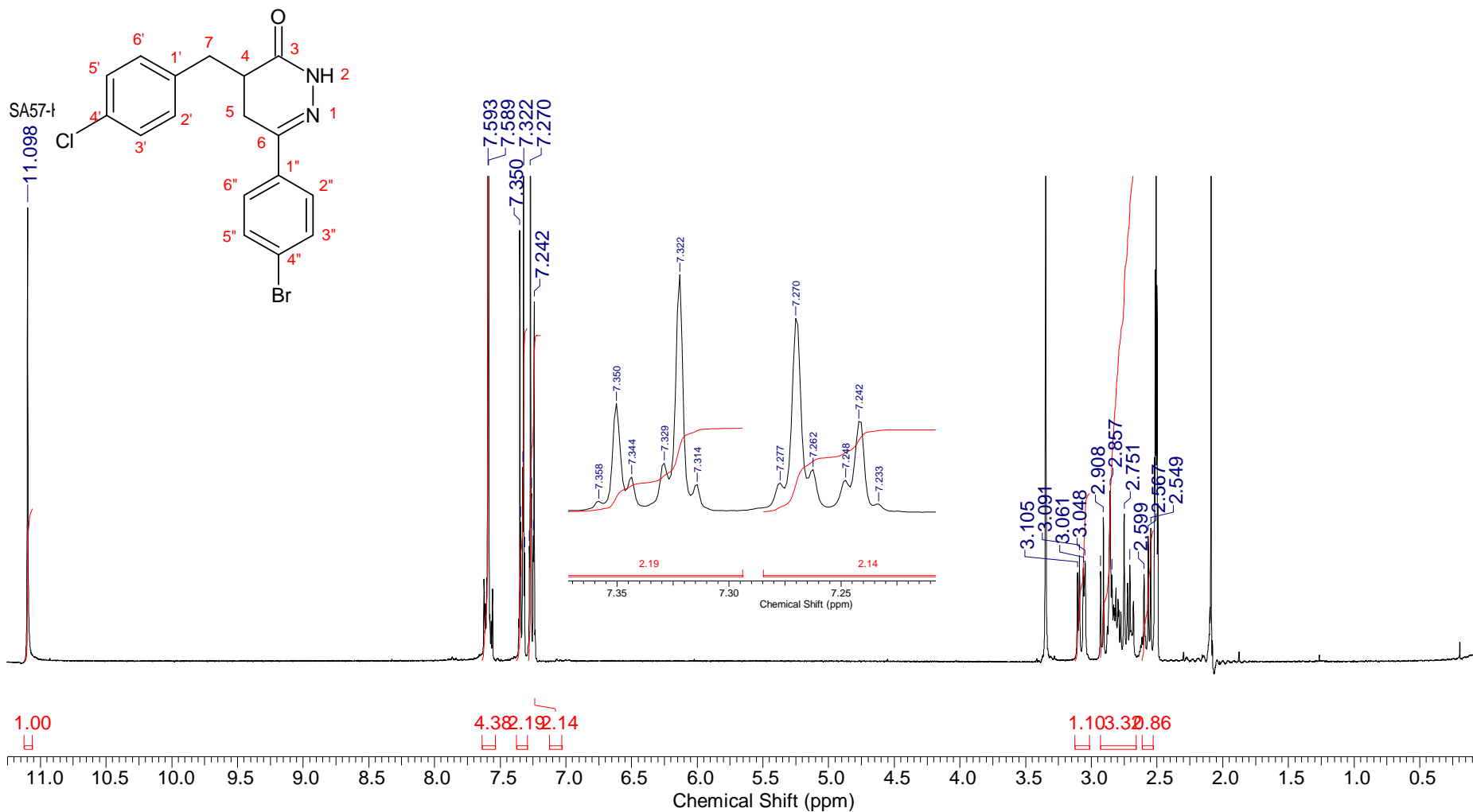
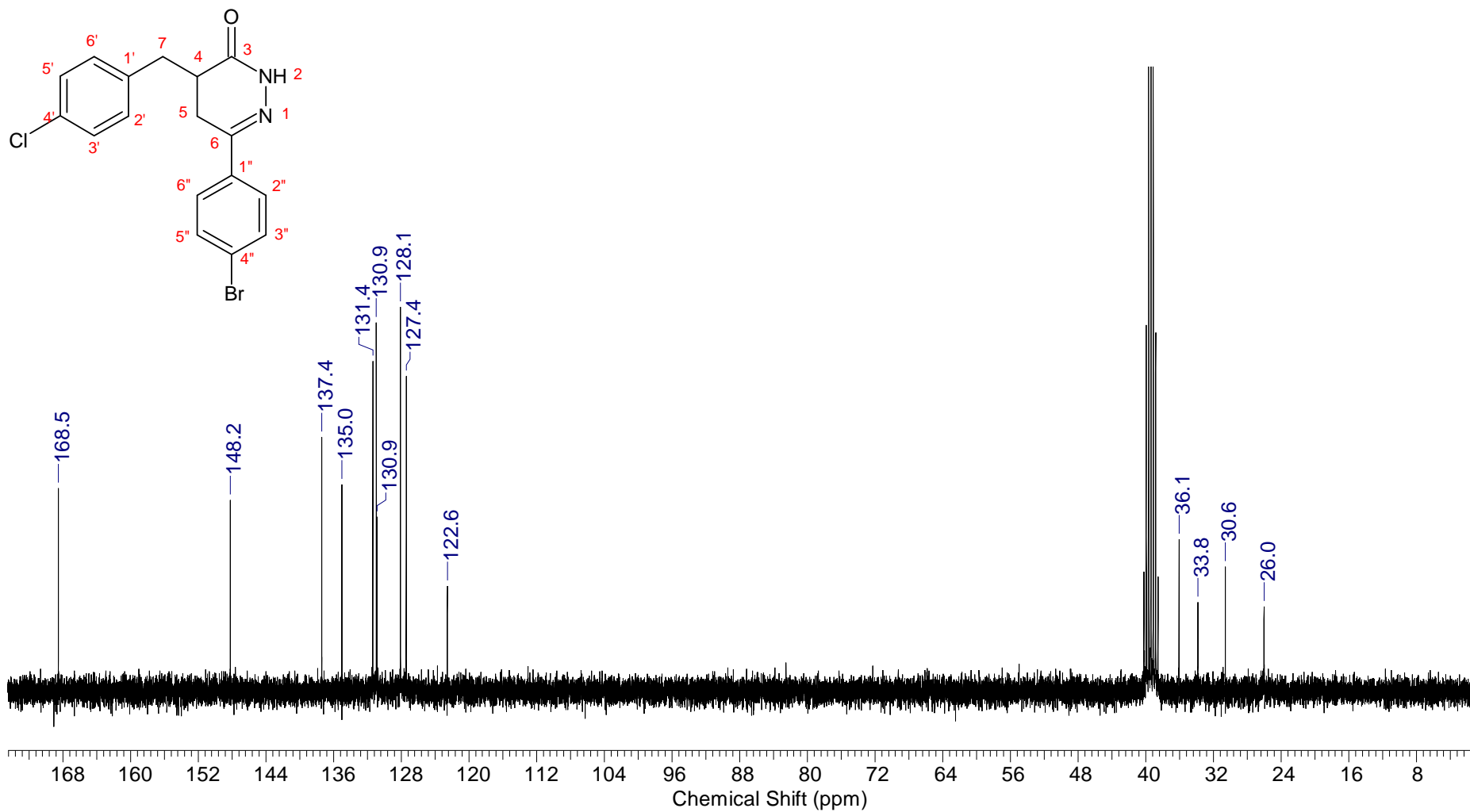


Figura 10-A: Espectro de RMN ^{13}C (75,46 MHz, DMSO- d_6) do composto **8e**.



6-(4-Bromofenil)-4-(3-fluorobenzil)-4,5-dihidro-2H-piridazin-3-ona (8g)
Figura 11-A: Espectro de RMN ¹H (300MHz, DMSO-d₆) do composto 8g.

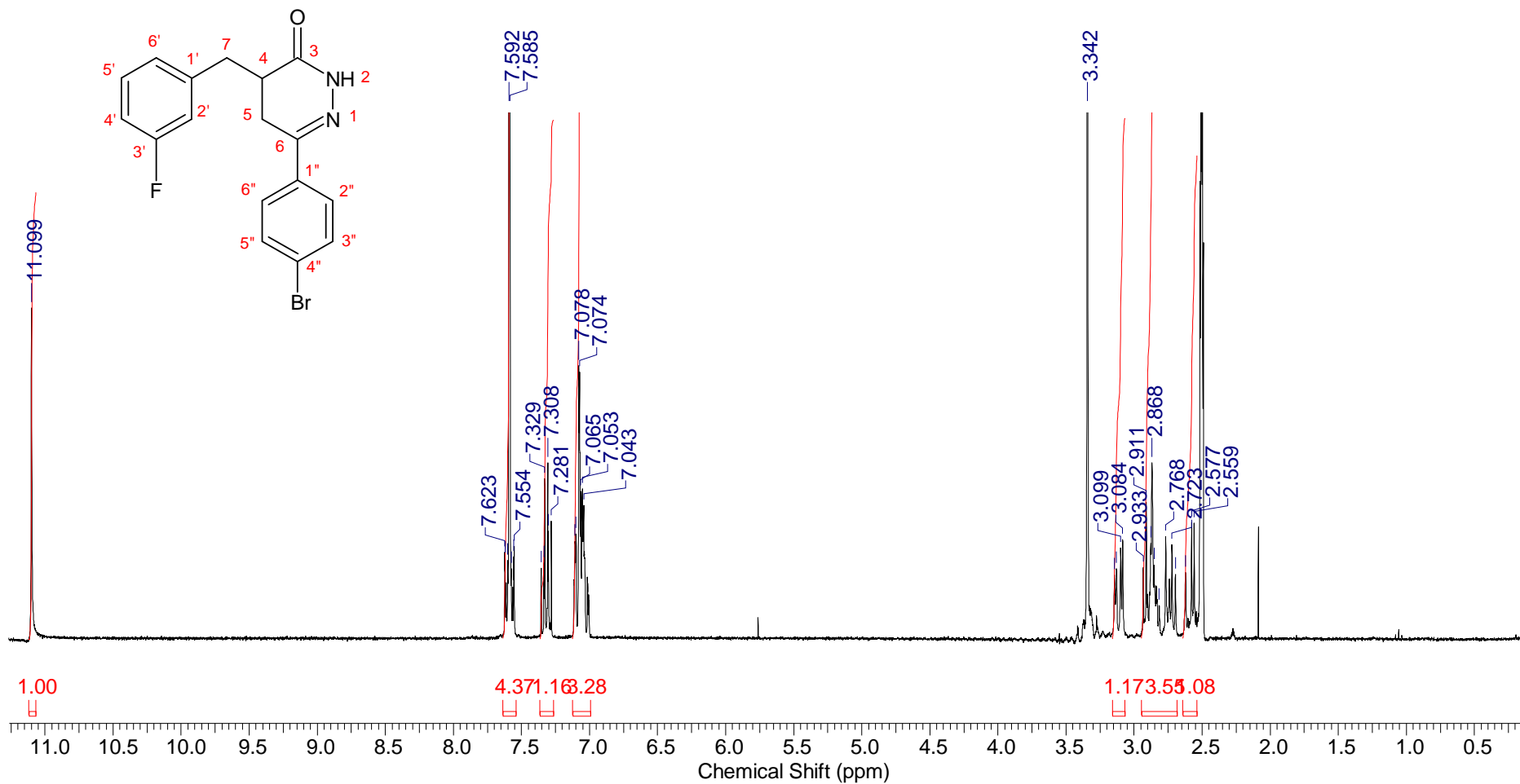
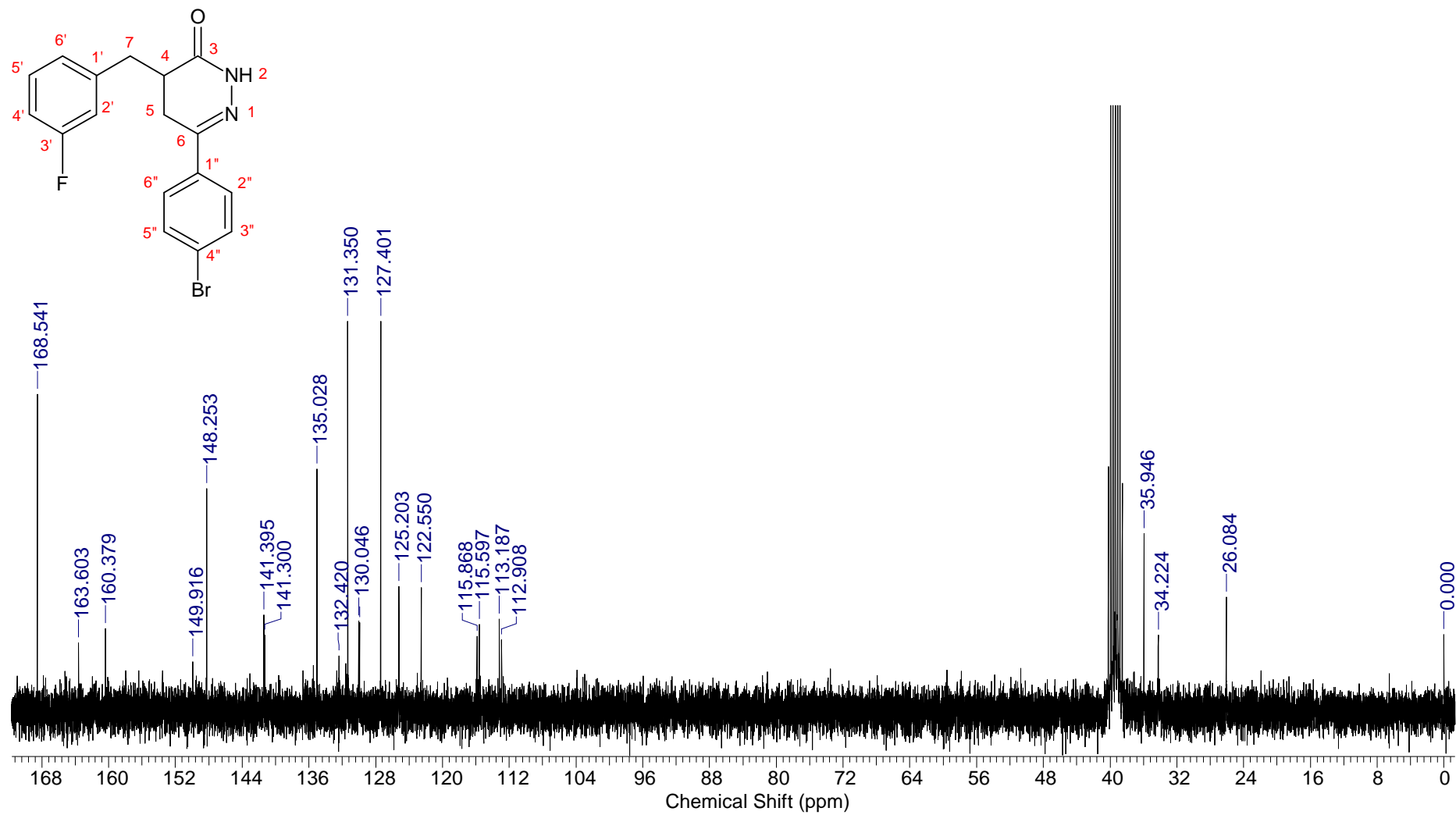


Figura 12-A: Espectro de RMN ^{13}C (75,46 MHz, DMSO- d_6) do composto **8g**



6-(4-Bromofenil)-4-(3-nitrobenzil)-4,5-dihidro-2H-piridazin-3-ona (8h)
Figura 13-A: Espectro de RMN ¹H (300MHz, DMSO-d₆) do composto 8h.

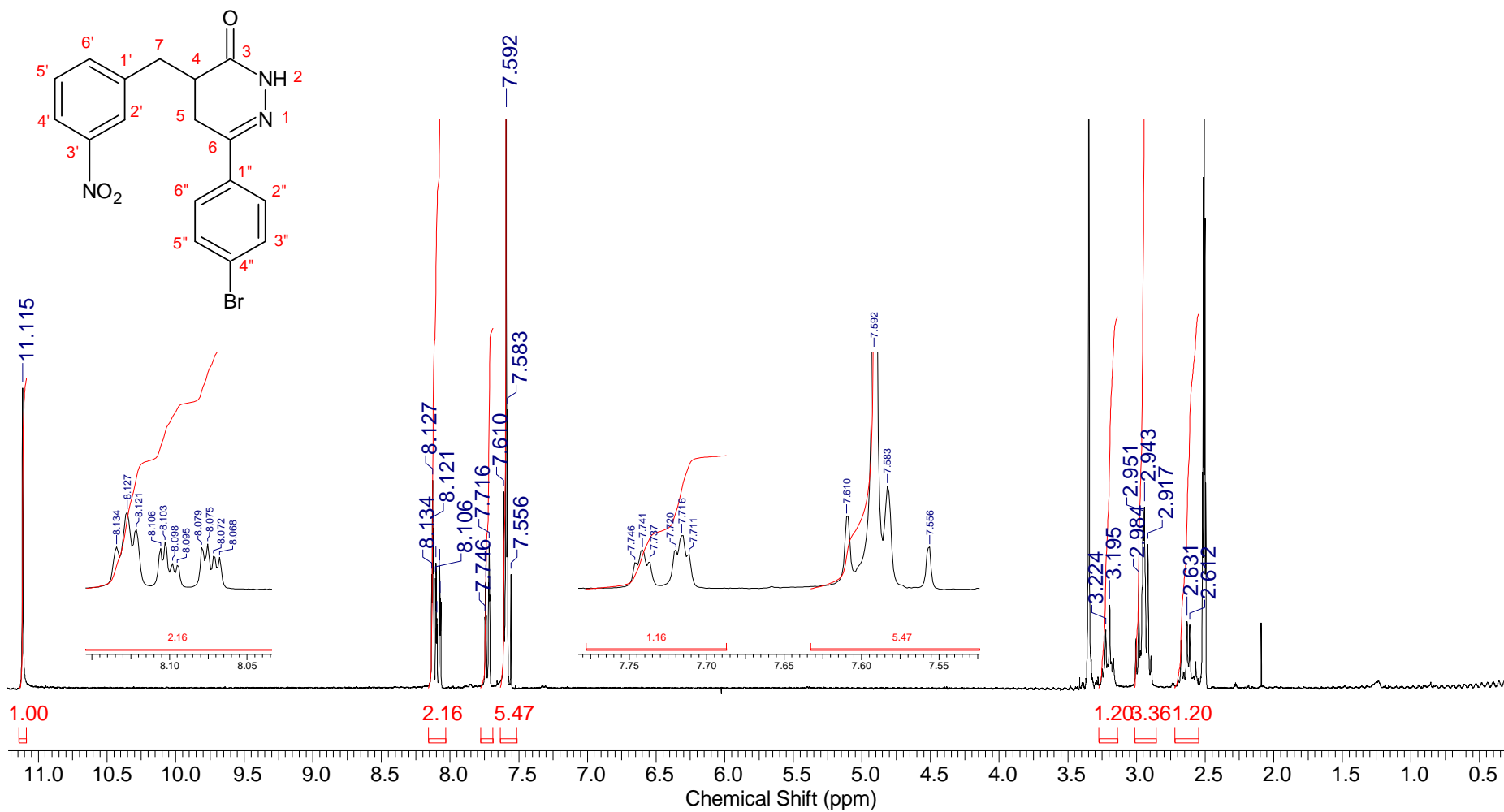
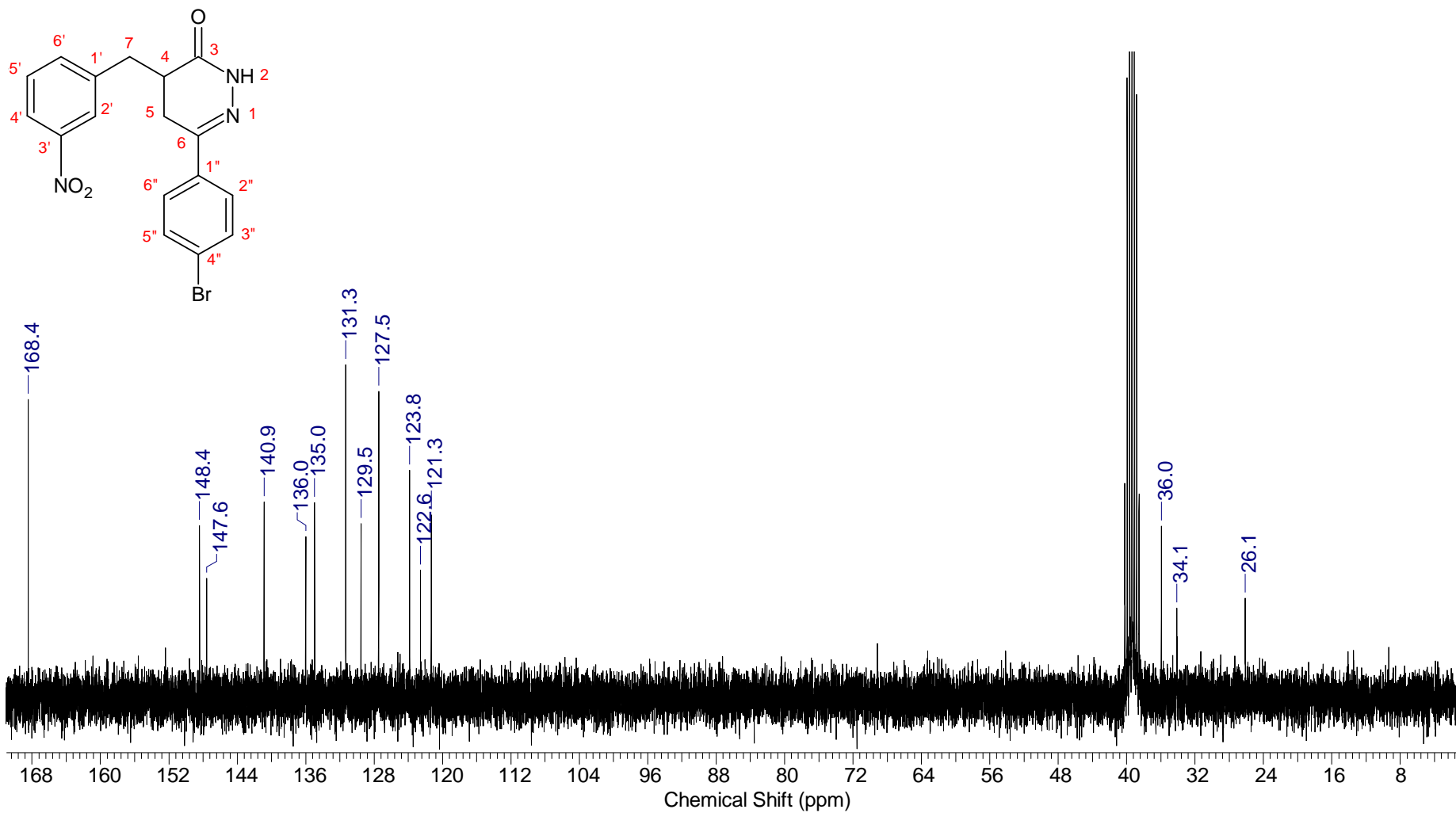


Figura 14-A: Espectro RMN ^{13}C (75,46 MHz, DMSO- d_6) do composto **8h**.



6-(4-Bromofenil)-4-(2-fluorbenzil)-4,5-dihidro-2H-piridazin-3-ona (8i)

Figura 15-A: Espectro de RMN ¹H (300MHz, DMSO-d₆) do composto 8i.

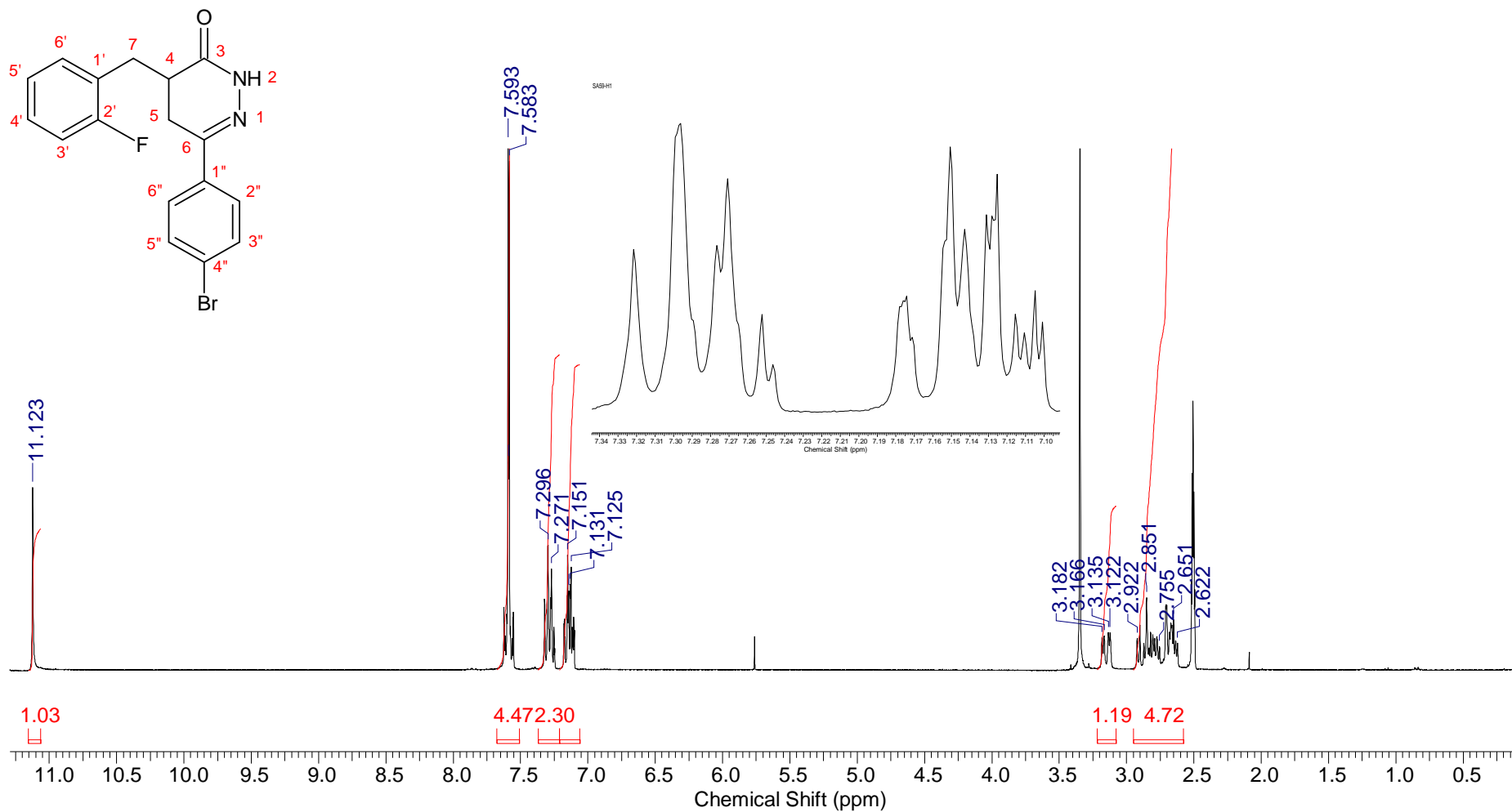
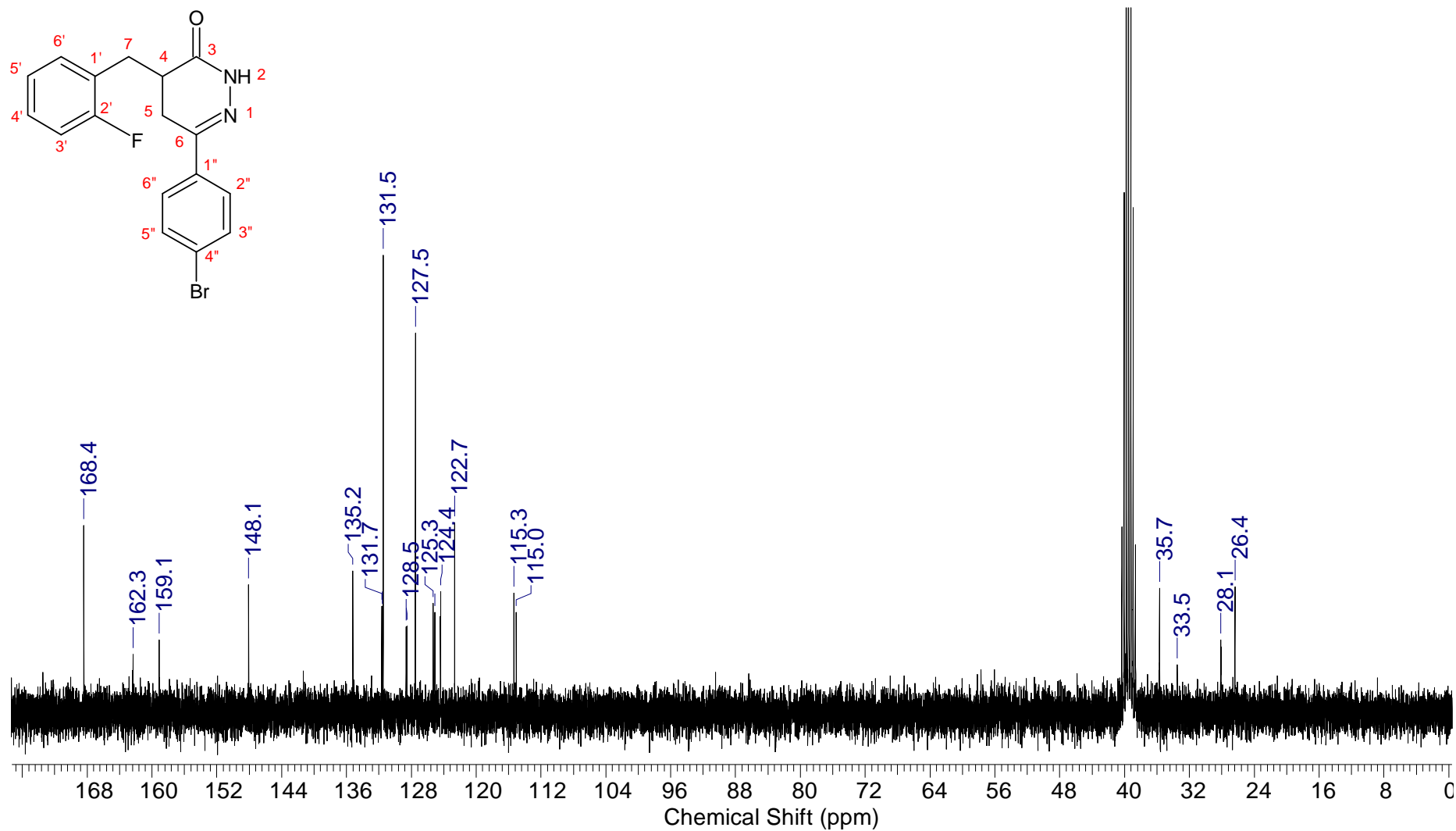


Figura 16-A : Espectro de RMN ^{13}C (75,46 MHz, DMSO- d_6) do composto **8i**.



6-(4-Bromofenil)-4-(2-metóxibenzil)-4,5-didro-2H-piridazin-3-ona (8j)

Figura 17-A: Espectro de RMN ¹H (300MHz, DMSO-d₆) do composto 8j.

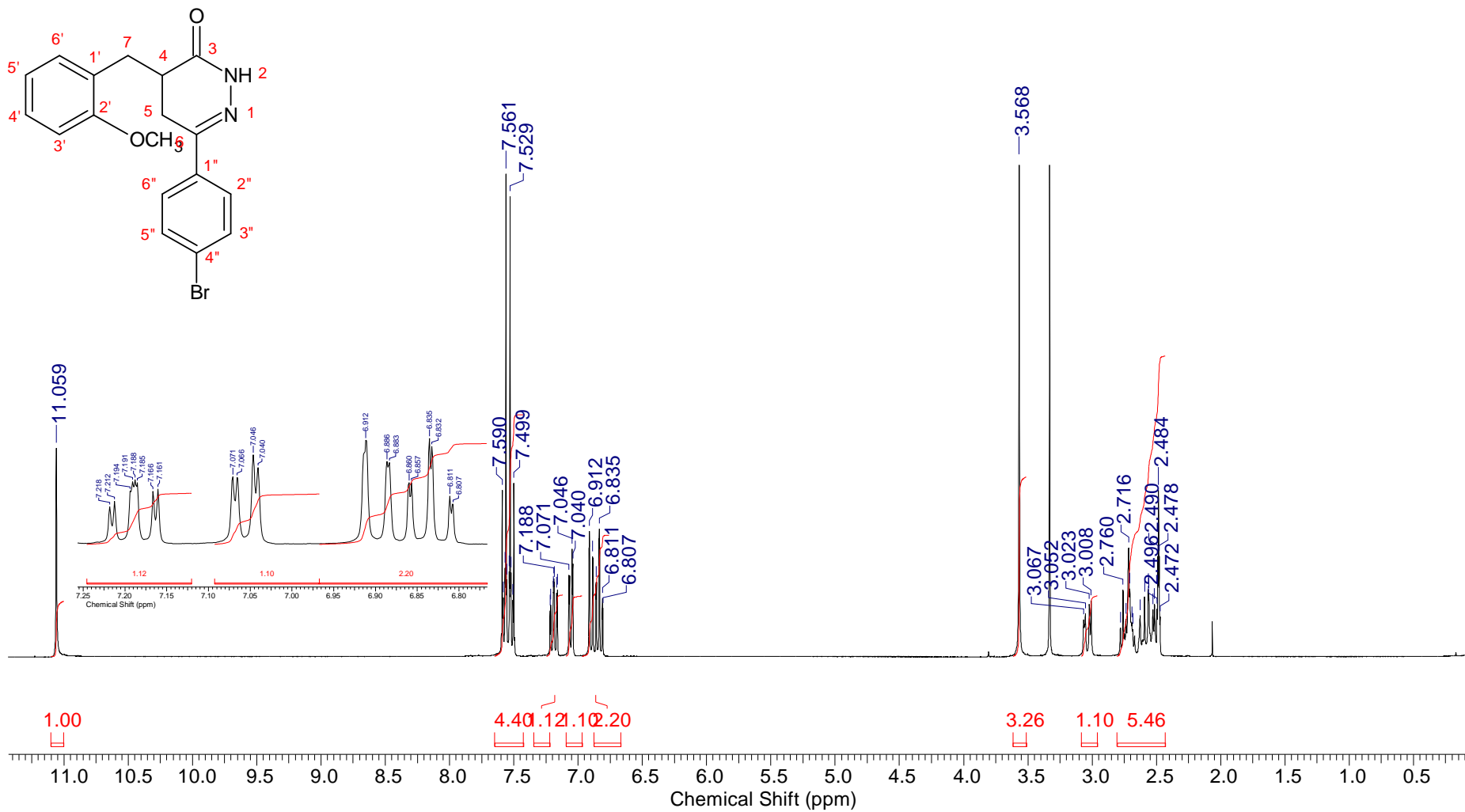
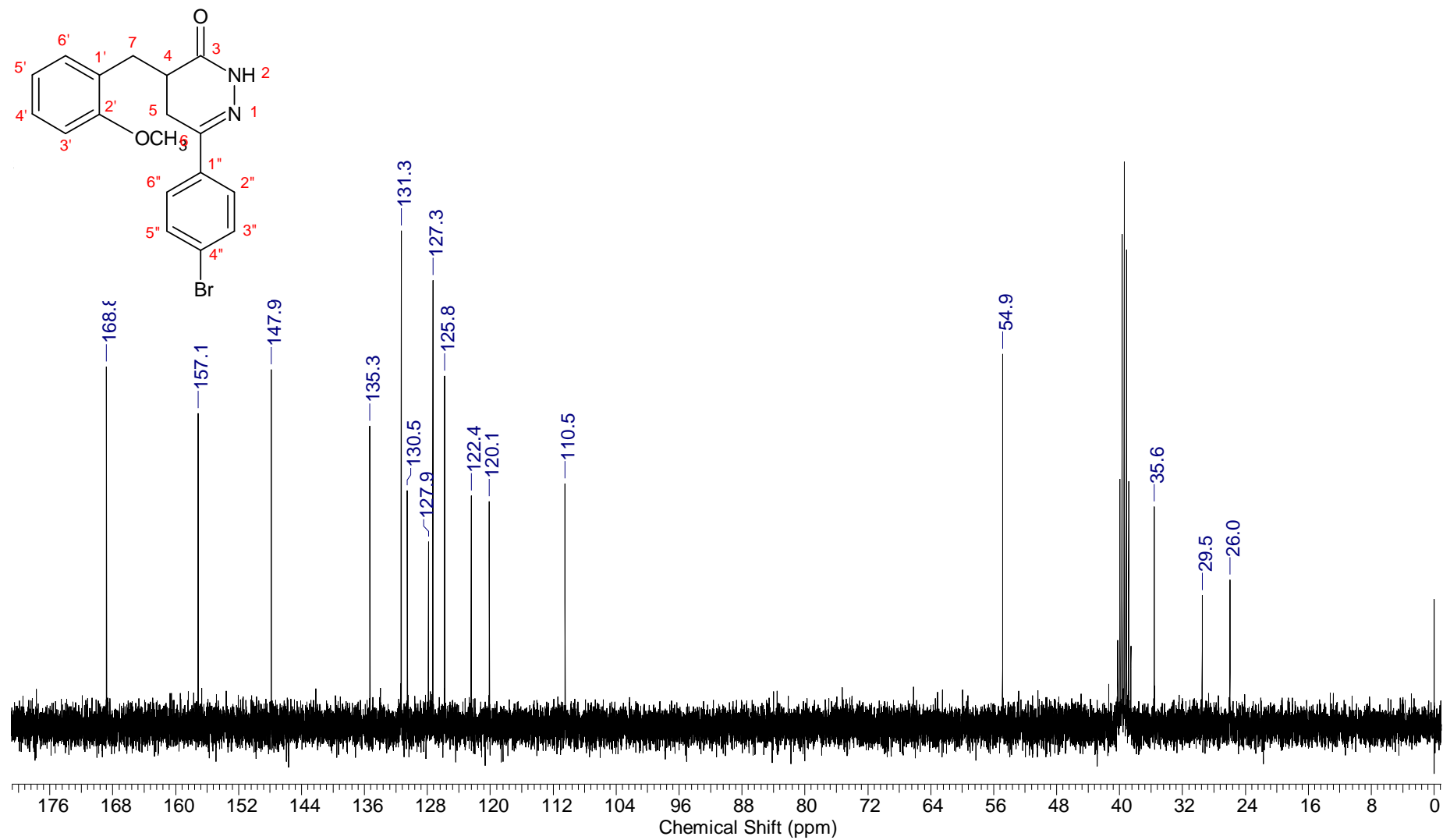


Figura 18-A: Espectro de RMN ^{13}C (75,46 MHz, DMSO- d_6) do composto **8j**



Metil 4-[[6-(4-bromofenil)-3-oxo-2,3,4,5-tetrahidropiridazin-4-il]metil]benzoato (8I)

Figura 19-A: Espectro de RMN ¹H (300MHz, DMSO-d₆) do composto 8I.

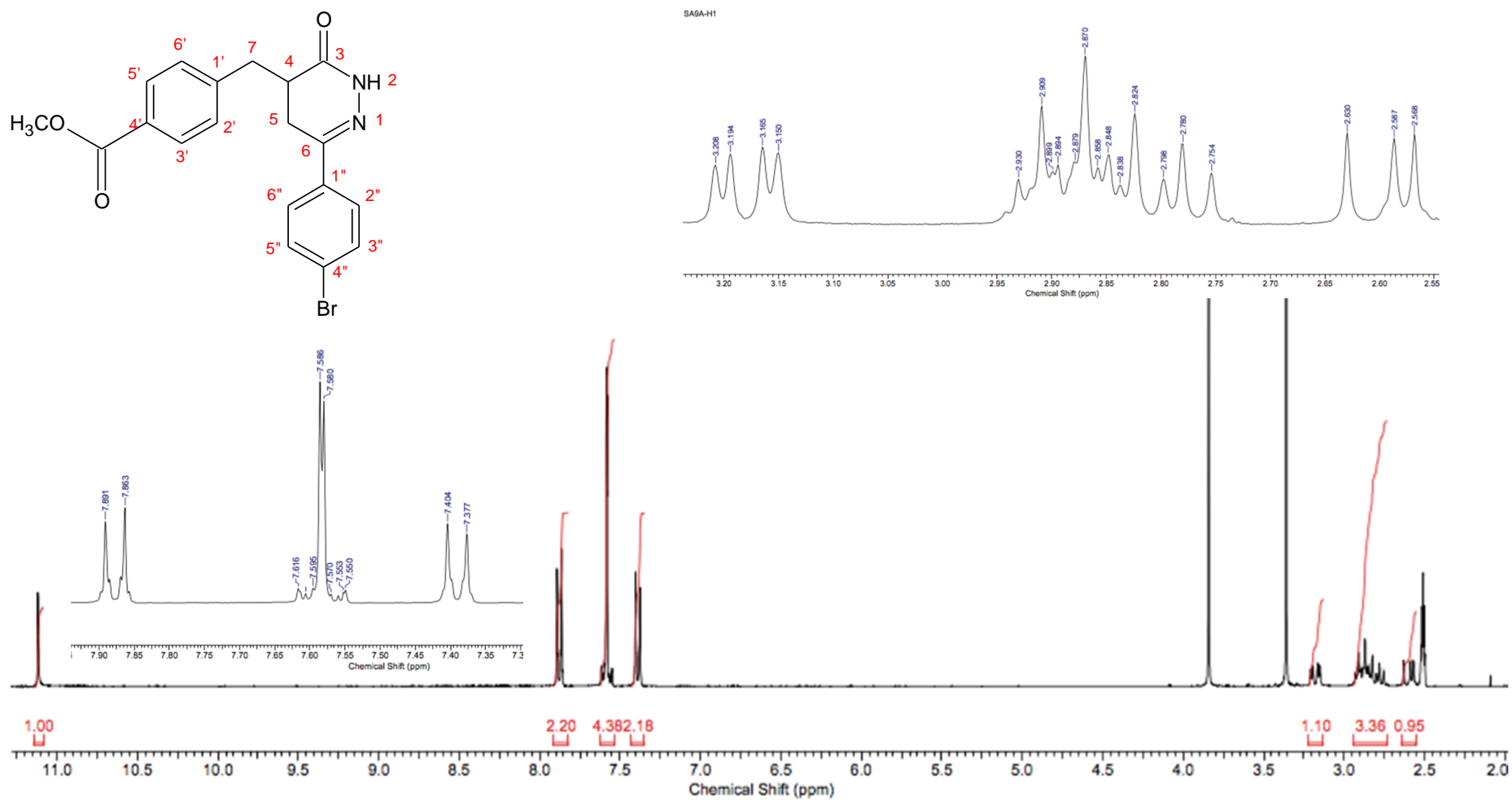
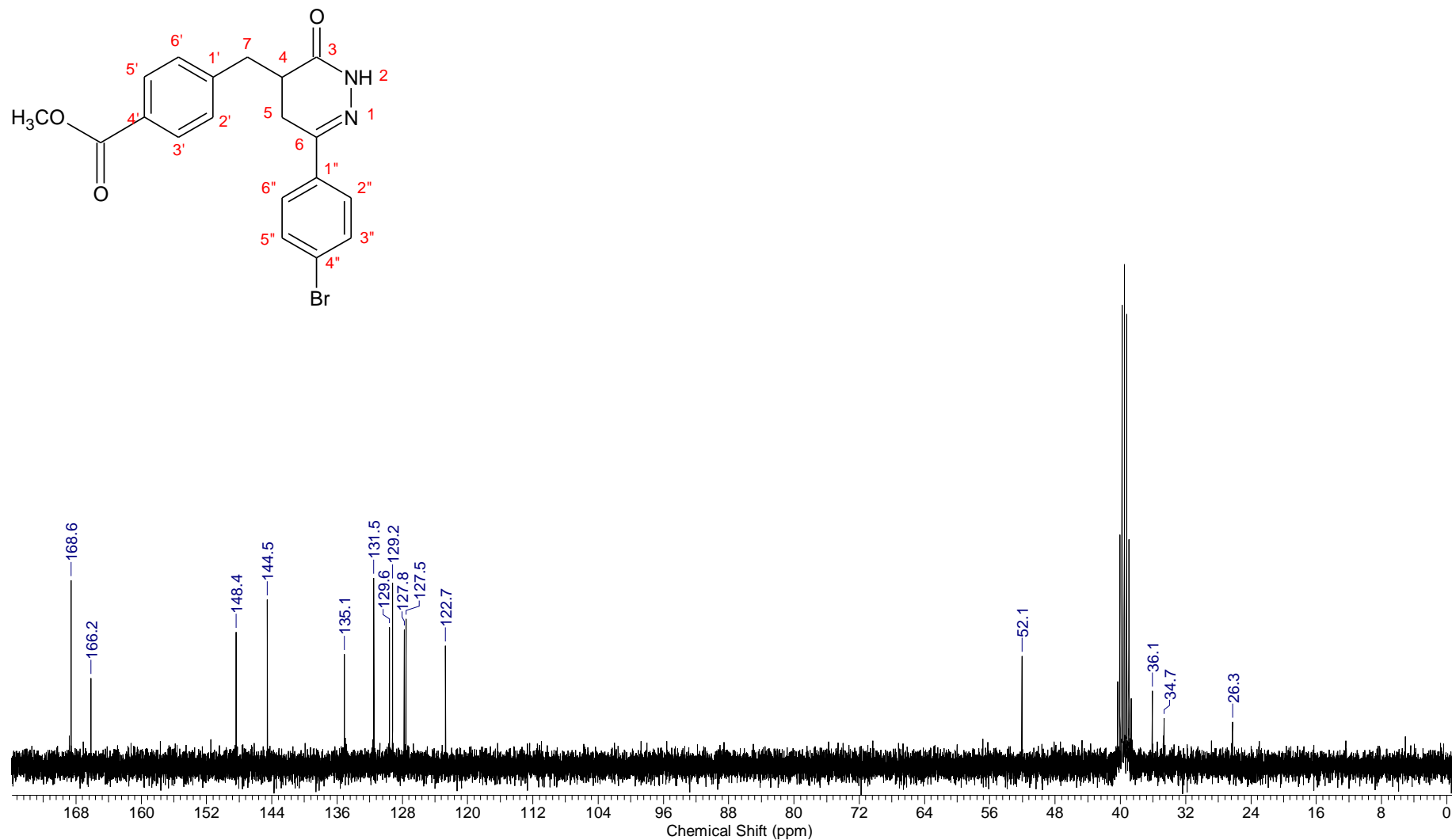


Figura 20-A: Espectro de RMN ¹³C (75,46 MHz, DMSO-d₆) do composto 8I



4-[[6-(4-bromofenil)-3-oxo-2,3,4,5-tetrahidropiridazin-4-il]metil]benzóico acido (8m)

Figura 21-A: Espectro de RMN ¹H (300MHz, DMSO-d₆) do composto 8m.

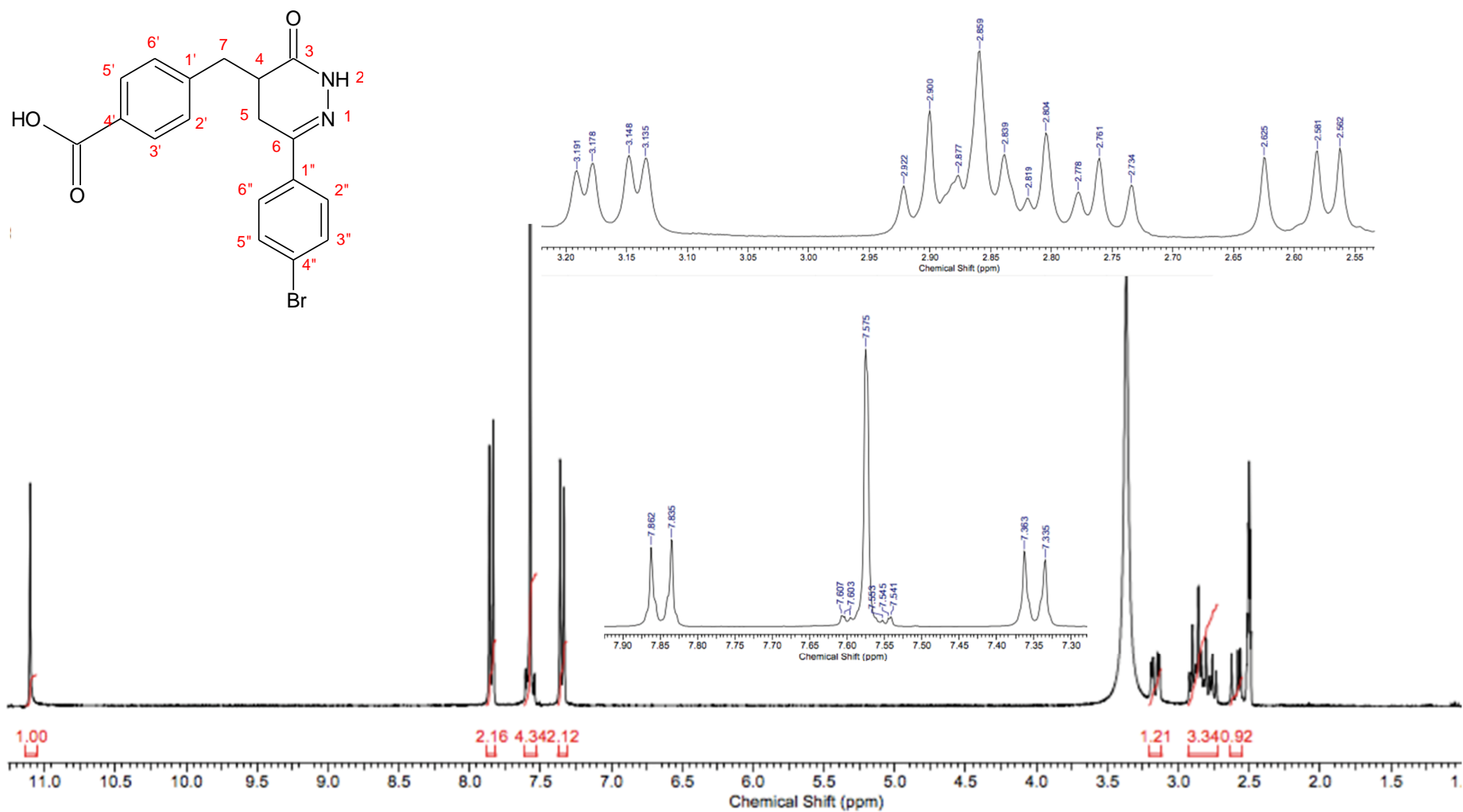


Figura 22-A: Espectro de RMN ^{13}C (75,46 MHz, DMSO- d_6) do composto 8m.

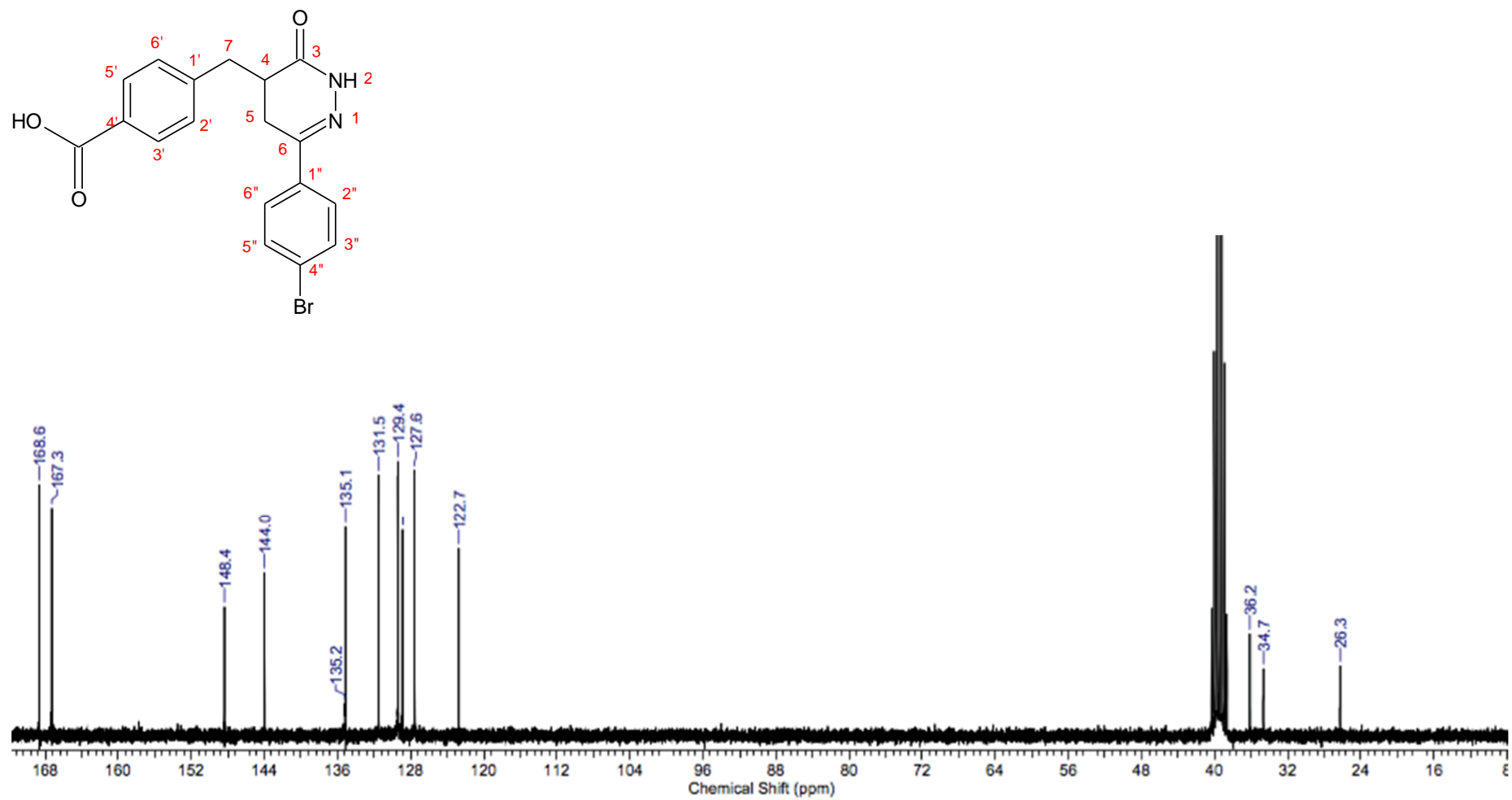
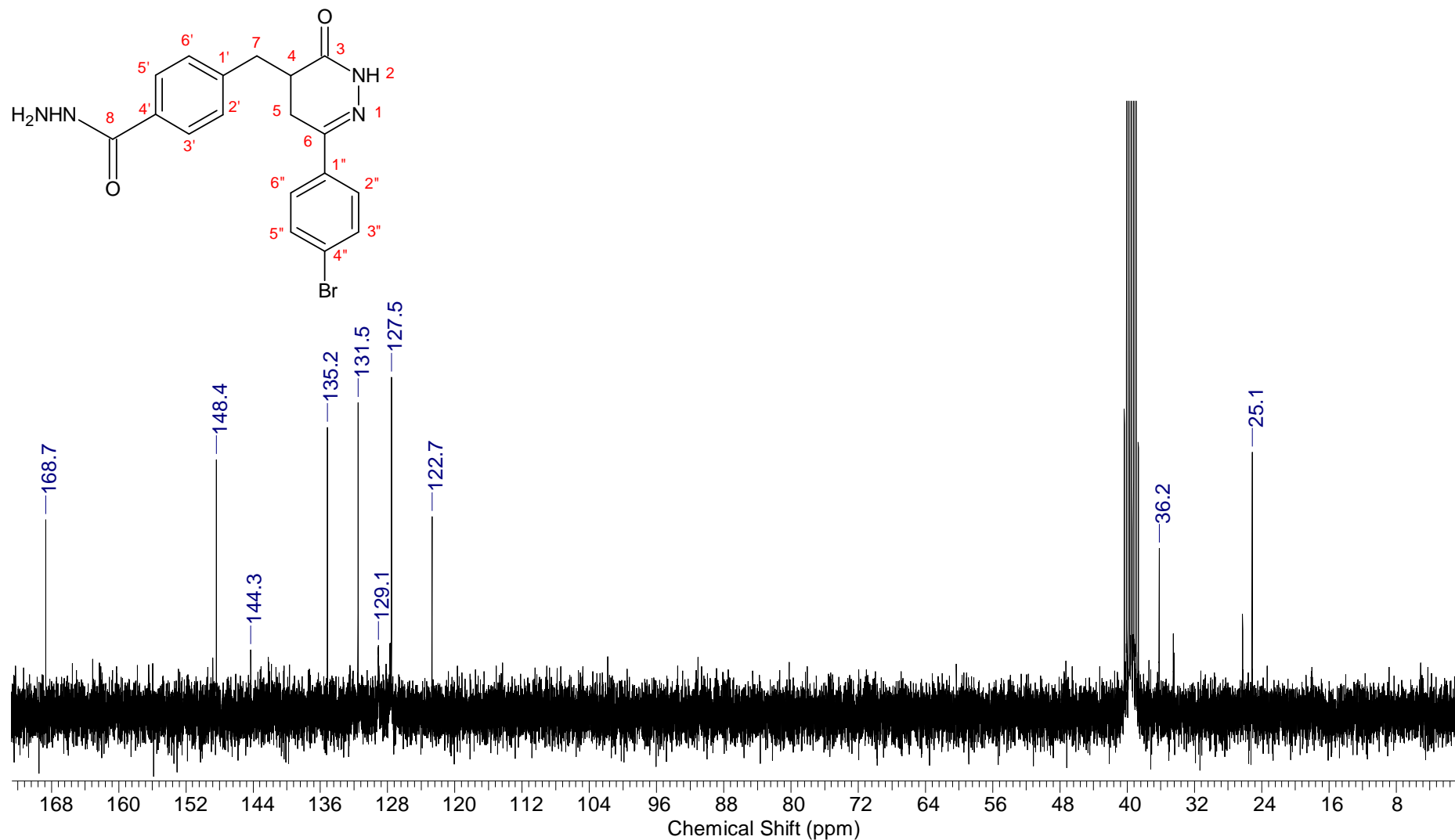


Figura 24-A: Espectro de RMN ^{13}C (75,46 MHz, DMSO- d_6) do composto **8n**.



4-[[6-(4-bromofenil)-3-oxo-2,3,4,5-tetraidropiridazin-4-il]metil]-*N*-hidroxibenzamida (8o)
 Figura 25-A: Espectro de RMN ¹H (300MHz, DMSO-d₆) do composto 8o.

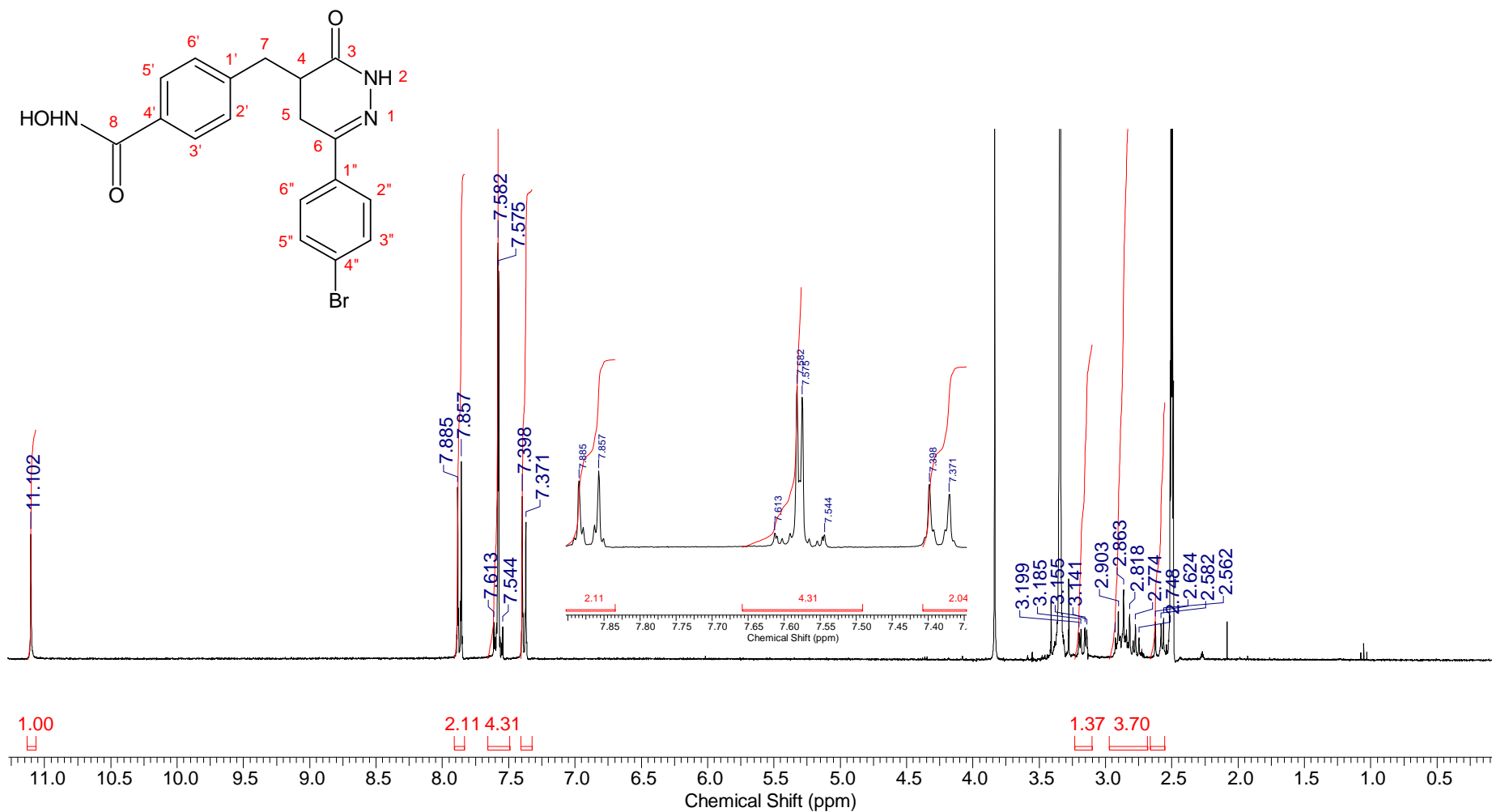
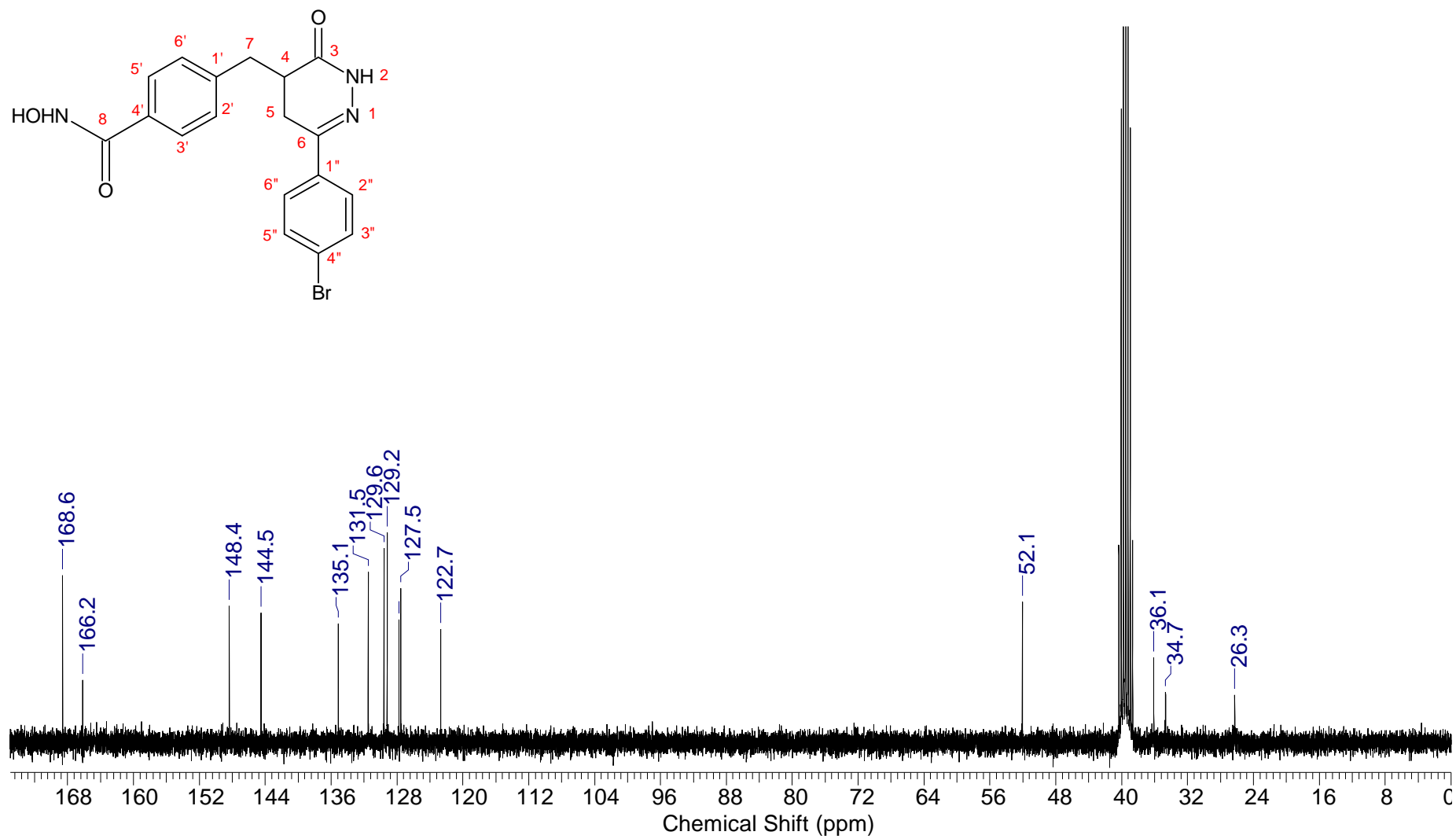


Figura 26-A: Espectro de RMN ^{13}C (75,46 MHz, DMSO- d_6) do composto **8o**.



6-(Fenil)-4-(benzil)-4,5-diidro-2H-piridazin-3-ona (9a)

Figura 27-A: Espectro de RMN ¹H (500,0 MHz, DMSO-d₆) do composto 9a.

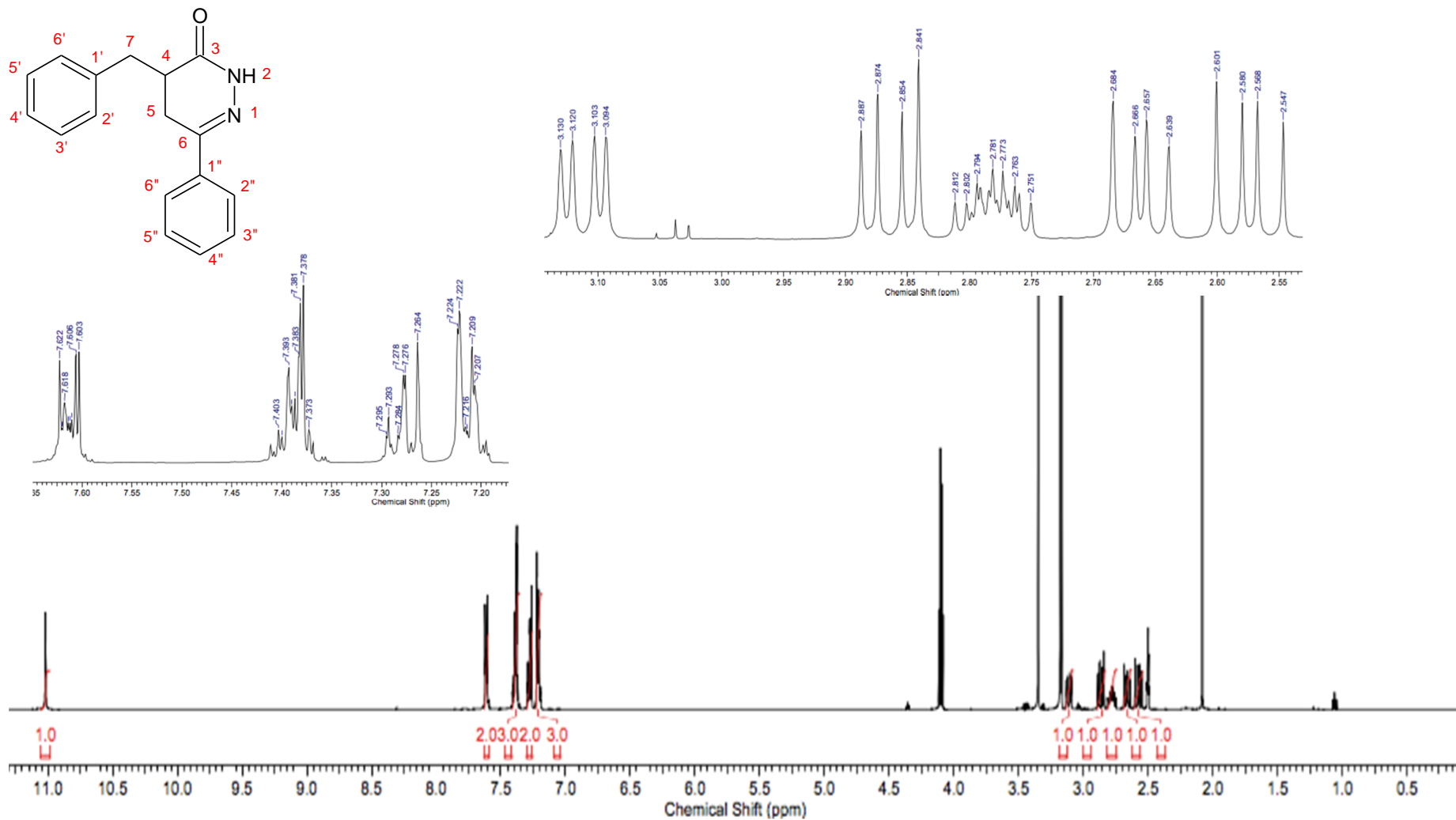
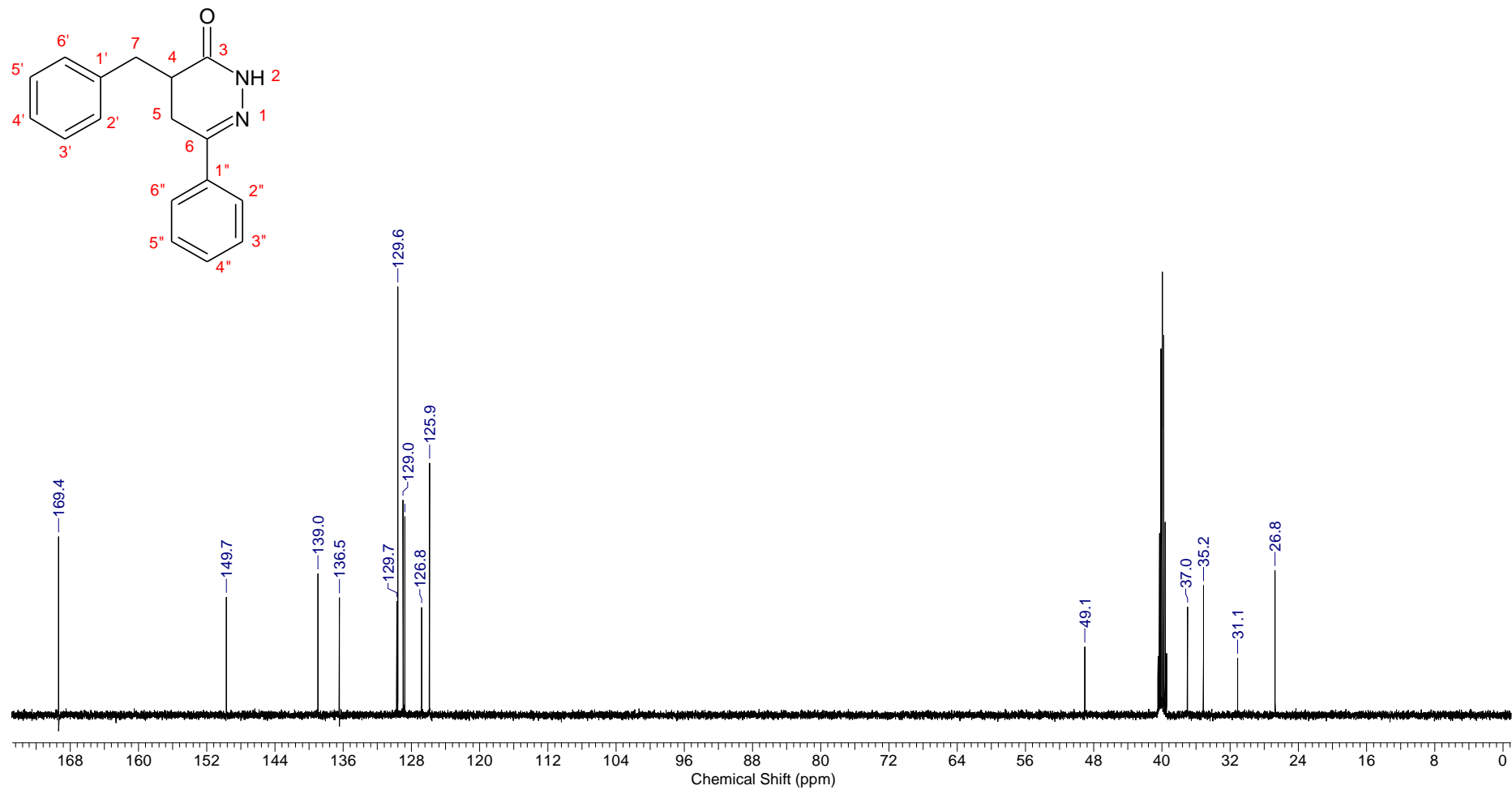


Figura 28-A: Espectro de RMN ¹³C (125,76 MHz, DMSO-d₆) do composto 9a.



6-(Fenil)-4-(4-fluorbenzil)-4,5-diidro-2H-piridazin-3-ona (9b)

Figura 29-A: Espectro de RMN ¹H (300MHz, DMSO-d₆) do composto 9b.

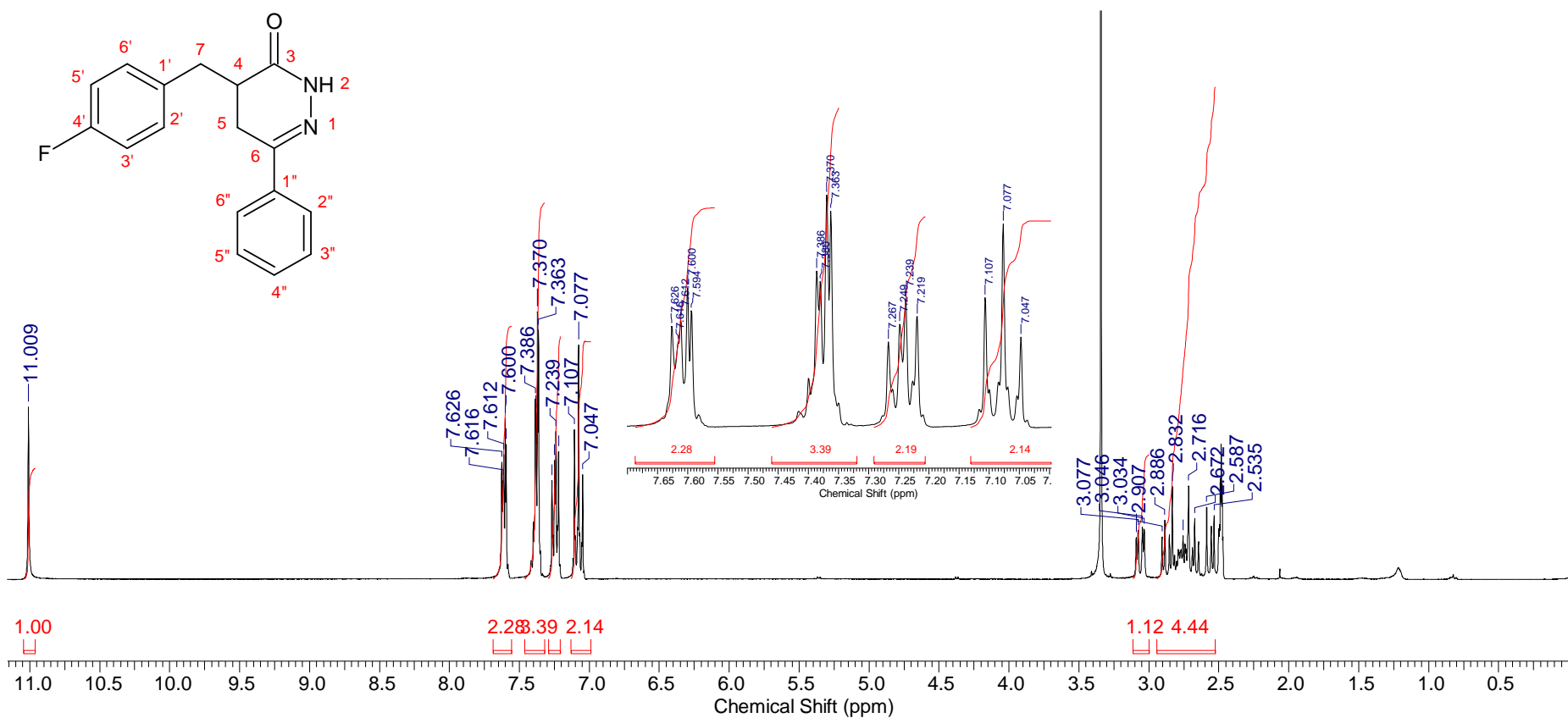
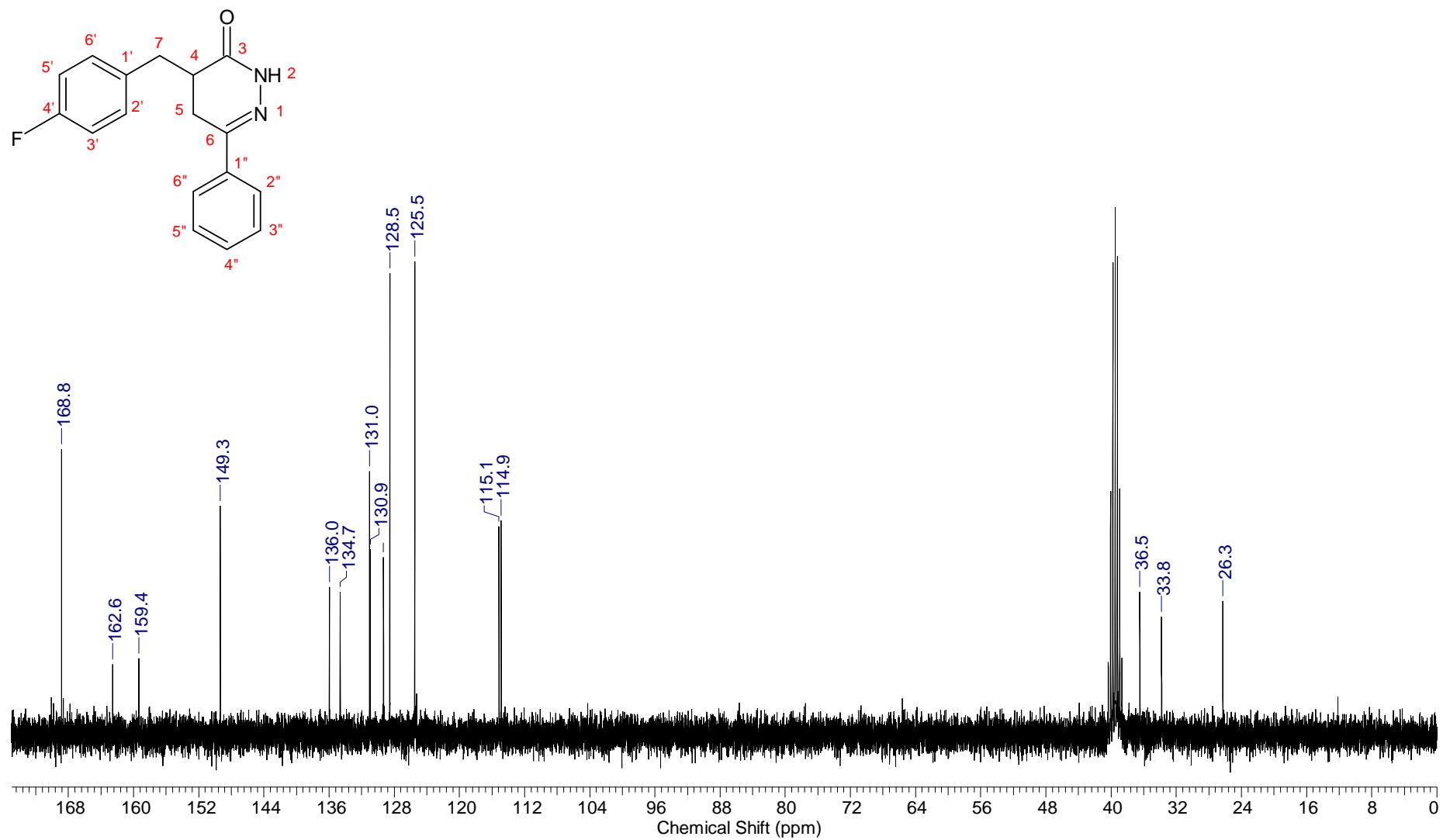


Figura 30-A: Espectro de RMN ^{13}C (75,46 MHz, DMSO-d_6) do composto **9b**



6-(fenil)-4-(4-metóxibenzil)-4,5-diidro-2H-piridazin-3-ona (9c)

$C_{18}H_{18}N_2O_2$; $MM=294,35$; $pf:174,3-175,5^{\circ}C$; $rendimento:91\%$; IV (filme de KBr, cm^{-1}): 3207, 3092, 1669

Figura 31-A: Espectro de RMN 1H (300MHz, $DMSO-d_6$) do composto **9c**.

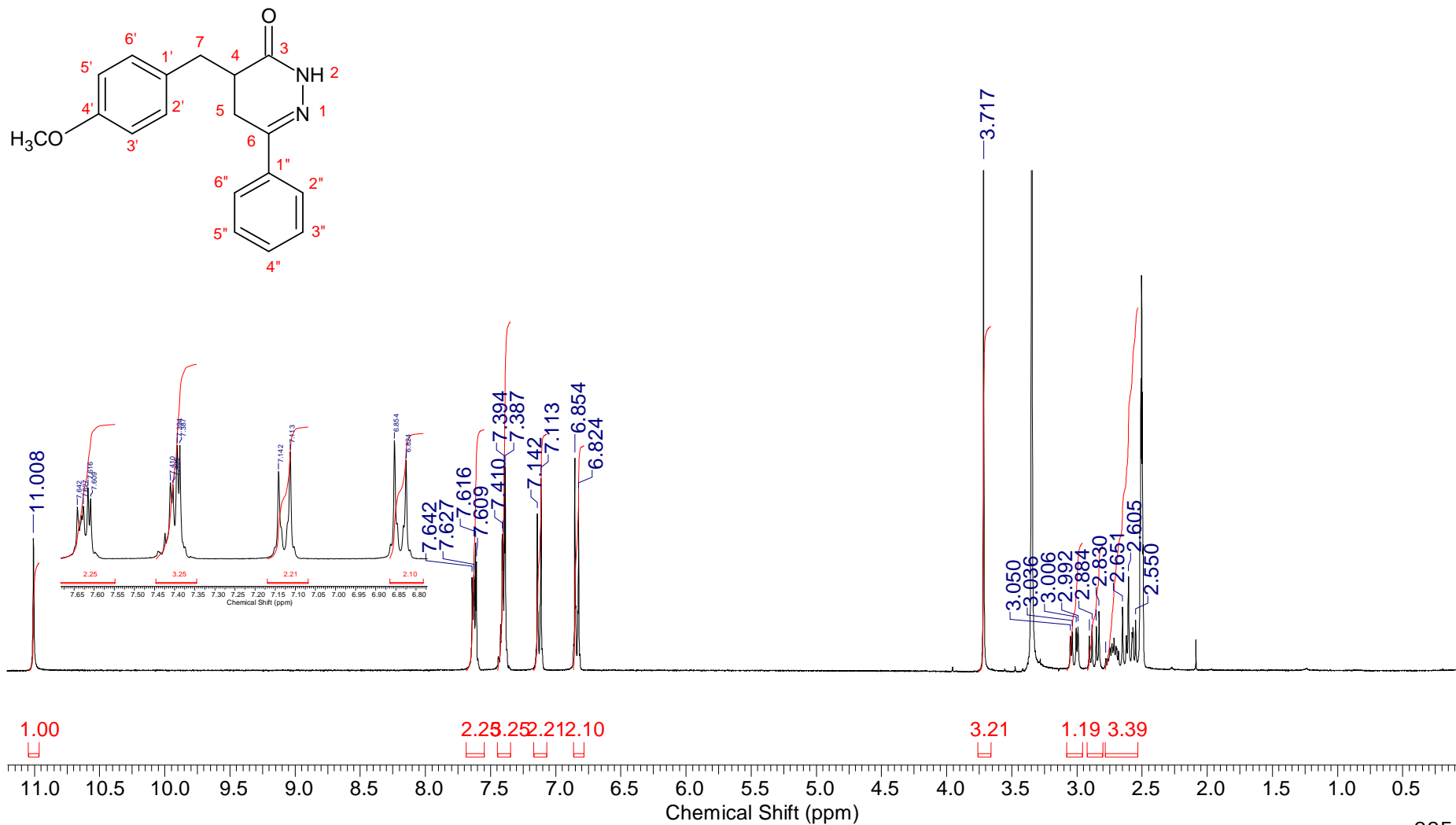
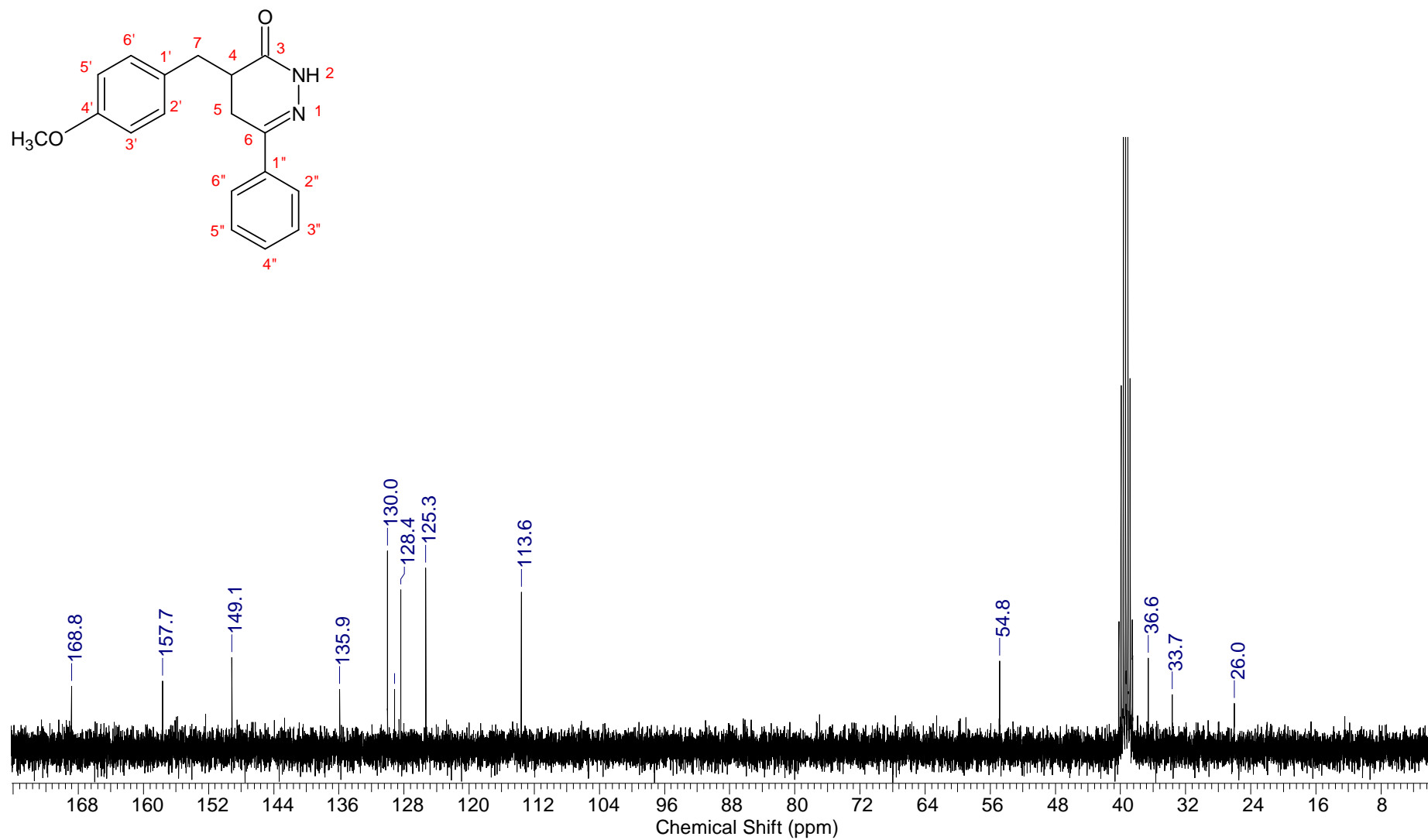


Figura 32-A: Espectro de RMN ^{13}C (75,46 MHz, DMSO- d_6) do composto **9c**.



4-(fenilmetileno)-bis-(3-fenilpirazol-5-ols) (13a)

$C_{25}H_{17}N_4O_2$; $MM= 408,45$; $pf:247,5-249,1^{\circ}C$; $rendimento: 71 \%$.

Figura 33-A: Espectro de RMN 1H (300MHz, DMSO- d_6) do composto 13a.

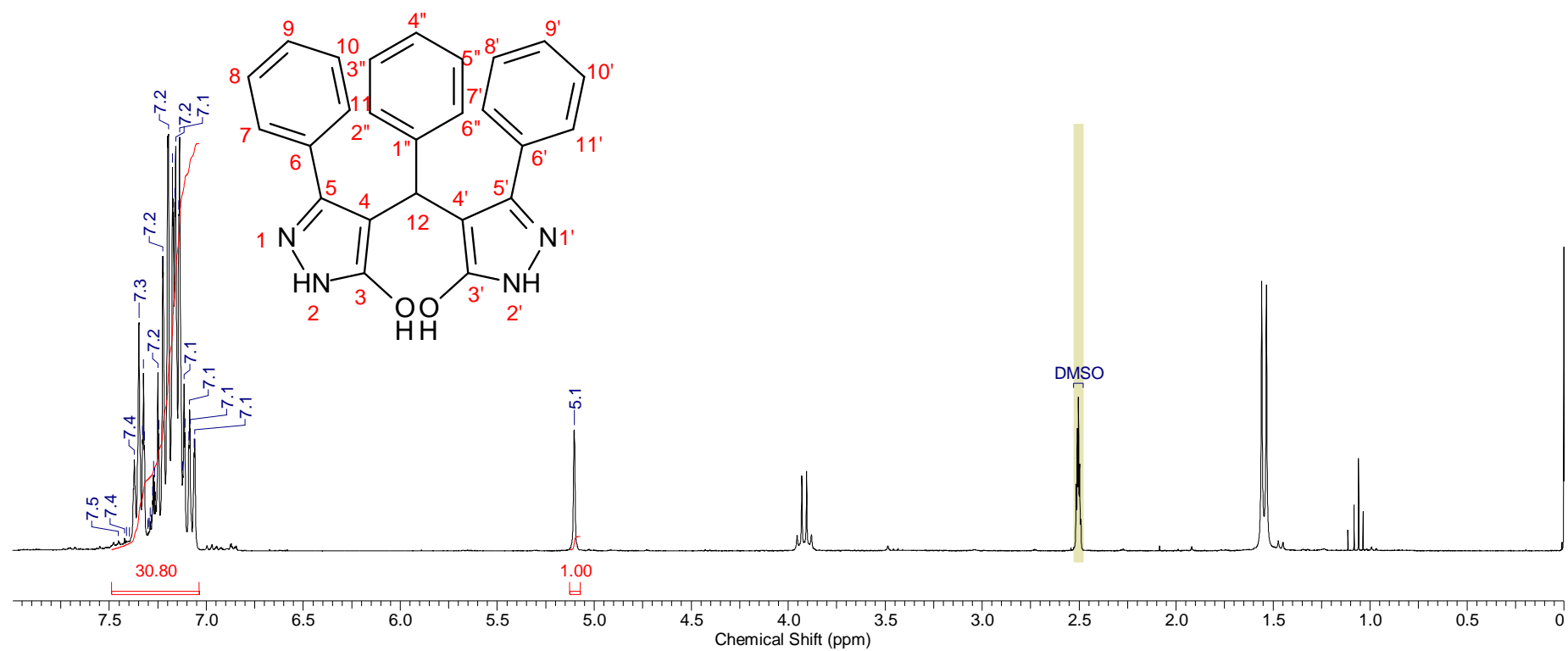


Figura 34-A: Espectro de RMN ^{13}C (75,46MHz, DMSO- d_6) do composto 13a.

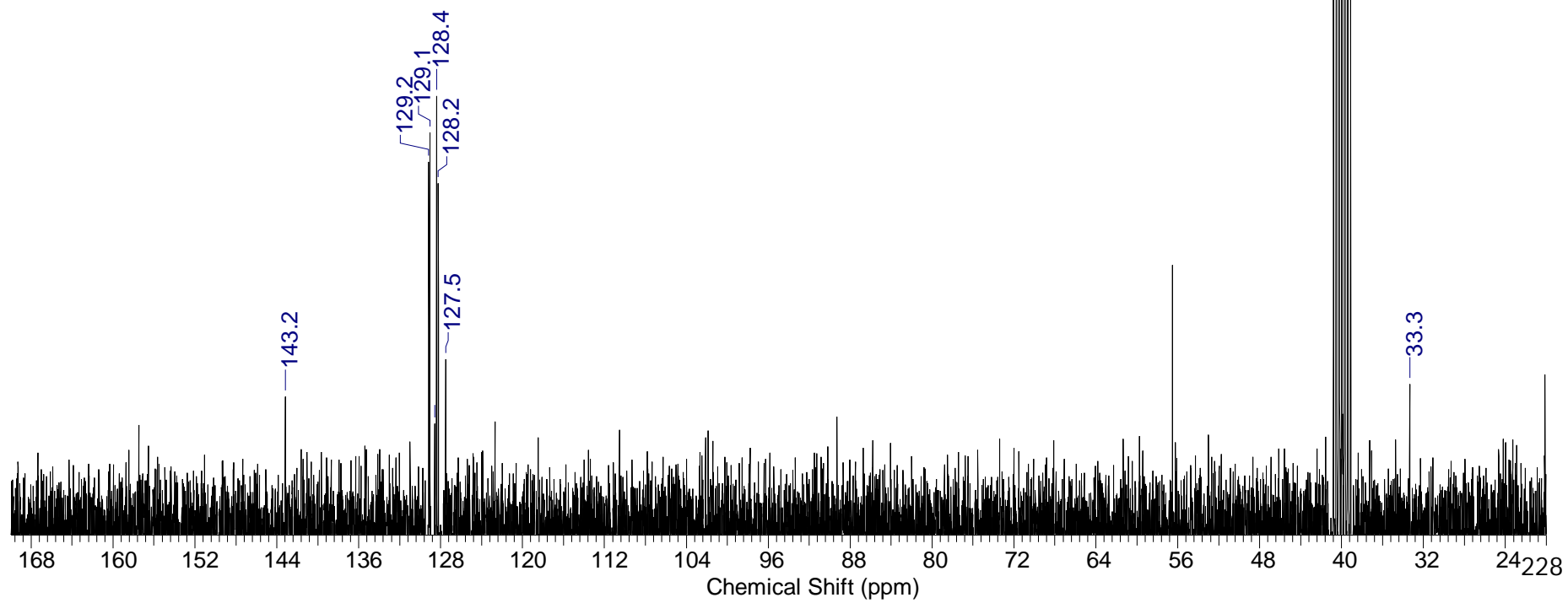
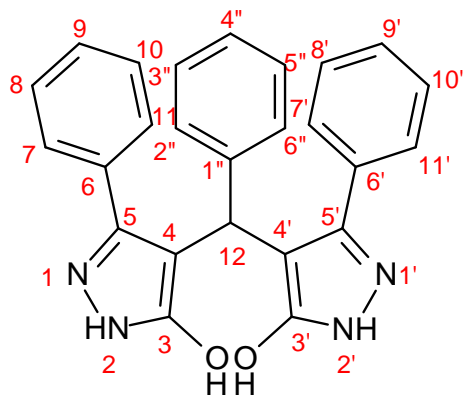


Figura 35-A: Mapa de contornos H-C HMBC (300,0/75,5 MHz, DMSO-d₆) para o composto 13a.

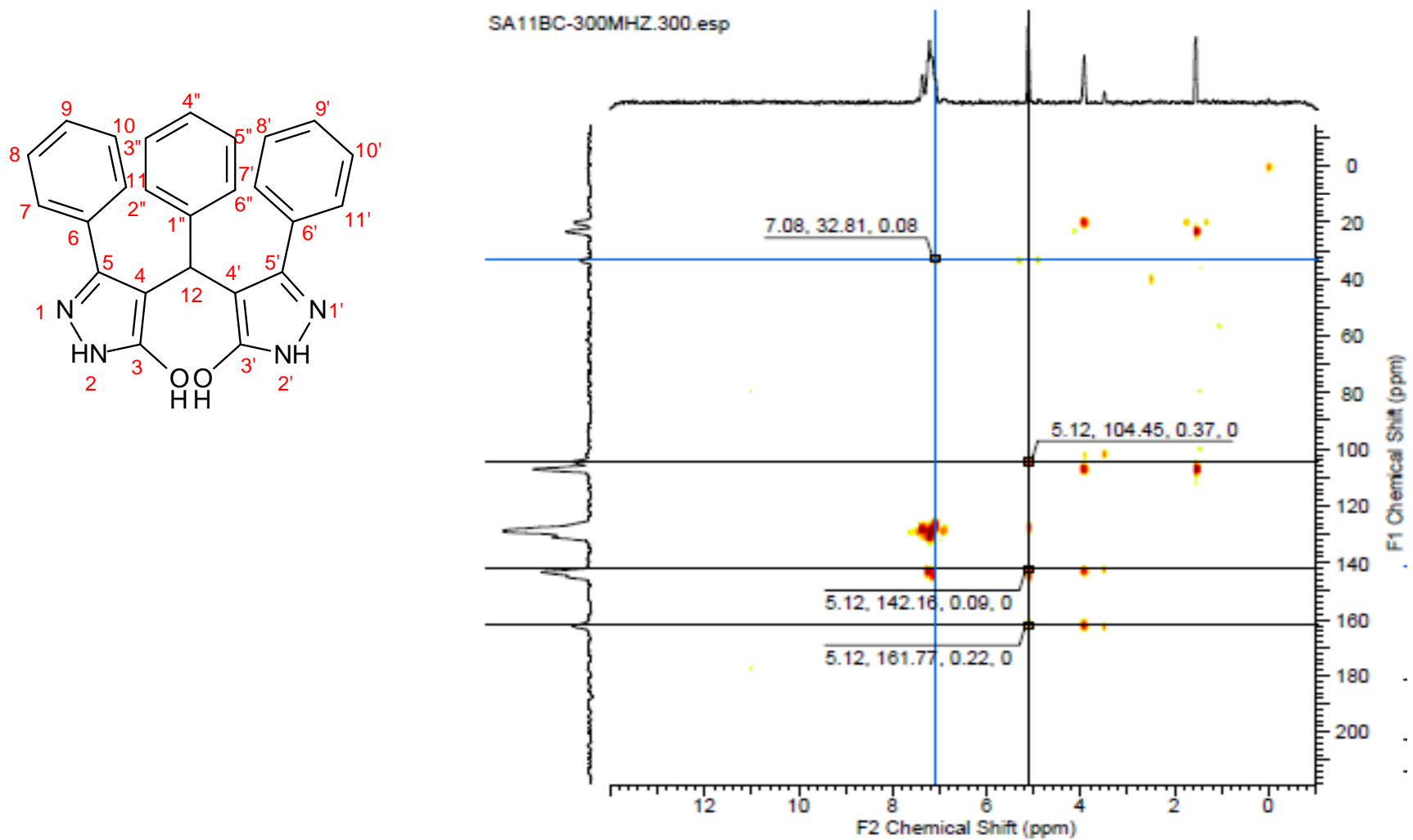
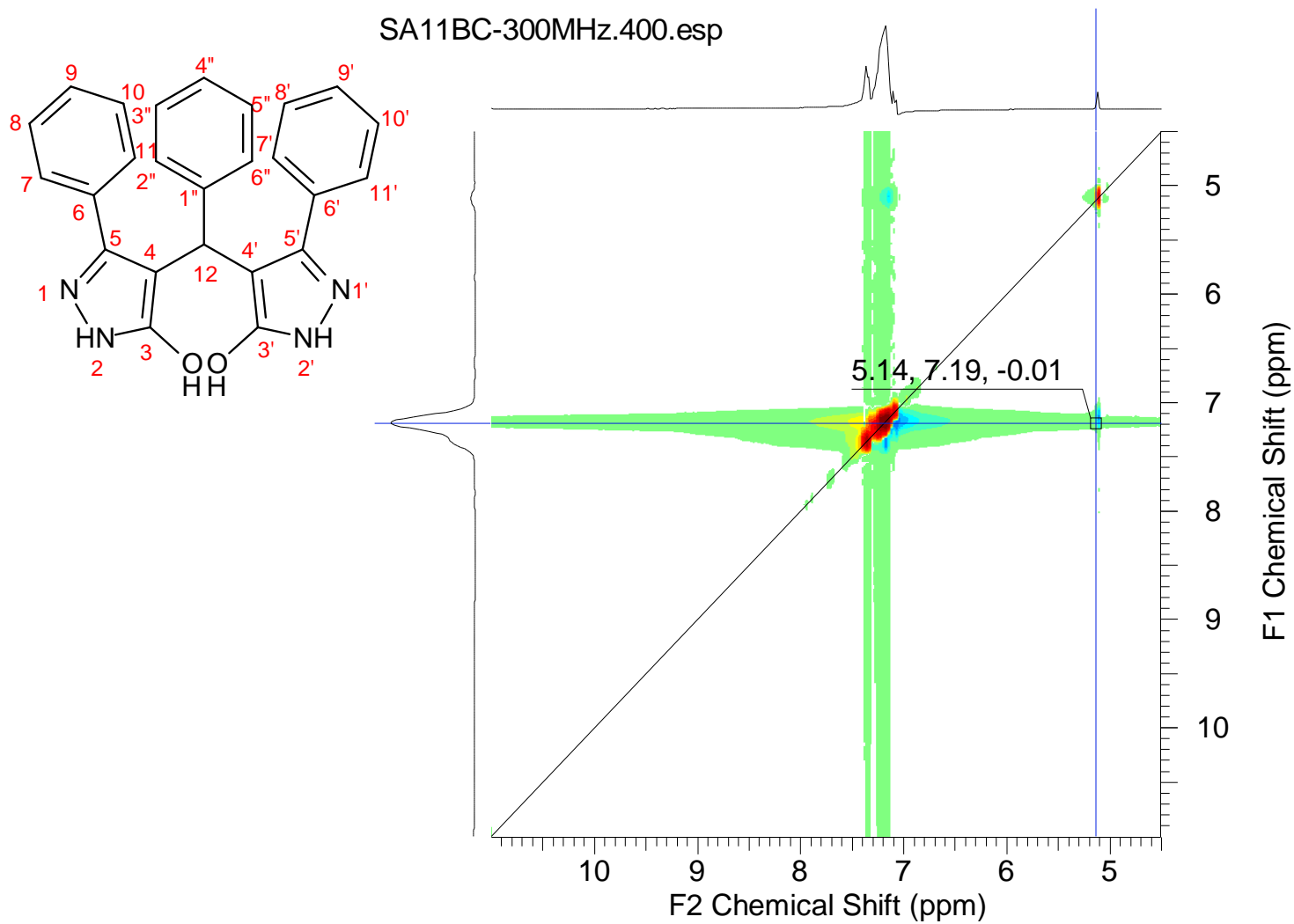


Figura 36-A: Mapa de contornos H-H Noesy (300,0 MHz, DMSO-d₆) para o composto 13a.



4-(4-Dimetilaminofenilmetileno)-bis-(3-fenilpirazol-5-ols) (13b)
Figura 37-A: Espectro de RMN ¹H (300MHz, DMSO-d₆) do composto **13b**.

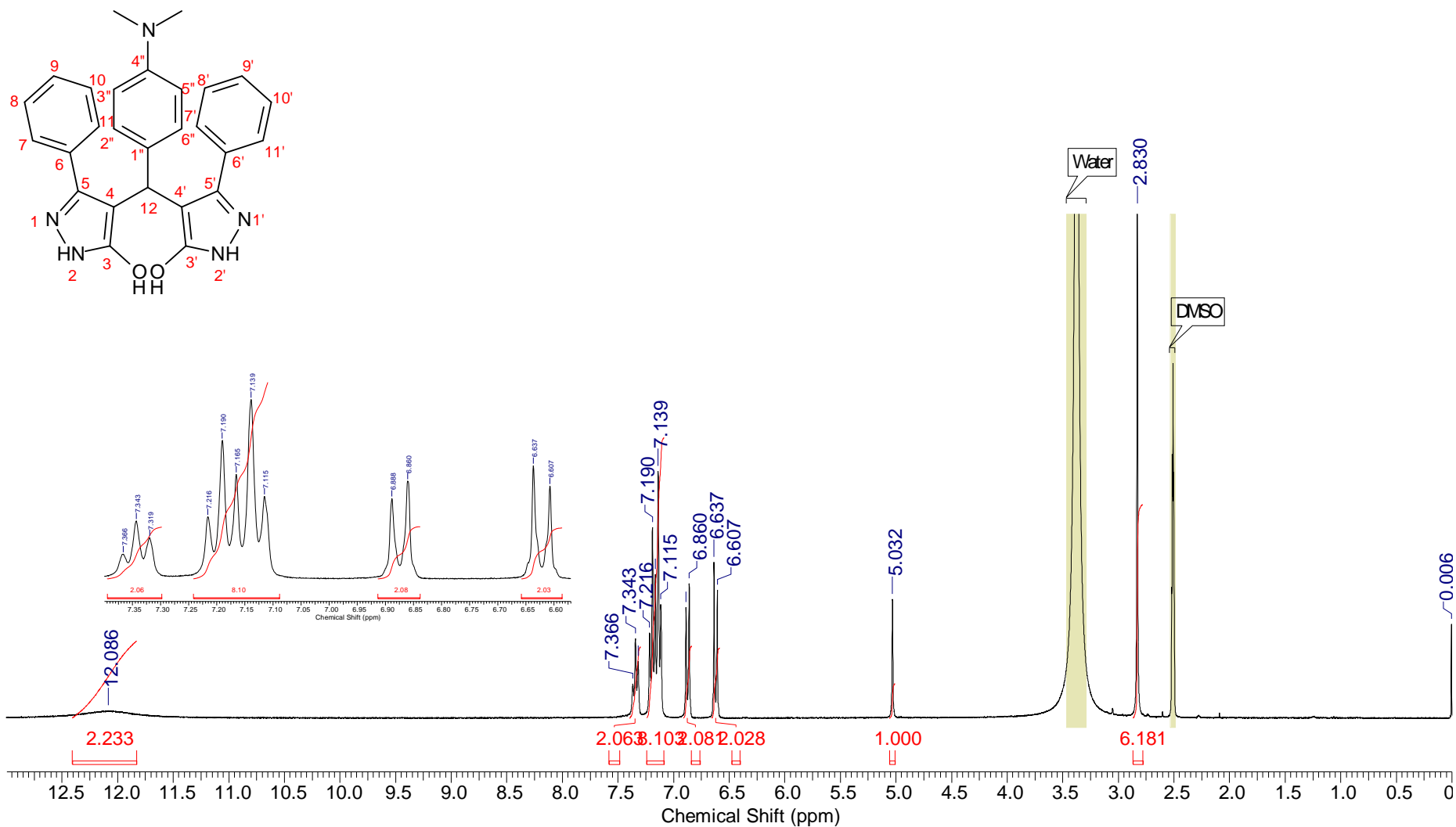


Figura 38-A: Espectro de RMN ^{13}C (75,46 MHz, DMSO- d_6) do composto 13b.

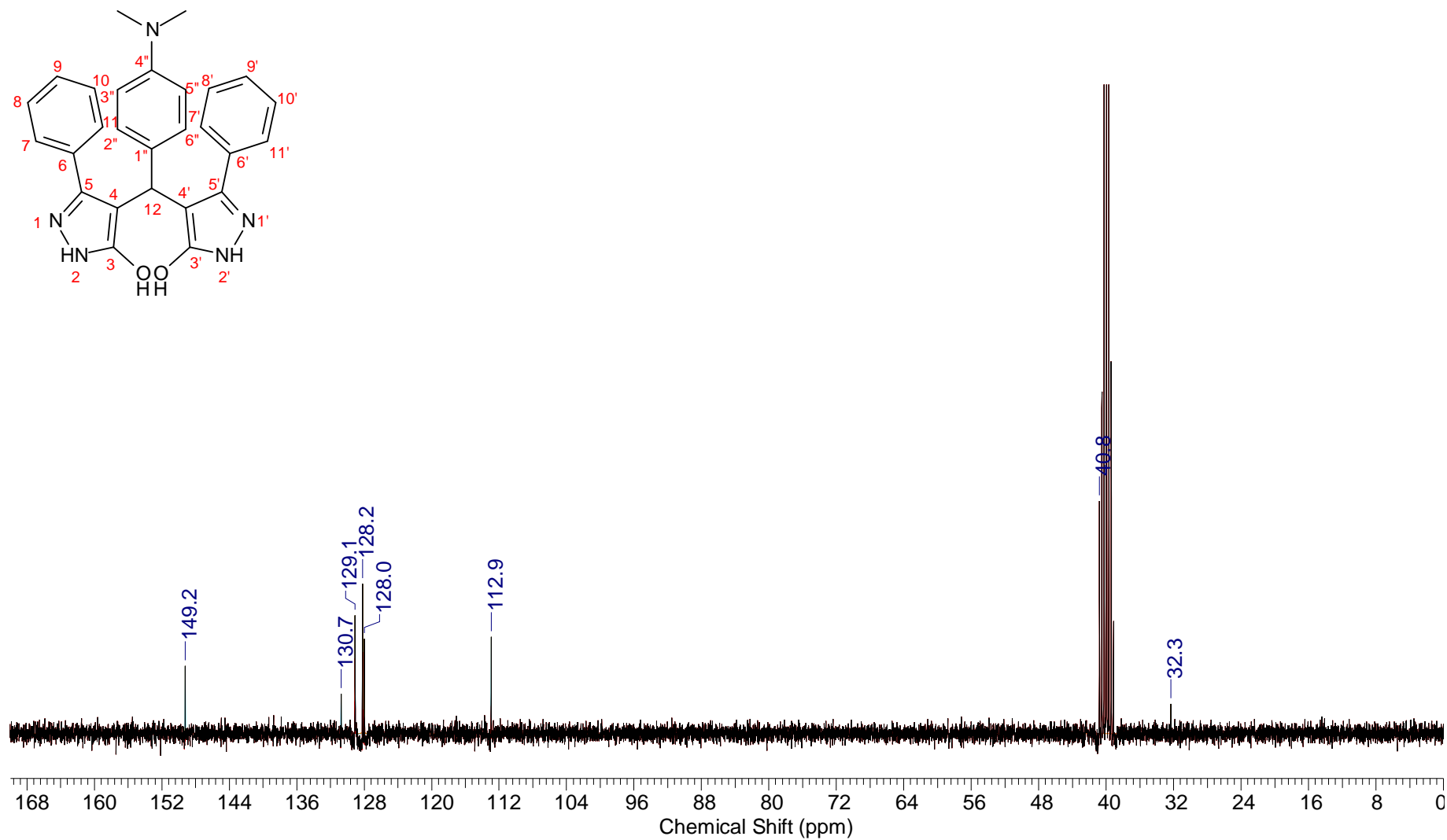


Figura 39-A: Mapa de contornos H-C HMBC (300,0/75,5 MHz, DMSO-d₆) para o composto **13b**.

SA10B.300.esp

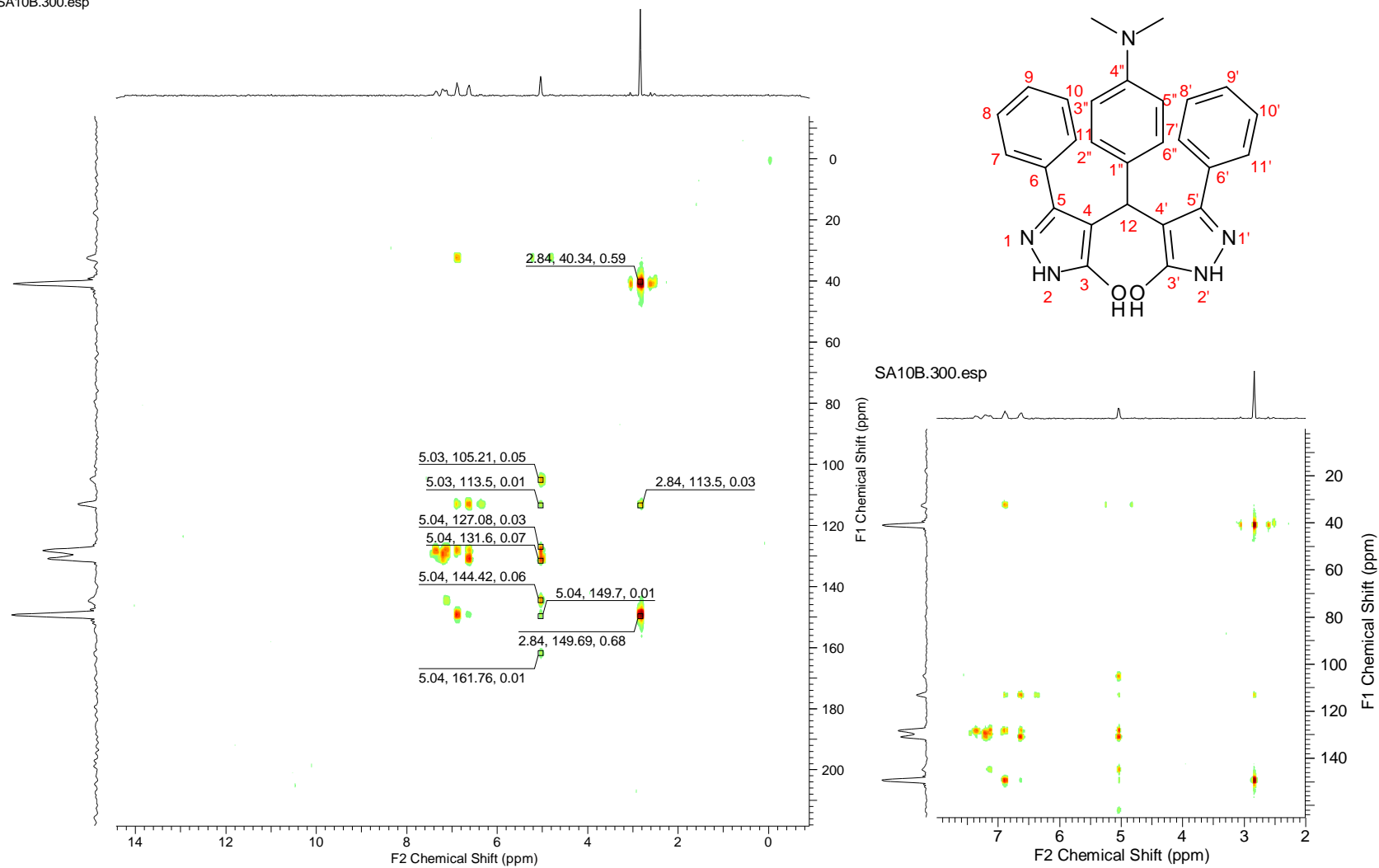
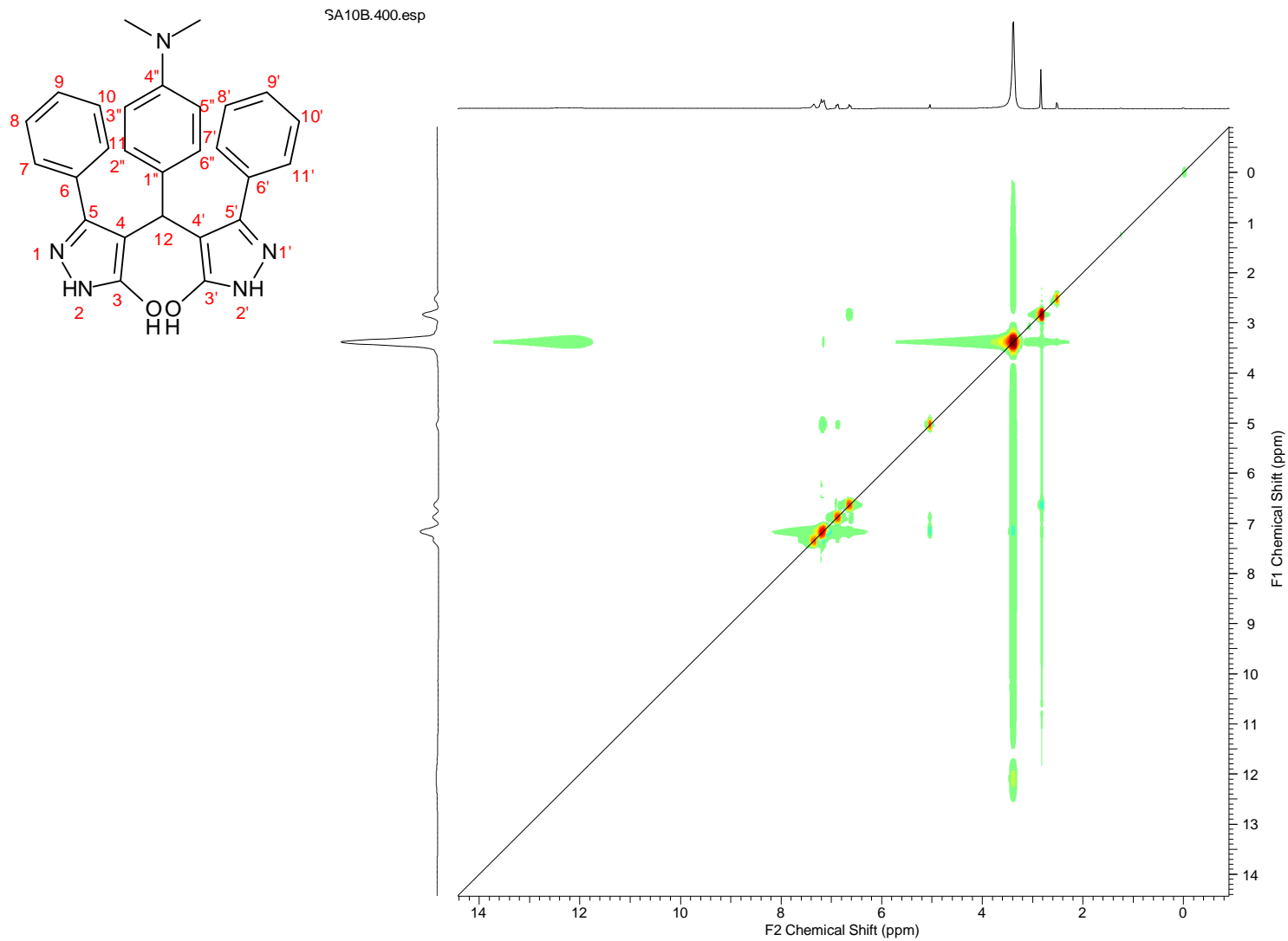


Figura 40-A: Mapa de contornos H-H Noesy (300,0 MHz, DMSO-d₆) para o composto **13b**.



4-(4-metilfenilmetileno)-bis-(3-fenilpirazol-5-ols) (13c)

Figura 41-A: Espectro de RMN ^1H (500MHz, DMSO-d_6) do composto 13c.

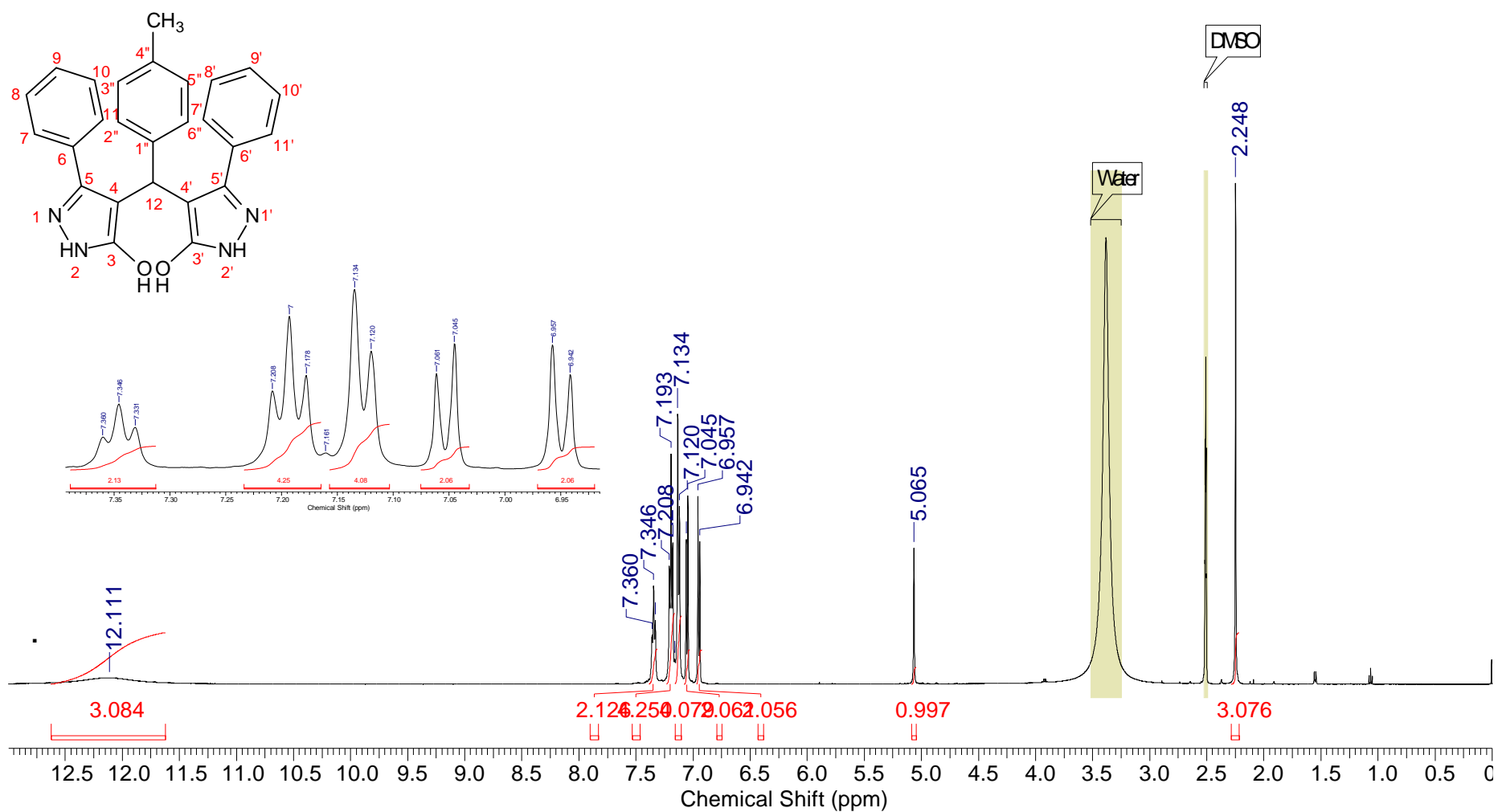
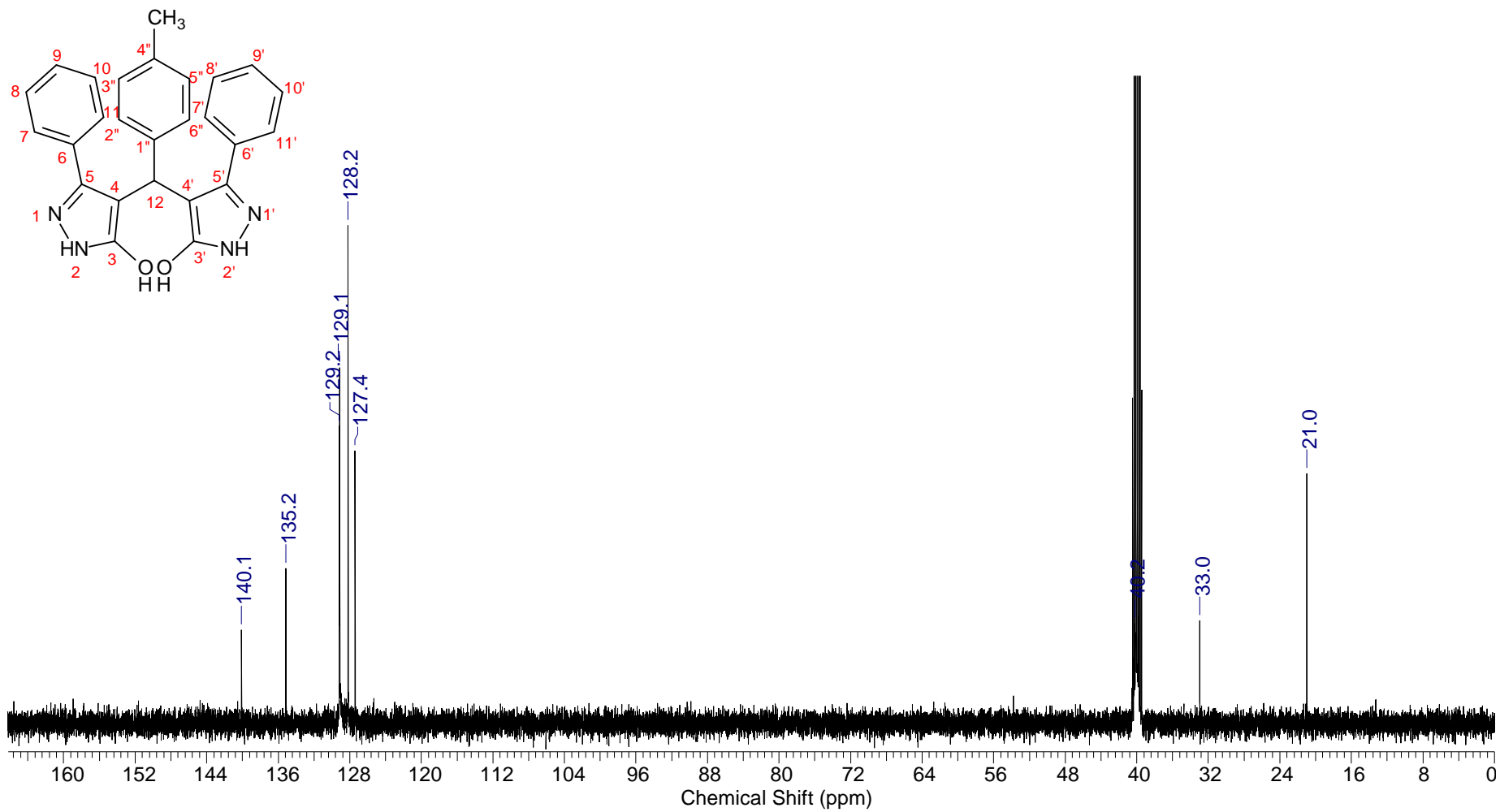


Figura 42-A: Espectro de RMN ^{13}C (125,76 MHz, DMSO- d_6) do composto **13c**



4-(4-metóxiifenilmetileno)-bis-(3-fenilpirazol-5-ols) (13d)

Figura 43-A: Espectro de RMN ¹H (500MHz, DMSO-d₆) do composto 13d.

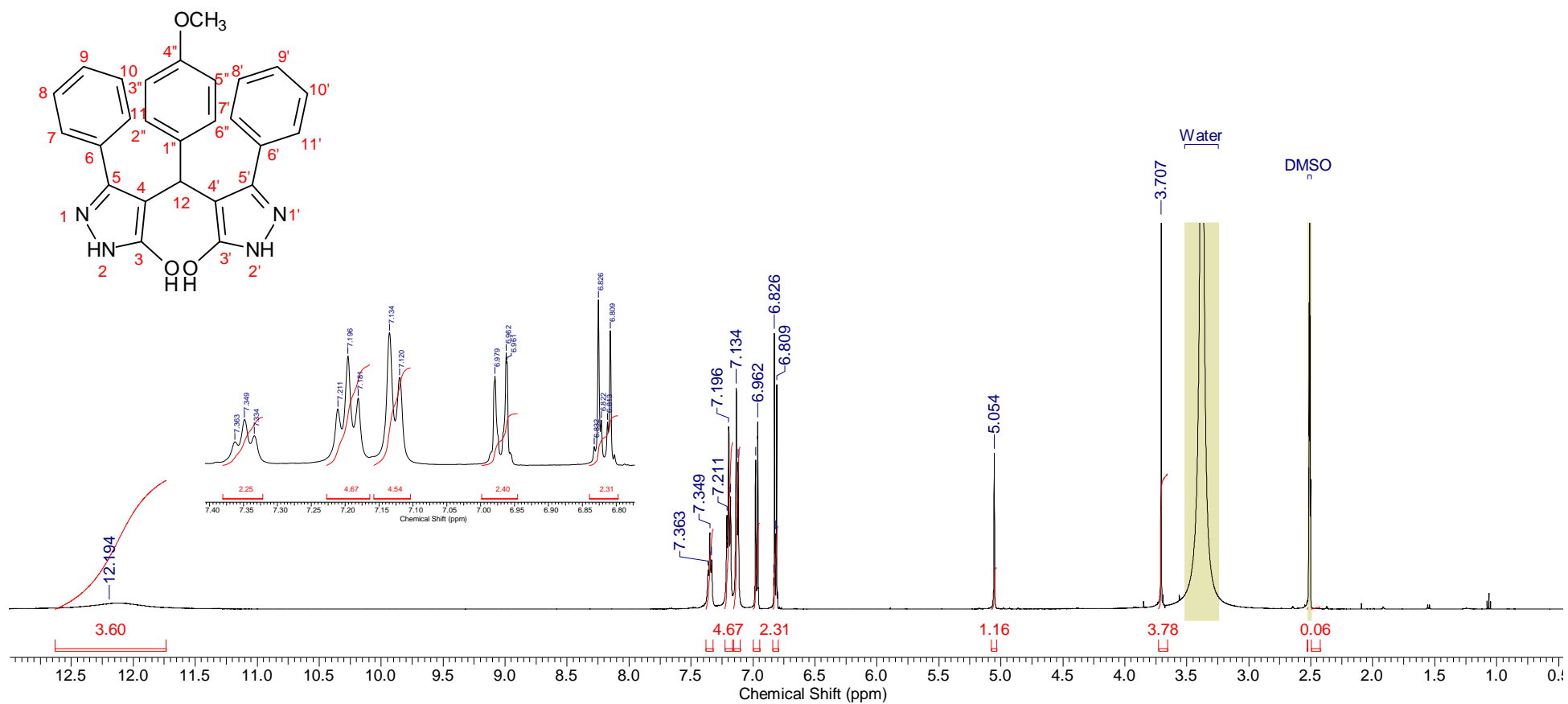


Figura 44-A: Espectro de RMN ^{13}C (125,76 MHz, DMSO- d_6) do composto 13d.

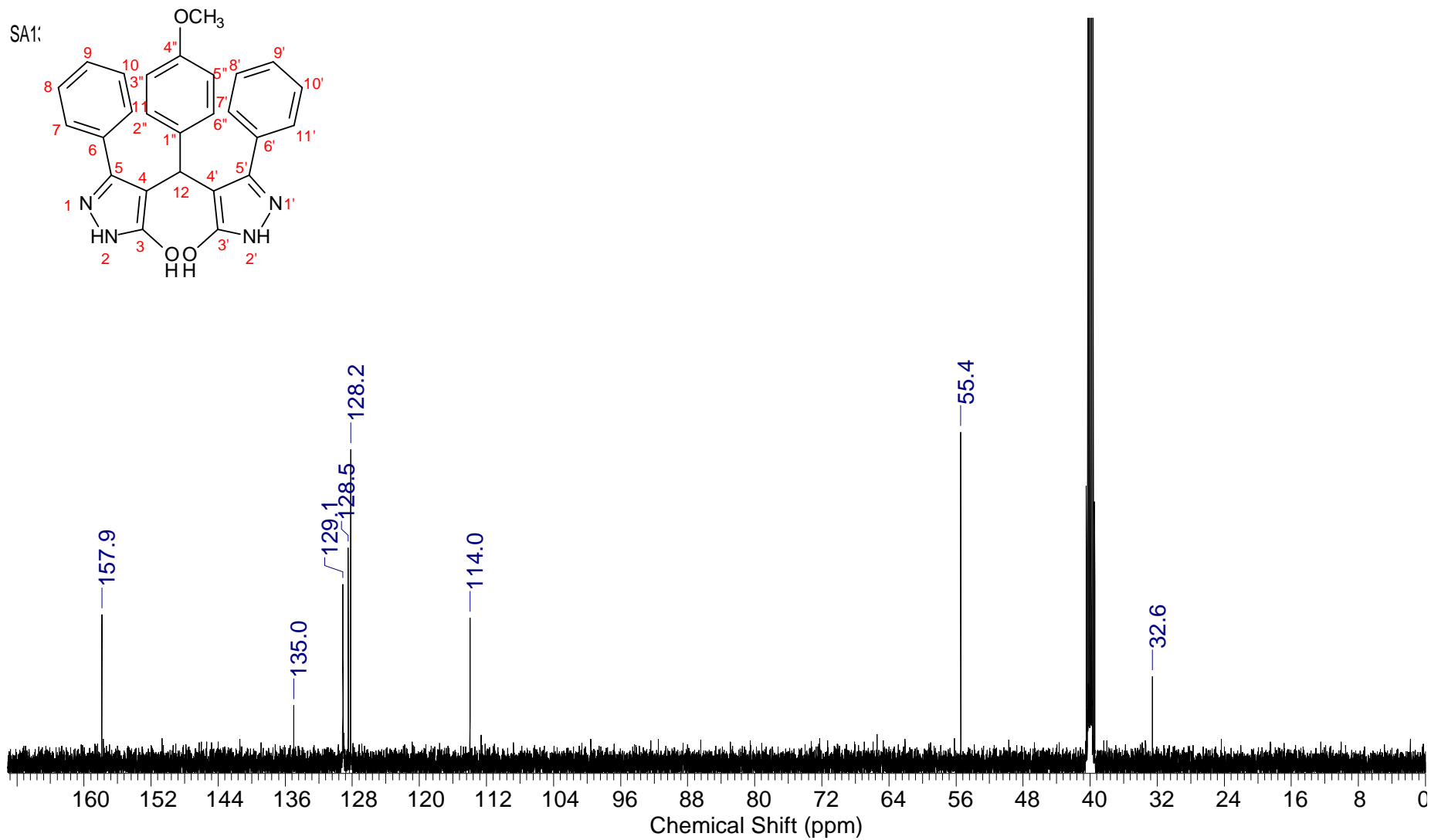
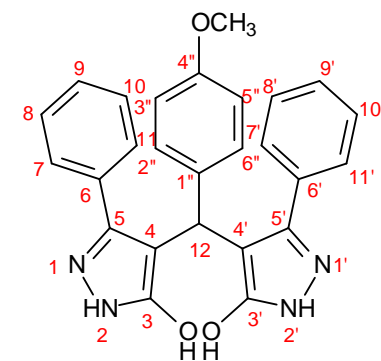
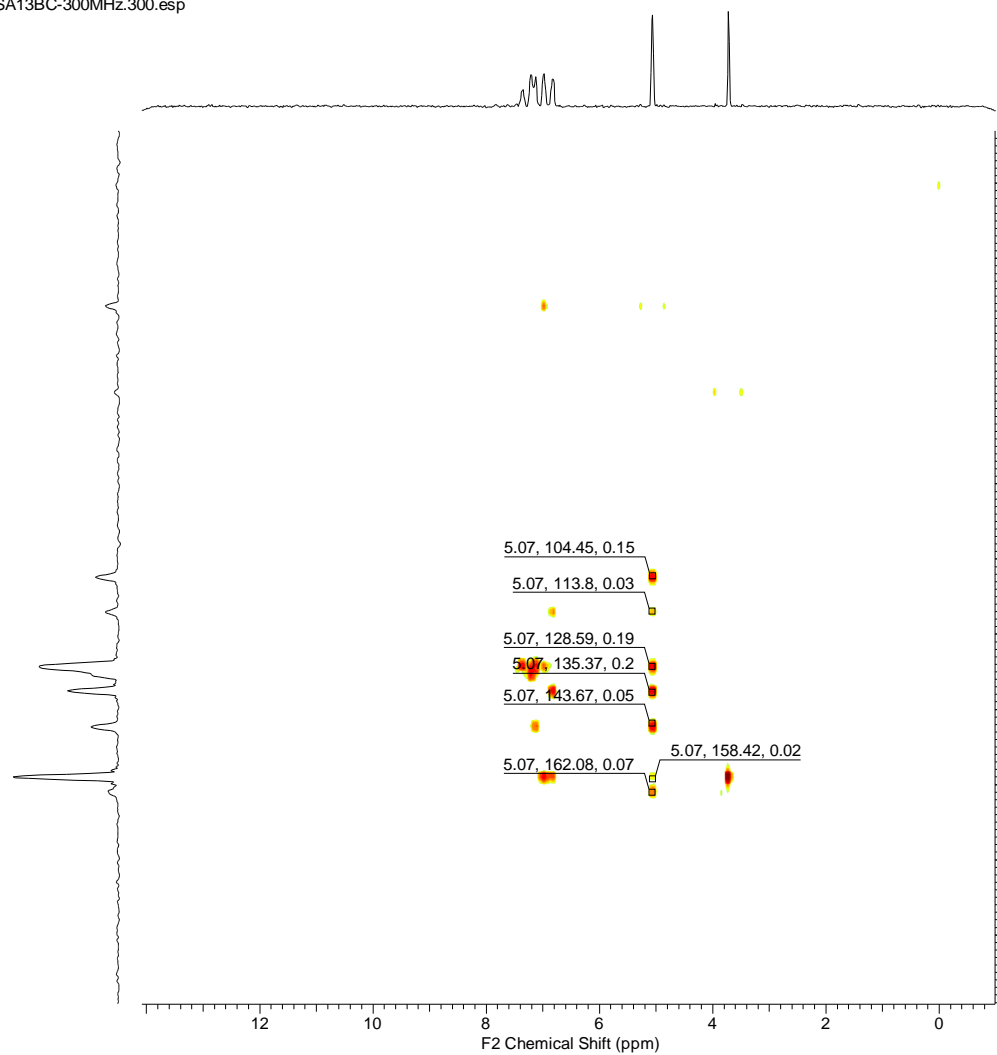


Figura 45-A: Mapa de contornos H-C HMBC (500,0/125,8 MHz, DMSO-d₆) para o composto **13d**.

SA13BC-300MHz.300.esp



SA13BC-300MHz.300.esp

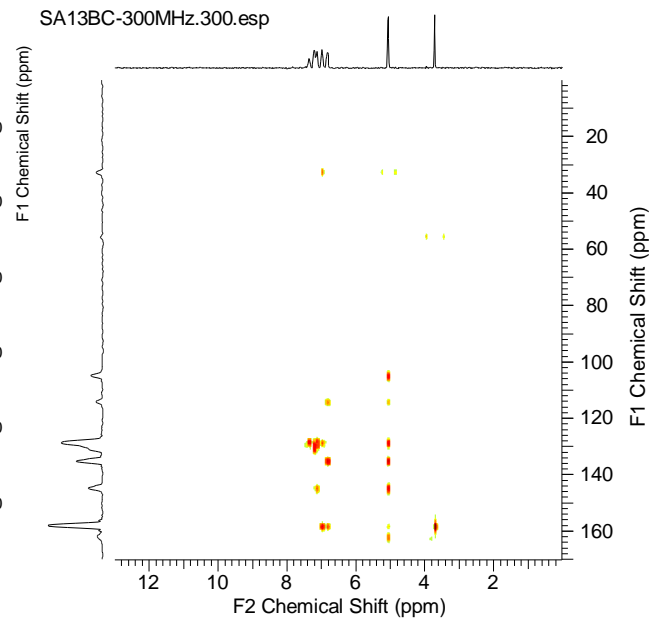
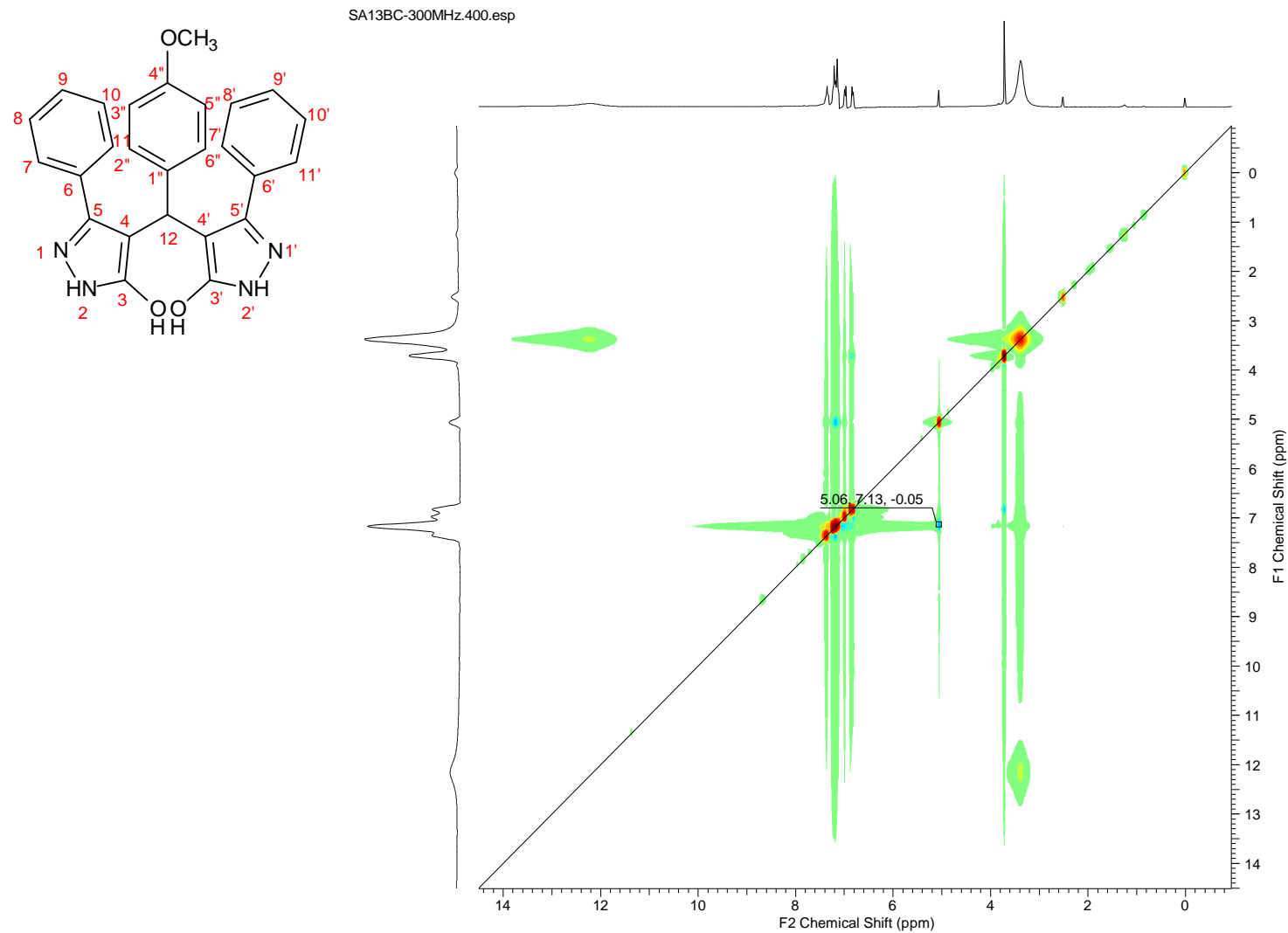


Figura 46-A: Mapa de contornos H-H Noesy (500,0 MHz, DMSO-d₆) para o composto 13d.



4-(4-nitrofenilmetileno)-bis-(3-fenilpirazol-5-ols) (13e)

Figura 47-A: Espectro de RMN ¹H (500MHz, DMSO-d₆) do composto 13e.

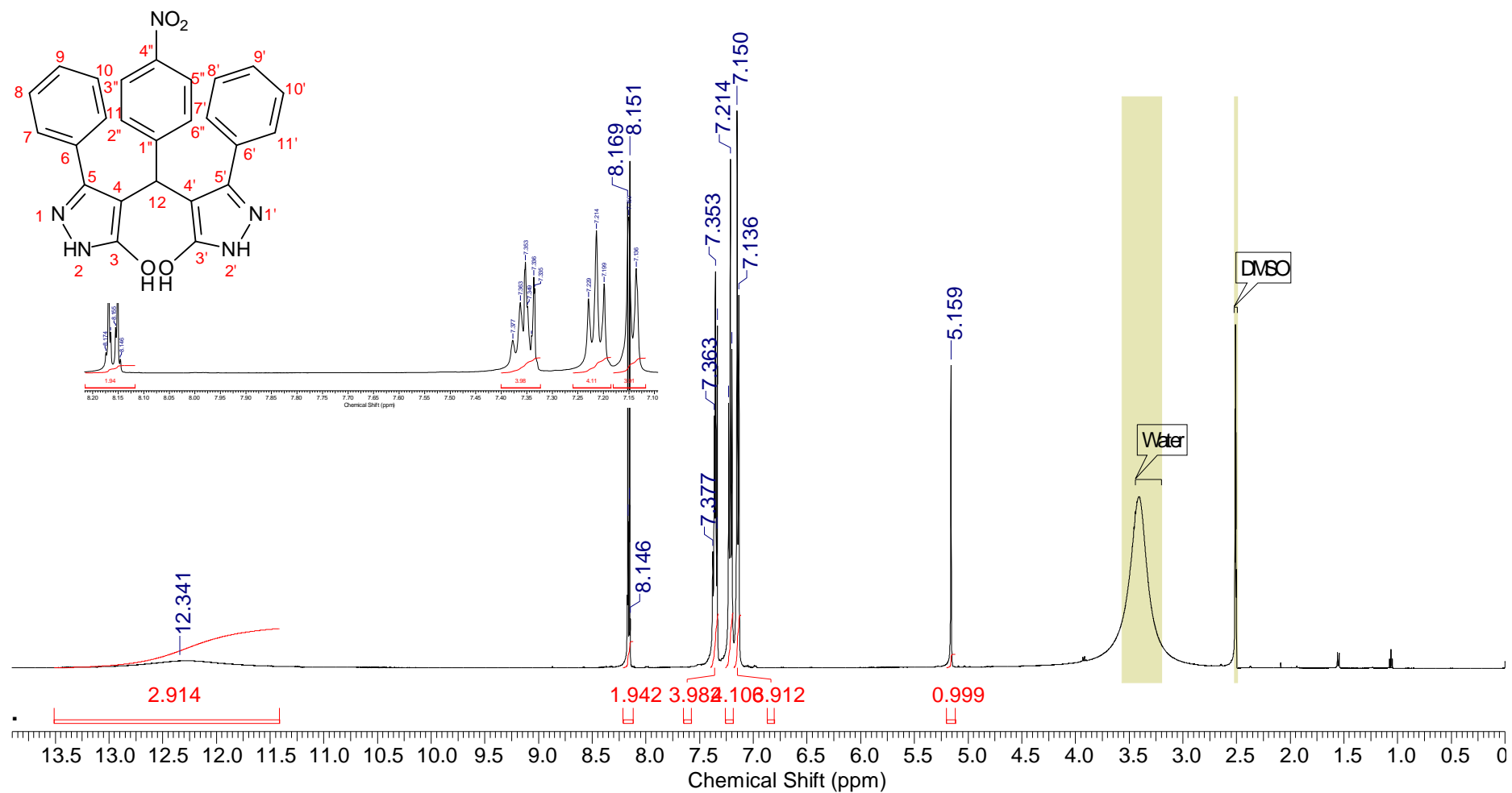


Figura 48-A: Espectro de RMN ^{13}C (1255,76 MHz, DMSO- d_6) do composto **13e**

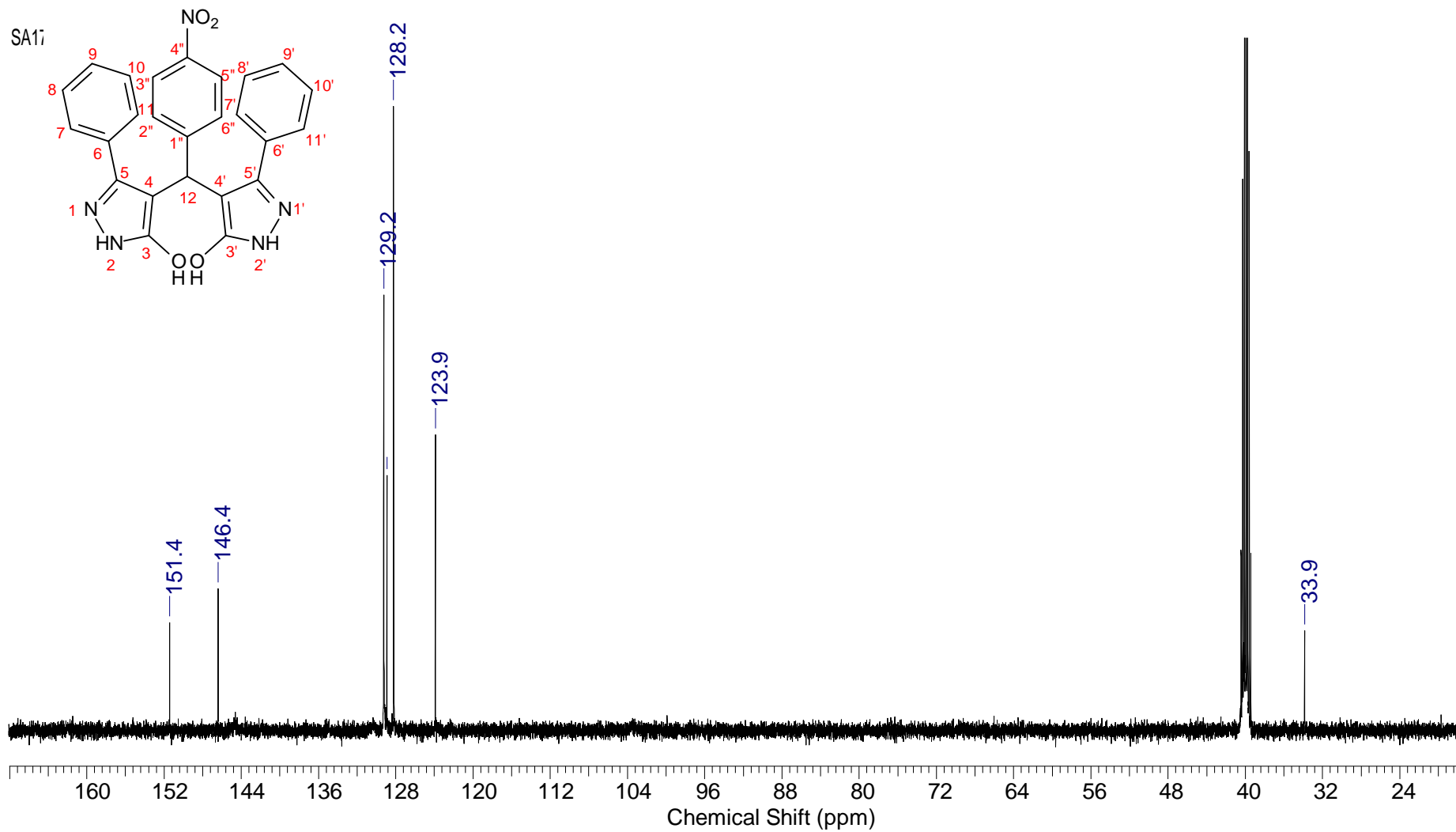
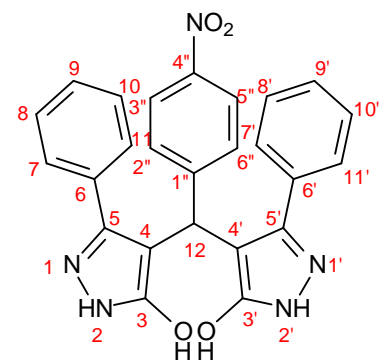
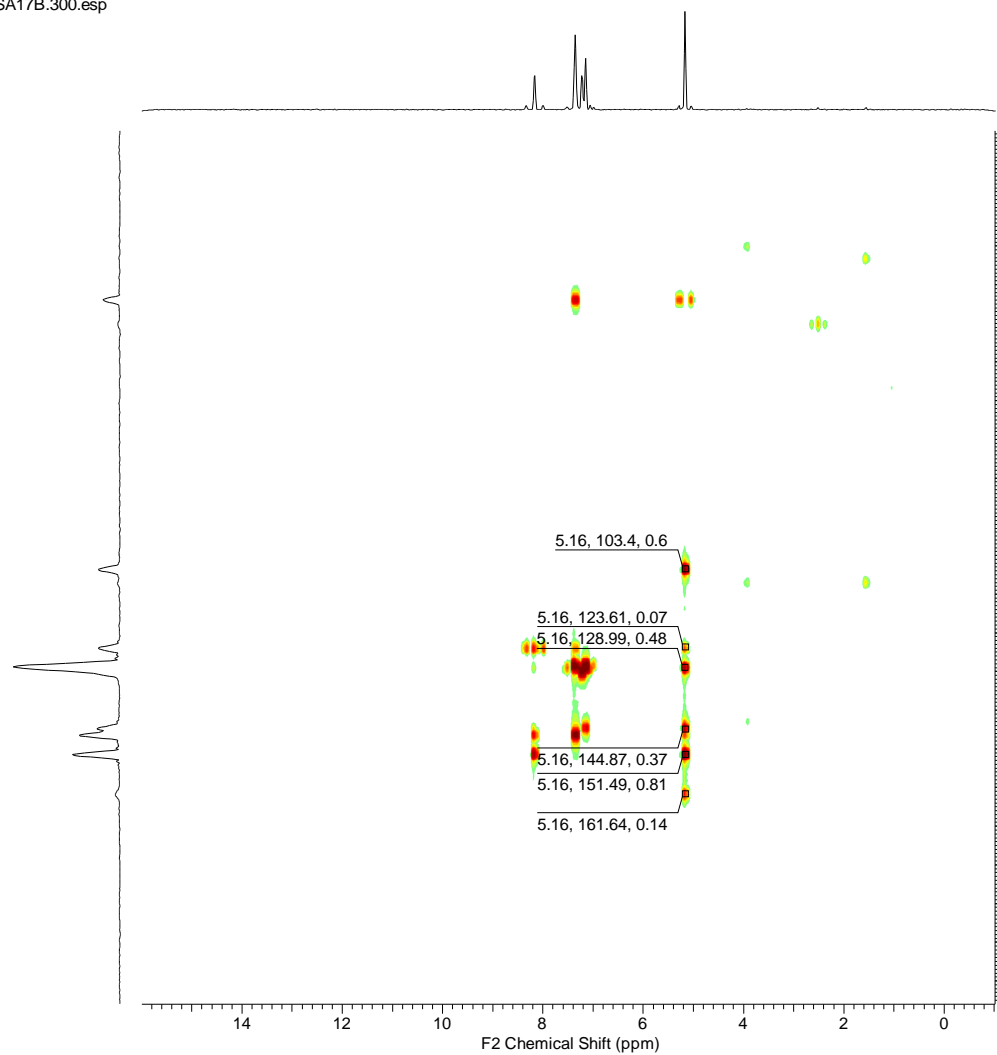


Figura 49-A: Mapa de contornos H-C HMBC (500,0/125,8 MHz, DMSO-d₆) para o composto 13e.

SA17B.300.esp



SA17B.300.esp

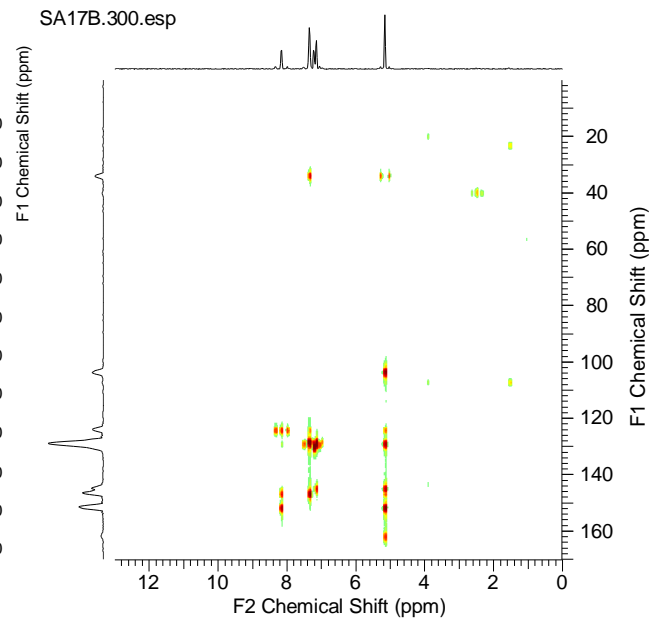
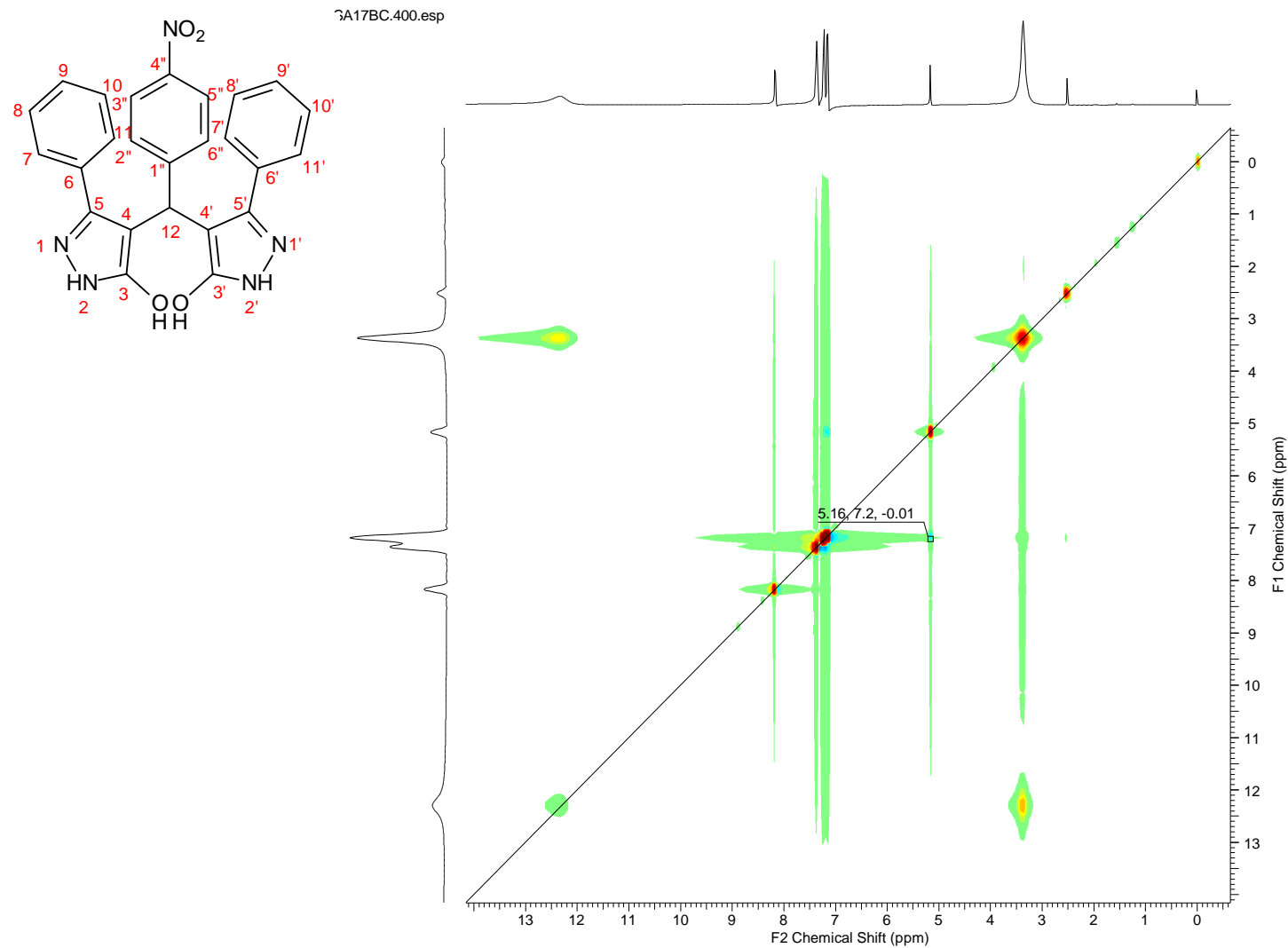


Figura 50-A: Mapa de contornos H-H Noesy (500,0 MHz, DMSO-d₆) para o composto 13e.



4-(3-nitrofenilmetileno)-bis-(3-fenilpirazol-5-ols) (13f)

Figura 51-A: Espectro de RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) do composto 13f.

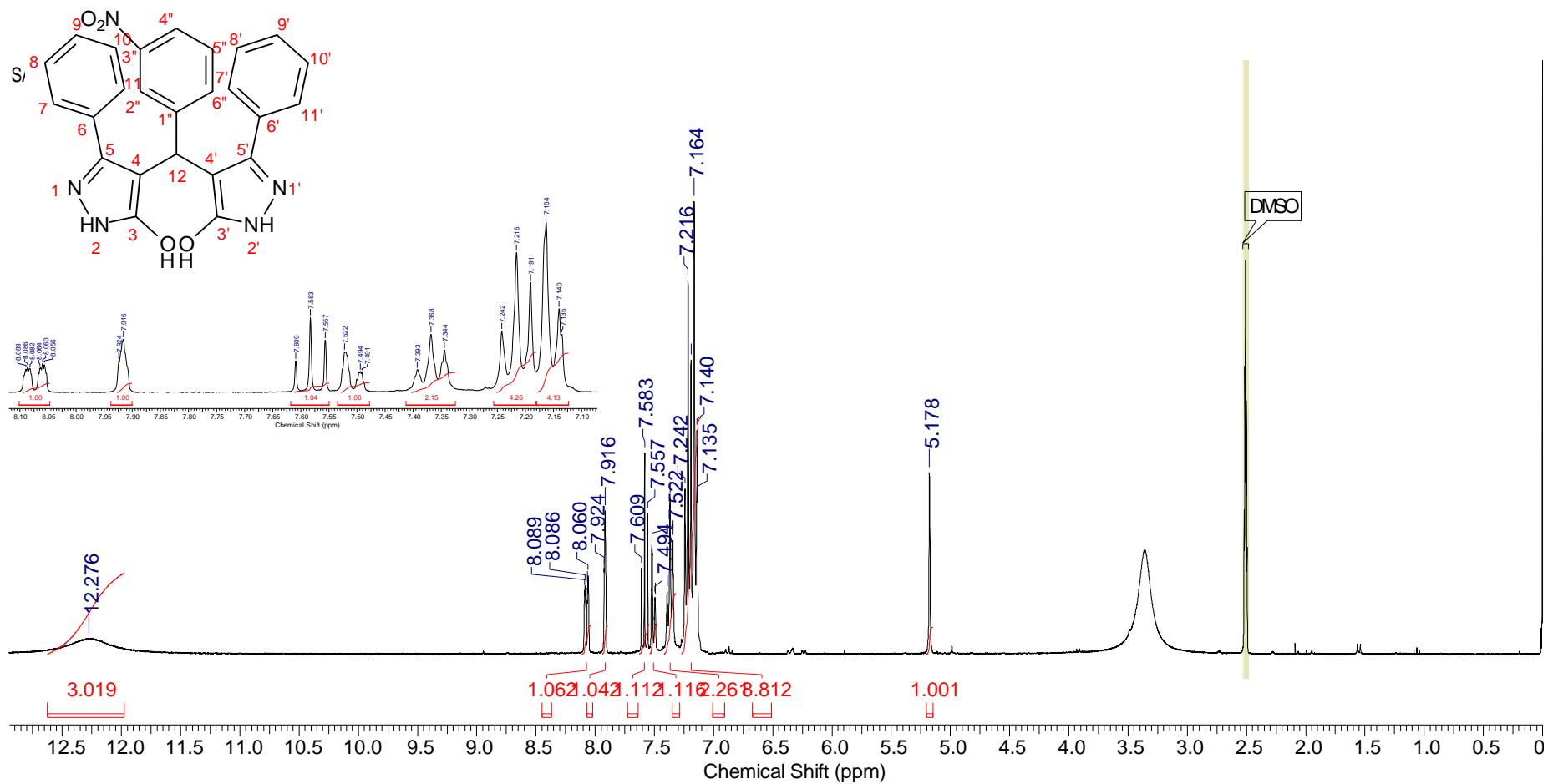


Figura 52-A: Espectro de RMN $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ (75,46 MHz, DMSO-d_6) do composto **13f**.

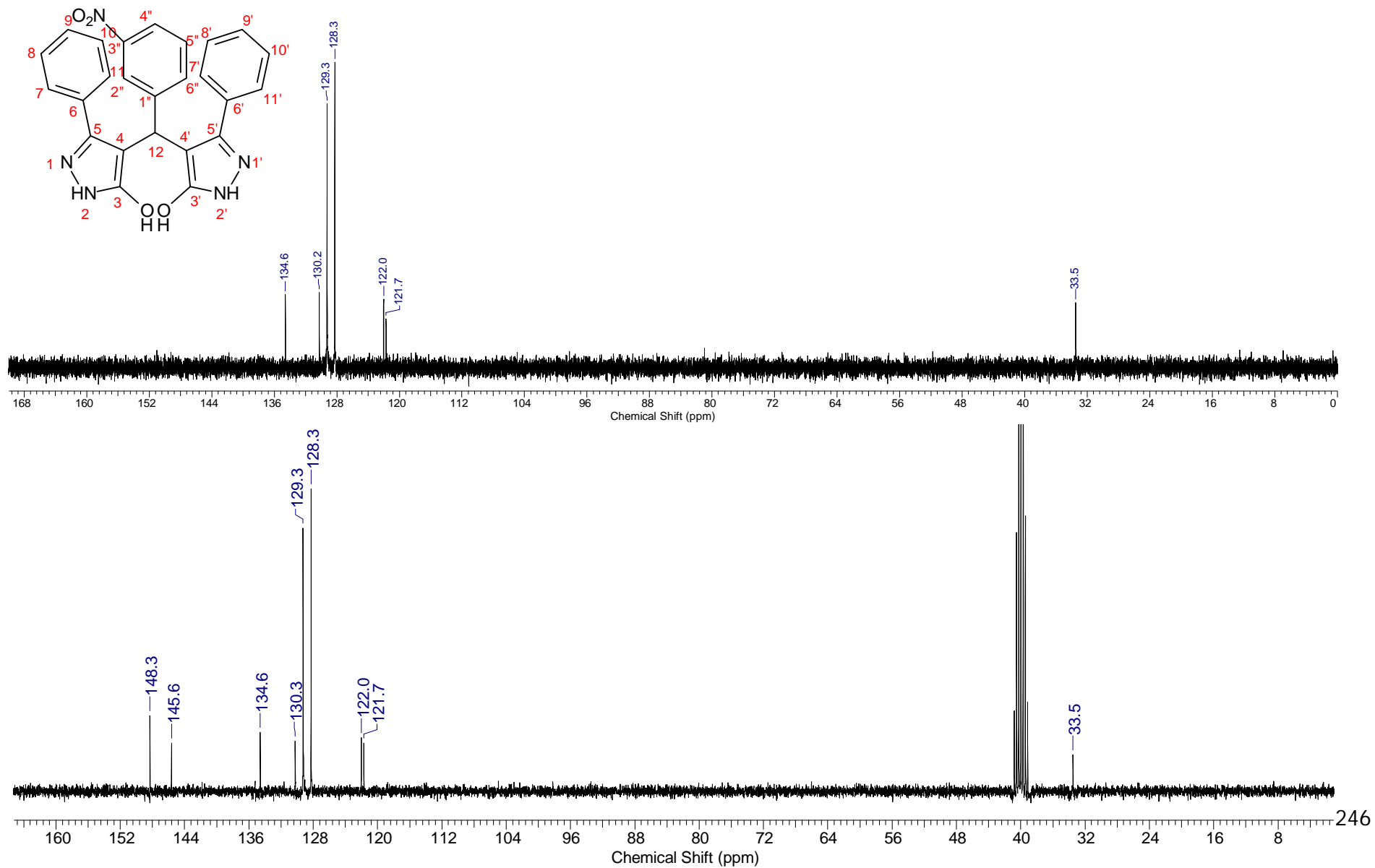


Figura 53-A: Mapa de contornos H-C HMBC (300,0/75,5 MHz, DMSO-d₆) para o composto **13f**.

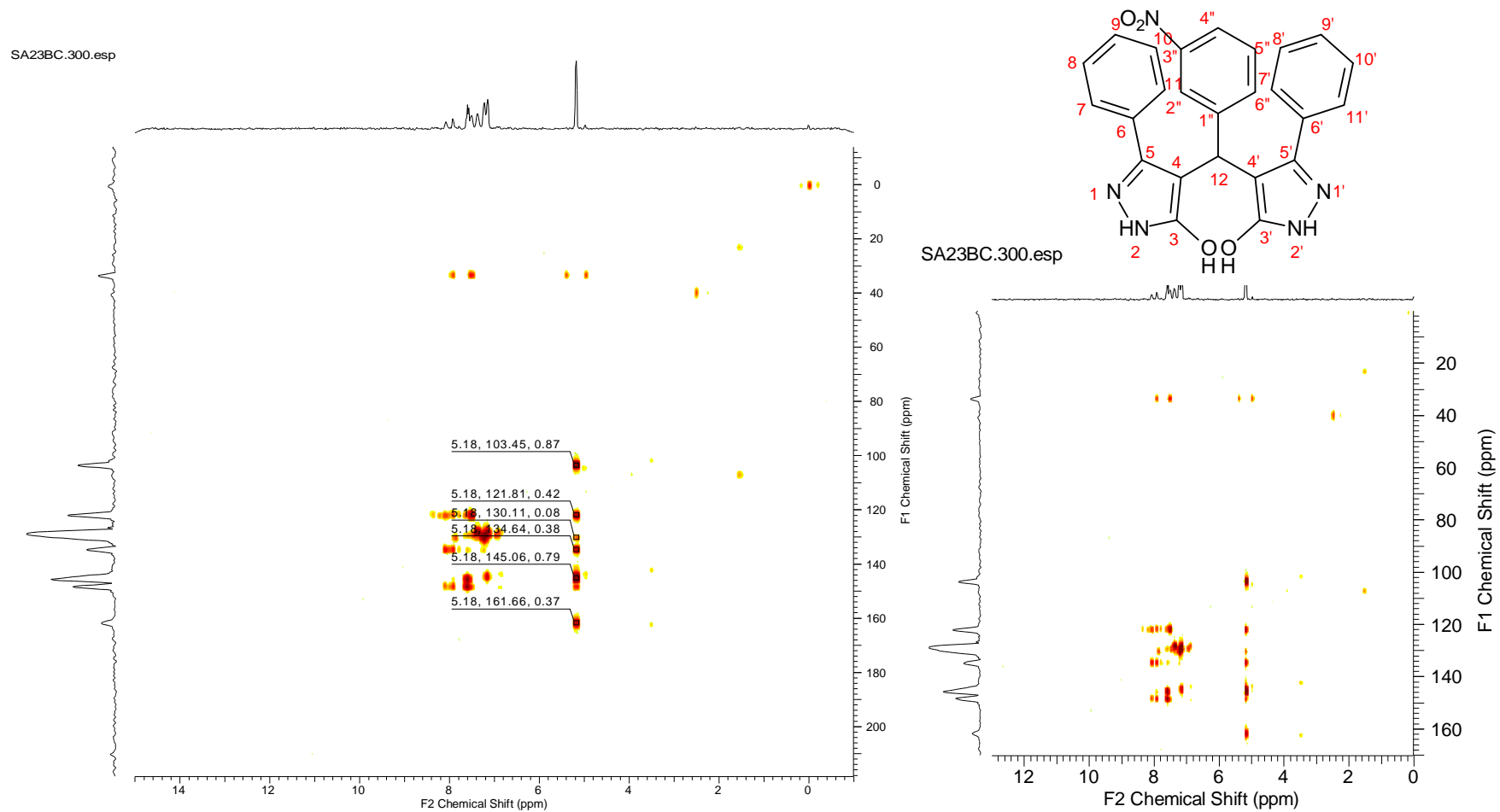
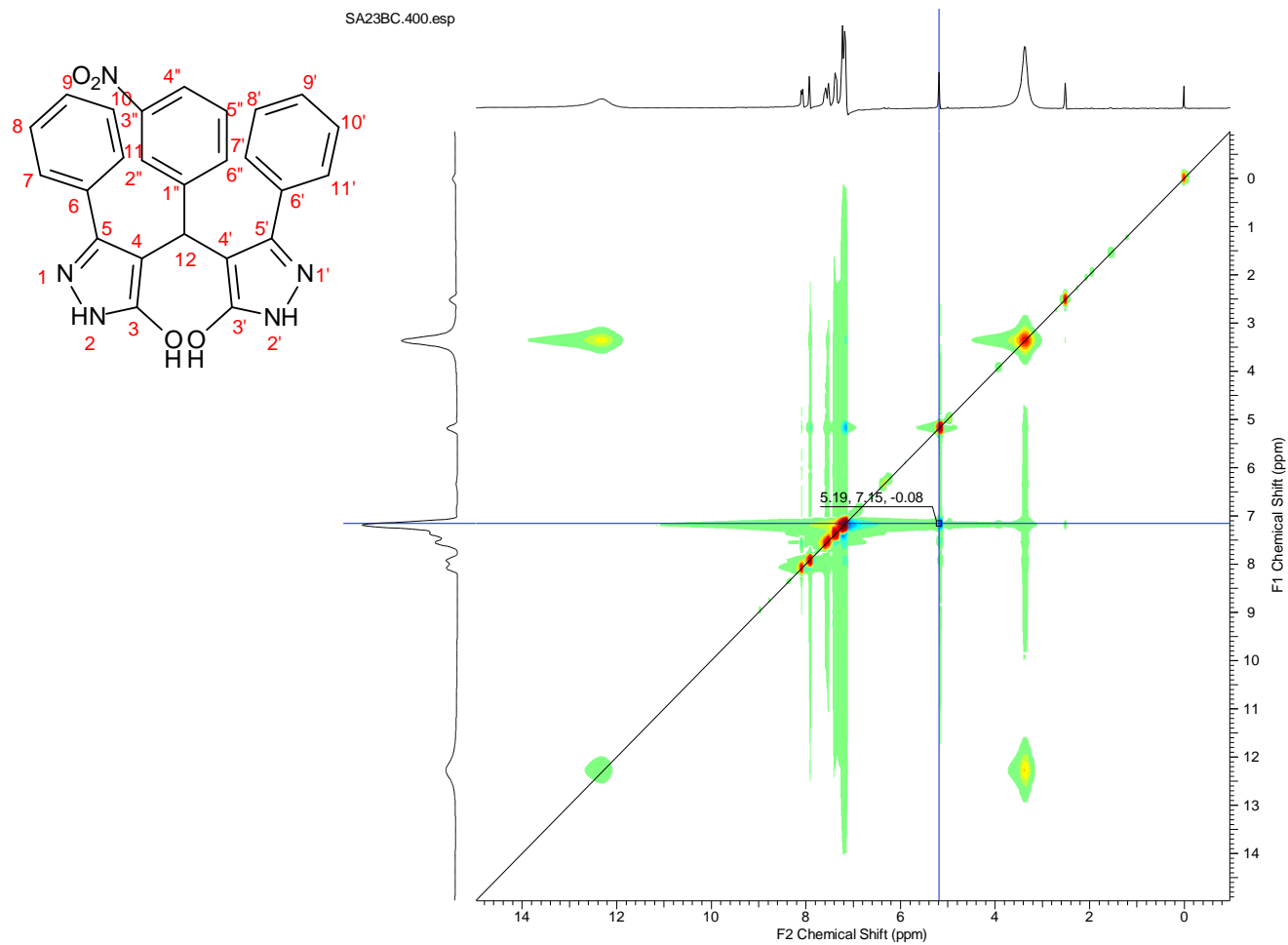


Figura 54-A: Mapa de contornos H-H Noesy (300,0 MHz, DMSO-d₆) para o composto 13f.



Derivados Benzimidazólicos
éster metil 2-(1-metil-benzimidazol-2-il)benzoato (32)

Figura 55-A: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) do composto **32**.

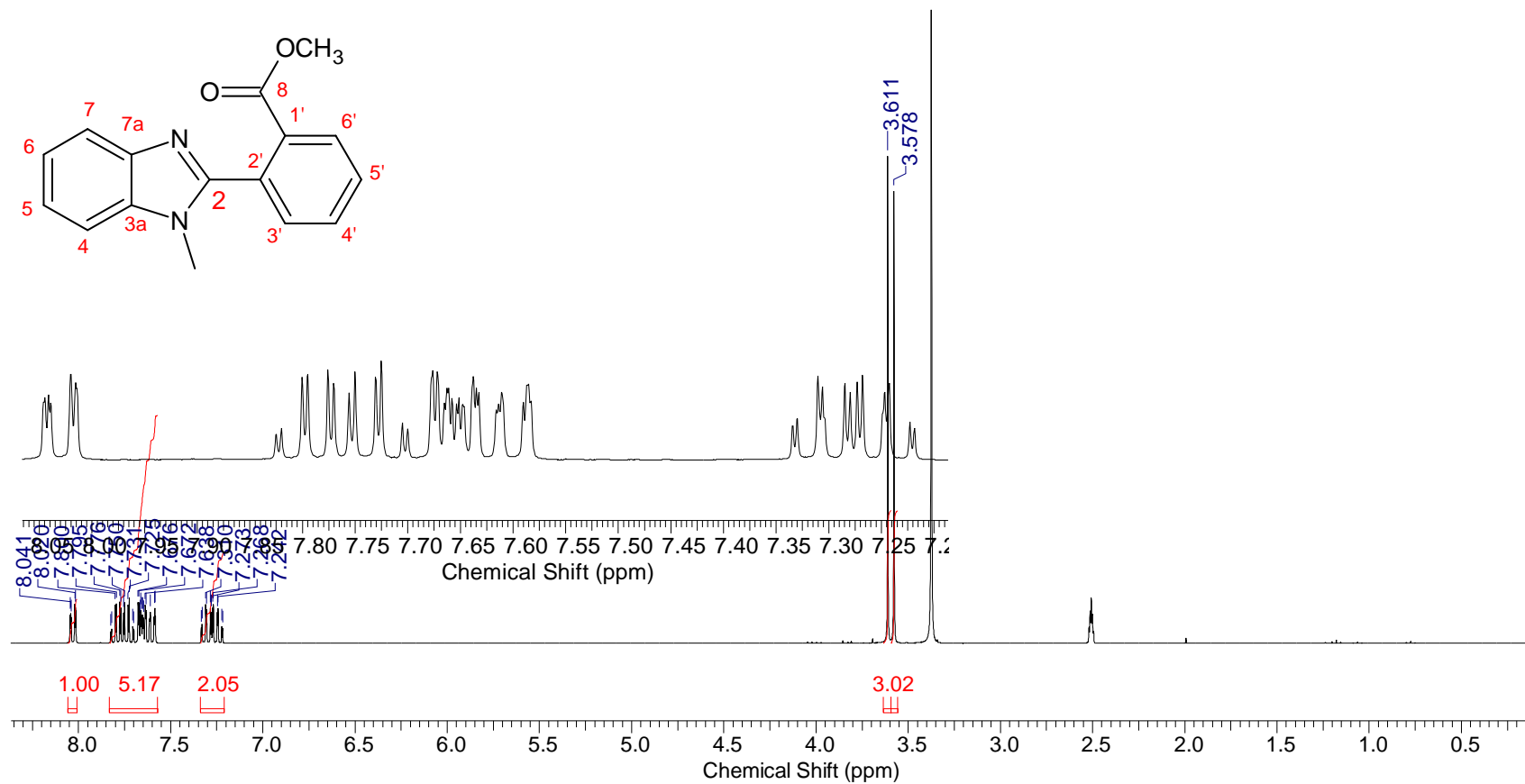
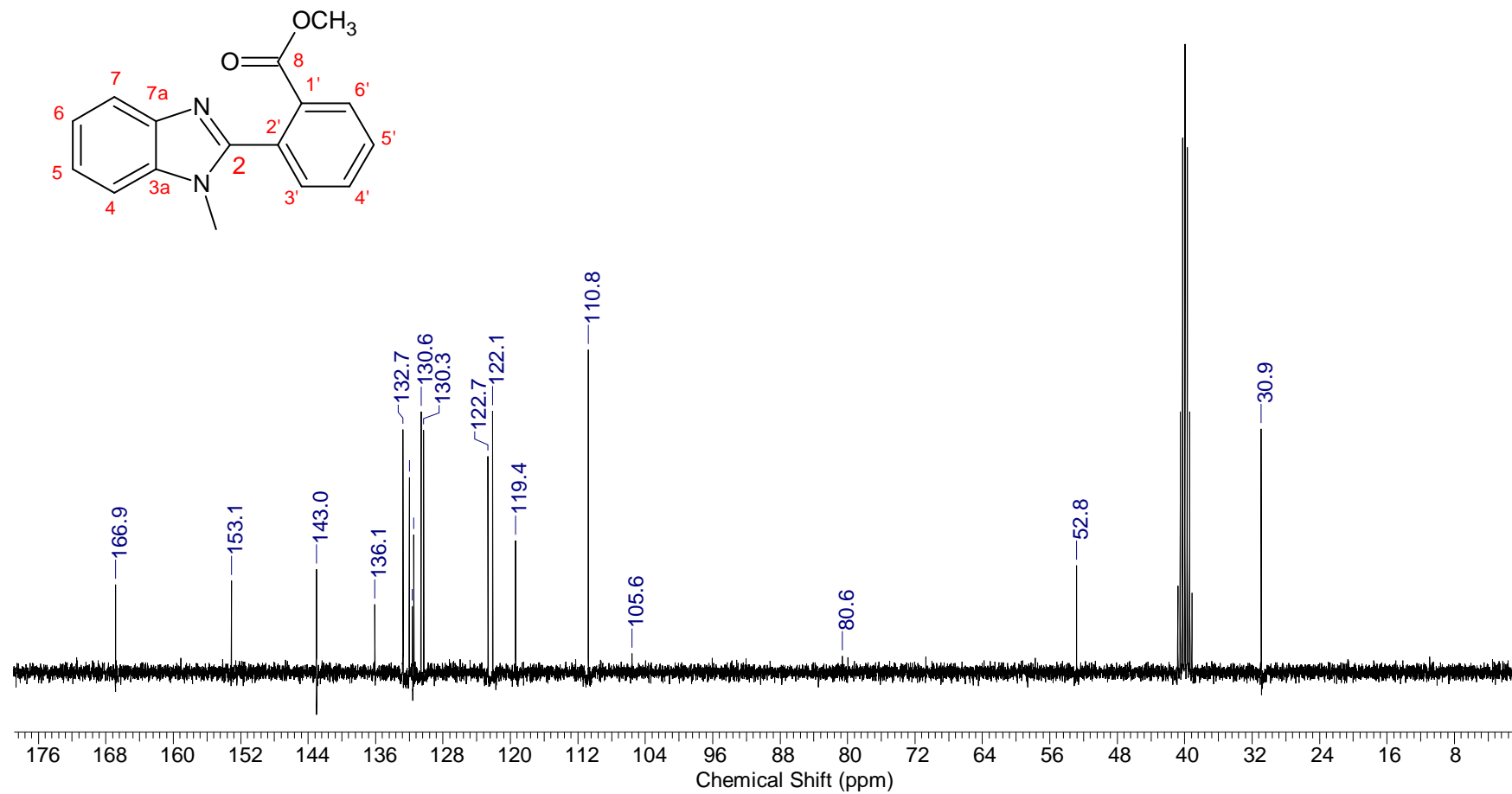


Figura 56-A: Espectro de RMN ^{13}C (75,46MHz, DMSO- d_6) do composto **32**.



éster metil 2-(1,5-dimetil-benzimidazol-2-il)benzoato (33)

Figura 57-A: Espectro de RMN ¹H (300MHz, DMSO-d₆) do composto 33.

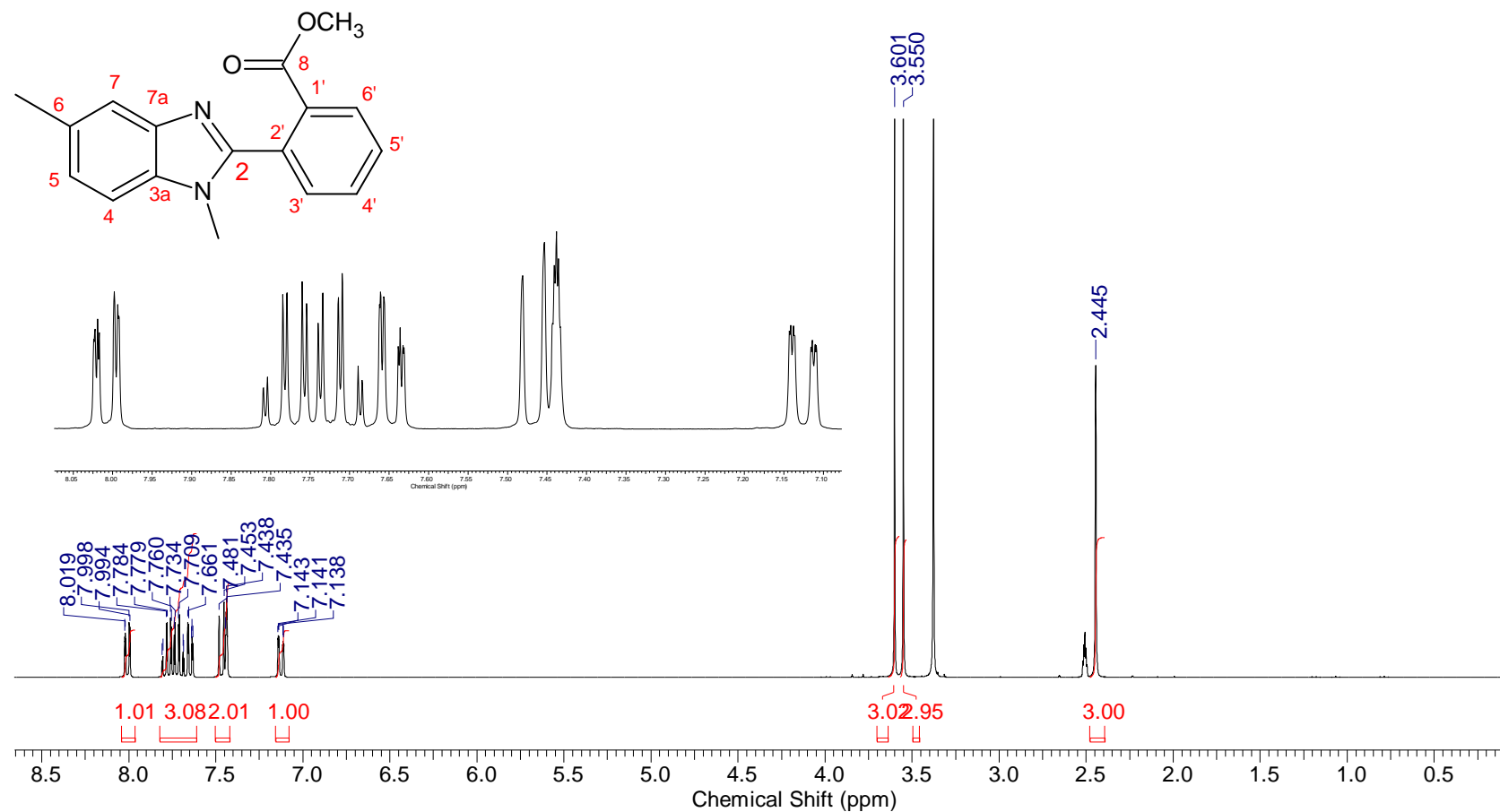
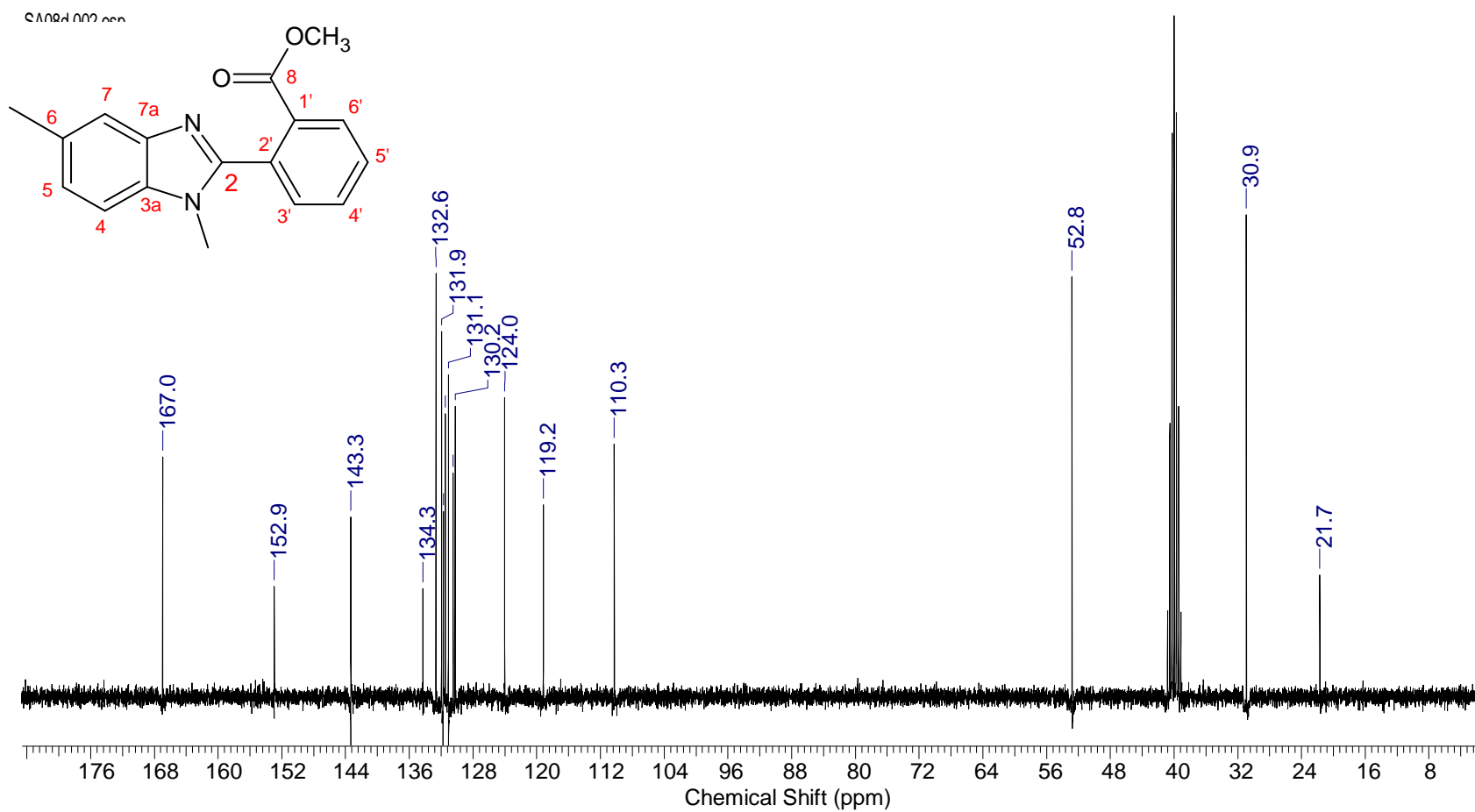


Figura 58-A: Espectro de RMN ^{13}C (75,46MHz, DMSO- d_6) do composto **33**.



2-(1-metil-benzimidazol-2-il)benzoidrazida (34)

Figura 60-A: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) do composto **34**.

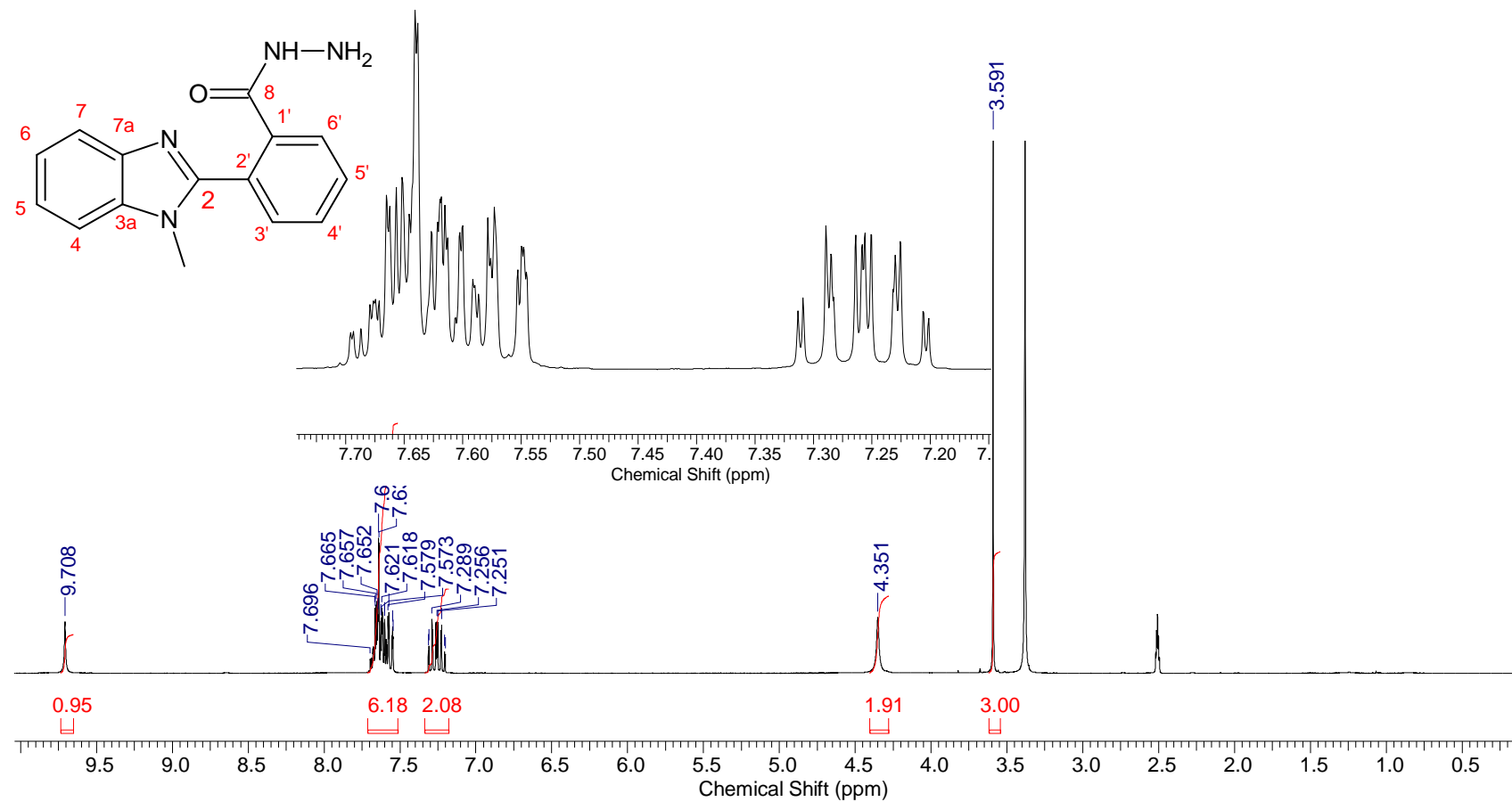
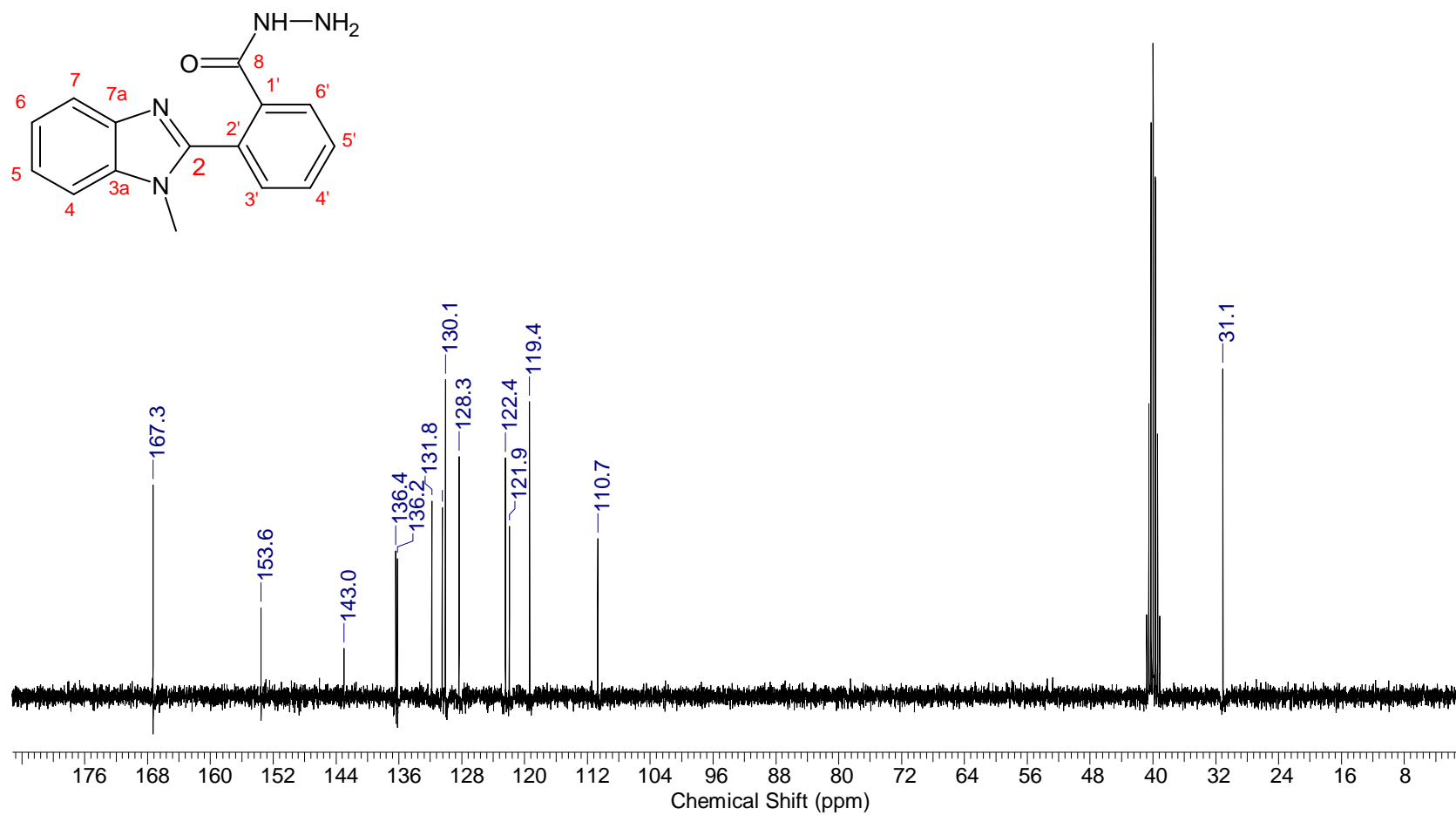


Figura 61-A: Espectro de RMN ^{13}C (75,46MHz, DMSO- d_6) do composto **34**.



2-(1,5-dimetil-benzimidazol-2-il)benzoidrazida (35)

Figura 62-A: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, DMSO-d_6) do composto **35**.

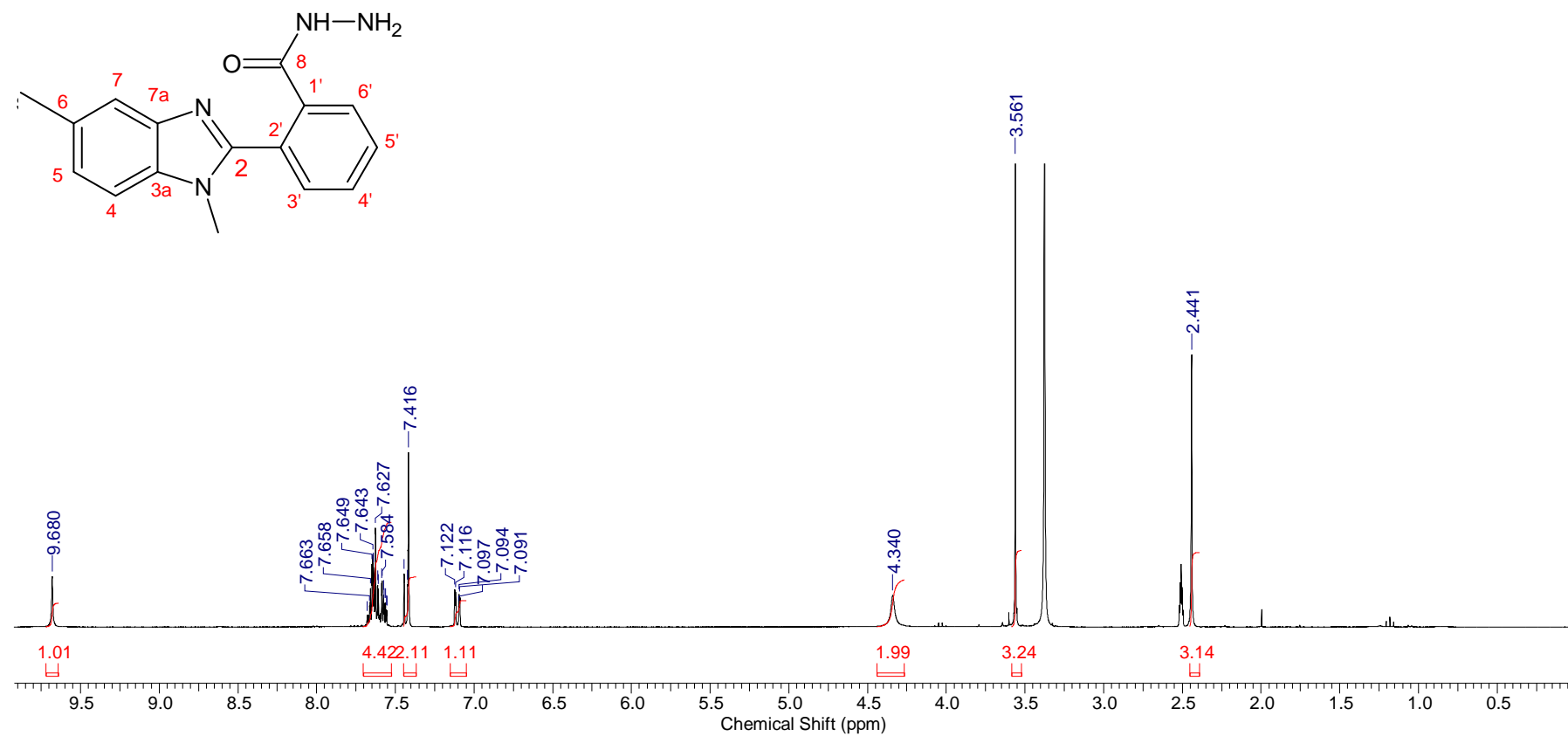
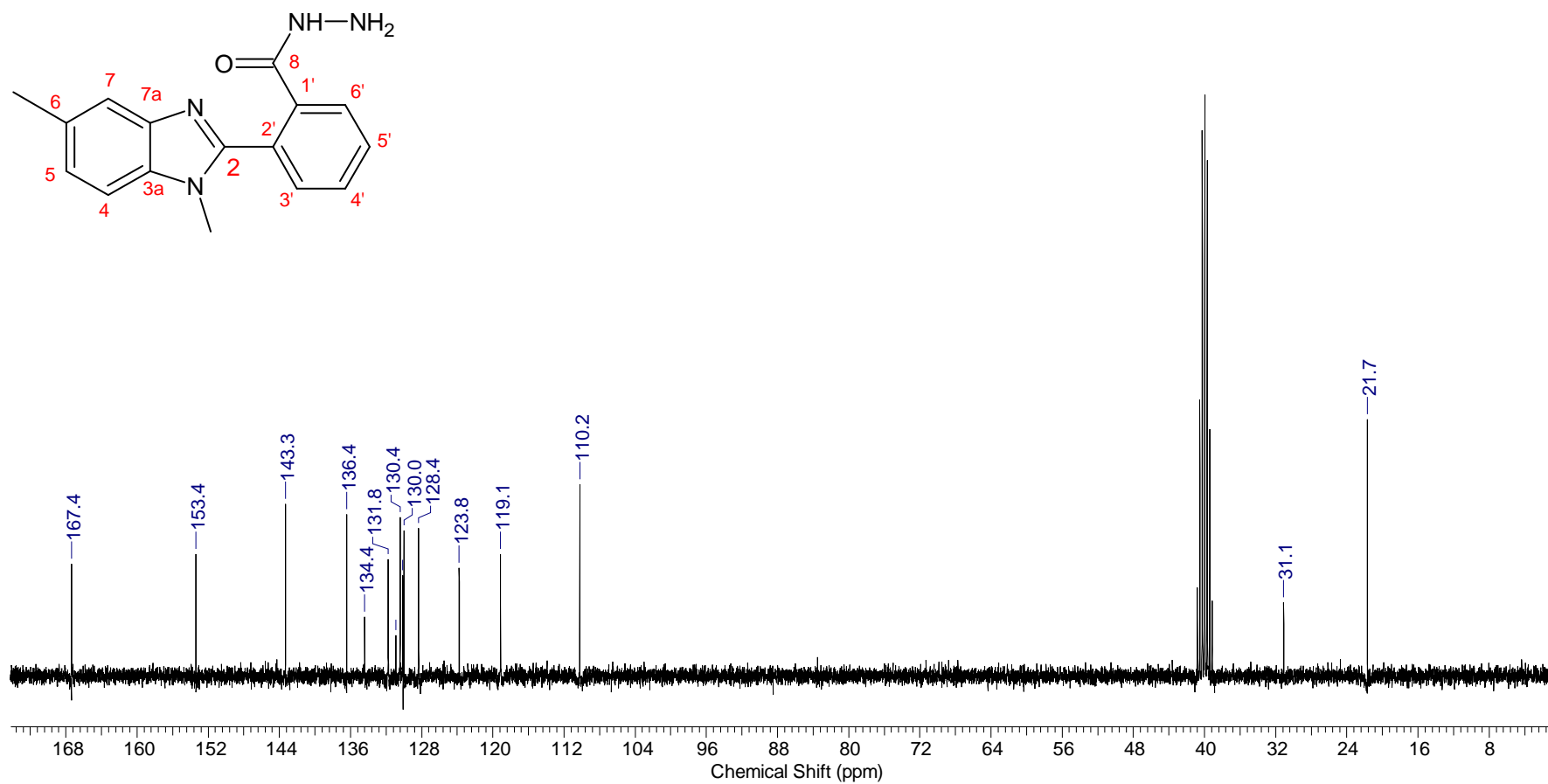


Figura 63-A: Espectro de RMN ^{13}C (75,46MHz, DMSO- d_6) do composto 35.



2-(1-metil-benzimidazol-2-il)-*N*-benziledenobenzoidrazida (36a)

Figura 64-A: Espectro de RMN ¹H (300MHz, DMSO-d₆) do composto 36a.

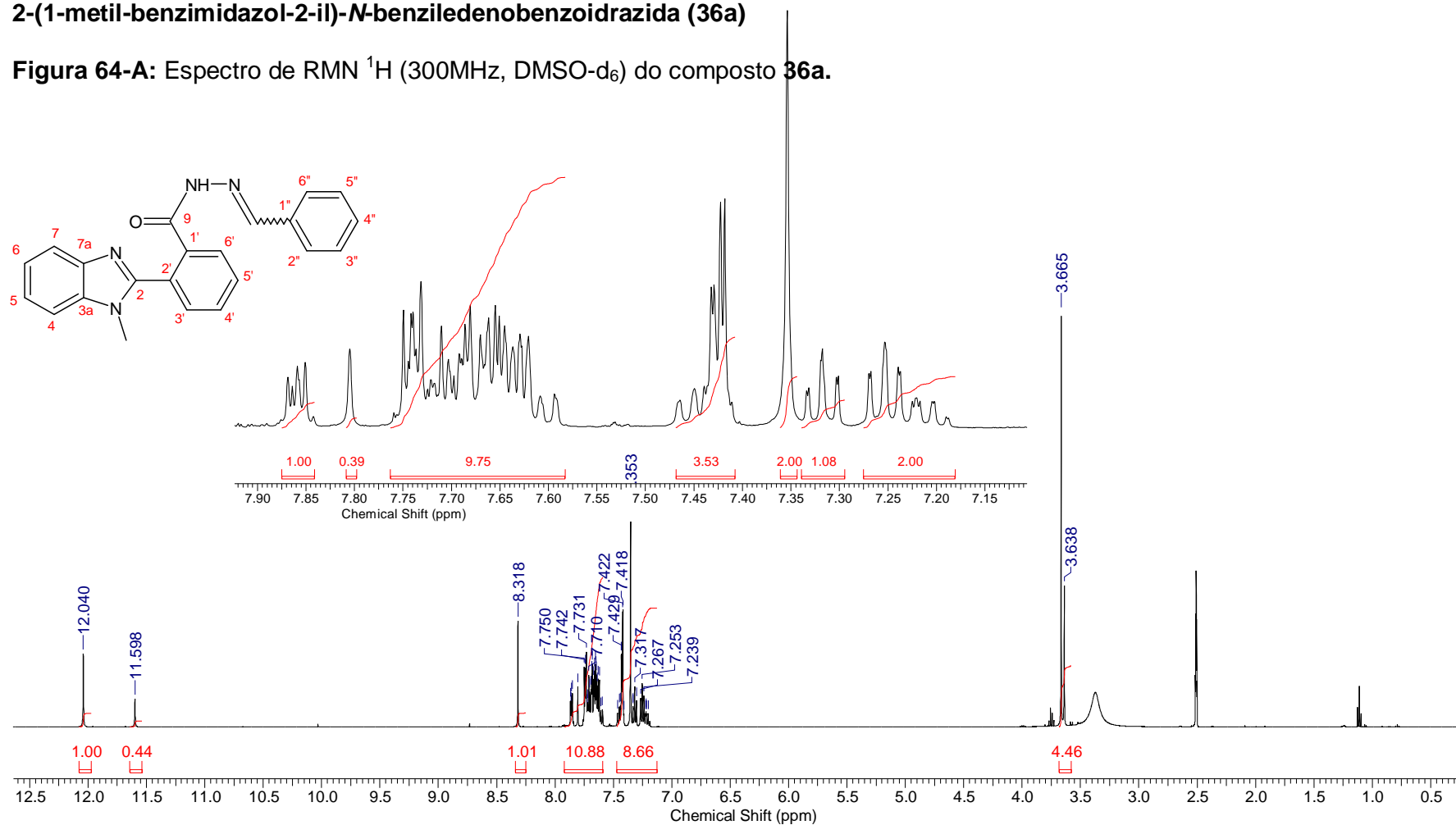
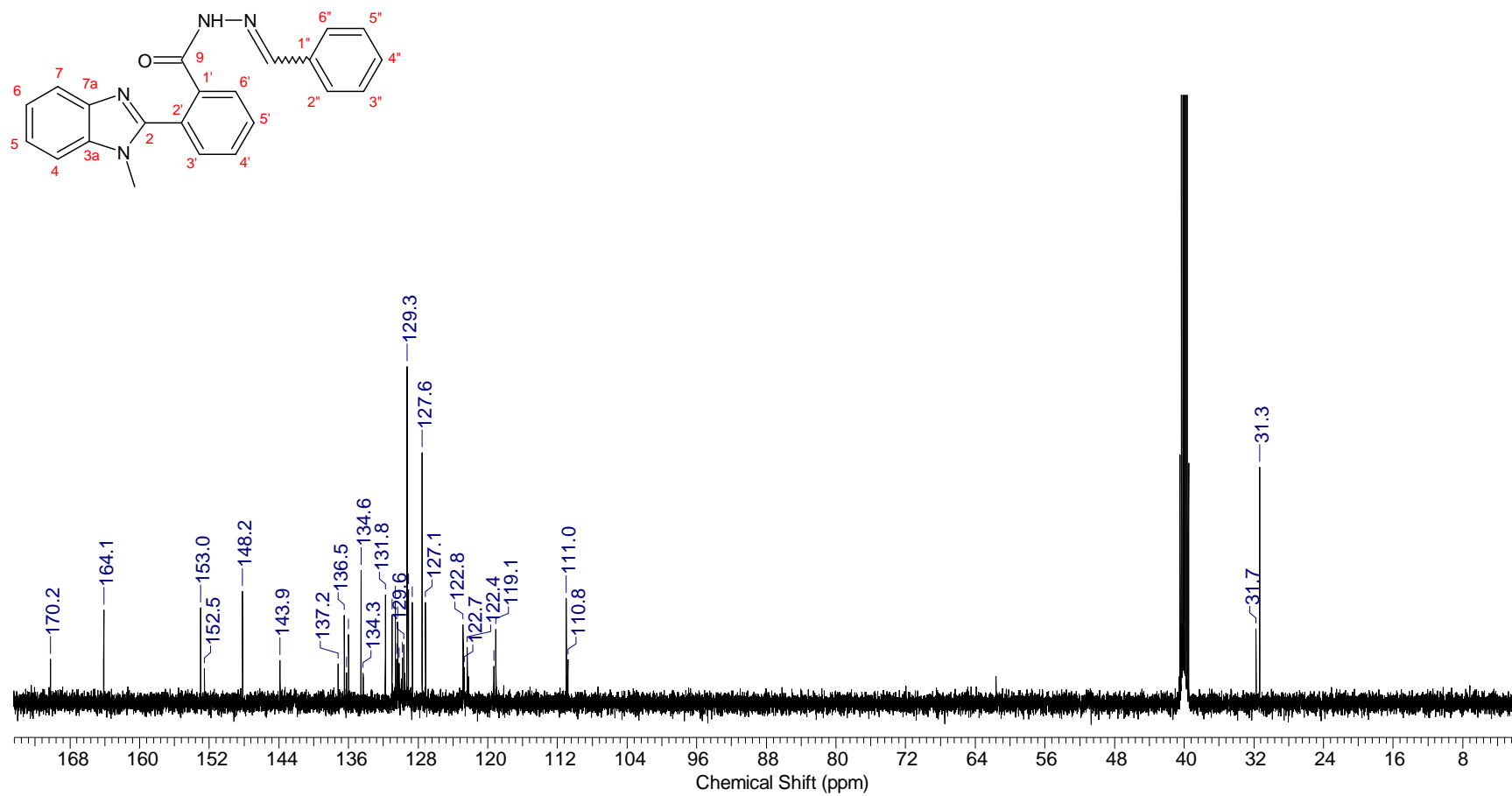


Figura 65-A: Espectro de RMN ^{13}C (75,46MHz, DMSO- d_6) do composto **36a**.



***N*-(4-metóxi-benzilideno)-2-(1-metil-benzimidazol-2-il)benzoidrazida (36b)**

Figura 66-A: Espectro de RMN ^1H (300MHz, DMSO- d_6) do composto **36b**.

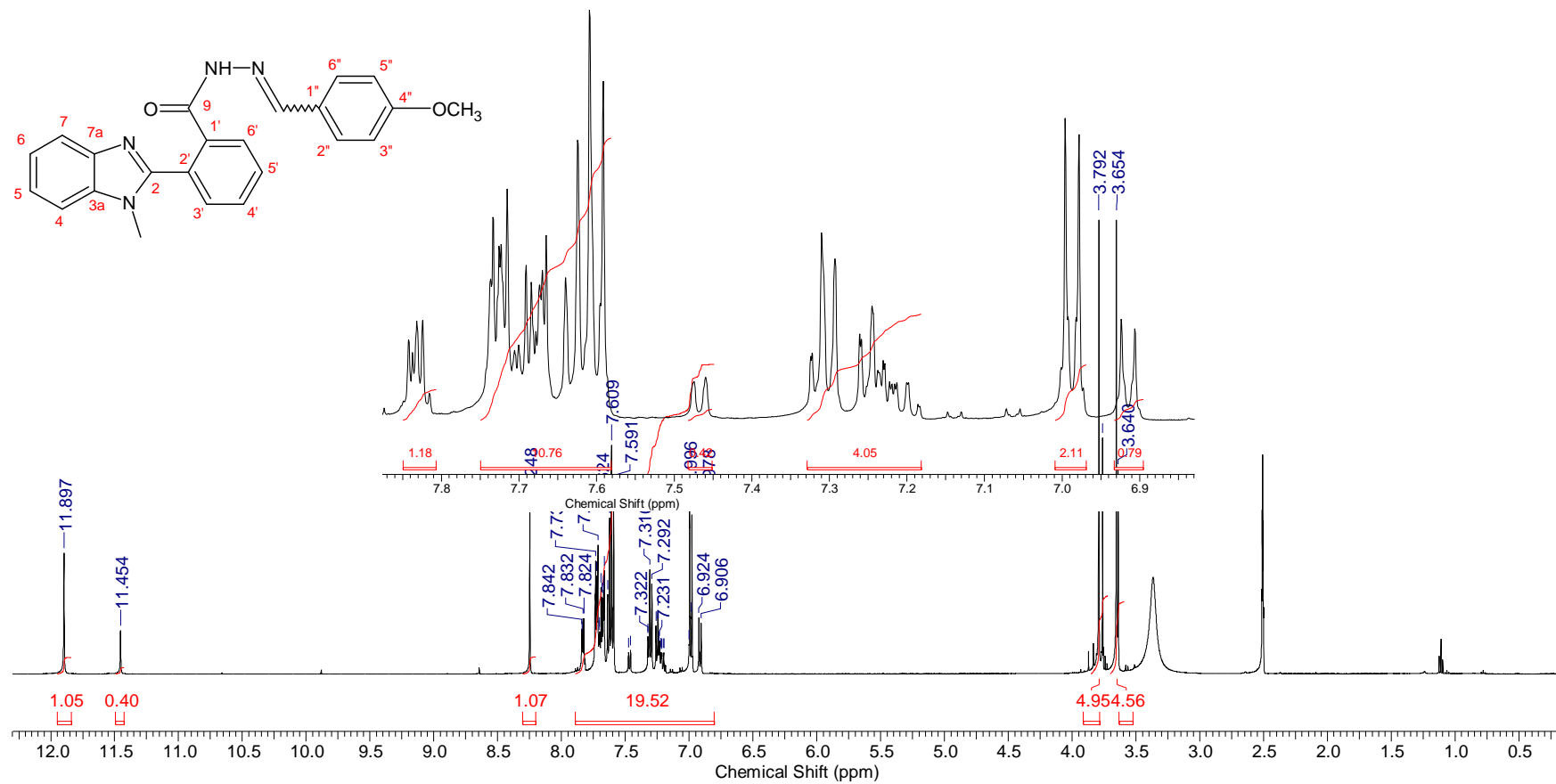
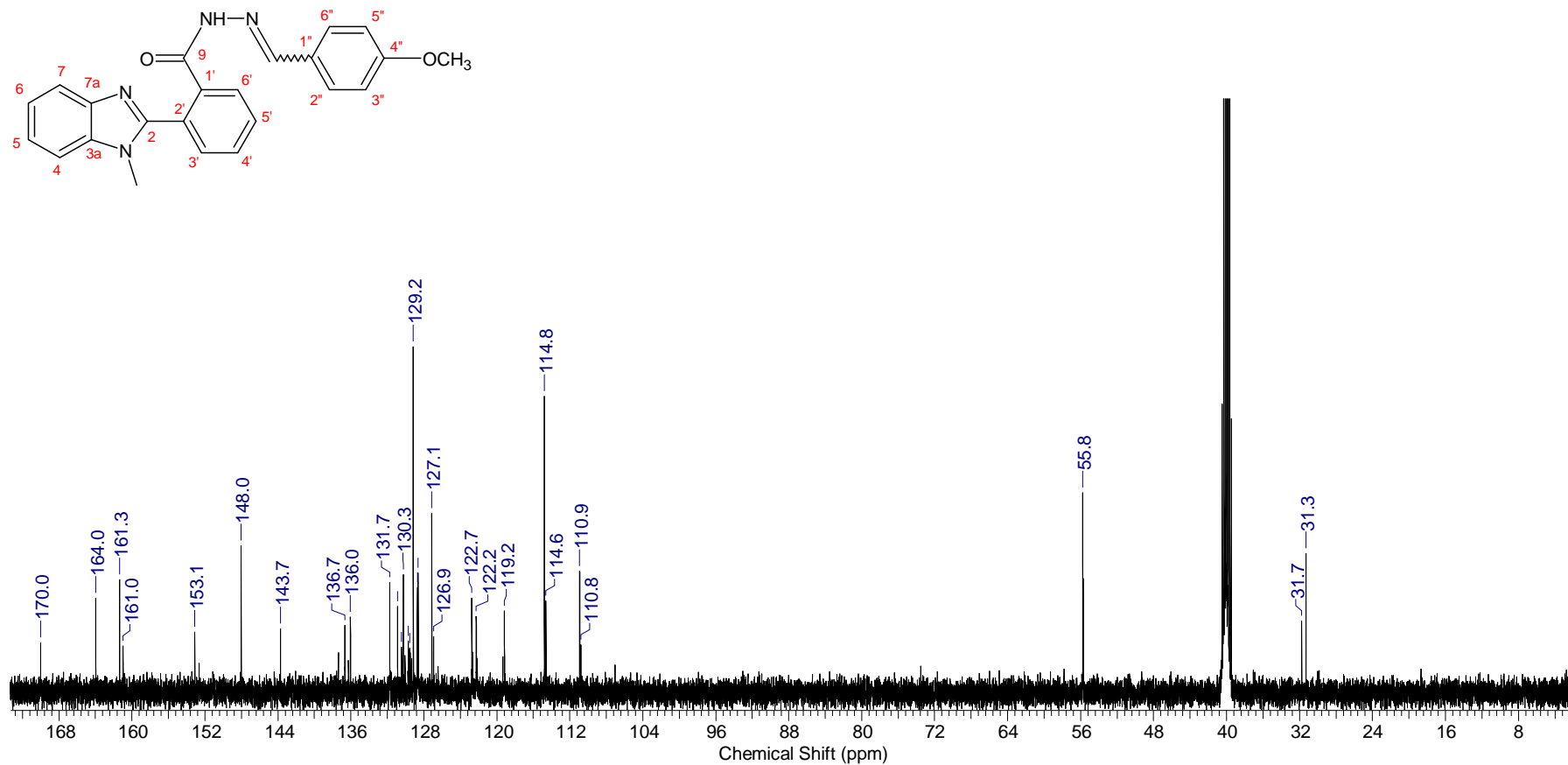
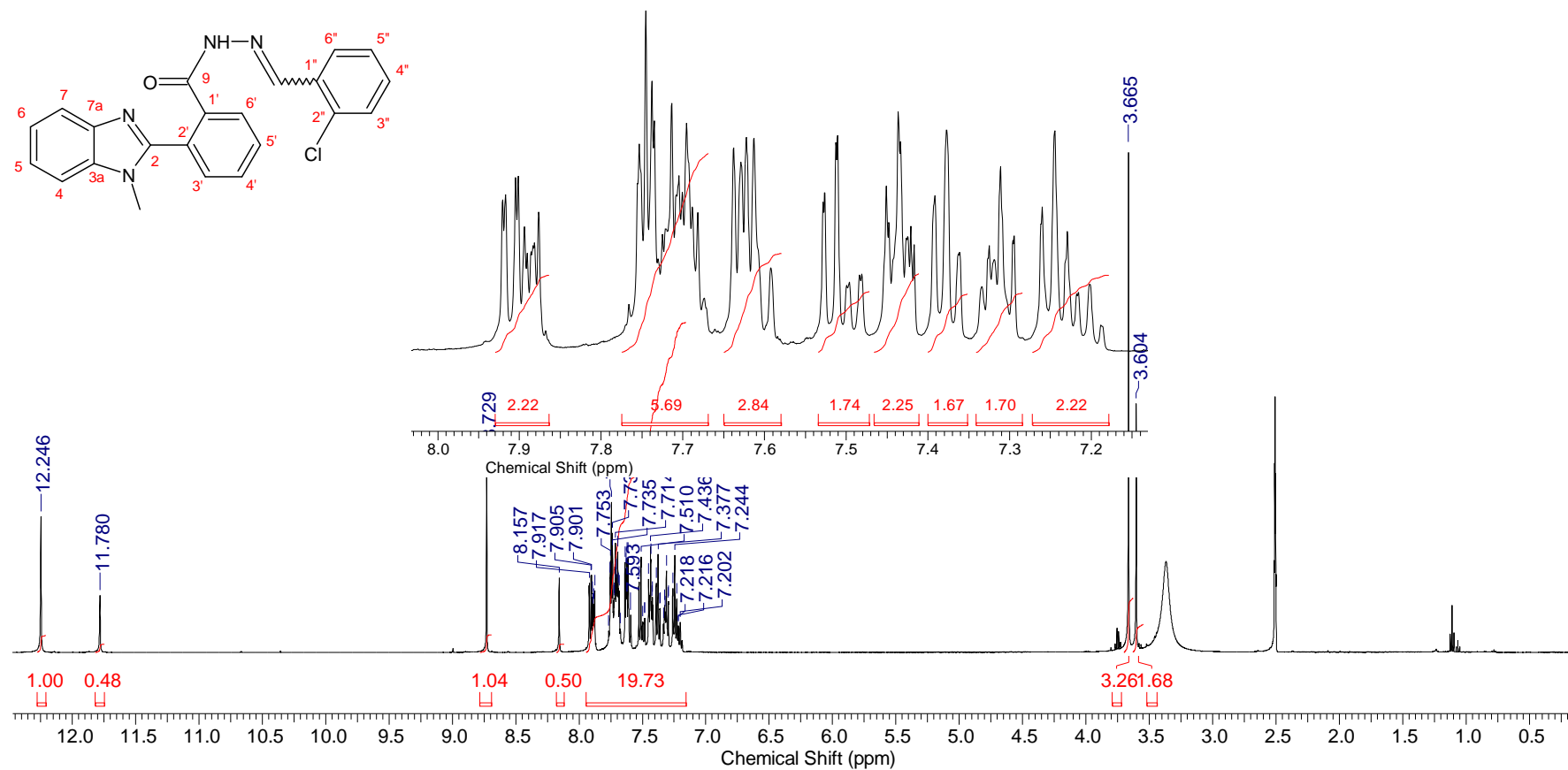


Figura 67-A: Espectro de RMN ^{13}C (75,46MHz, DMSO- d_6) do composto **36b**.



***N*-(2-cloro-benzilideno)-2-(1-metil-benzimidazol-2-il)benzoidrazida (36c)**

Figura 68-A: Espectro de RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) do composto **36c**.



***N*-(4-flúor-benzilideno)-2-(1-metil-benzimidazol-2-il)benzoidrazida (36d)**

Figura 70-A: Espectro de RMN ¹H (300MHz, DMSO-d₆) do composto 36d.

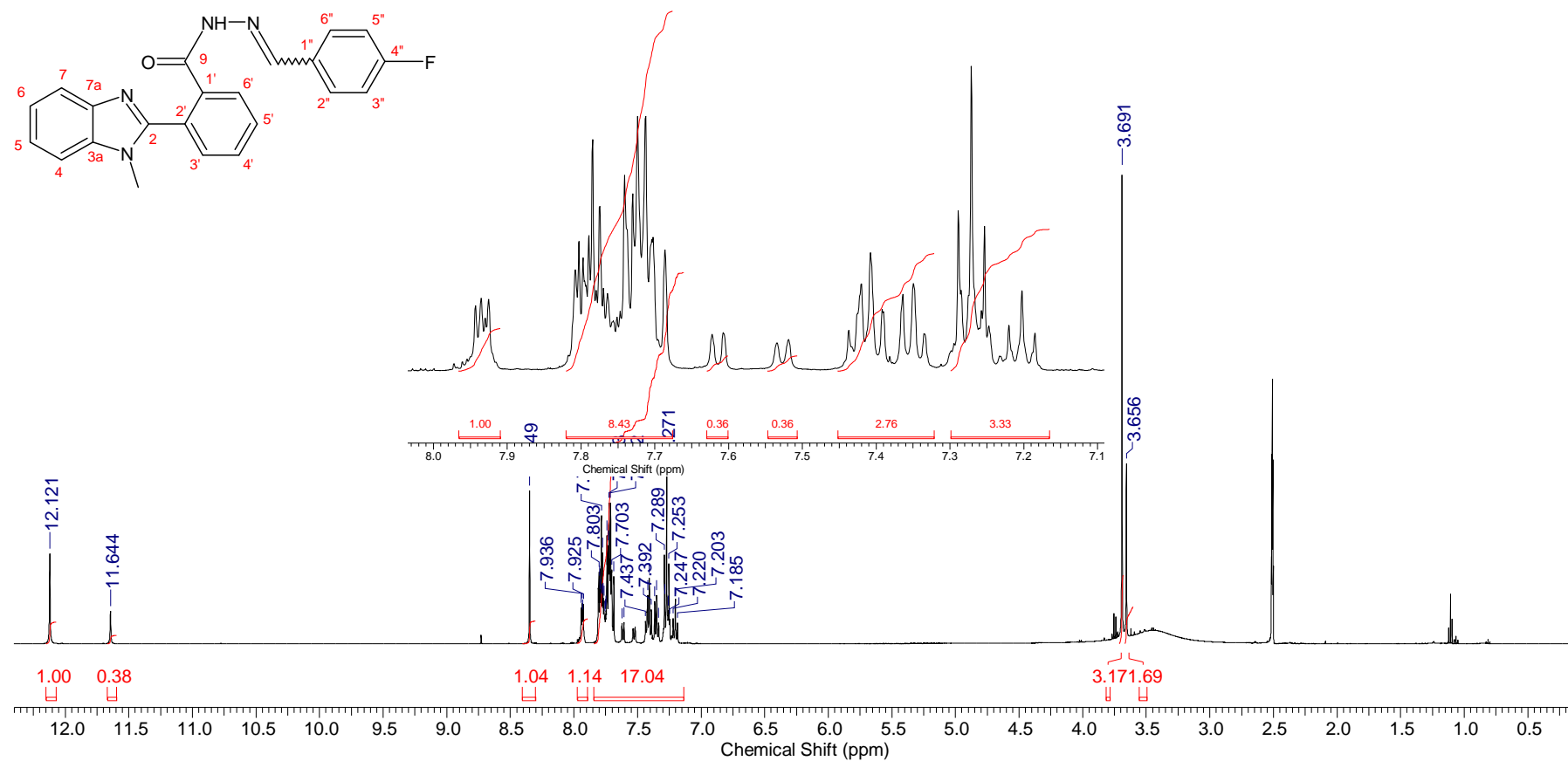
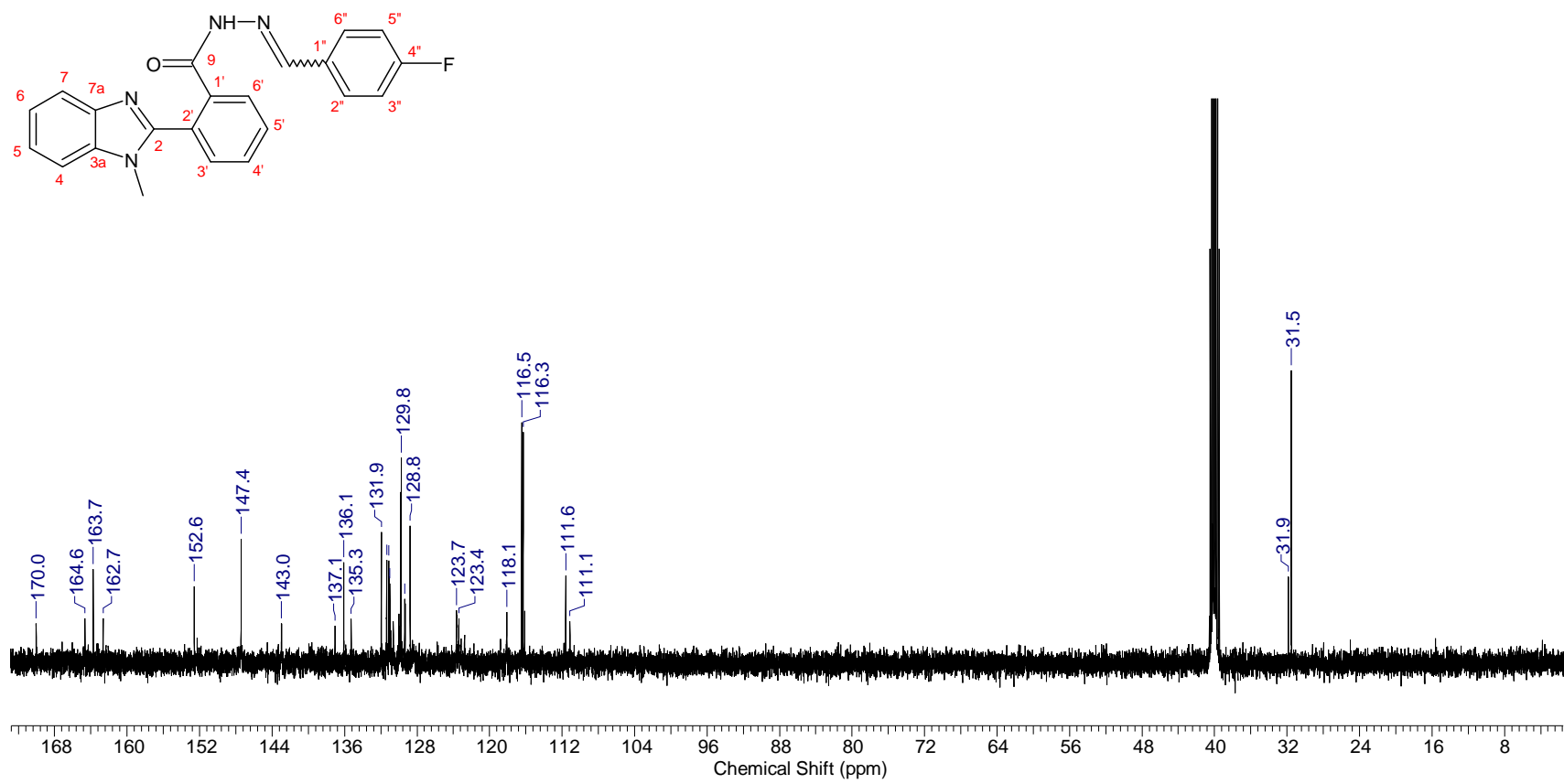


Figura 71-A: Espectro de RMN ^{13}C (75,46MHz, DMSO- d_6) do composto **36d**.



2-(1-metil-benzimidazol-2-il)-N-[(tiofeno-2-il)metileno]benzoidrazida (36e)

Figura 72-A: Espectro de RMN ^1H (300MHz, DMSO- d_6) do composto 36e.

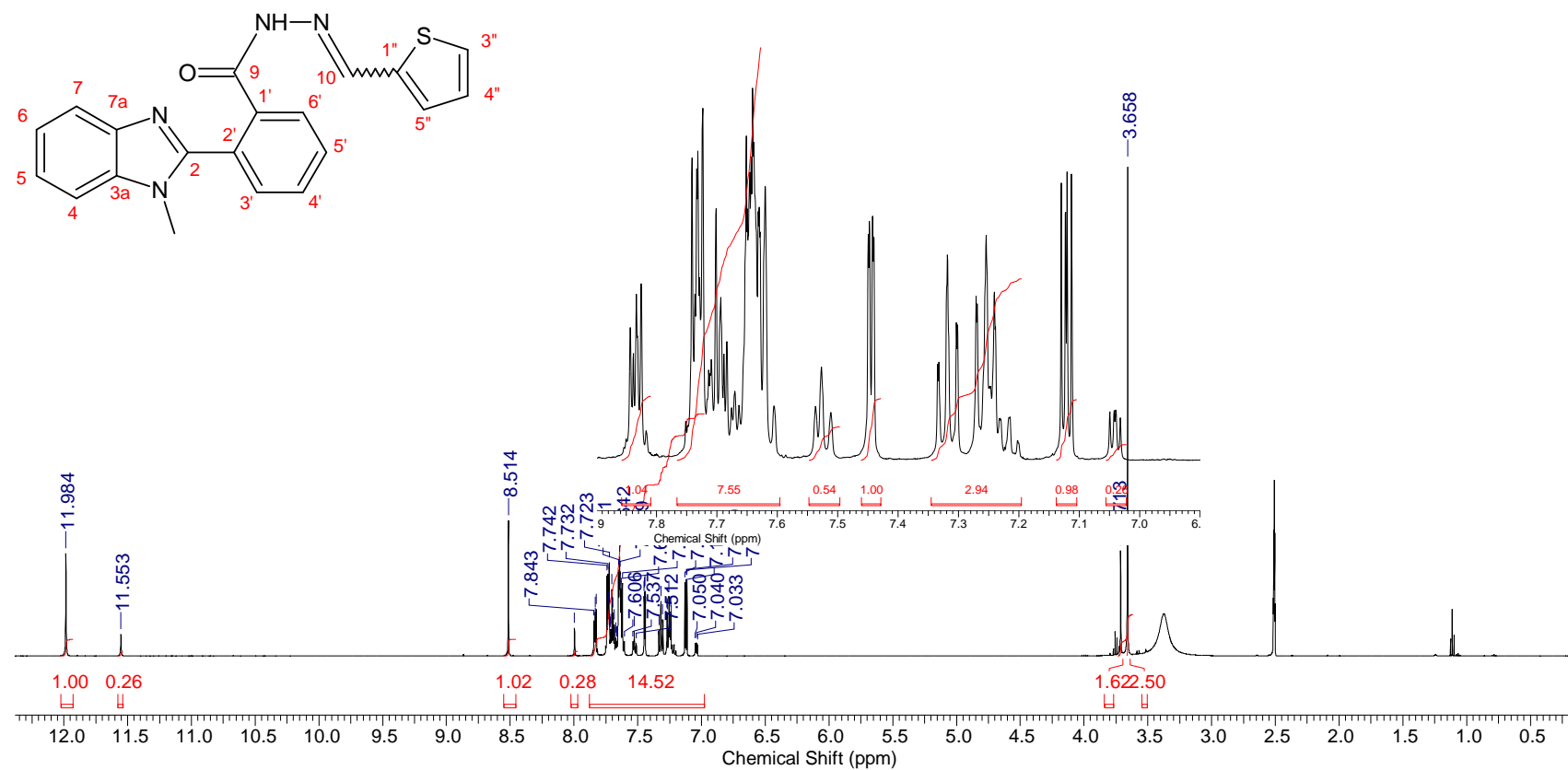
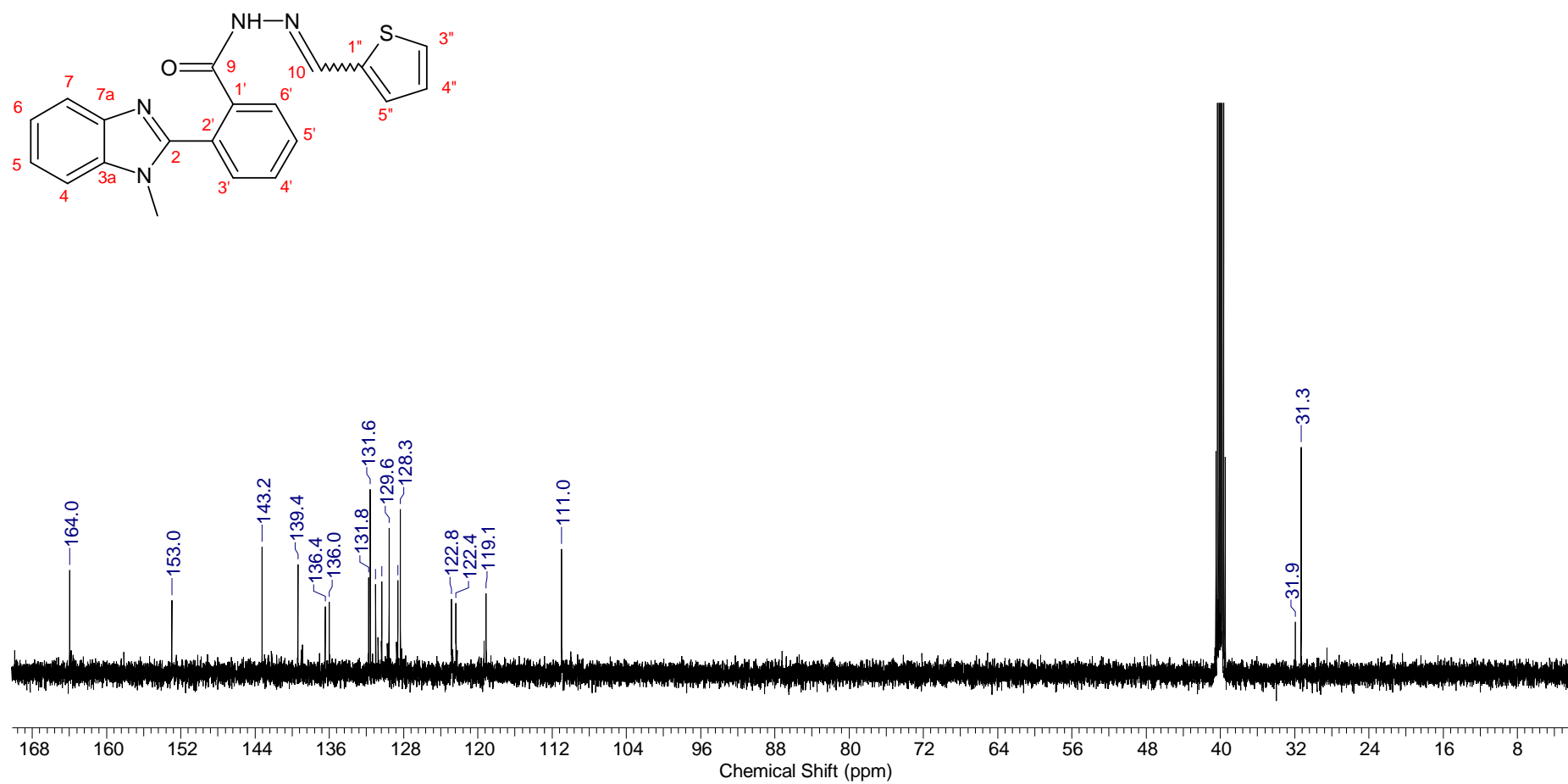


Figura 73-A: Espectro de RMN ^{13}C (75,46MHz, DMSO- d_6) do composto **36e**.



2-(1,5-dimetil-benzimidazol-2-il)-*N*-benziledenobenzoidrazida (37a)

Figura 74-A: Espectro de RMN ^1H (300MHz, DMSO- d_6) do composto 37a.

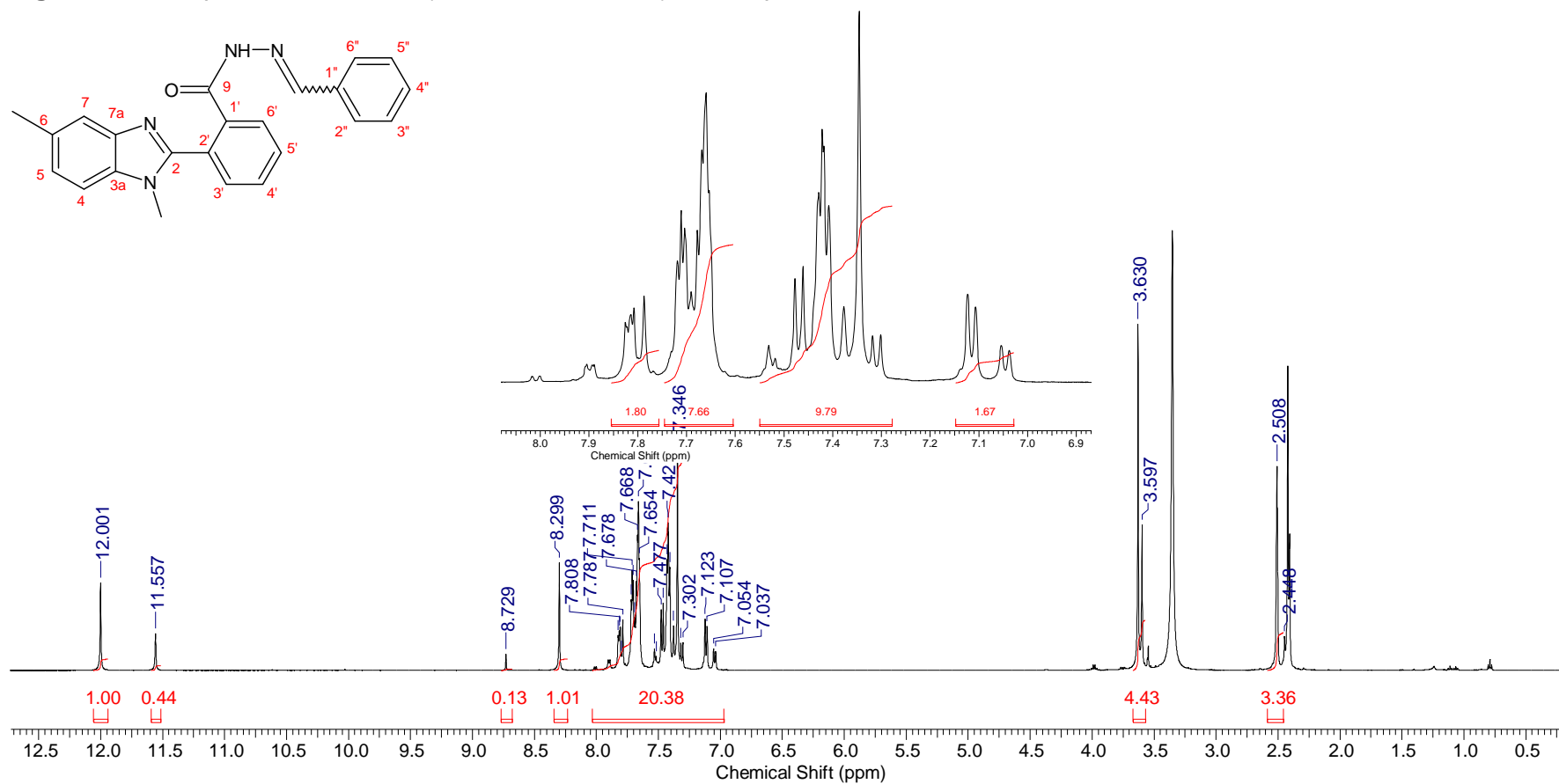
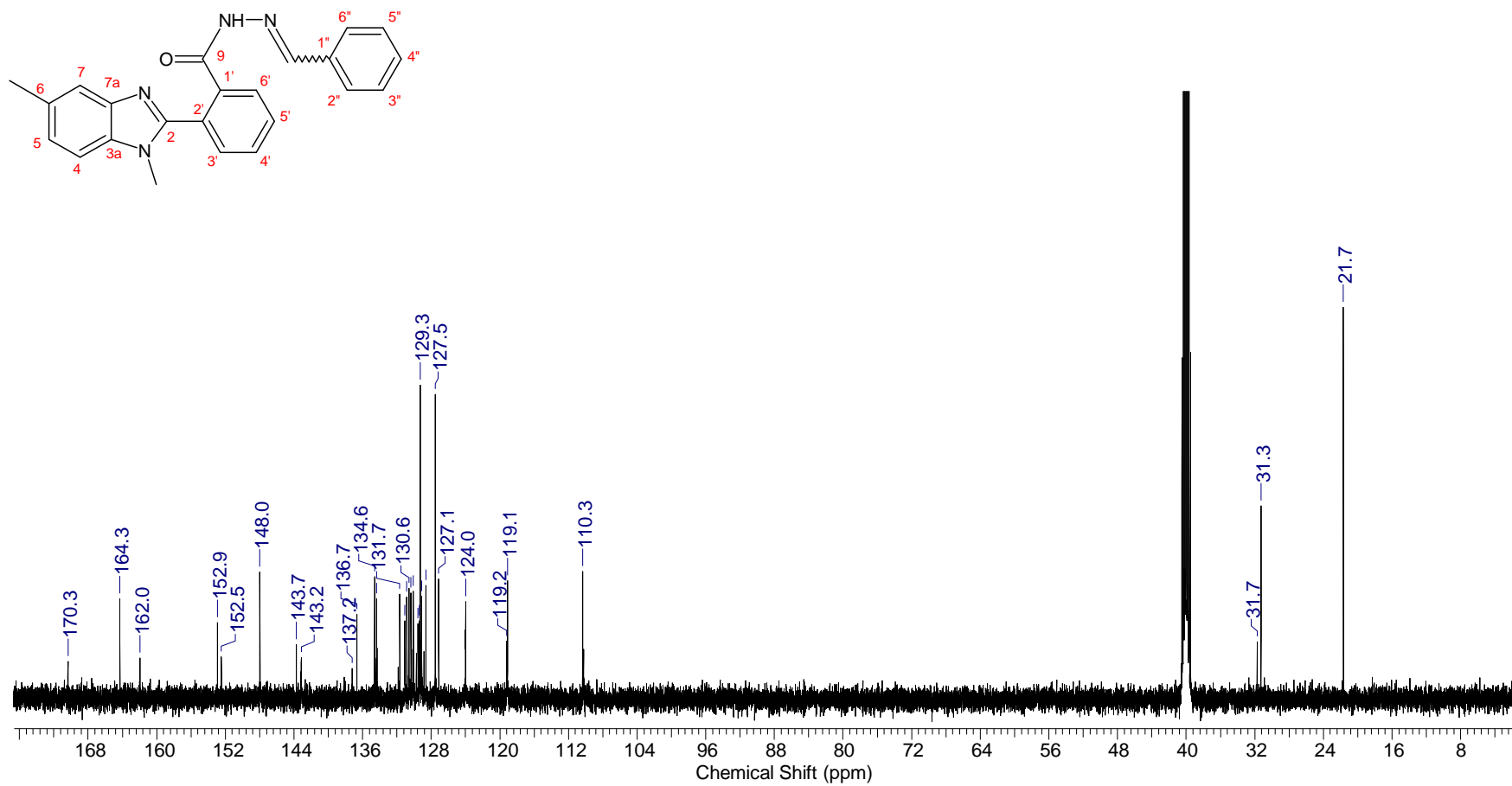


Figura 75-A: Espectro de RMN ^{13}C (75,46MHz, DMSO- d_6) do composto **37a**.



***N*-(2-cloro-benzilideno)-2-(1,5-dimetil-benzimidazol-2-il)benzoidrazida (37c)**

Figura 76-A: Espectro de RMN ¹H (500MHz, DMSO-d₆) do composto **37c**.

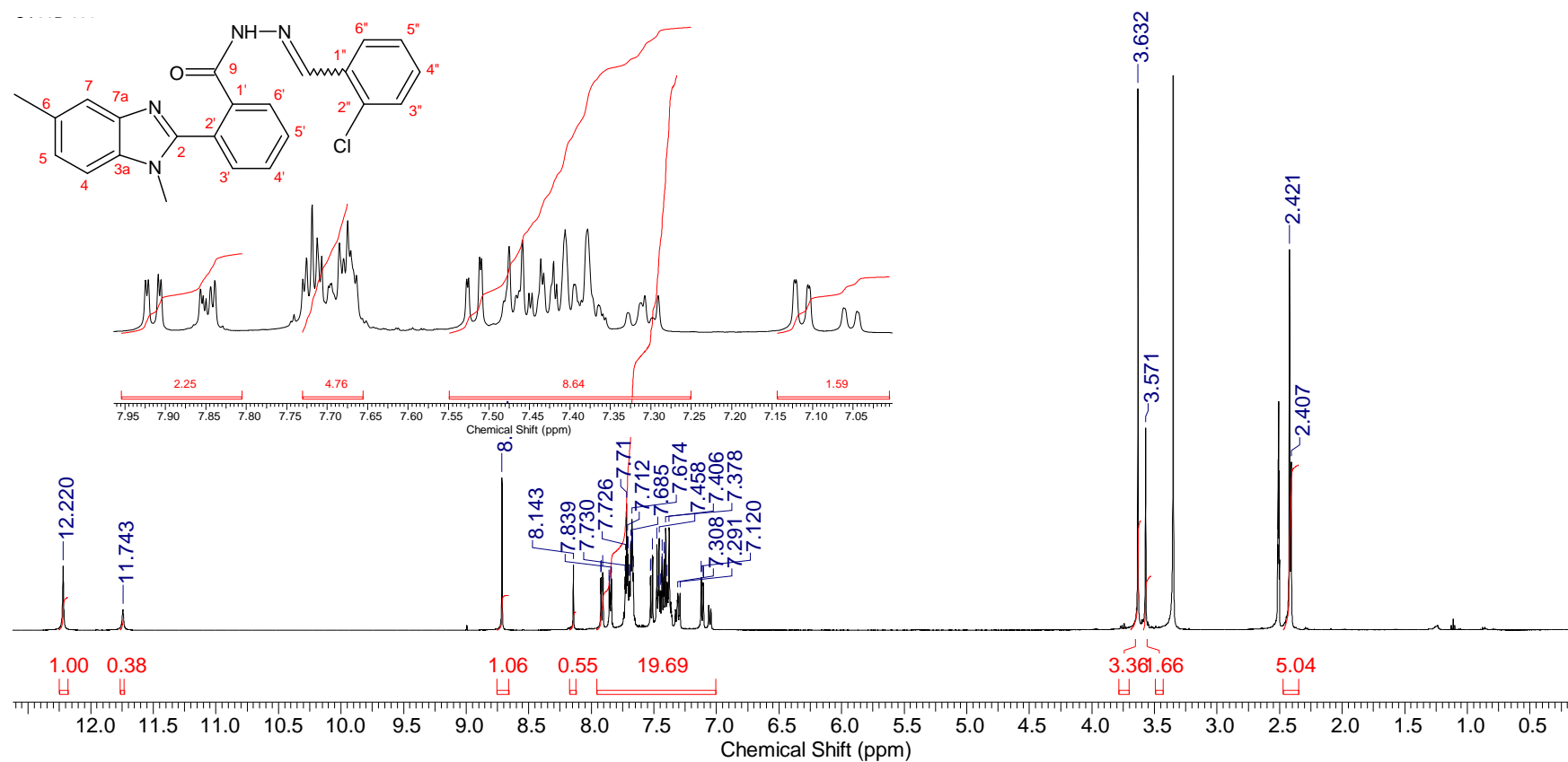
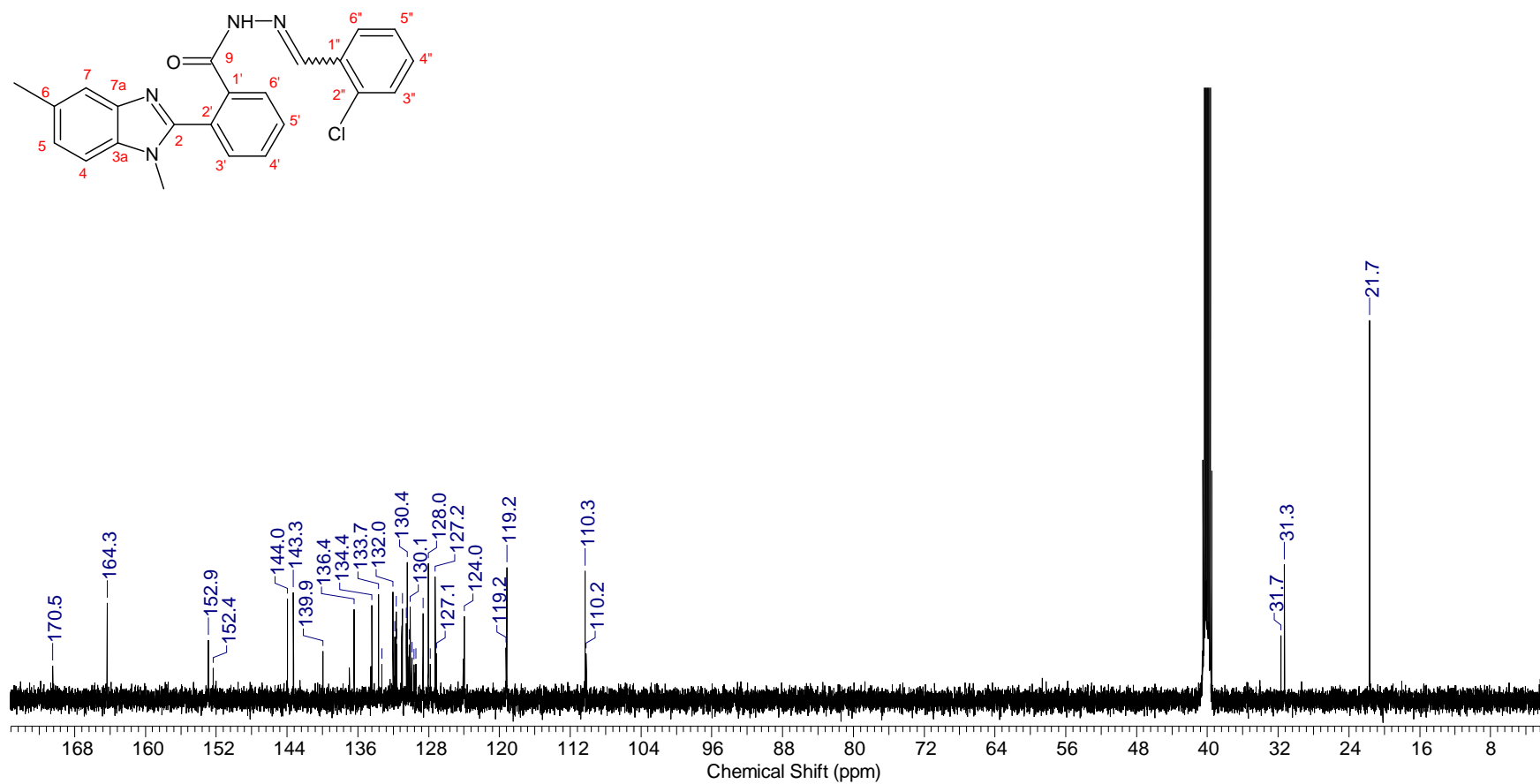


Figura 77-A: Espectro de RMN ^{13}C (125,76MHz, DMSO- d_6) do composto **37c**.



***N*-(4-fluor-benzilideno)-2-(1,5-dimetil-benzimidazol-2-il)benzoidrazida (37d)**

Figura 78-A: Espectro de RMN ¹H (500MHz, DMSO-d₆) do composto **37d**.

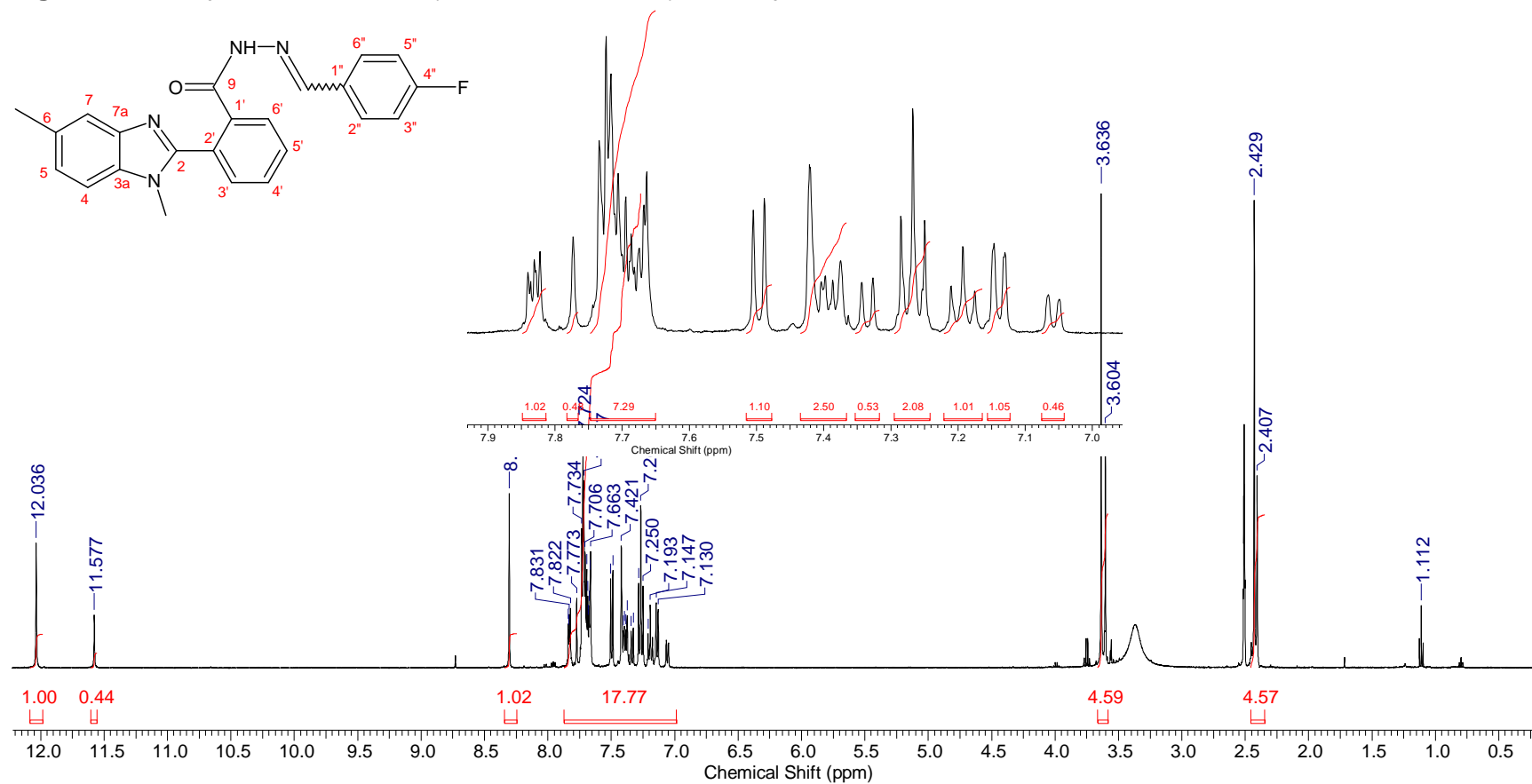
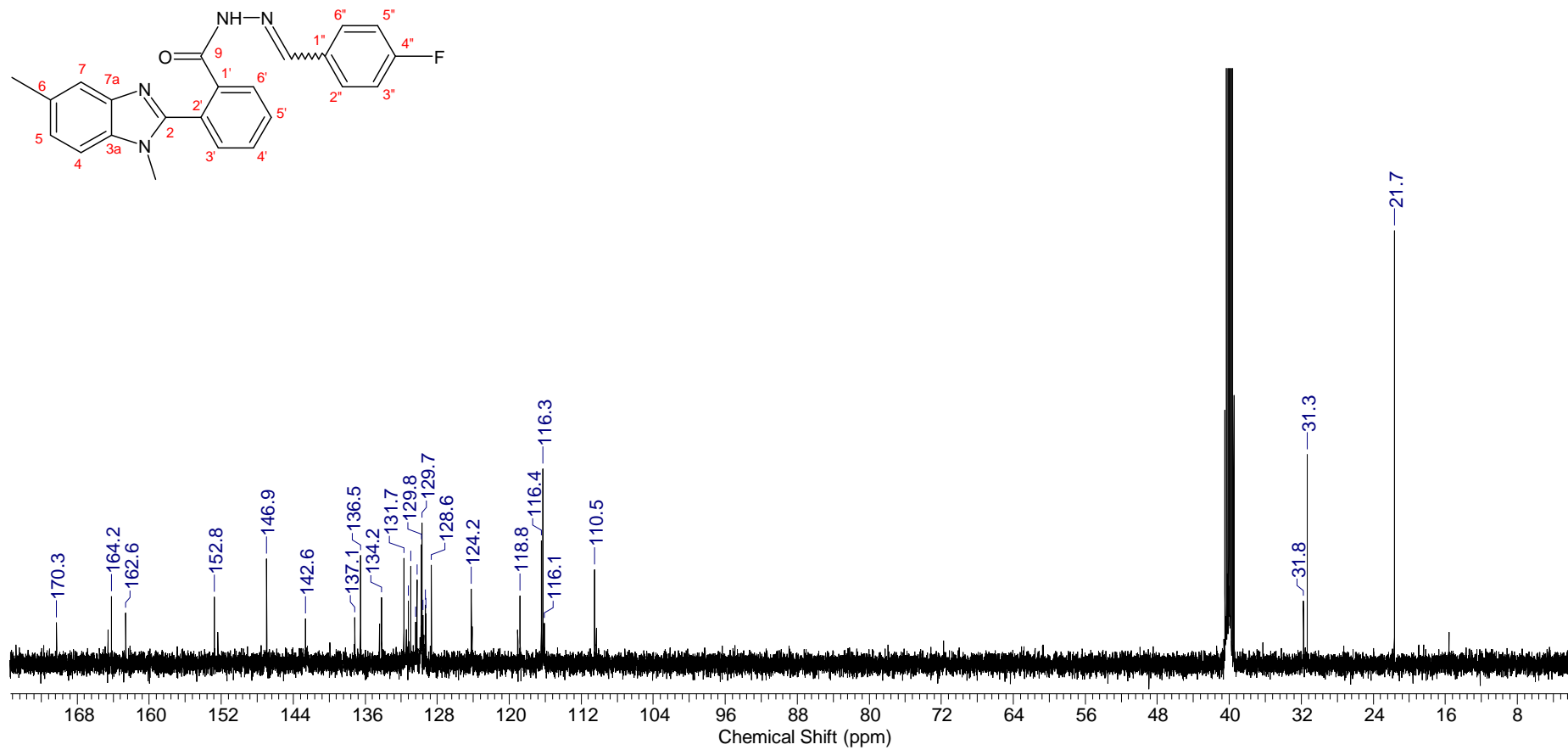


Figura 79-A: Espectro de RMN ^{13}C (125,76MHz, DMSO- d_6) do composto **37d**.



2-(1,5-dimetil-benzimidazol-2-il)-N-[(tiofeno-2-il)metileno]benzoidrazida (37e)

Figura 80-A: Espectro de RMN ^1H (300MHz, DMSO- d_6) do composto 37e.

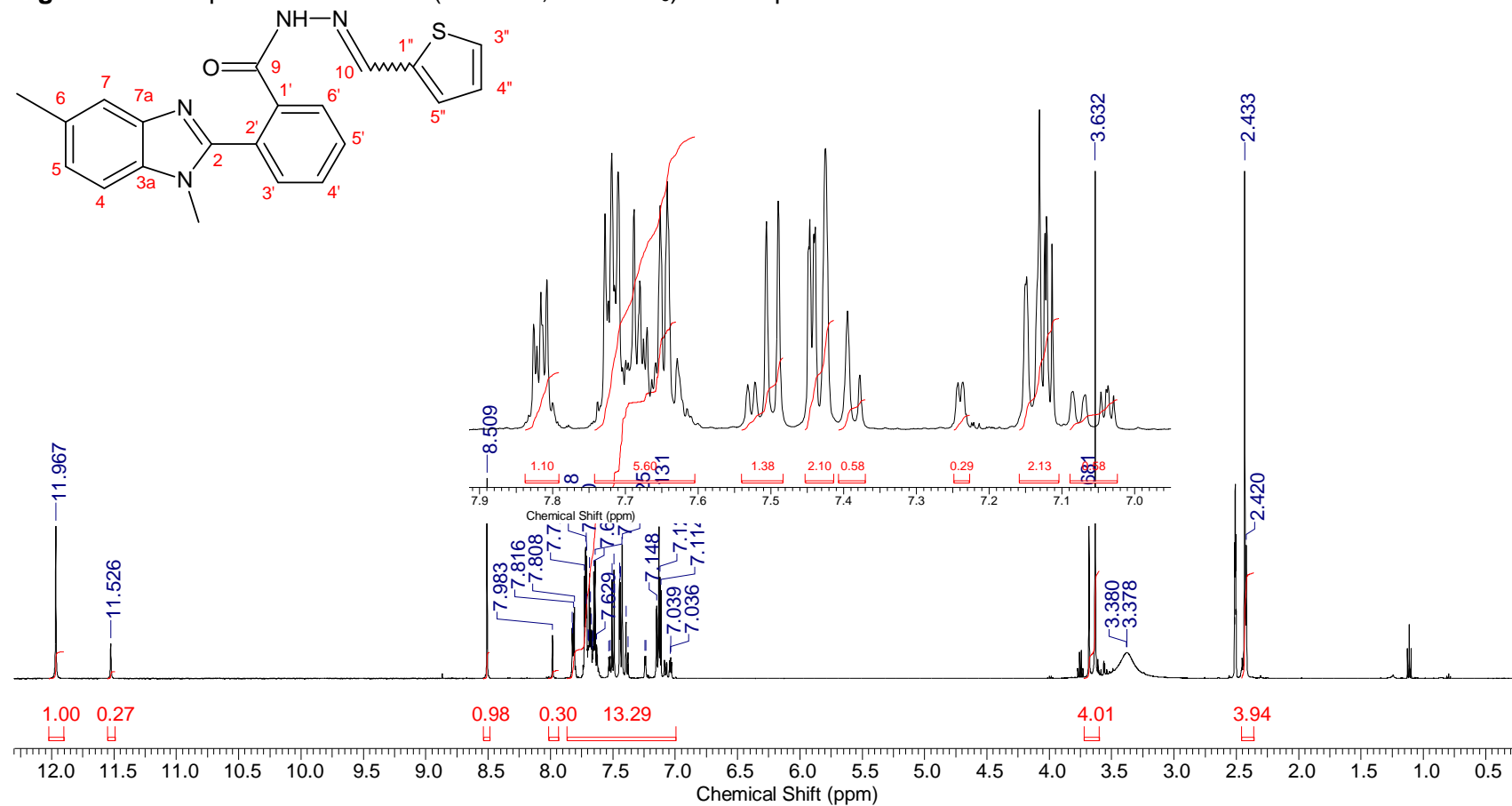


Figura 81-A: Espectro de RMN ^{13}C (75,46MHz, DMSO- d_6) do composto **37e**.

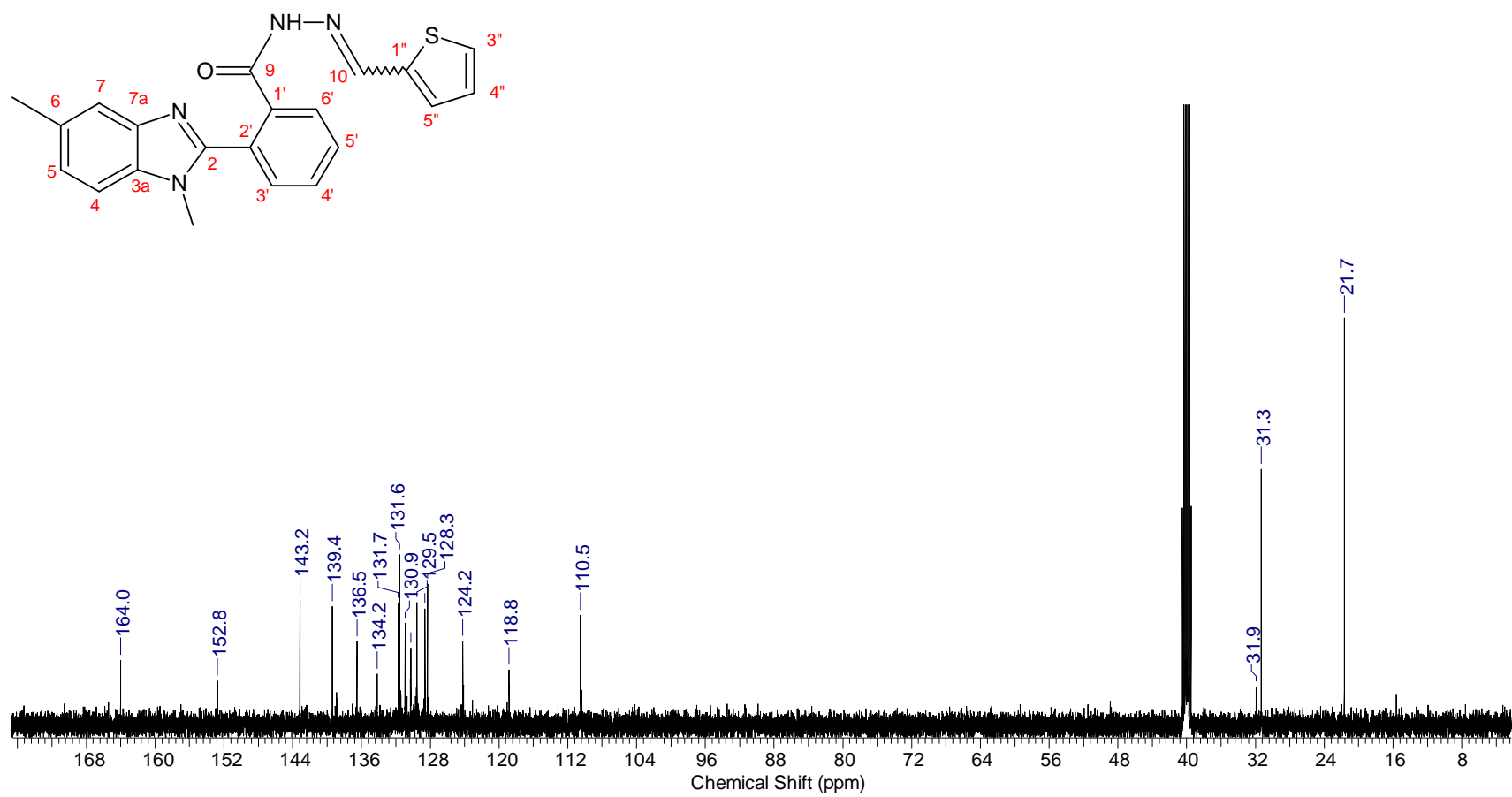


Figura 82-A. **a)** Perfil espectral do composto **8a** (10 μM) com diferentes concentrações de ctDNA (53, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700 e 848 μM , curvas a-l respectivamente); **b)** Gráfico de Stern–Volmer para o composto **8a** (processo de quenching); **c)** Curva logarítmica dupla para cálculo da constante de ligação do composto **8a** com o ctDNA. Condição: pH = 7.2 (Tris–HCl 50 mM e 100 mM NaCl) a 30°C.

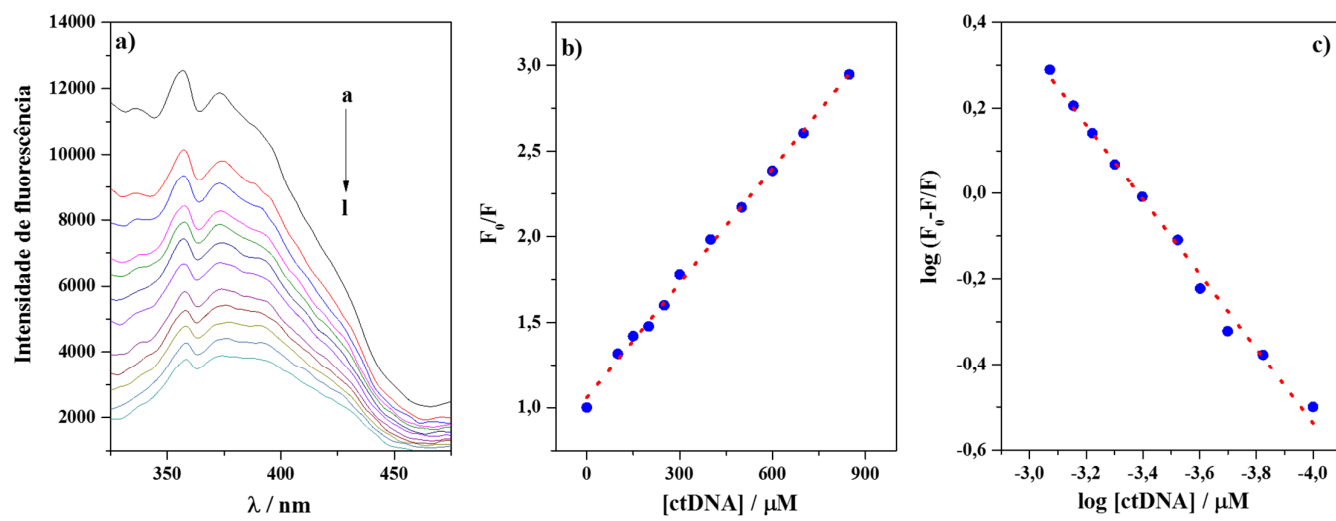


Figura 83-A. Espectro de absorção do composto **8a** (10 μM), ctDNA (40 μM) e **8a**-ctDNA e (SA79-ctDNA) – ctDNA. Condição: pH = 7,2 (Tris-HCl 50 mM com 100 mM NaCl) a 30°C.

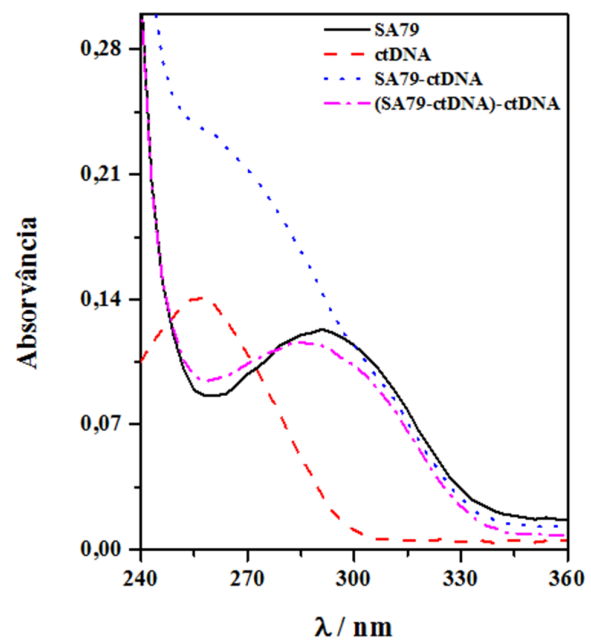


Figura 84-A Decréscimo da intensidade de fluorescência do sistema BE-DNA por competição do composto **8a** (50, 100, 150, 200 e 275 μM , curvas a-e, respectivamente).

