

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos
Programa de Pós-Graduação em Química



Dissertação de Mestrado

5-Amino-7-(trifluorometil)pirazolo[1,5-a]pirimidinas: síntese mediada por líquido iônico, estudo teórico e potencial antiglioma

Cinara Teiroba de Ávila

Pelotas, 2021

Cinara Teiroba de Ávila

5-Amino-7-(trifluorometil)pirazolo[1,5-a]pirimidinas: síntese mediada por líquido iônico, estudo teórico e potencial antiglioma

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química do Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química

Orientador: Prof. Dr. Wilson João Cunico Filho

Coorientador: Prof. Dr. Robson da Silva Oliboni

Pelotas, 2021

Cinara Teiroba de Ávila

5-Amino-7-(trifluorometil)pirazolo[1,5-a]pirimidinas: síntese mediada por líquido iônico, estudo teórico e potencial antiglioma

Dissertação aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Química, Programa de Pós-Graduação em Química, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 03 de setembro de 2021.

Banca examinadora:



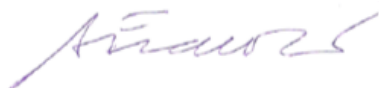
.....
Prof. Dr. Wilson Cunico (Orientador)

Doutor em 2004 pela Universidade Federal de Santa Maria



.....
Prof. Dra. Claudia Regina Brandão Gomes

Doutora em 2003 pela Universidade Federal Fluminense



.....
Prof. Dr. André Francisco Pivato Biajoli

Doutor em 2013 pela Universidade Estadual de Campinas

Dedico este trabalho a meu noivo Lucas, pelo apoio e suporte. E para minhas amigas Caroline e Taís pela sua presença em todos os momentos difíceis, sem apoio delas este projeto de pesquisa teria o seu valor reduzido.

Agradecimentos

Esta dissertação de mestrado não poderia chegar a um bom resultado sem o precioso apoio de várias pessoas. Em primeiro lugar agradeço ao meu orientador o Prof. Dr. Wilson Cunico e coorientador o Prof. Dr. Robson Oliboni, pela disponibilidade e apoio nesses anos de pesquisa e pelas valiosas contribuições dadas durante todo o processo.

Desejo dar agradecimento especial a minha eterna mestre Taís Goulart por realizarmos esse trabalho juntas e estar sempre disposta a ajudar. Um agradecimento especial para minhas ex-colegas e amigas Adriana, Bruna e Melinda Victor pelos conselhos e incentivo. E também a minha IC querida, Larissa Moura, que além de companheira se tornou uma grande amiga.

Agora devo agradecer a minha rede de apoio: desde psicóloga, psiquiatra, grupo diz Aí, até amigos e familiares que deram força emocional durante esse período difícil de pandemia e de mestrado. Minha primeira rede de apoio e porto seguro é meu noivo, agradeço demais pelo total apoio em cada etapa desse processo. Que acima de tudo é um grande amigo, sempre presente nos momentos difíceis com uma palavra de incentivo ou um chocolate.

Em sequência agradeço a minha família, por todo amor e paciência, e por acreditarem no meu potencial e que eu seria capaz de superar os obstáculos que a vida me apresentou.

Finalmente, agradecimento muito especial para todos meus amigos, principalmente, para Caroline Moraes. Ela foi a amiga que me apoiou esse dois anos desafiadores e me acolheu me mostrando como é bom viver. Agradeço também aos meus grandes amigos Luciano, Vitória, Tamara, Sara, Gabi, Vitor, Nara que estão no meu coração.

Agradeço a central analítica e pessoal do grupo Lasol pelas análises de massas e ressonância magnética nuclear. Agradeço ao Programa de pós-graduação em Química e a Universidade Federal de Pelotas, pela estrutura e todos os conhecimentos adquiridos. E por fim agradeço aos órgãos de fomento FAPERGS, CAPES e CNPQ pelo auxílio financeiro.

Resumo

AVILA, Cinara Teiroba de. **5-Amino-7-(trifluorometil)pirazolo[1,5-a]pirimidinas: síntese mediada por líquido iônico, estudo teórico e potencial antiglioma** 2021. **96f.** Dissertação (Mestrado em Química) - Programa de Pós-Graduação em Química, Centro de Ciências Químicas Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2021.

Este trabalho descreve a síntese, o estudo teórico, a atividade antiglioma e citotoxicidade *in vitro* de uma série de pirazolo[1,5-a]pirimidinas a partir de três etapas de reação. A primeira etapa de reação foi do composto 1,1,1-trifluoro-4,4-dietoxi-3-buten-2-ona através da reação com trietil ortoacetato, anidrido trifluoroacético, piridina como base e em solvente clorofórmio. A segunda etapa de reação foi através do composto anterior com aminas substituídas para obter as β -enaminonas (4-amino-4-etoxi-1,1,1-trifluorobut-3-en-2-onas), precursores para a síntese do heterociclo fundido. A terceira etapa de reação consiste na obtenção das pirazolo[1,5-a]pirimidinas a partir da síntese utilizando as β -enaminonas com o 3-amino-5metilpirazol em líquido iônico [BMIM][PF₆] obtendo nove compostos inéditos na literatura com bons rendimentos (42-86%). As análises de cromatografia acoplada a espectrometria de massas (CG/EM) e ressonância magnética nuclear (RMN) de ¹H, ¹³C, ¹⁵N e bidimensionais (COSY, HMBC e HMQC) comprovam a formação dos produtos esperados. O estudo teórico teve como objetivo de propor um mecanismo usando líquido iônico atuando como mediador gera um complexo com as β -enaminonas e favorece a reação de formação das pirazolo[1,5-a]pirimidinas. A reação de isomerização de β -enaminona e a identificação do enaminoester foi a partir RMN de ¹H e ¹³C e bidimensionais (COSY, HMQC, HMBC). A proposta de mecanismo foi estudada a partir de ensaios computacionais. O estudo antiglioma demonstrou que quatro pirazolo[1,5-a]pirimidinas tiveram ação na concentração de 100 μ M. O composto 2-metil-5-fenilamino-7-(trifluorometil)pirazolo[1,5-b]pirimidina reduziu a linhagem celular de glioblastoma em 20% numa concentração 25 μ M. O estudo de citotoxicidade em astrócitos constata que as quatro pirazolo[1,5-a]pirimidinas não são citotóxicos para células centrais nervosas saudáveis.

Palavras-chave: pirazol, pirimidina, antiglioma, citotoxicidade

Abstract

AVILA, Cinara Teiroba de. **5-Amino-7-(trifluoromethyl) pyrazolo[1,5-a]pyrimidines: ionic liquid-mediated synthesis, theoretical study and antiglioma potential** 2021. 96f. Dissertation (Master Chemical) – Centro de Ciência Química, Farmacêutica e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2021.

This work described the synthesis, theoretical study, *in vitro* antiglioma activity and cytotoxicity of a series pyrazolo[1,5-a]pyrimidines from three reaction steps. The first reaction step was the compound 1,1,1-trifluoro-4,4-diethoxy-3-buten-2-one by reaction with triethyl orthoacetate, trifluoroacetic anhydride, pyridine as base and in chloroform solvent. The second reaction step was through the above compound with substituted amines to obtain the β -enaminones (4-amino-4-ethoxy-1,1,1-trifluorobut-3-en-2-ones), precursors for the synthesis of the fused heterocycle. The third reaction step consists in obtaining the pyrazolo[1,5-a]pyrimidines from the synthesis using the β -enaminones with the 3-amino-5methylpyrazole in ionic liquid [BMIM][PF₆] obtaining nine new compounds in the literature with good yields (42-86%). Gas chromatography–mass spectrometry (CG/MS) and nuclear magnetic resonance (NMR) ¹H, ¹³C, ¹⁵N and two-dimensional (COSY, HMBC and HMQC) confirm the formation of the expected products. A theoretical study was performed aiming to propose a mechanism in which ionic liquid acting as a mediator generates a complex with β -enaminones and favors the formation reaction of pyrazolo[1,5-a]pyrimidines. The β -enaminone isomerization reaction and the identification of the enaminoester were based on ¹H and ¹³C NMR and two-dimensional (COSY, HMQC, HMBC). The proposed mechanism was studied from computational tests. The study antiglioma demonstrated that four pyrazolo[1,5-a]pyrimidines had activity at a concentration of 100 μ M. The compound 2-methyl-5-phenylamino-7-(trifluoromethyl)pyrazolo[1,5-a]pyrimidine, reducing the glioblastoma cell line by 20% at a concentration of 25 μ M. The cytotoxicity study on astrocytes found that the four pyrazolo[1,5-a]pyrimidines are not cytotoxic to healthy central nerve cells.

Key-words: pyrazole, pyrimidine, antiglioma, cytotoxicity

Lista de Figuras

Figura 1: Fármacos disponíveis no mercado contendo o sistema pirazolo[1,5-a]pirimidina.....	13
Figura 2: Estrutura química de purinas comparada a estrutura da pirazolo[1,5-a]pirimidina.	14
Figura 3: Estrutura da β -enaminonas.....	17
Figura 4: Numeração dos átomos das pirazolo[1,5-a]pirimidinas.....	20
Figura 5: Classificação dos líquidos iônicos.....	23
Figura 6: Composto da série de aminobenzotiazol conjugados de pirazolo[1,5-a]pirimidina com maior atividade anticâncer.....	26
Figura 7: Composto com atividade inibidor da RET quinase.....	26
Figura 8: Estrutura química de PP-4-one	27
Figura 9: CG/EM do composto 10 e composto 7j.....	32
Figura 10: CG/EM A) do composto 7k B) do composto 7kk.	33
Figura 11: RMN ^1H do composto 7k e 7kk (em negrito sinal do 7k)	34
Figura 12: RMN ^1H do composto 7k e 7kk (em negrito sinal do 7k) em CDCl_3 (400 MHz).....	35
Figura 13: Espectro de massas (EM) do composto 7e.....	37
Figura 14: Espectro de RMN de ^1H do composto 7e em CDCl_3 (400 MHz).....	37
Figura 15: Espectro de RMN de ^{13}C do composto 7e em CDCl_3 (100 MHz).	38
Figura 16: Expansão de espectro de RMN de ^{13}C do composto 7e.....	39
Figura 17: Espectro de RMN de COSY.....	40
Figura 18: Espectro de RMN de $\text{HMQC}_{\text{H-C}}$	41
Figura 19: A) Espectro de RMN 2D de $\text{HMBC}_{\text{H-C}}$ em B) Expansão do espectro de RMN de HMBC.....	42
Figura 20: Diagrama de reação para a formação do composto 7 no nível de teoria B3LYP / def2-TZVP. Os valores de energia estão em kcal / mol.	44
Figura 21: Diagrama de reação do composto 7, intermediários Int1' (kcal/mol).....	45
Figura 22. Comparação entre espectro de RMN ^1H em CDCl_3 do composto 5j e 10.	47
Figura 23. Comparação entre espectro de RMN ^{13}C em CDCl_3 do composto 5h e 10.	48
Figura 24. Espectro de RMN em CDCl_3 bidimensional - HSQC da molécula 10 em CDCl_3	49

Figura 25. Espectro de RMN bidimensional - HMBC da molécula 10.	50
Figura 26: Orbitais moleculares de HOMO e LUMO da molécula 5j.	52
Figura 27: Orbitais moleculares HOMO e LUMO da molécula 6 e 8, respectivamente.	53
Figura 28: Resultados de teste em linha celular de glioblastoma C6 em rato. * P<0,01; ** P<0,001; *** P<0,0001	56
Figura 29: Resultados de citotoxicidade em linhagem celular astrócitos.	57
Figura 30: Espectro de CG/EM da pirazolo[1,5-a]pirimidina 7a.....	75
Figura 31: Espectro de CG/EM da pirazolo[1,5-a]pirimidina 7b.....	76
Figura 32: Espectro de CG/EM da pirazolo[1,5-a]pirimidina 7c.....	77
Figura 33: Espectro de CG/EM da pirazolo[1,5-a]pirimidina 7d.....	78
Figura 34: Espectro de CG/EM da pirazolo[1,5-a]pirimidina 7e.....	79
Figura 35: Espectro de CG/EM da da pirazolo[1,5-a]pirimidina 7f.....	80
Figura 36: Espectro de CG/EM da pirazolo[1,5-a]pirimidina 7g.....	81
Figura 37: Espectro de CG/EM da pirazolo[1,5-a]pirimidina 7h.....	82
Figura 38: Espectro de CG/EM da pirazolo[1,5-a]pirimidina 7i.....	83
Figura 39: Espectro de RMN de ^1H da pirazolo[1,5-a]pirimidina 7a (400 MHz em CDCl ₃).	85
Figura 40: Espectro de RMN de ^{13}C da pirazolo[1,5-a]pirimidina 7a (100 MHz em CDCl ₃).	86
Figura 41: Espectro de RMN de ^1H da pirazolo[1,5-a]pirimidina 7b (400 MHz em CDCl ₃).	86
Figura 42: Espectro de RMN de ^{13}C da pirazolo[1,5-a]pirimidina 7b (100 MHz em CDCl ₃).	87
Figura 43: Espectro de RMN de ^1H da pirazolo[1,5-a]pirimidina 7c (400 MHz em CDCl ₃).	87
Figura 44: Espectro de RMN de ^{13}C da pirazolo[1,5-a]pirimidina 7c (100 MHz) em CDCl ₃).	88
Figura 45: Espectro de RMN de ^1H da pirazolo[1,5-a]pirimidina 7d (400 MHz em CDCl ₃).	88
Figura 46: Espectro de RMN de ^{13}C da pirazolo[1,5-a]pirimidina 7d (100 MHz em CDCl ₃).	89
Figura 47: Espectro de RMN de ^1H da pirazolo[1,5-a]pirimidina 7e (400 MHz em CDCl ₃).	90

Figura 48: Espectro de RMN de ^{13}C da pirazolo[1,5-a]pirimidina 7e (100 MHz em CDCl_3).	90
Figura 49: Espectro de RMN de ^1H da pirazolo[1,5-a]pirimidina 7f (400 MHz em CDCl_3).	91
Figura 50: Espectro de RMN de ^{13}C da pirazolo[1,5-a]pirimidina 7f (100 MHz em CDCl_3).	91
Figura 51: Espectro de RMN de ^1H da pirazolo[1,5-a]pirimidina 7g (400 MHz em CDCl_3).	92
Figura 52: Espectro de RMN de ^{13}C da pirazolo[1,5-a]pirimidina 7g (100 MHz em CDCl_3).	92
Figura 53: Espectro de RMN de ^1H da pirazolo[1,5-a]pirimidina 7h (400 MHz em CDCl_3).	93
Figura 54: Espectro de RMN de ^{13}C da pirazolo[1,5-a]pirimidina 7h (100 MHz em CDCl_3).	93
Figura 55: Espectro de RMN de ^1H da pirazolo[1,5-a]pirimidina 7i (400 MHz em CDCl_3).	94
Figura 56: Espectro de RMN de ^{13}C da pirazolo[1,5-a]pirimidina 7i (100 MHz em CDCl_3).	94
Figura 57: Espectro de COSY, composta 10 (CDCl_3).	96

Lista de Tabela

Tabela 1. Propriedades físicas, rendimentos e coloração das β -enaminonas 5a-l. ..	28
Tabela 2: Condições de reação para formação do composto 7.	29
Tabela 3: Condições de reação para formação do composto 7c com liquido iônico .	30
Tabela 4: Propriedades físicas, rendimentos e coloração dos pirazolo[1,5-a]pirimidina 7a-i.	36
Tabela 5: Dados de RMN de ^1H dos principais deslocamentos químicos (ppm) dos pirazolo[1,5-a]pirimidina 7a-i.	37
Tabela 6: Dados de RMN de ^{13}C dos principais deslocamentos químicos (ppm) das pirazolo[1,5-a]pirimidina 7a-i.	39
Tabela 7: Condições reacionais para o composto 10 em 72h.	51
Tabela 8: Valores parciais de Hirshfeld, ADCH e CM5 calculados para a molécula 5j.	51
Tabela 9. Valores parciais de Hirshfeld, ADCH e CM5 calculados para a molécula 6 e 8.	52
Tabela 10: Energia livre de Gibbs para reação de formação do composto 10 e 7.	54

Sumário

1. Introdução e Objetivos.....	13
2. Revisão da literatura	17
2.1 Síntese de β -enaminonas trifluorometiladas.....	17
2.2 Síntese de pirazolo[1,5-a]pirimidina	19
2.3 Síntese de pirazolo[1,5-a]pirimidina com líquido iônico.....	22
2.4 Pirazolo[1,5-a]pirimidina com atividade biológica.....	25
3. Apresentação e discussão dos resultados	27
3.1 Síntese, identificação e estudo teórico de pirazolo[1,5-a]pirimidina (7a-l)	27
3.2 Síntese, identificação e estudo teórico de novo enaminoéster (10).....	46
3.3 Avaliação da atividade antiglioma e citotoxicidade	55
4. Conclusão	57
5. Materiais e métodos.....	58
5.1. Reagentes e Solventes utilizados	58
5.2. Equipamentos utilizados.....	58
5.2.1. Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas	58
5.2.2. Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear	58
5.2.3. Medidor de ponto de fusão	58
5.3. Métodos experimentais.....	58
5.3.1. Procedimento para síntese de 1,1,1-trifluor-4,4-dietoxi-but-3-em-2-ona (3).....	58
5.3.2. Procedimento para síntese de β -enaminonas (5a-g e 5j-l).....	59
5.3.3. Procedimento para síntese de β -enaminonas (5h-i).....	62
5.3.4. Procedimento para síntese de pirazolo[1,5-a]pirimidina.....	62
5.4. Métodos teóricos.....	66
5.5. Testes biológicos e análise experimental	67
5.5.1. Procedimentos gerais de cultura de células	67
5.5.1.1 Culturas de células	67
5.5.1.2 Culturas primárias de astrócitos	67
5.5.2. Tratamento de cultura de células in vitro.....	67
5.5.3. Ensaio de viabilidade celular	68
5.5.4. Análise Estatística	68
6. Referências Bibliográficas	68
ANEXO I – Espectros de CG/EM.....	74
ANEXO II – Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C	84
ANEXO III – Espectros de RMN bidimensional	95

1. Introdução e Objetivos

Compostos orgânicos nitrogenados vêm apresentando grande interesse na química medicinal por estarem presentes em inúmeras substâncias com alta atividade biológica. Aproximadamente 85% dos fármacos disponíveis na terapêutica moderna são de origem sintética e destes, 62% possuem no mínimo um núcleo heterociclo, sendo que 91% contendo nitrogênio em suas estruturas (BARREIRO; FRAGA, 2015). Dentre estas estruturas pode-se destacar fármacos que possuem o sistema pirazolopirimidinas, como o indiplon (HASSAN; HAFEZ; OSMAN, 2015), dinaciclib (LI et al., 2013), dorsomorfina (YU et al., 2008), ocinaplon e anagliptin (KATO et al., 2011) ilustrados na figura abaixo (Figura 1).

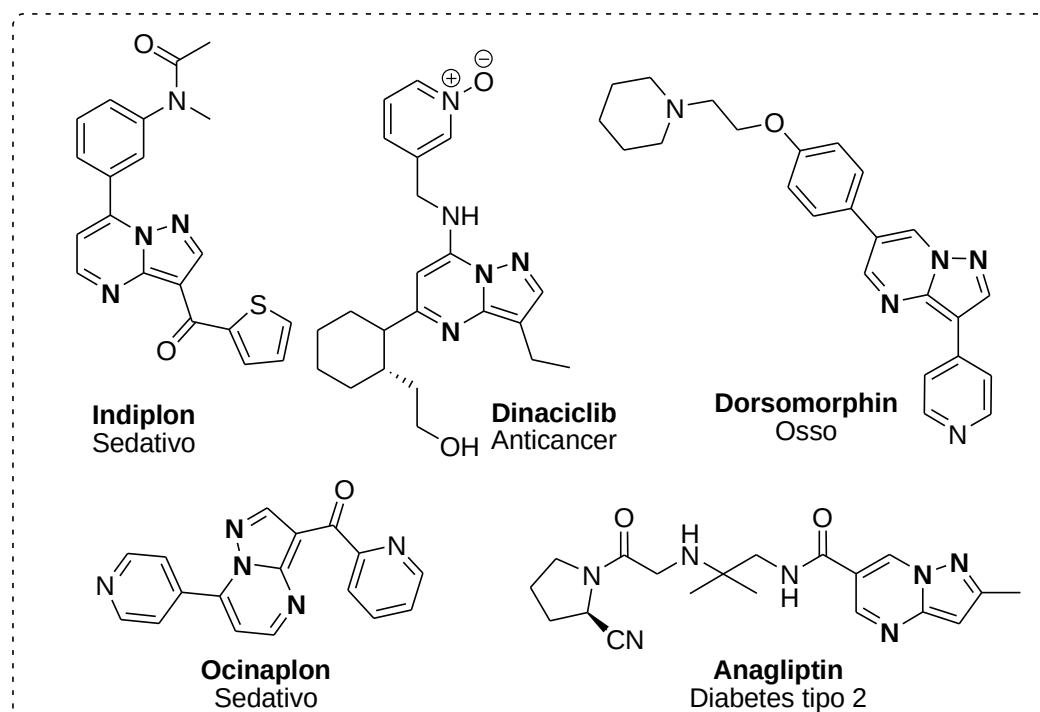


Figura 1: Fármacos disponíveis no mercado contendo o sistema pirazolo[1,5-a]pirimidina

Entre as classes de heterociclos, os ciclos condensados como as pirazolo[1,5-a]pirimidinas estão presentes em diversos segmentos da sociedade, como desenvolvimento de fármacos, agroquímicos e materiais. Essas moléculas são análogas a purinas (Figura 2) e possuem propriedades antimetabólicas, ou seja, têm propriedade de inibir por competição as reações de purinas naturais (BARREIRO; FRAGA, 2015).

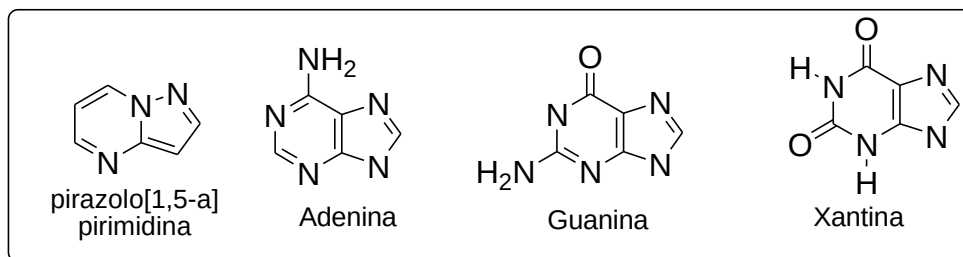
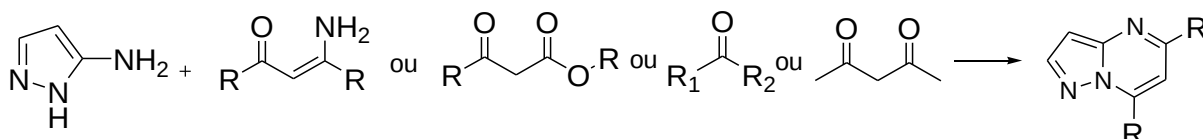


Figura 2: Estrutura química de purinas comparada a estrutura da pirazolo[1,5-a]pirimidina.

As pirazolo[1,5-a]pirimidina podem ser obtidas através da condensação de 3 ou 5-aminopirazol com cetonas, 1,3-dicetonas, enaminonas ou β -cetoéster, dentre outras (CHERUKUPALLI *et al.*, 2017)(Esquema 1). Este heterociclo ocupa posição de destaque por estar presente em compostos com potencial ação biológica, como AGGARWAL *et al.*, (2014) verificou que compostos desta classe têm apresentado atividades antimicrobiana e anti-inflamatória, enquanto HASSAN *et al.*, (2016) avaliaram a atividade antitumoral.

Esquema 1.



Os químicos orgânicos sintéticos têm se esforçado para produzir cada vez mais compostos heterocíclicos através de novos e eficientes métodos sintéticos de transformação. Entre as principais reações orgânicas, a ciclocondensação é a mais atrativa para metodologias de síntese (DRUZHININ; BALENKOVA; NENAJDENKO, 2007), surgindo uma necessidade de otimizar esses processos. Assim, os líquidos iônicos (LIs) têm atraído um interesse crescente e recentemente no contexto da síntese orgânica "verde". Embora os LI tenham sido inicialmente introduzidos como meio de reação "verde" alternativo por causa de suas propriedades físicas e químicas únicas de não-volatilidade, não-inflamabilidade, estabilidade térmica e miscibilidade controlada. Marchando muito além dessa fronteira, os Lis vêm mostrando seu papel significativo no controle de reações como solvente ou catalisadores e, além disso, têm uma grande característica que é a capacidade de serem reutilizados muitas vezes (WASSERSCHIED; WELTON, 2003).

Também é importante destacar o átomo de flúor presente em moléculas orgânicas que promove propriedades interessantes no ponto de vista da síntese orgânica e da química medicinal. A substituição de um átomo de hidrogênio por um átomo de flúor altera propriedades significativas do composto, como por exemplo, a acidez e a basicidade, além da lipofilicidade, propriedade fundamental para o controle da absorção, transporte e interação de fármaco-receptor (DOLBIER, 2016). Deste modo, há um grande interesse da indústria farmacêutica e também na agroquímica por novas substâncias trifluorometiladas. Dentre inúmeros exemplos, DI GRANDI *et al.*, (2009) demonstrou que pirazolo[1,5-*a*]pirimidinas com substituintes trifluorometilados foram identificados como potentes inibidores de proteína quinase serina/treonina(B-Raf) que oferece um meio viável para o tratamento do câncer.

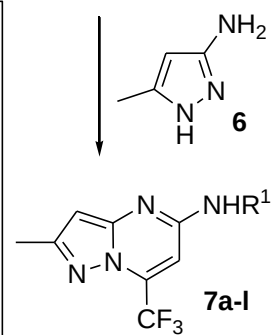
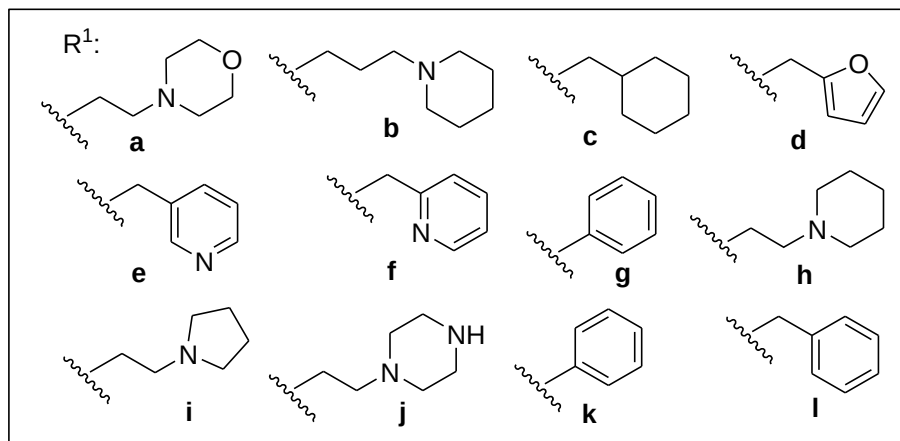
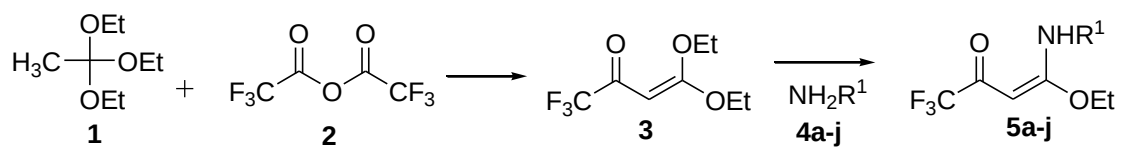
1.1. Objetivo geral

Tendo em vista que os heterociclos nitrogenados possuem uma vasta aplicabilidade principalmente na química medicinal o presente trabalho tem como objetivo sintetizar pirazolo[1,5-*a*]pirimidinas contendo como substituintes grupos aminos e trifluorometilado utilizando liquido iônico como mediador (Esquema 2). Também será realizado o estudo computacional e estudo da atividade antiglioma e citotoxicidade *in vitro*.

1.2. Objetivos específicos

- Realizar a síntese de pirazolo[1,5-*a*]pirimidinas **7** utilizando líquido iônico como mediador;
- Caracterizar por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM) e por ressonância magnética nuclear (RMN) oos novos produtos **7a-i**;
- Realizar o estudo de proposta de mecanismo com base em dados teóricos para o composto **7**.

Esquema 2.



2. Revisão da literatura

Nesse capítulo será abordada uma revisão da literatura sobre as moléculas que estão relacionadas ao trabalho. Primeiramente serão apresentadas as β -enaminonas trifluorometiladas, relacionando sua estrutura química como bloco construtor para heterociclos e a possível isomerização estrutural. A partir do segundo capítulo será feita uma revisão sobre a pirazolo[1,5-a]pirimidina quanto a sua estrutura e métodos de sínteses, dando ênfase a reação com líquido iônico. Por fim, será abordado as principais atividades dos heterociclos pirazolo[1,5-a]pirimidina, visto que estes heterociclos possuem grande aplicabilidade na química medicinal para o desenvolvimento de novos fármacos.

2.1 Síntese de β -enaminonas trifluorometiladas

As β -enaminonas são compostos orgânicos conjugados que apresentam na sua estrutura grupamento amino. Além disso, ela possui dois centros eletrofílicos na posição **B** e **D**, três sistemas nucleofílicos na posição **A**, **C** e **E** descrito na figura 3. Com isso, essas substâncias se tornam intermediários versáteis uma vez que combinam a nucleofilicidade ambidentada das enaminas com a eletrofilicidade ambidentada das enonas (KASCHERES, 2003).

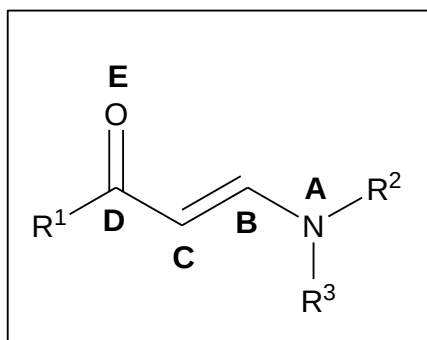
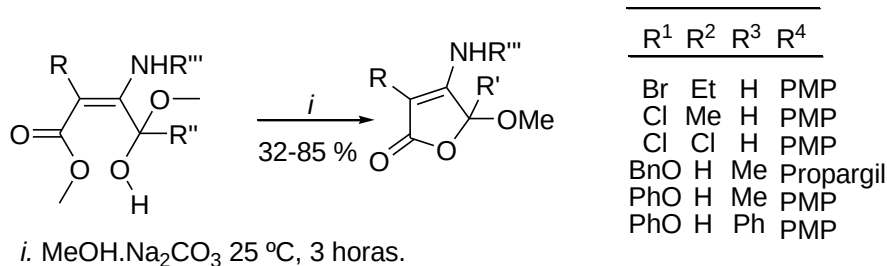


Figura 3: Estrutura da β -enaminonas

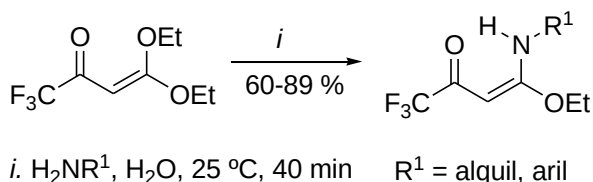
Por meio de reações de substituição eletrofílica e nucleofílica, as enaminonas são eficazes como blocos de construção na síntese orgânica de compostos bioativos acíclicos, aromáticos e heterocíclicos, como azóis (MOHAREB et al., 2020). Além disso, substâncias dessa classe são valiosas para a construção de heterociclos de nitrogênio biologicamente ativos, como por exemplo, na síntese realizada por ALCAIDE et al. (2000), que utilizaram enaminonas derivadas do ácido tetrônico para obter derivados de acrilato (Esquema 3).

Esquema 3.



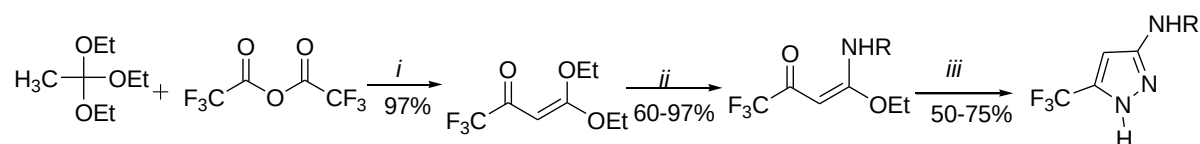
Tendo em vista que compostos fluorados tem seu destaque na química medicinal, por aumentar a estabilidade metabólica de um composto bloqueando o sítio reativo, biodisponibilidade e interações proteína-ligante (PURSER *et al.*, 2008). Logo, os compostos que contêm substituintes trifluormetilados têm sido relatados por terem potenciais propriedades únicas ao flúor, como lipofilicidade e estabilidade (OJIMA, 2009). As introduções desse grupo em compostos orgânicos resultam em mudanças positivas nas propriedades químicas, bioquímicas e físicas, perante o composto original (WANG *et al.*, 2015). Portanto, STEFANI *et al.*, (2005) descreveram a síntese de β -enaminonas trifluorometiladas utilizando água como solvente em temperatura ambiente por 40 minutos com rendimentos de bons a ótimos (Esquema 4).

Esquema 4.



Recentemente, GOULART, (2017) descreveu a síntese de pirazóis contendo o grupo trifluorometil. Os compostos foram sintetizados com eficiência usando um protocolo de três etapas de reação. A primeira etapa é a síntese de β -dietoxi, enquanto que a segunda é para formação de diferentes β -enaminonas e por fim, a reação para produzir pirazóis trifluorometilados (Esquema 5).

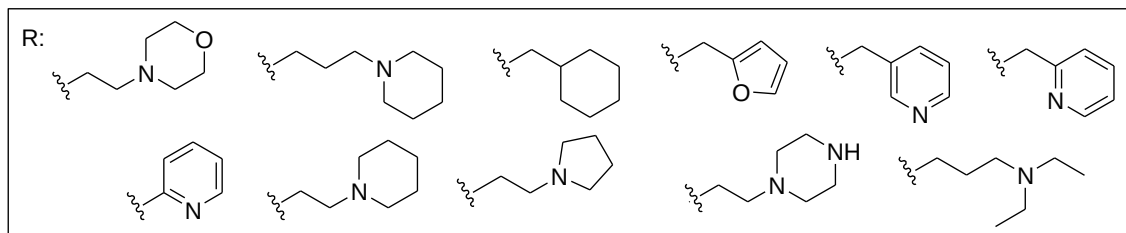
Esquema 5.



i: Piridina, CHCl_3 , 0 °C, 3 h- 25°C., 24 h

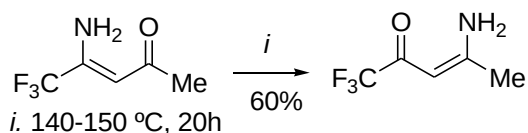
ii: RNH_2 , MeCN, 25 °C, 18 h

iii: $\text{NH}_2\text{NH}_2 \cdot 2\text{HCl}$, Et_3N , EtOH, 78 °C, 48 h



As β -enaminonas normalmente apresentam isomeria de configuração, na qual ocorre devido à rotação de ligação sigma, porém em 1982, (FILYANKOVA; PASHKEVICH; POSTOVSKII, 1982) demonstraram isomerização de β -aminovinilcetonas para β -enaminonas em altas temperaturas por 20h, no qual se obteve o produto puro a partir da destilação fracionada com rendimento de 60%, sendo caracterizado como isomeria estrutural e parcial (Esquema 6).

Esquema 6.



A partir do exposto foi possível observar as contribuições ao longo dos anos para estas moléculas que são intermediários significativos na síntese orgânica, pois podem sofrer uma variedade de transformações químicas resultando em moléculas estruturalmente complexas na química orgânica e medicinal, como por exemplo, núcleos heterociclos.

2.2. Síntese de pirazolo[1,5-a]pirimidina

As pirazolo[1,5-a]pirimidinas são uma classe de compostos heterocíclicos fundidos obtidos através da condensação de 3 ou 5-amino pirazol com cetonas, enaminonas, β -cetoésteres, dentre outras (CHERUKUPALLI et al., 2017). Sua nomenclatura foi atribuída conforme regras desenvolvidas por Hantzsch-Widman (EICHER; HAUPTMANN; SPEICHER, 2013), e abaixo está demonstrado à

subclasse que é conectada através da ligação 1,5 do pirazol e a do anel da pirimidina (Figura 4).

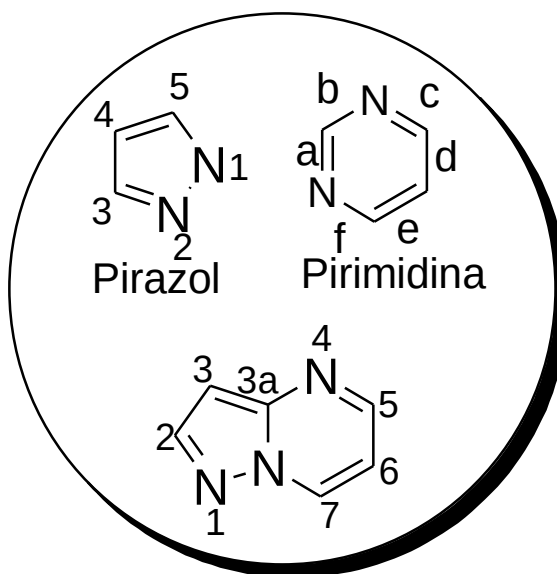
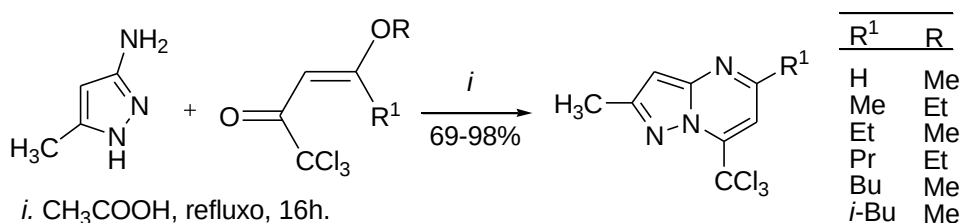


Figura 4: Numeração dos átomos das pirazolo[1,5-a]pirimidinas.

MARTINS *et al.*, (2009) descreveu a síntese das 2-metil-7-triclorometilpirazolo[1,5-a]pirimidinas que foi realizada a partir da reação de ciclocondensação do tipo [NCN] + [CCC], que consiste na união de dois reagentes para formação de um produto. O grupo NCN é representado pelo 3-amino-5-metilpirazol e o grupo CCC é representado pelas 1,1,1-tricloro-4-alcoxi-3-alquen-2-onas. Nessa síntese foram obtidos os compostos com rendimentos bons a excelentes, utilizando ácido acético como solvente, por um período de 16h. (Esquema 7).

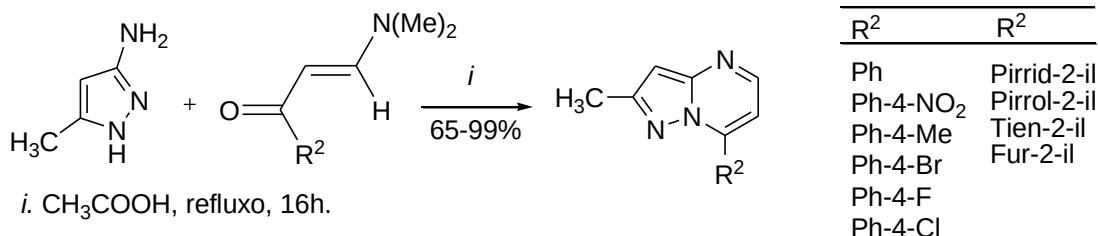
Esquema 7.



Neste mesmo estudo foi relatado a síntese das 2-metil-7-arylpirazolo[1,5-a]pirimidinas, através da reação de ciclocondensação do tipo [NCN] + [CCC] entre o 3-amino-5-metilpirazol com as β -dimetilaminovinil cetonas utilizando ácido acético

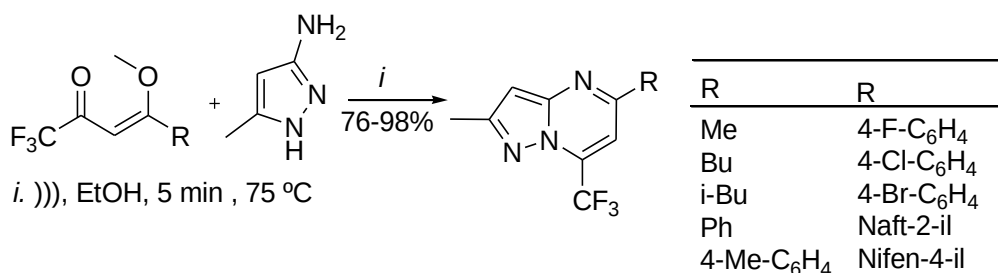
em refluxo durante 16 horas, com rendimentos de moderados à excelentes. (Esquema 8).

Esquema 8.



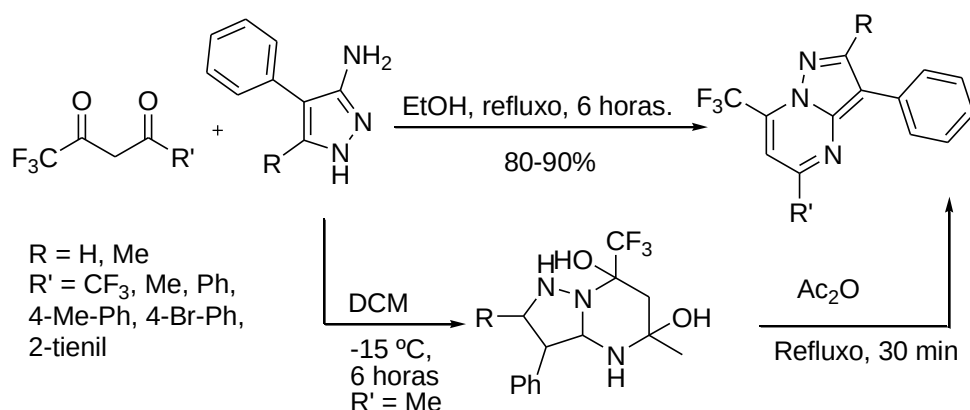
Já, BURIOL *et al.*, (2013) preparou uma série de compostos de pirazolo[1,5-a]pirimidinas à partir de enonas trifluorometiladas, fazendo uso de irradiação de ultrassom. As pirazolo[1,5-a]pirimidinas trifluorometiladas foram obtidas em 5 minutos de reação com rendimentos de moderados a bons (Esquema 9).

Esquema 9.



Em outro estudo, AGGARWAL *et al.*, (2014) descreveram uma síntese regioseletiva de metil-3-fenil-7-trifluorometilpir-azolo[1,5-a]pirimidinas por condensação de 4-aryl-5-aminopirazóis com um equivalente de trifluorometil-β-dicetonas. Para obter uma visão do mecanismo de reação, o intermediário, 5-metil-3-fenil-7-trifluorometil-4,5,6,7-tetra-hidropirazol[1,5-a]pirimidina-5,7-diol foi isolado realizando a reação em DCM a -15 °C por 6 h. Posteriormente este intermediário foi convertido em 7-trifluorometilpirazolo[1,5-a]pirimidino derivado por desidratação em refluxo com anidrido acético (Esquema 10). Os compostos sintetizados foram avaliados quanto à atividade anti-inflamatória. Um total de nove compostos foram testados quanto à sua atividade anti-inflamatória e apenas o composto com substituinte metilbenzeno exibiu a atividade anti-inflamatória de 83,4% quando comparado ao fármaco padrão Indometacina (84%).

Esquema 10.



2.3. Síntese de pirazolo[1,5-a]pirimidina com líquido iônico

Líquidos iônicos (LIs) são uma classe de solventes com propriedades muito interessantes, como não volatilidade, não-inflamabilidade, estabilidade térmica e miscibilidade controlada, podendo também ser reutilizados muitas vezes. Por conta de suas características únicas, o líquido iônico também ganhou popularidade como alternativa mais “verde” em relação aos solventes orgânicos usuais. A definição mais simples de um LI é um líquido composto exclusivamente de íons (WASSERSCHIED; WELTON, 2003).

Por demonstrar tamanha versatilidade, o LI pode ser utilizado como solvente e/ou catalisador. Nestas funções serão determinadas pelas características reacionais de cada reação, ainda assim a função mais importante do LI é estabilizar o complexo ativado carregado por meio de interações do tipo solvente-soluto (MARTINS *et al.*, 2008).

Quando se trata de líquidos iônicos aniônicos, os mesmo podem ser divididos em quatro grupos: (a) sistemas baseados em cloretos e sais orgânicos, tais como cloreto de 1-butil-3-metilimidazólio, [BMIM][Cl]; (b) sistemas baseados em ânions como $[\text{PF}_6]^-$, $[\text{BF}_4]^-$ e $[\text{SbF}_6]^-$; (c) sistemas baseados em ânions, como $[\text{CF}_3\text{SO}_3]^-$, $[(\text{CF}_3\text{SO}_2)_2\text{N}]^-$, $[\text{Tf}_2\text{N}]^-$ e semelhantes; (d) sistemas baseados em ânions, como alquilsulfatos e alquilsulfonatos (BRINCHI; GERMANI; SAVELLI, 2003; WASSERSCHIED; WELTON, 2003). Os exemplos descritos são baseados em cátions amônio, sulfônio, fosfônio, imidazólio, piridínio, picolínio, pirrolidínio, tiazólio, oxazólio, pirazólico e nitrogênios assimétricos, diferentemente substituídos (WASSERSCHIED; WELTON, 2003) (Figura 5).

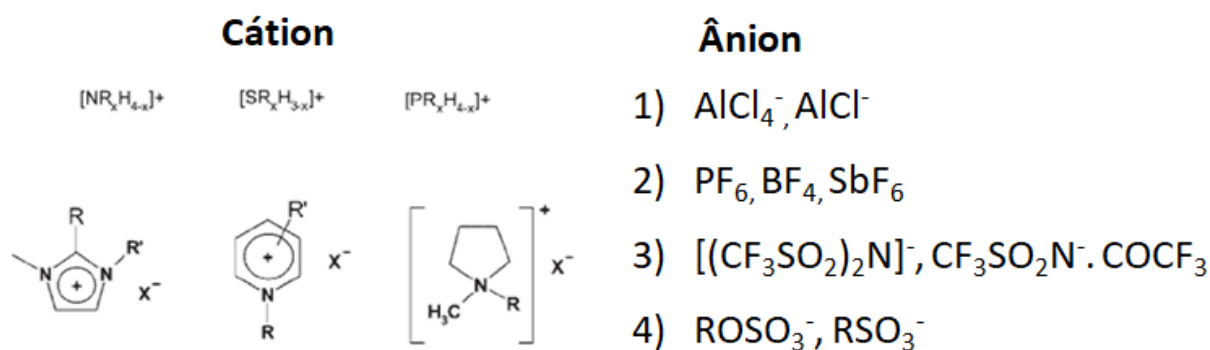
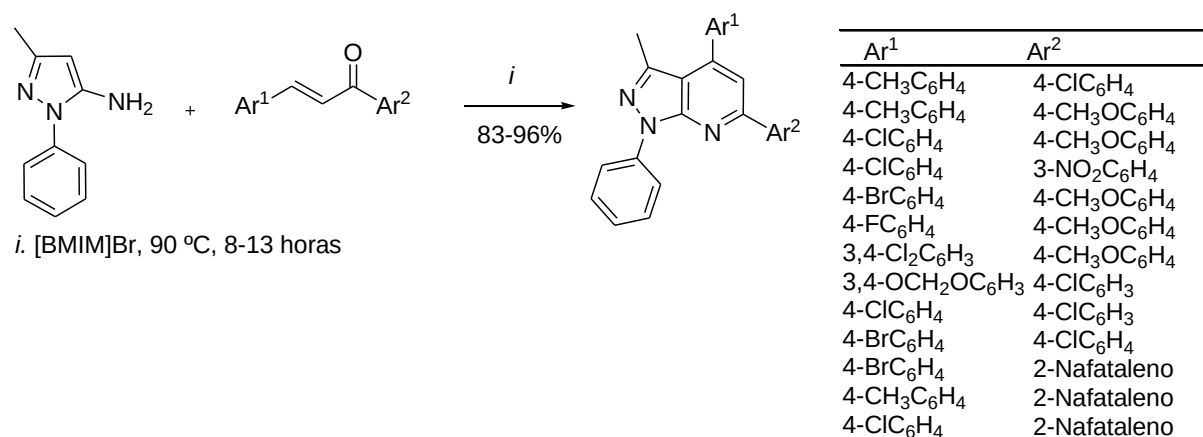


Figura 5: Classificação dos líquidos iônicos.

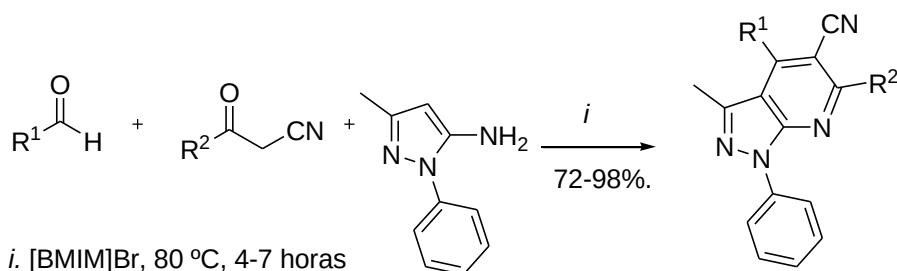
Assim, SHI; ZHOU; LIU, (2015) fizeram o uso de um LI como meio reacional, onde foi possível sintetizar 13 compostos, a partir de 3-metil-1-fenil-1*H*-pirazol-5-amina com cetonas α,β -insaturadas. A mistura foi agitada a 90 °C por 8–13 h, os produtos tiveram alto rendimentos (Esquema 11). Logo, este protocolo tem condições de reação mais suaves, com alta eficiência e procedimento ambientalmente sustentável.

Esquema 11.



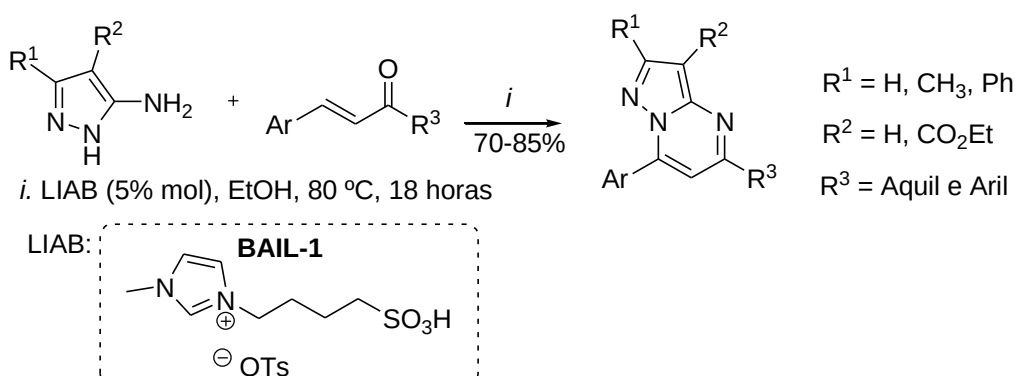
HUANG *et al.*, (2021) descreveram uma reação eficiente fazendo também a utilização de LI no meio reacional, a partir de 4-metilbenzaldeído, 3-oxo-3-fenilpropanonitrila e 3-metil-1-fenil-1*H*-pirazol-5-amina. Os derivados de piridina fundidos correspondentes foram sintetizados através de reações *one pot*, com rendimentos de 72-98%. A mistura foi agitada a 80 °C por 4-7h (Esquema 12). Este método tem as vantagens de ser eficiente com condições de reação mais suaves, em apenas uma etapa de reação e tempo de reação mais curto.

Esquema 12.



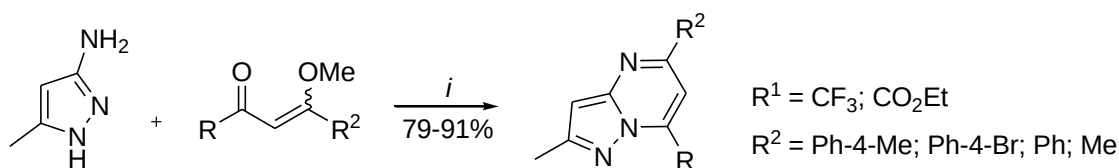
No estudo de SINGSARDAR *et al.*, (2018) se utiliza líquidos iônicos ácidos de Brønsted (LIAB) como catalisadores da reação entre 1*H*-pirazol-5-amina e chalcona, com etanol como solvente, fazendo a utilização de condições brandas de temperatura (80 °C) e obtendo bons rendimentos que ficaram na média de 80% (Esquema 13). Reação em *tandem* prossegue através da adição de aza-Michael seguido por ciclização intramolecular para produzir os derivados de pirazolopirimidina desejados.

Esquema 13.



FRIZZO, (2010) sintetizou composto a partir da reação de ciclocondensação de 1,1,1-trifluór-4-alcóxi-3-alquen-2-onas com 3(5)-aminopirazol usando líquido iônico como meio reacional. Os reagentes e o LI foram adicionados em quantidades equivalentes, formando uma mistura homogênea que foi aquecida a 100°C por 2 h, fornecendo os compostos esperados com bons rendimentos (Esquema 13).

Esquema 14.



i. [BMIM][BF₄], 100 °C, 2 horas

2.4. Pirazolo[1,5-a]pirimidina com atividade biológica

As pirazolo[1,5-a]pirimidinas são conhecidas por serem análogos de purinas com diversas aplicações biológicas como antimetabólitos em interações bioquímicas de purinas, antitripanossomais e sedativos (HASSAN; HAFEZ; OSMAN, 2015), ansiolíticos (SELLERI et al., 2005), ligantes de receptores de benzodiazepínicos (SELLERI et al., 2001), dentre outras. Por conta de sua grande importância biológica os cientistas medicinais descobriram várias novas drogas que consistem em ter essa molécula central, citado na figura 1 (página 13).

Os tumores cerebrais podem se formar em praticamente qualquer tipo de tecido ou célula do cérebro e da medula espinhal. Glioma é um termo geral para um grupo de tumores que começam nas células da glial. Vários tipos de tumores podem ser considerados gliomas, como os astrocitomas. Astrocitomas são o tipo mais comum de glioma e se formam a partir de células chamadas astrócitos. Drogas que estão se mostrando mais eficazes para o antiglioma devem causar apoptose nas células tumorais e manter as células saudáveis (astrócitos) (Louis et al., 2016).. Visto que um dos objetivos desse trabalho será testar as substâncias sintetizadas como potencial antiglioma, será abordado com maior ênfase relatos de novos derivados de pirazolpirimidinas com potencial anticâncer.

Em seu estudo de KAMAL et al., (2013) demonstraram a eficiência da série de aminobenzotiazol conjugados a pirazolo[1,5-a]pirimidina para atividade anticâncer. Os compostos foram testado contra cinco linhagens de células de câncer humano (A-549, HeLa, MCF-7, HT-29 e ACHN), sendo que alguns desses compostos exibiram atividade anticâncer promissora em concentração micro molar (μM) (Figura 5).

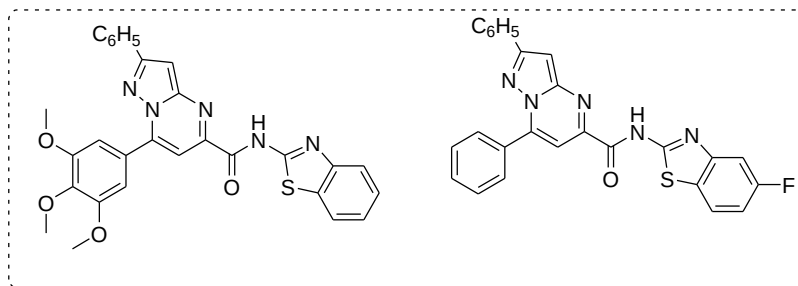


Figura 6: Composto da série de aminobenzotiazol conjugados de pirazolo[1,5-a]pirimidina com maior atividade anticâncer.

MATHISON, C.J.N. *et al.* (2020) demonstraram a síntese de um potente inibidor de receptor da tirosina quinase (RET quinase) com alta seletividade em ensaios celulares (Figura 7). Os autores sintetizaram três substituições diferentes na posição 6 para a família de pirazolo[1,5-a]pirimidinas, isto é, fenil, *p*-acetamidofenil e 2-tiazolil. O grupo fenil foi utilizado devido à disponibilidade sintética do substrato; no entanto, o *p*-acetamidofenil e os grupos 2-tiazolil conferiram potência aumentada contra um elevado número de receptores transmembrana tirosina quinase e linhas de células cancerígenas. A seletividade do composto da Figura 6 é devido o grupo amino na posição 5 (R^2), que favorece uma ligação de H com uma molécula de água dentro do sítio ativo da enzima. A geometria restrita do anel de piperidina facilita as interações de Van der Waals com alguns resíduos de proteína. Os pesquisadores concentraram seus esforços na mudança de polaridade em R^3 para reduzir a lipofilicidade geral; com este objetivo, eles substituíram o grupo metoxi por uma variedade de amidas e obtiveram um composto sem grande perda no potencial anticâncer.

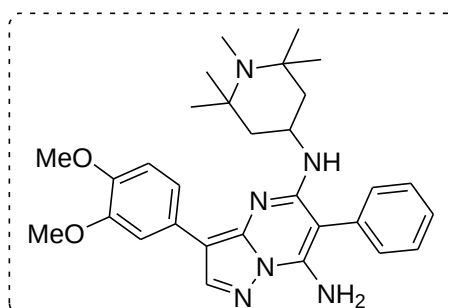


Figura 7: Composto com atividade inibidor da RET quinase

Já, LIU *et al.*, (2020) demonstraram que um derivado de pirazol, pirazolo[4,3-c]piridinona (PP-4-one), que tem na sua estrutura um átomo de flúor, (Figura 7), suprimiu a viabilidade das células U251, C6 e U87 em um concentração de 0,25 μ M. Logo, esse composto tem potencial antiproliferativo para células de glioma através

do direcionamento dos níveis de cAMP e Bcl-2. Também promoveu a apoptose das células de glioma por meio da ativação da caspase e interrupção do ciclo celular. Assim, o PP-4-ona pode ser usado para desenvolver candidatos a drogas para o tratamento de glioma.

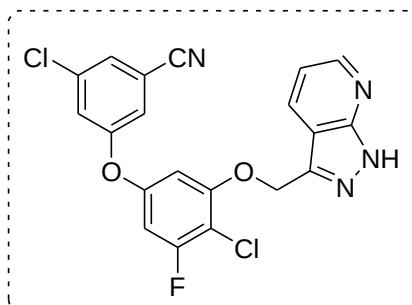


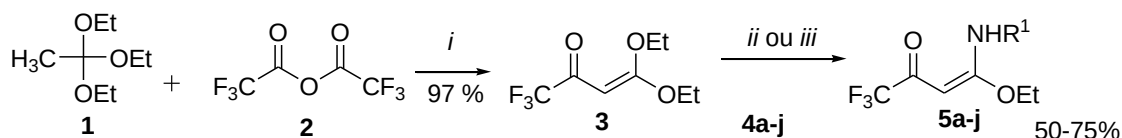
Figura 8: Estrutura química de PP-4-one

3. Apresentação e discussão dos resultados

3.1. Síntese, identificação e estudo teórico de pirazolo[1,5-a]pirimidina (7a-l)

Para a obtenção das pirazolo[1,5-a]pirimidina foi primeiro preciso sintetizar seus precursores, 1,1,1-trifluor-4,4-dietoxi-but-3-en-2-ona (**3**) e β -enaminonas (**5a-l**), sendo que o composto **3** foi sintetizado a partir da metodologia de HOJO; MASUDA; KAMITORI, (1976); as β -enaminonas **5a-g** e **5j-l** foram sintetizados a partir da metodologia de GOULART, (2017) no qual foi utilizado acetonitrila como solvente por 18 horas em temperatura ambiente, enquanto que as β -enaminonas **5h-i** foram baseadas em STEFANI et al., (2005), onde foi utilizado água como solvente por 40 minutos (Esquema 14). Todos os compostos foram identificados por RMN de ^1H e ^{13}C e os rendimentos foram de acordo com a literatura (Tabela 1).

Esquema 15.



i: Piridina, CH₂Cl, 0 °C 3h, 25 °C 24h.

ii: NH₂R¹ (**4a-g**; **4j-l**), MeCN, 25 °C, 18h.

iii: NH₂R² (**4h-i**), H₂O, 25 °C, 40 min.

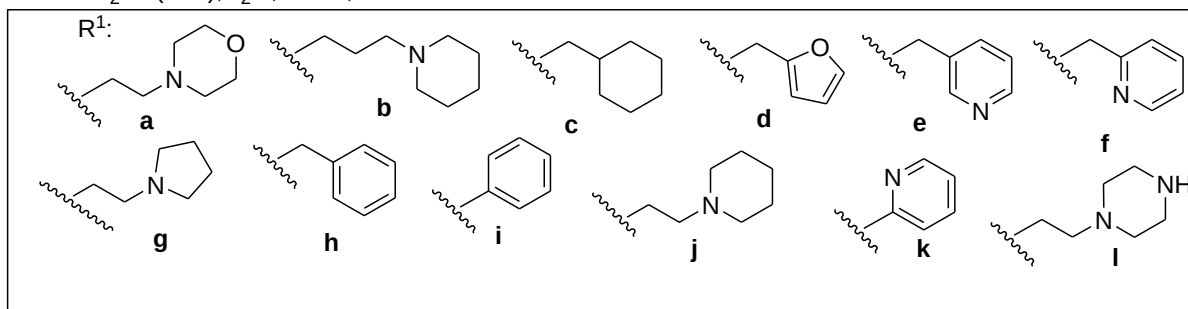
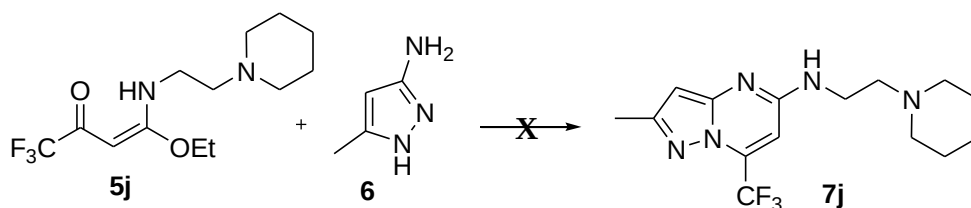


Tabela 1. Propriedades físicas, rendimentos e coloração das β -enaminonas **5a-l**.

Comp.	Fórm. Mol (g/mol)	Rend. (%)	P.F. (°C)	Coloração
5a	C ₁₂ H ₁₉ F ₃ N ₂ O ₃	71	58-60	Castanho
5b	C ₁₄ H ₂₃ F ₃ N ₂ O ₂	85	72-74	Castanho
5c	C ₁₃ H ₂₀ F ₃ NO ₂	94	Óleo	Amarelo
5d	C ₁₁ H ₁₂ F ₃ NO ₃	80	217-219	Âmbar
5e	C ₁₂ H ₁₃ F ₃ N ₂ O ₂	86	81-83	Amarelo
5f	C ₁₂ H ₁₃ F ₃ N ₂ O ₂	90	81-83	Amarelo
5g	C ₁₂ H ₁₉ F ₃ N ₂ O ₂	97	Óleo	Castanho
5h	C ₁₂ H ₁₂ F ₃ NO ₂	74	38-40	Amarelo
5i	C ₁₃ H ₁₄ F ₃ NO ₂	71	80-82	Amarelo
5j	C ₁₃ H ₂₁ F ₃ N ₂ O ₂	76	65-67	Amarelo
5l	C ₁₁ H ₁₁ F ₃ N ₂ O ₂	81	73-75	Amarelo
5l	C ₁₂ H ₂₀ F ₃ N ₃ O ₂	94	81-83	Castanho

Em posse dessas, foi iniciada a terceira etapa sobre o estudo de otimização de reação, assim foi testado um equivalente de β -enaminona **5j** e de pirazol **6** com diferentes solventes e não se obtendo o produto desejado. (Esquema 16, Tabela 1 linhas 1 a 4).

Esquema 16



Também foi testado a reação da β -enaminona **5c** em conjunto com o pirazol **6** em diferentes solventes demonstrado na tabela 1 (linhas 1 a 4). Também não houve o consumo total dos matérias de partida. Sendo assim, foram explorados diferentes métodos para obter o produto em radiação micro-ondas (linhas 5 e 6) e ultrassom (linha 7) onde não houve sucesso. Por fim, foi testado uma reação com base em FRIZZO, (2010) com 1 equivalente do LI Tetrafluorborato 1-butil-3-metilimidazolio ([BMIM][BF₄]), onde obteve-se o produto **7c** com rendimentos de 36% (Tabela 2, linha 8).

Esquema 17.

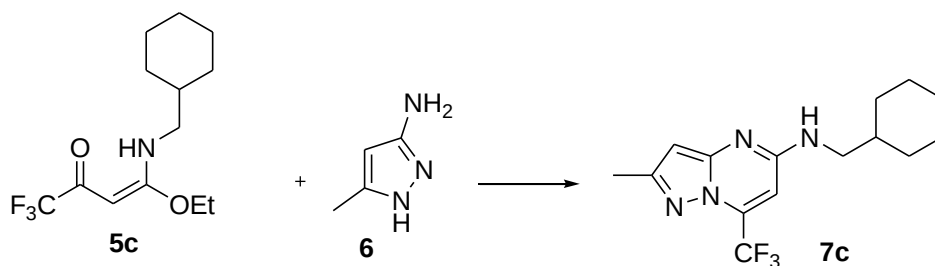


Tabela 2: Condições de reação para formação do composto **7**.

Linha	Condição de reação				Rendimento ^a
	Equiv. Mmol (5:6)	Temp. (°C)	Solvente/ Catalisador	Tempo (h)	
1	1:1	78	Etanol	72	-
2	1:1	110	Tolueno	72	-
3	1:1	67	Acetonitrila	72	-
4	1:1	110	Ácido Acético	72	-
5 [#]	1:1	110	Tolueno	1,50	-
6 [#]	1,5:1	110	Tolueno/ Ácido acético	1,50	-
7 [*]	1:1	-	Tolueno	1,50	-

8 1:1 100 - / [BMIM][BF₄] 2 36%

Micro-ondas *Ultrassom a = rendimento de composto isolado

Após obter o produto desejado, manteve-se o aperfeiçoamento da reação e percebeu-se que o aumento da quantidade equivalente do líquido iônico, aumento do tempo reacional e diminuição da temperatura não colaboram para o aumento do rendimento (tabela 3, linha 9, 10 e 11). Assim, foi alterado o líquido iônico para o 1-butil-3-metilimidazólio hexafluorofostato ([BMIM][PF₆]), em uma temperatura de 100 °C por 24 horas e obteve-se 60% de rendimento (tabela 3, linha 12). Logo, foi testado o mesmo procedimento utilizando o etanol como solvente e não houve nenhum consumo do material de partida (tabela 3, linha 13). Por fim, foi testado com o dobro de quantidade do líquido iônico e o rendimento subiu para 74% (tabela 3, linha 14)

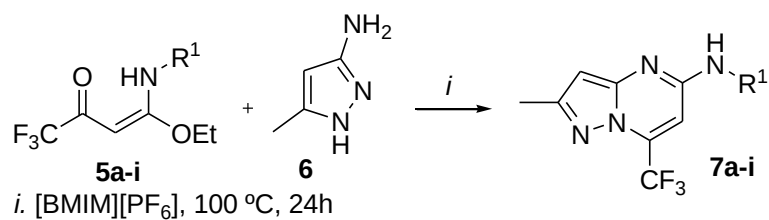
Tabela 3: Condições de reação para formação do composto **7c** com líquido iônico

Linha	Condição de reação					Rendimento ^a
	Equiv.Mmol (5:6: L.I.)	L.I.	Temp. (°C)	Solvent e	Tempo (h)	
9	1:1:2	[BMIM][BF ₄]	100	-	2	26%
10	1:1:2	[BMIM][BF ₄]	75	-	2	7%
11	1:1:1	[BMIM][BF ₄]	100	-	4	15%
12	1:1,2:1	[BMIM][PF ₆]	100	-	24	60%
13	1:1,2:1	[BMIM][PF ₆]	78	Etanol	24	-
14	<u>1:2:1</u>	<u>[BMIM][PF₆]</u>	<u>100</u>	<u>-</u>	<u>24</u>	<u>74%</u>

a = rendimento de composto isolado

Foi escolhida as condições reacionais da linha 14 para aumentar o esboço dessa síntese, assim foi sintetizada uma série de pirazolo[1,5-a]pirimidina através de reação de condensação entre pirazol **6** com β -enaminonas **5a-I** utilizando LI como mediador por 24h à 100 °C (Esquema 18).

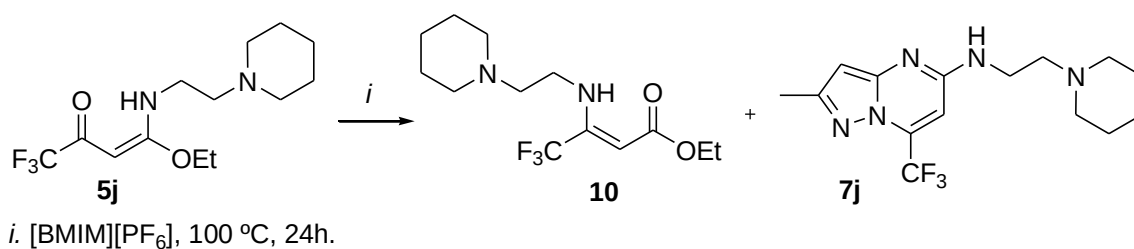
Esquema 18.



R ¹ :	Rendimento	R ¹ :	Rendimento	R ¹ :	Rendimento
	50%		42%		48%
	43%		77%		40%
	74%		51%		86%

Em contra partida na reação de formação do composto **7j** (R=(piperidin-1-il)etil) foi observado no CG/EM além do produto esperado, o enaminoéster **10** com aproximadamente 84% de área no CG (Esquema 19, Figura 9).

Esquema 19.



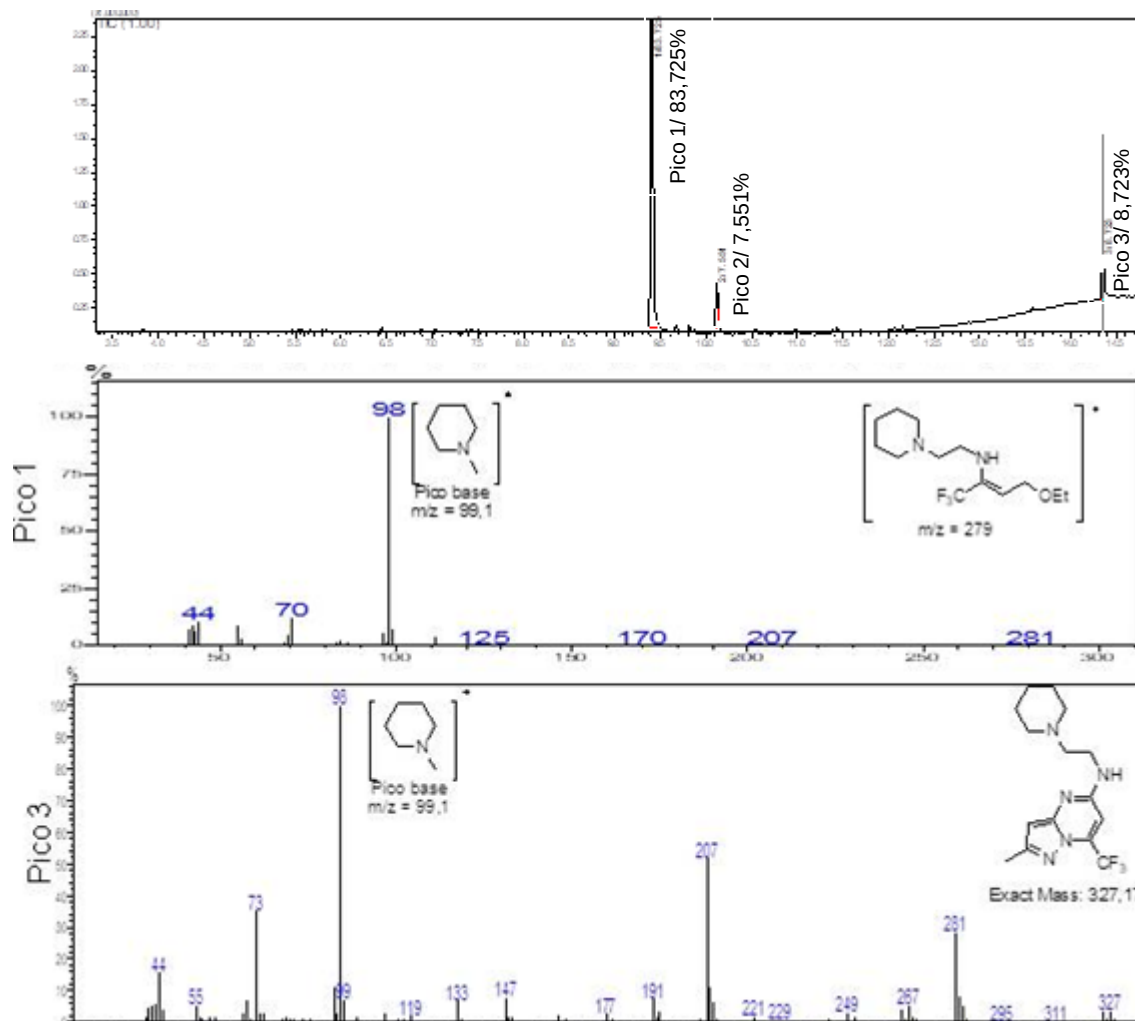
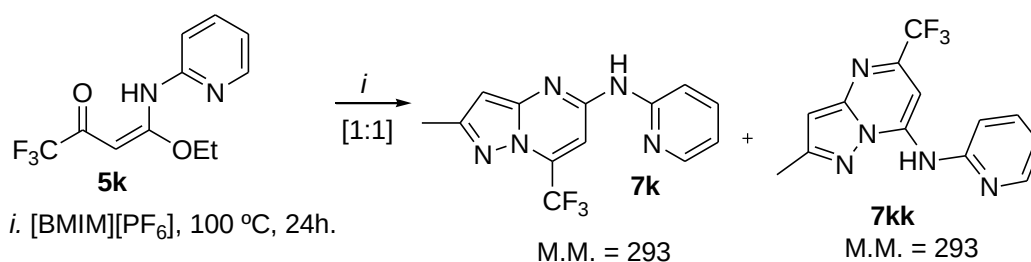


Figura 9: CG/EM do composto **10** e composto **7j**.

Já, na reação para formar o produto **7k** ($R=(2\text{-piridil})$) foi possível identificar, por CG/EM e RMN de ^1H e ^{13}C a 2-metil-5-amino-(piridin-2-a)-7-(trifluorometil)pirazol[1,5-a]pirimidina **7k** e seu regioisômero 2-metil-7-amino-(piridin-2-a)-5-(trifluorometil)pirazolo[1,5-a]pirimidin-7-a **7kk** (Esquema 20). A figura 10A ilustra o espectro de massas do composto com percentual de 47,70% e a figura 10B mostra o espectro de massa do seu regioisômero com área de 52,30%, ambos íon molecular de $m/z = 293$. Aumentando a temperatura ($120\text{ }^\circ\text{C}$) e, o tempo da reação para 48 horas não forneceu apenas o composto **7k**.

Esquema 20.



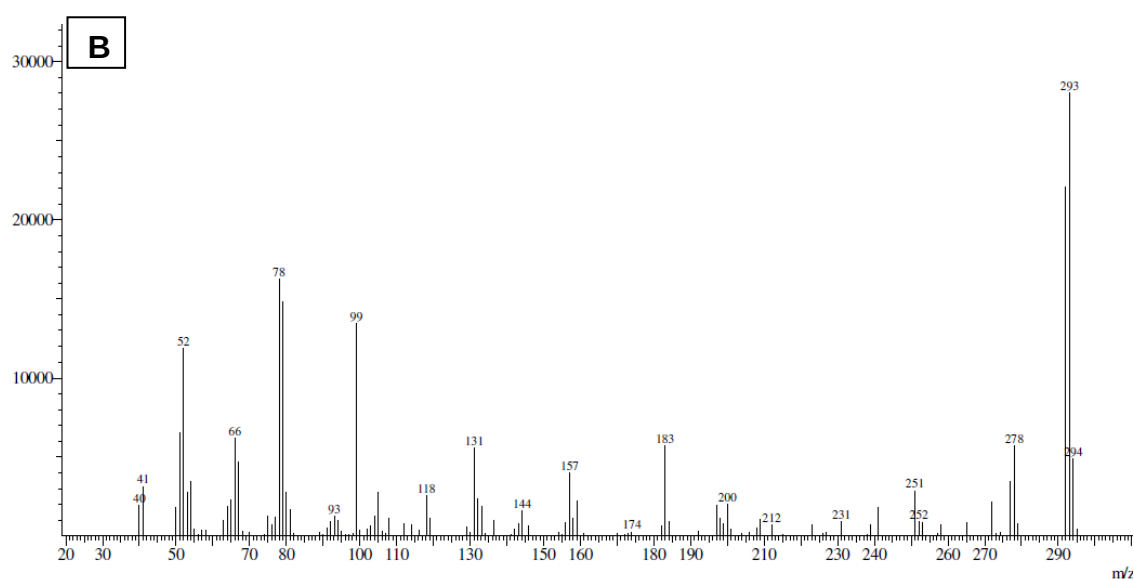
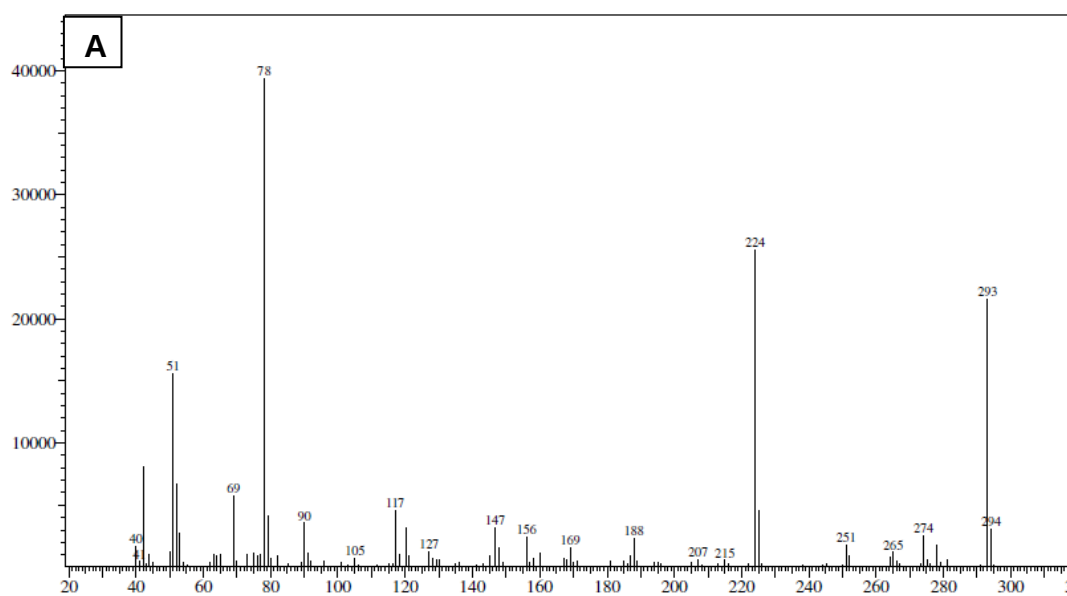
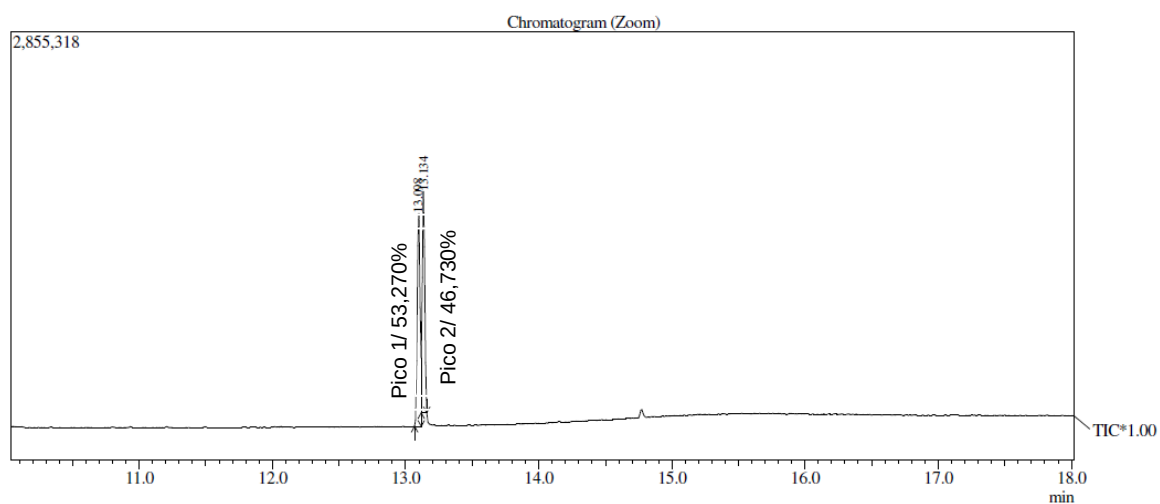


Figura 10: CG/EM do composto 7k e do composto 7kk.

No espectro de RMN de ^1H pode-se perceber a presença das duas moléculas **7k** e **7kk**, onde os sinais em negrito são referentes ao **7k** e o restante ao **7kk**. Assim, pode se verificar a presença de duas metilas e os sinais característicos da pirazol[1,5-a]pirimidina (H6 e H3), onde o hidrogênio H6 se observou-se um região mais blindada do espectro (Figura 11).

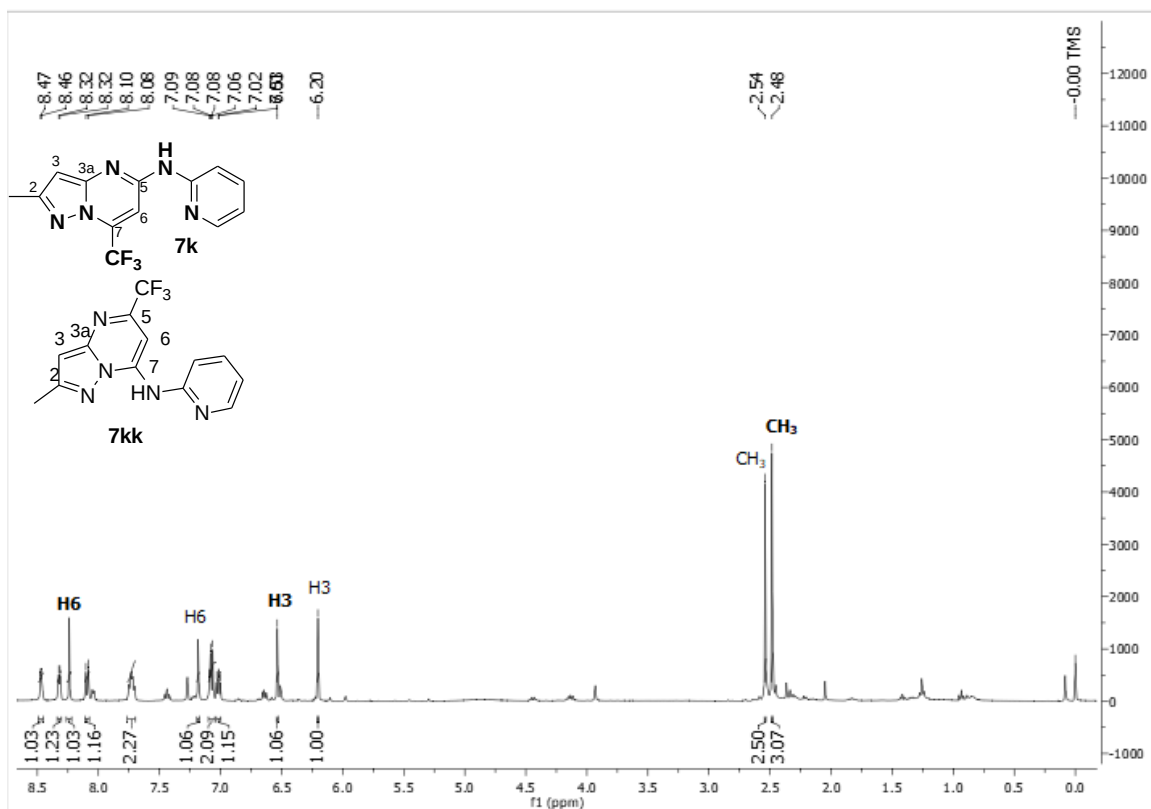


Figura 11: RMN ^1H do composto **7k** e **7kk** (em negrito sinal do **7k**)

No espectro de RMN de ^{13}C foi possível identificar todos os sinais das duas moléculas, sendo que os em negrito são relacionados a molécula **7k** e o restante a **7kk**. Na molécula **7k** verifica-se os sinais característicos do pirazolo[1-5-a]pirimidina e semelhantes a serie sintetizada **7a-i**. A metila apresentou-se em torno de 14,7 ppm, os sinais do carbono C6 são observados em 87,6 ppm na forma de um quarteto de $^3J = 4,9$ Hz e o carbono C3 é assinalado em 97,4 ppm. Também verifica-se dois sinais na forma de um quarteto, o C7 em 147,9 ppm com $^2J_{\text{C-F}} = 35$ Hz e o CF_3 em 122,4 ppm com $^1J_{\text{C-F}} = 175,4$ Hz. Enquanto, para o regioisomêro **7kk** verifica-se o sinal da metila em torno de 14,8 ppm, o sinal característico do C3 do pirazol C3 em 94,8 ppm, o carbono C6 apresenta-se em 98,5 ppm com $^3J_{\text{C-F}} = 4,9$ Hz. Do mesmo modo, essa molécula apresenta dois sinais na forma de quarteto, sendo o carbono C5 em 134,9 ppm com $^2J_{\text{C-F}} = 36,9$ Hz e outro em 119,0 ppm com $^1J_{\text{C-F}} = 191,7$ Hz correspondente ao CF_3 da molécula **7kk** (Figura 12).

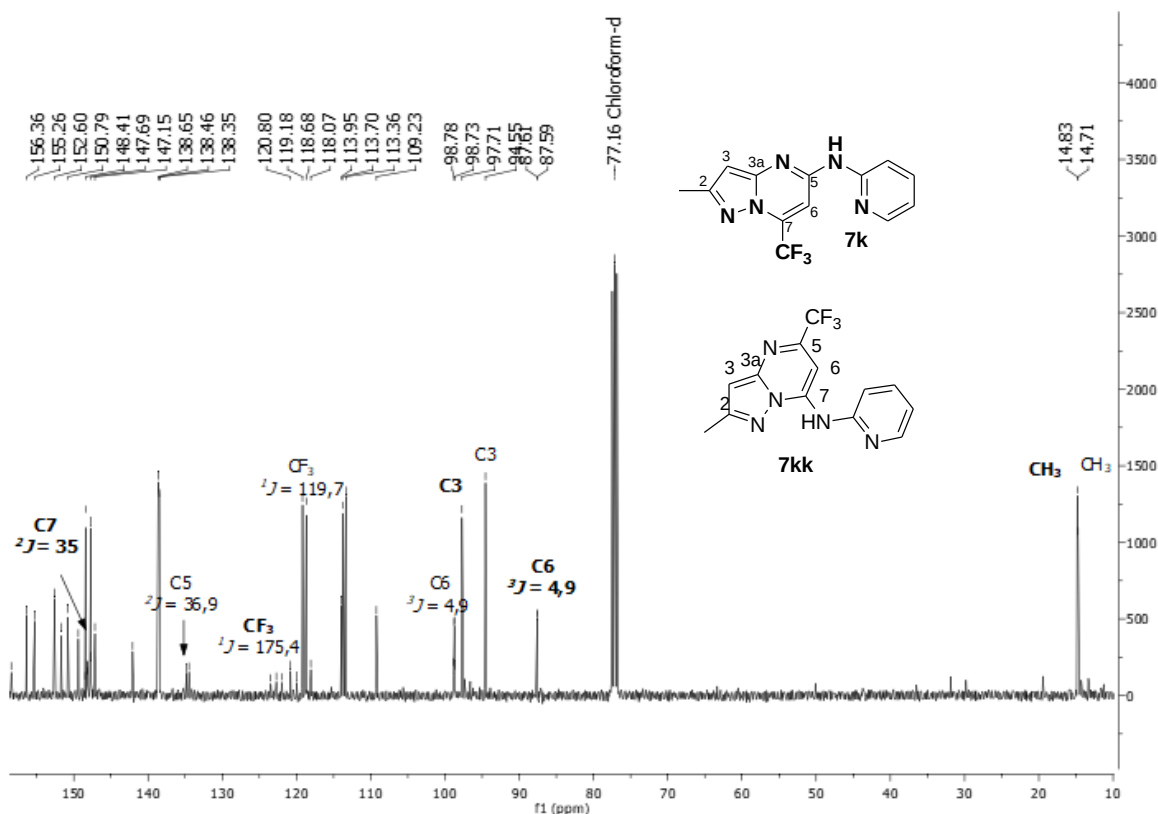
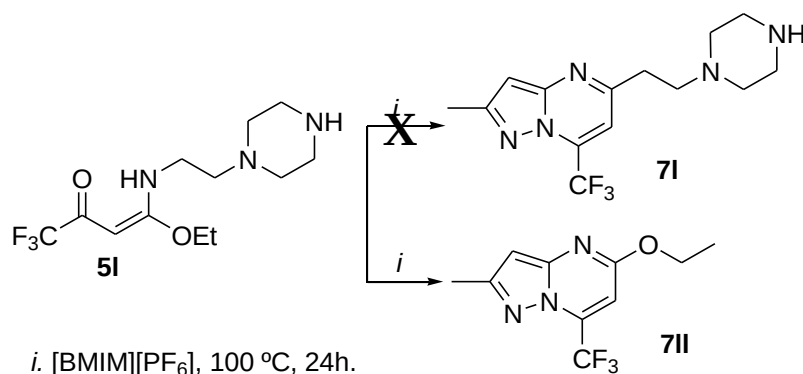


Figura 12: RMN ^1H do composto **7k** e **7kk** (em negrito sinal do **7k**) em CDCl_3 (400 MHz)

A molécula **7I** ($\text{R} = ((\text{piperazil})\text{etil})$) não foi obtida na condição de reação utilizada, sendo o composto observado observada a molécula 5-etoxi-2-metil-7-(trifluorometil) pirazolo[1,5-a]pirimidina **7II** com a maior área no cromatograma (42%) e confirmada no espectro de massas (Esquema 21).

Esquema 21.



Desse modo, foram sintetizados um total de nove compostos inéditos (**7a-i**), na grande maioria sólidos, com exceção do composto **7c**, que apresentaram ponto de fusão com valores variando de 70-143 °C. Suas fórmulas moleculares, pesos moleculares, rendimentos, pontos de fusão e coloração estão expostos na Tabela 4.

Tabela 4: Propriedades físicas, rendimentos e coloração dos pirazolo[1,5-a]pirimidina **7a-i**.

Comp.	Fórm. Mol (g/mol)	P.M. (g/mol)	Rend. ^a (%)	P.F. (°C)	Coloração
7a	C ₁₄ H ₁₈ F ₃ N ₅ O	329,15	50	95-97	Amarelo
7b	C ₁₆ H ₂₂ F ₃ N ₅	341,18	43	94-96	Laranja
7c	C ₁₅ H ₁₉ F ₃ N ₄	312,16	74	Óleo	Amarelo
7d	C ₁₃ H ₁₁ F ₃ N ₄ O	296,09	42	94-96	Âmbar
7e	C ₁₄ H ₁₂ F ₃ N ₅	307,10	77	140-143	Âmbar
7f	C ₁₄ H ₁₂ F ₃ N ₅	307,10	51	95-97	Laranja
7g	C ₁₄ H ₁₈ F ₃ N ₅	313,15	48	94-96	Amarelo
7h	C ₁₅ H ₁₃ F ₃ N ₄	306,11	40	70-73	Branco
7i	C ₁₄ H ₁₁ F ₃ N ₄	292,09	86	99-102	Verde

a = rendimento de composto isolado

Na análise por CG/EM de todas as substâncias há presença do íon molecular e o pico base é referente ao fragmento da amina ou do íon molecular. Para exemplificar, será apresentado a análise do composto **7e**, onde verificou cromatograma um pico de retenção 13 min. e 76 s. No EM aparece o íon molecular do composto **7e** ($m/z = 307$) (Figura 13), o segundo fragmento oriundo da porção da amina tendo $m/z = 201$ e o pico base de $m/z = 92$ é referente a 3-metilpiridina.

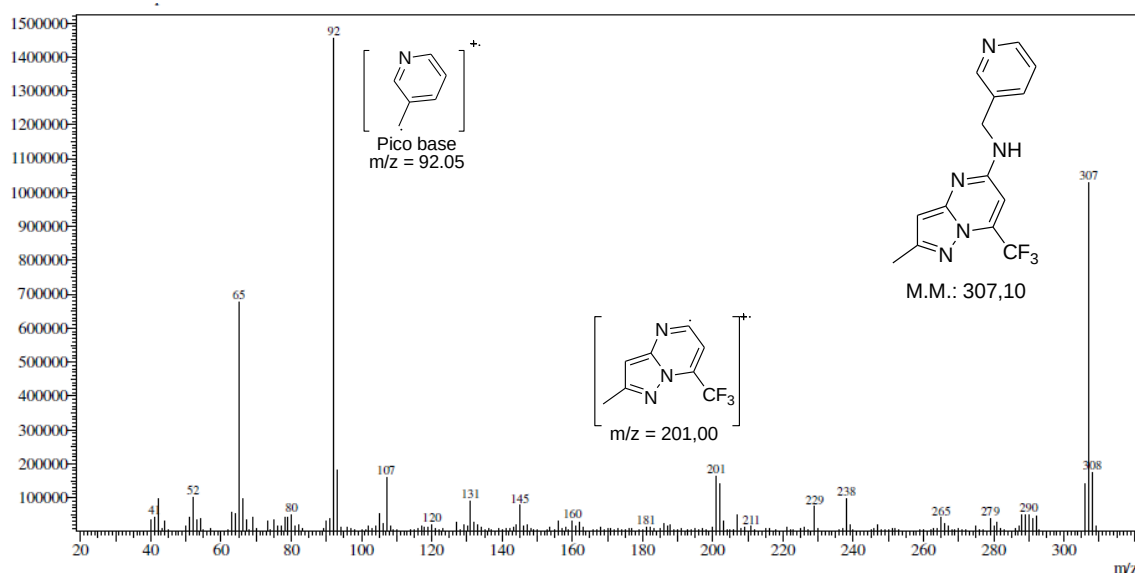
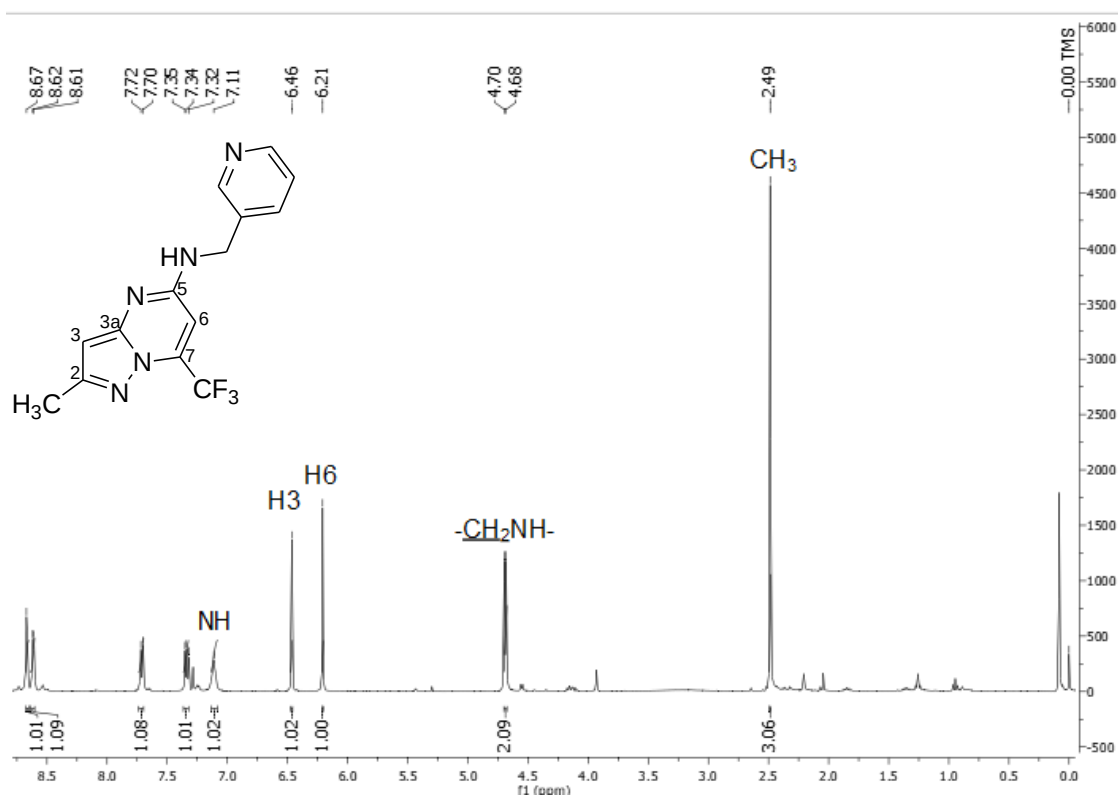


Figura 13: Espectro de massas (EM) do composto **7e**.

No espectro de RMN ^1H da molécula **7e** verificou-se a presença dos sinais dos hidrogênios H6 e H3 característicos do anel pirazolo[1,5-a]pirimidina. O hidrogênio do anel pirimidina H6 apareceu na forma de um simpleto em 6,21 ppm e o H3 do pirazol identificado como simpleto em 6,46 ppm. Além disso, foi identificado os hidrogênios da metila na forma de simpleto em 2,49 ppm, o metileno em forma de duplete em 4,69 ppm e hidrogênio do nitrogênio em 7,11 ppm na forma de sinal alargado (Figura 14).

**Figura 14:** Espectro de RMN de ^1H do composto **7e** em CDCl_3 (400 MHz).

Na Tabela 5 estão demonstrados os dados comparativos de RMN de ^1H para os sinais característicos dos compostos pirazolo[1,5-a]pirimidina **7a-i**. Os valores de deslocamentos para os hidrogênios NH, H3, H6 e $-\text{NHCH}_2-$ foram atribuído com auxílio de RMN 2D e como base em MARTINS *et al.*, (2009).

Tabela 5: Dados de RMN de ^1H dos principais deslocamentos químicos (ppm) dos pirazolo[1,5-a]pirimidina **7a-i**.

Composto	NH	H3	H6	$-\text{NHCH}_2-$
7^a	7,40	6,43	6,17	3,51

7b	7,26	6,38	6,09	3,53
7c	6,55	6,34	6,09	3,20
7d	6,96	6,44	6,36	4,61
7e	7,11	6,47	6,13	4,69
7f	7,74	6,46	6,24	4,75
7g	7,28	6,42	6,17	3,52
7h	7,01	6,42	6,21	4,60
7i	8,26	6,44	6,44	-

No espectro de RMN de ^{13}C da molécula **7e** os sinais que confirmaram a formação do anel fundido são os carbonos C2, C3 e C6. O carbono C2 está na região mais desblindada do espectro em 155,7 ppm, o C3 apareceu em 97,3 ppm e o C6 está em 80,8 ppm. O carbono referente ao grupo trifluorometil aparece na forma de um quarteto em 121,2 ppm ($^1J_{\text{C-F}} = 212,2 \text{ Hz}$), além disso verifica-se o sinal referente CH_2 ligado ao nitrogênio em torno de 43,9 ppm e o sinal referente ao metil em 14,6 ppm (Figura 15).

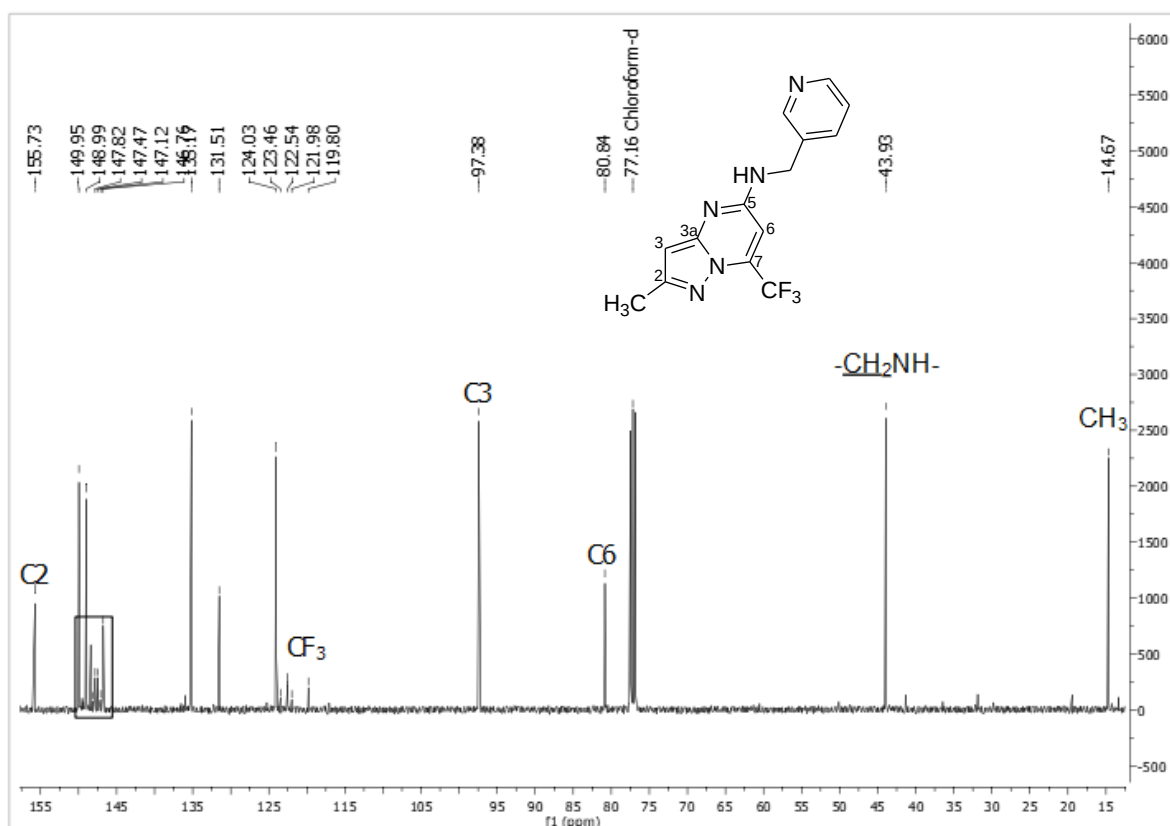


Figura 15: Espectro de RMN de ^{13}C do composto **7e** em CDCl_3 (100 MHz).

Na expansão de espectro apresentada na (Figura 16), encontra-se os sinais C3a, C7 e C5 que também caracterizam o composto **7e**. O carbono C3a tem um deslocamento químico em 148,4 ppm, o carbono C7 aparece na forma de um quarteto em 147,5 ppm ($^2J_{C-F} = 35,8$ Hz) e o carbono C5 tem um deslocamento em 146,7 ppm.

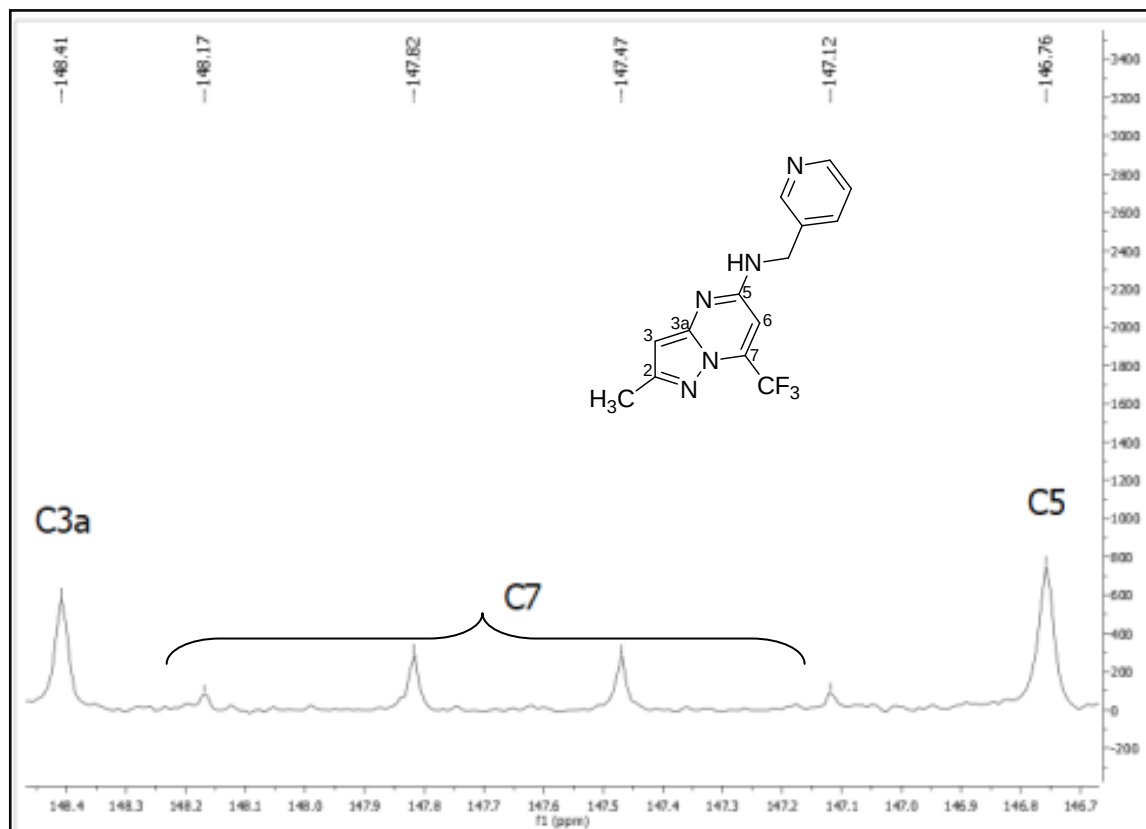


Figura 16: Expansão de espectro de RMN de ^{13}C do composto **7e**.

A Tabela 6 apresenta os deslocamentos químicos (ppm) dos dados comparativos de RMN de ^{13}C para os sinais característicos dos carbonos dos compostos pirazolo[1,5-a]pirimidina **7a-i**. Os valores dos deslocamentos para os carbonos C2, C3a, C7, C5, C3 e C6 referentes ao pirazolo[1,5-a]pirimidina foram assinalados com o auxílio de RMN 2D e de acordo com MARTINS *et al.*, (2009).

Tabela 6: Dados de RMN de ^{13}C dos principais deslocamentos químicos (ppm) das pirazolo[1,5-a]pirimidina **7a-i**.

Compostos	C2	C3a	C7	C5	C3	C6
7a	155,5	148,5	147,5	146,9	97,0	80,7
7b	154,9	148,6	147,4	147,3	96,4	80,1
7c	155,3	148,5	147,5	147,0	97,0	80,5

7d	155,6	148,9	147,8	146,7	97,2	80,9
7e	155,7	148,9	147,6	146,5	97,3	80,8
7f	155,7	149,1	147,6	147,1	97,1	81,1
7g	155,4	148,5	147,5	147,0	96,9	80,6
7h	155,5	148,4	147,5	146,9	97,0	80,9
7i	156,1	149,0	148,1	145,6	97,8	82,3

Também foram analisados os compostos **7e** e **7i** em ressonância magnética bidimensional de COSY(*homonuclear Correlation Spectroscopy*), HSQC(*Heteronuclear Single Quantum Correlation*) e HMBC(*Heteronuclear Multiple Bond Correlation*) para auxiliar no correto assinalamento dos sinais. Para demonstração foi escolhido o composto **7e**. No COSY foi observado o acoplamento espacial do H3 com o CH₃, comprovando seu sinal, além dos acoplamentos da parte aromática (Figura 17).

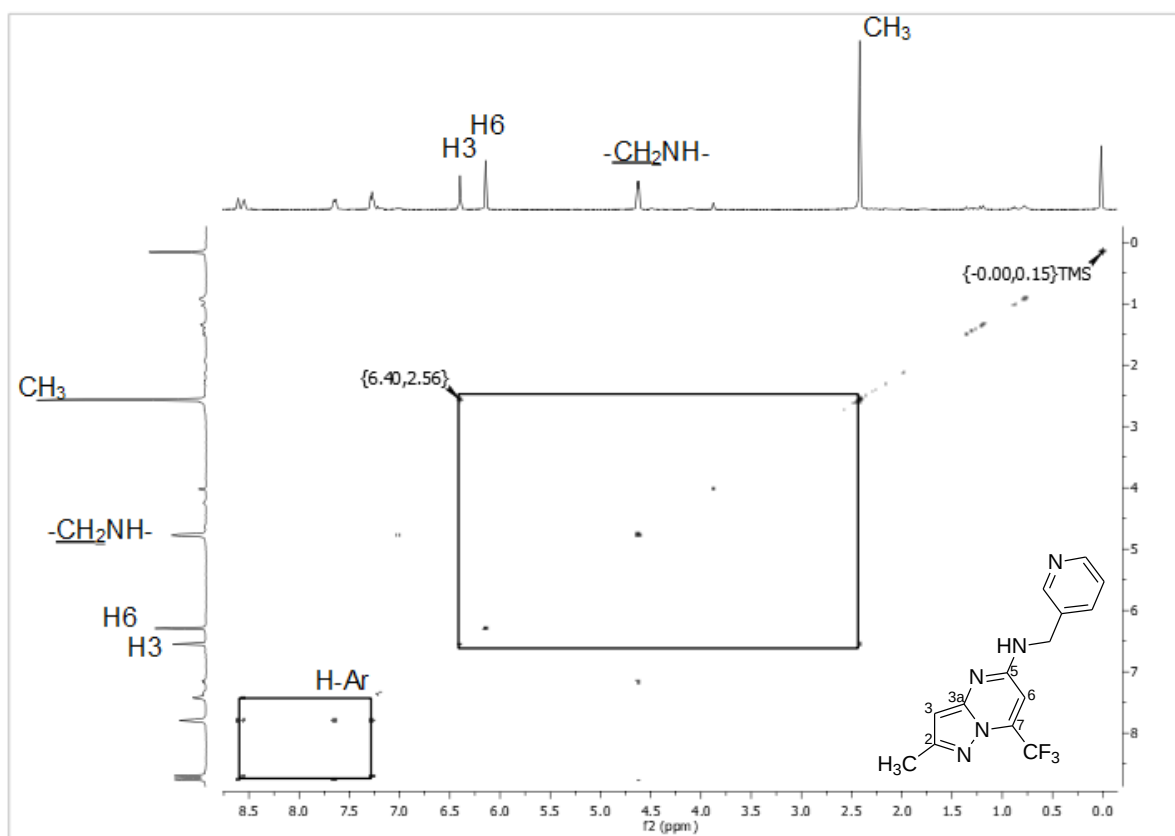


Figura 17: Espectro de RMN de COSY.

No espectro de HSQC foram observados os hidrogênios com seus respectivos carbonos, exemplificando para a molécula **7e**. Dar-se ênfase o C6 e C3,

que em MARTINS *et al.*, (2009) foi observado na respectiva ordem de deslocamento 104,9 e 96,2 ppm. Assim, no composto **7e** foi observado numa faixa diferente, onde o carbono C3 é mais desblindado em 98,2 ppm acoplando com o seu hidrogênio H3 em 6,44 ppm e o carbono C6 foi mais blindado em 80,5 ppm acoplando com o hidrogênio H6 em 6,17 ppm (Figura 18). Isso ocorre devido ao C6 e H6 estarem cercados de elétrons por causa dos seguintes vizinhos, CF₃ e o grupamento amina.

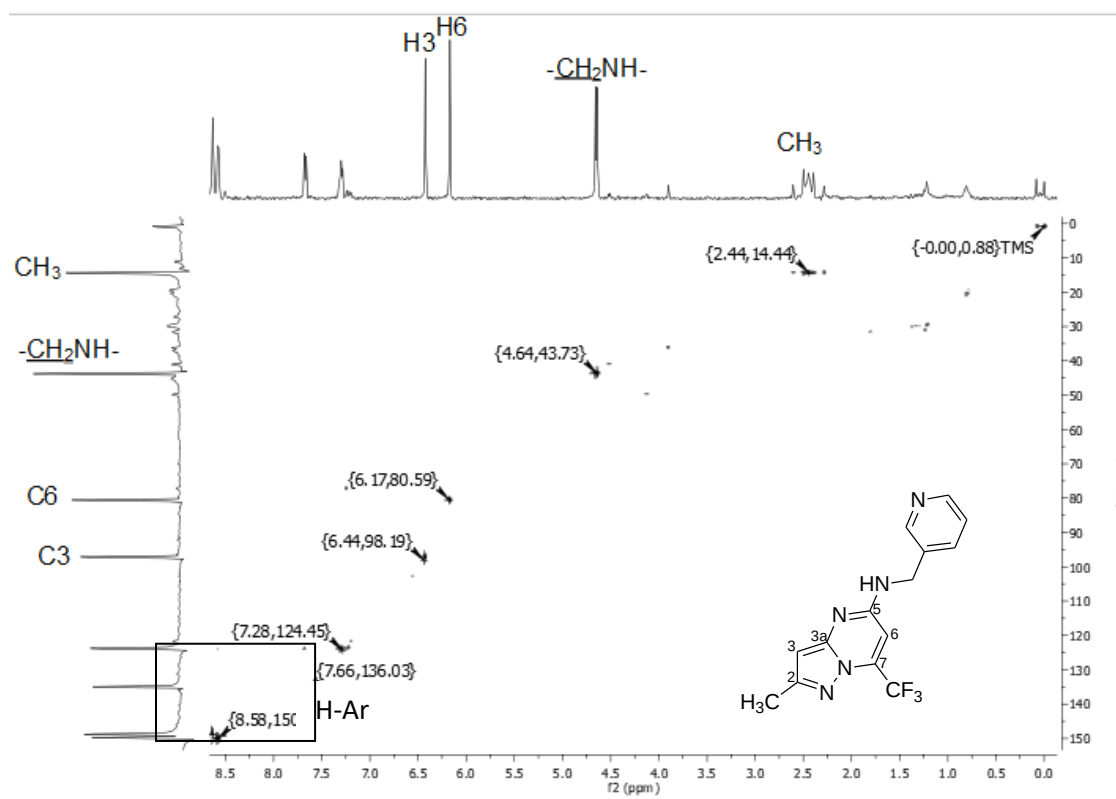


Figura 18: Espectro de RMN de HMQC_{H-C}.

Logo, no espectro de HMBC foram observados os acoplamentos entre carbono e os hidrogênios vizinhos novamente o H3 com interação com o CH₃ e o H6 com interação com o CF₃ (Figura 19A). Na expansão, figura 19B foi observada a interação do C5, C3a e C2 com o H3; do C5 e C7 com o H6; do C5 com o CH₂; C3a e C2 com o CH₃.

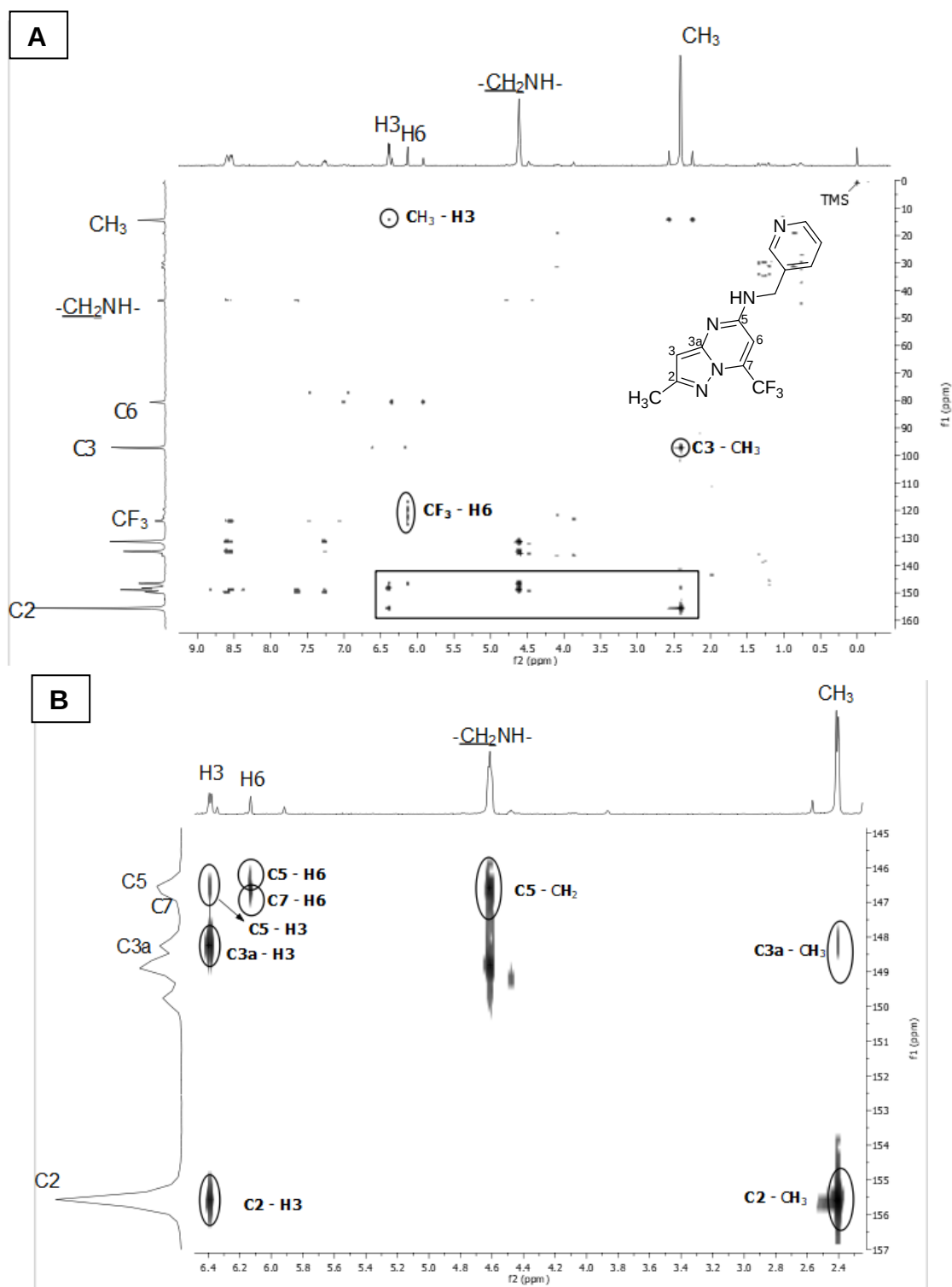
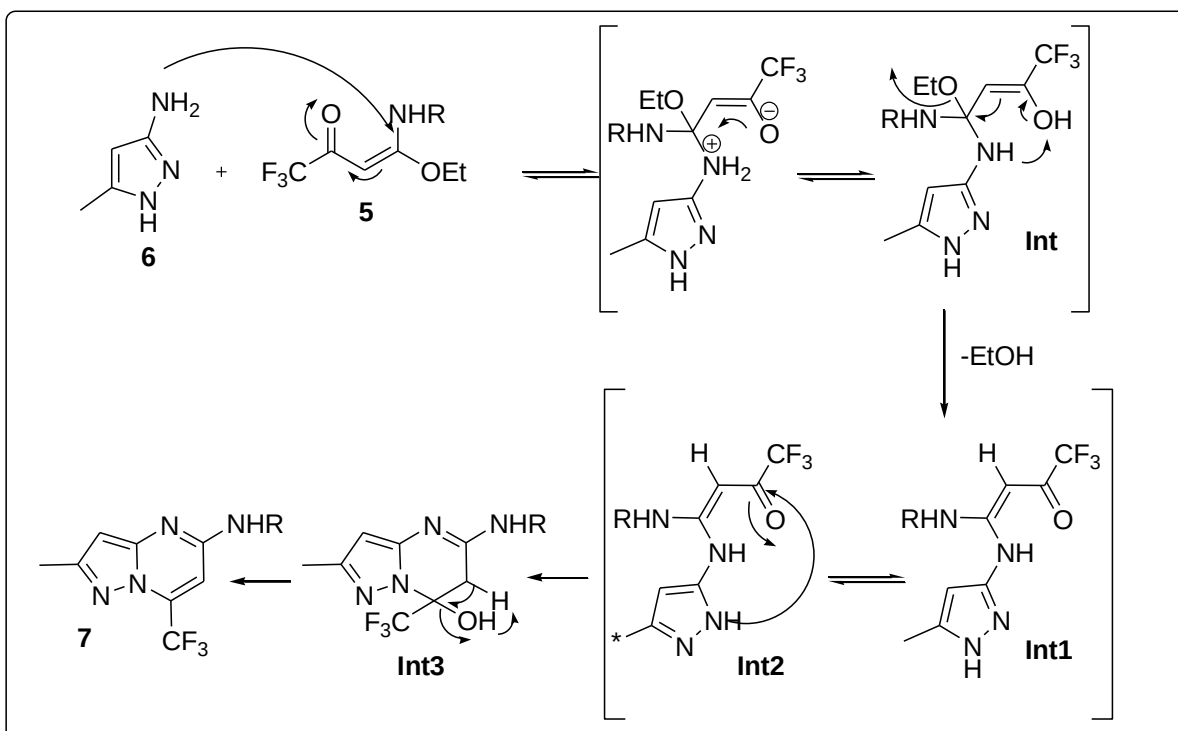


Figura 19: A) Espectro de RMN 2D de $\text{HMBC}_{\text{H-C}}$ em. **B)** Expansão do espectro de RMN de HMBC.

Para melhor compreensão da obtenção das pirazolo[1,5-a]piridimidina e o efeito do líquido iônico na reação, cálculos computacionais de estrutura eletrônica foram realizados. Foram estudados, através da teoria do funcional da densidade (DFT), a energia livre de Gibbs (ΔG) para o mecanismo proposto (Esquema 22) em

três diferentes sistemas: fase gasosa, em etanol e em líquido iônico. Nesse mecanismo ocorre o ataque inicial do nitrogênio do grupo amino ao carbono beta do composto **5** formando o intermediário (**Int**), posteriormente os pares de elétrons do oxigênio retornam e eliminando o grupo etoxi formando a enaminona intermediária (**Int1**). Após, ocorre a adição nucleofílica intramolecular do nitrogênio do anel pirazolínico ao carbono carbonílico (**Int2**) gerando o intermediário **Int3** que posterior a eliminação de uma molécula de água forma o composto **7**.

Esquema 22.



Mas observando a Figura 20, nota-se que não há uma diferença entre os ΔG quando adiciona-se o líquido iônico como solvente, tendo um ΔG similar às demais condições. Além disso, a energia de ativação, etapa lenta da reação ($5j+6 \rightarrow \text{Int}$), também não tem uma grande variação nas três condições. Pode-se propor que há uma influência da temperatura no mecanismo da reação.

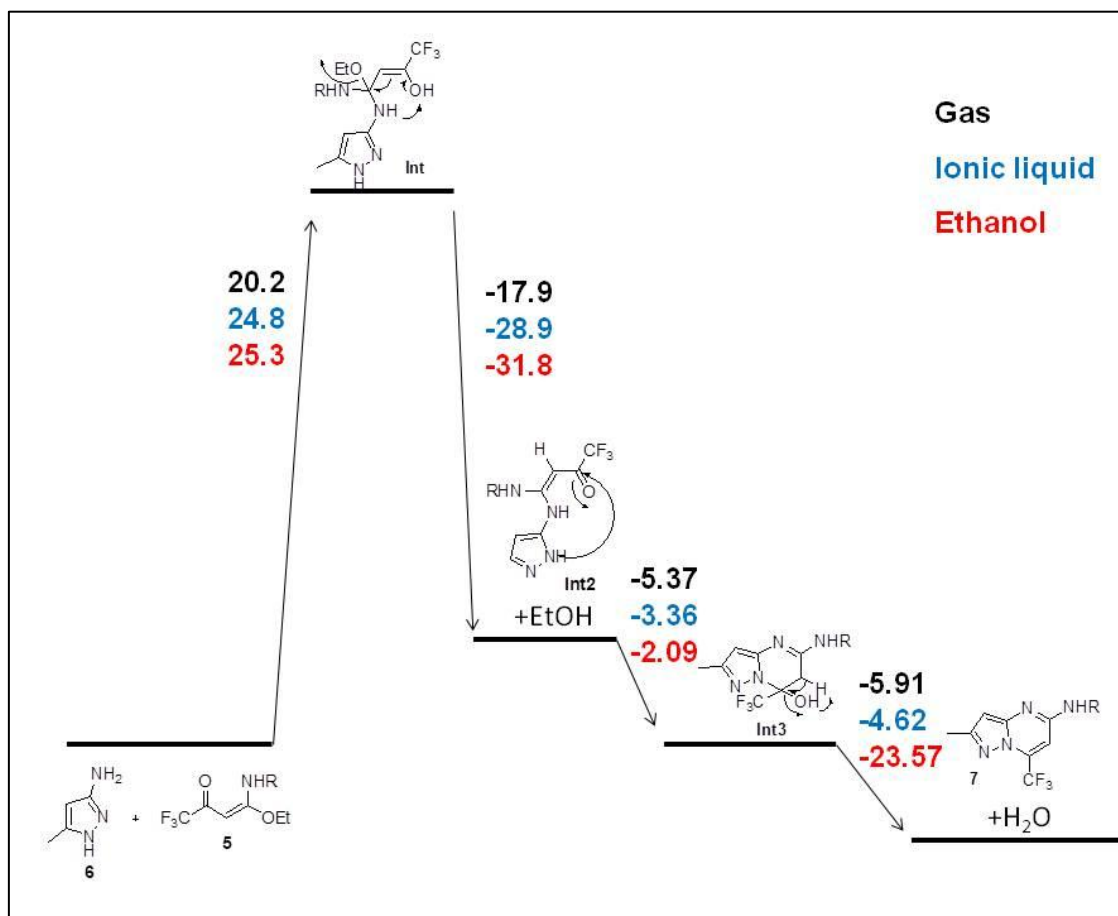


Figura 20: Diagrama de reação para a formação do composto 7 no nível de teoria B3LYP / def2-TZVP. Os valores de energia estão em kcal / mol.

Outra hipótese testada é que LI é catalisador da reação. Na Figura 20 identificou-se que o LI não diminui a energia de ativação, pois enquanto o valor de energia em etanol é 8,49 kcal/mol para líquido iônico é de 21,1 kcal/mol para forma o **Int1'**. Na Figura 21, calculou-se a variação de energia para uma etapa intermediária para formação do **Int2**. Nesta possível etapa, o efeito do líquido iônico como melhor solvente poderia ser comprovado ao estabilizar as cargas nos reagentes. Porém, a energia para formar **int1'**, tanto para formar **int3'** é maior com LI que com solvente etanol.

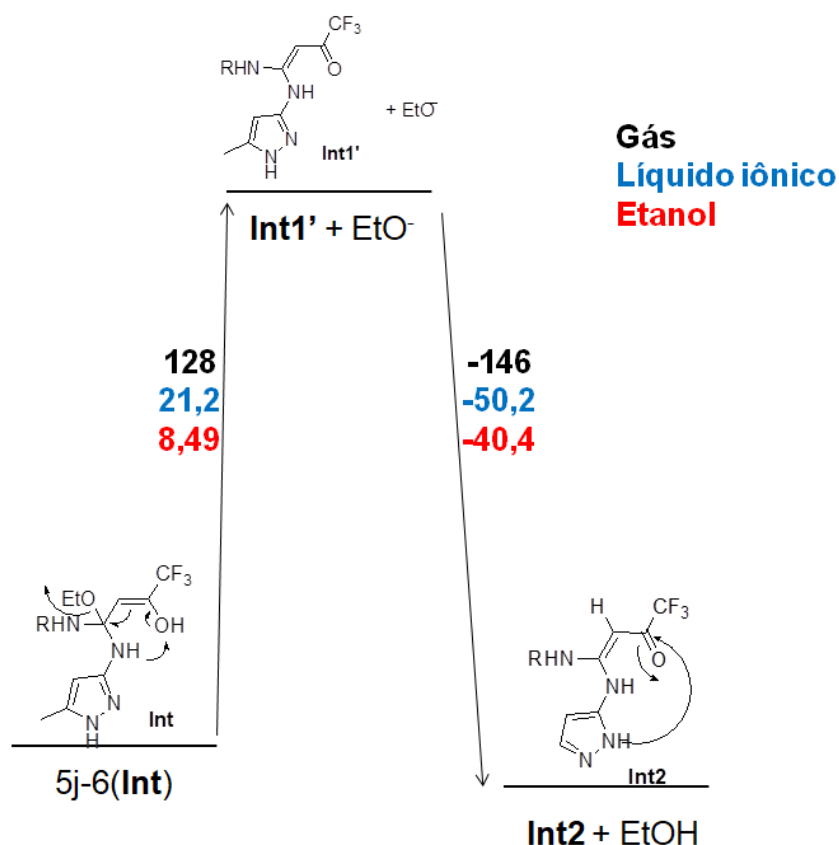
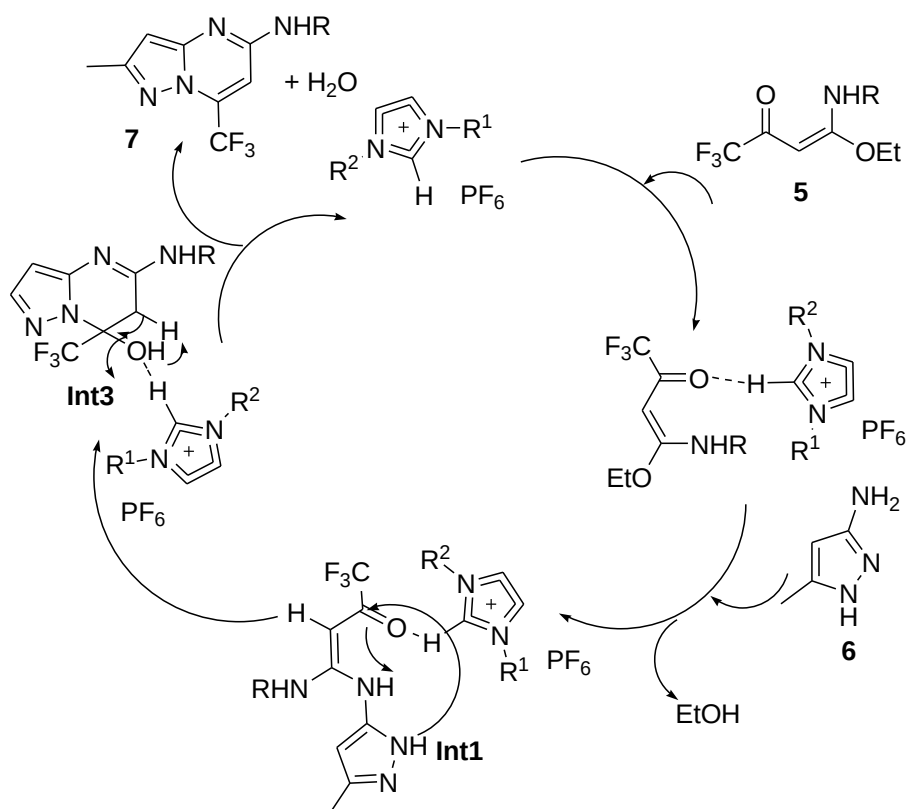


Figura 21: Diagrama de reação do composto **7**, intermediários **Int1'** (kcal/mol).

Este presente trabalho propõe o mecanismo para reação para a obtenção de **7** utilizando o líquido iônico ([BMIM][PF₆]) como mediador, com base em ROSTANIZADEH *et al.*, (2009). A primeira etapa é a formação de uma carbonila parcialmente positiva devido à amplificação pelo líquido iônico. A segunda etapa é o ataque de nitrogênio do composto **6** na β -carbonila formando **int1**. A terceira etapa é o ataque de nitrogênio do pirazol para ciclar o composto formando **int3**. A última etapa é a eliminação da água para formar o composto **7** e recuperar o líquido iônico (Esquema 23).

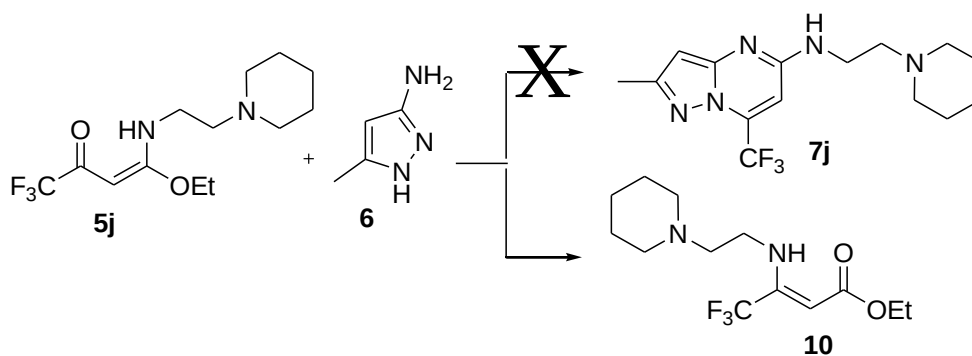
Esquema 23.



3.2. Síntese, identificação e estudo teórico de novo enaminoéster (10)

Conforme mencionado anteriormente, na reação para a formação do composto **7j** não observou a formação do produto desejado em nenhuma das condições reacionais testadas, observando-se a formação do composto etil4,4,4-trifluor-3-(2-(piperidin-1-il)etilamino)but-2-enoato **10**. Verificou-se a formação desse composto após uma purificação em cromatografia em coluna com eluente 8:2(hexano/acetato de etila) e a análise do espectro de RMN de ¹H e ¹³C (Esquema 24).

Esquema 24.



No espectro de RMN de hidrogênio observou uma mudança sutil na diferença de sinais entre β -enaminona **5j** e enaminoéster **10** (Figura 22). Essa diferença está na localização do sinal do hidrogênio do nitrogênio, H7, no espectro que no

composto **5j** está numa parte mais desblindada em torno de 10 ppm, enquanto que no composto **10** está numa parte mais blindada em torno de 8 ppm, como demonstra na Figura 18. Essa blindagem está associada a proximidade que esse hidrogênio está do grupo CF_3 na molécula **10**, que por consequência faz com que a ressonância dessa molécula seja menos eficiente do que no composto **5j**. Além disso, os pares de elétrons do oxigênio também estão ocupados com o substituinte etóxi, fazendo com que H7 fique mais blindando no espectro de RMN ^1H para na molécula **10** (Esquema 25).

Esquema 25.

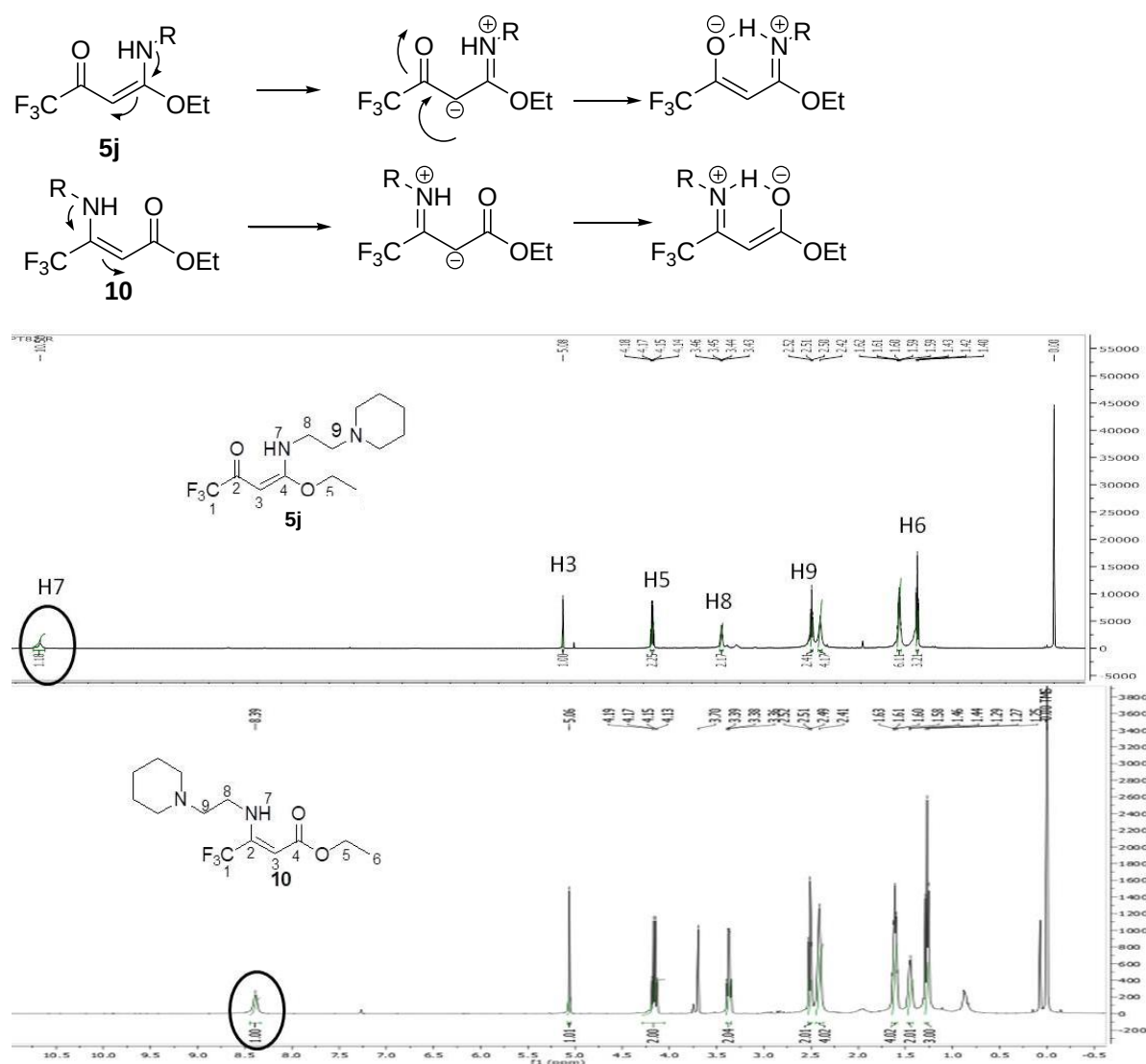


Figura 22. Comparação entre espectro de RMN ^1H em CDCl_3 do composto **5j** e **10**.

No espectro de RMN de ^{13}C observou-se o carbono carbonílico ($\text{C} = \text{O}$) a 169,7 ppm. Existem dois quartetos que correspondem aos carbonos vinílicos a 147,0 ppm ($^2J_{\text{C-F}} = 30$ Hz) para C2 e 84,0 ppm ($^3J_{\text{C-F}} = 5$ Hz) ppm para C3. O espectro de

RMN de **10** foi comparado com o da β -enaminona **5j**. A principal diferença é o deslocamento químico de C2. O carbono C2 do β -enaminoéster **10** aparece a 163,5 ppm uma vez que o C2 da β -enaminona **5j** aparece como um quarteto a 174 ppm ($^2J_{C-F}$ = 32 Hz) devido ao acoplamento com flúor (Figura 23).

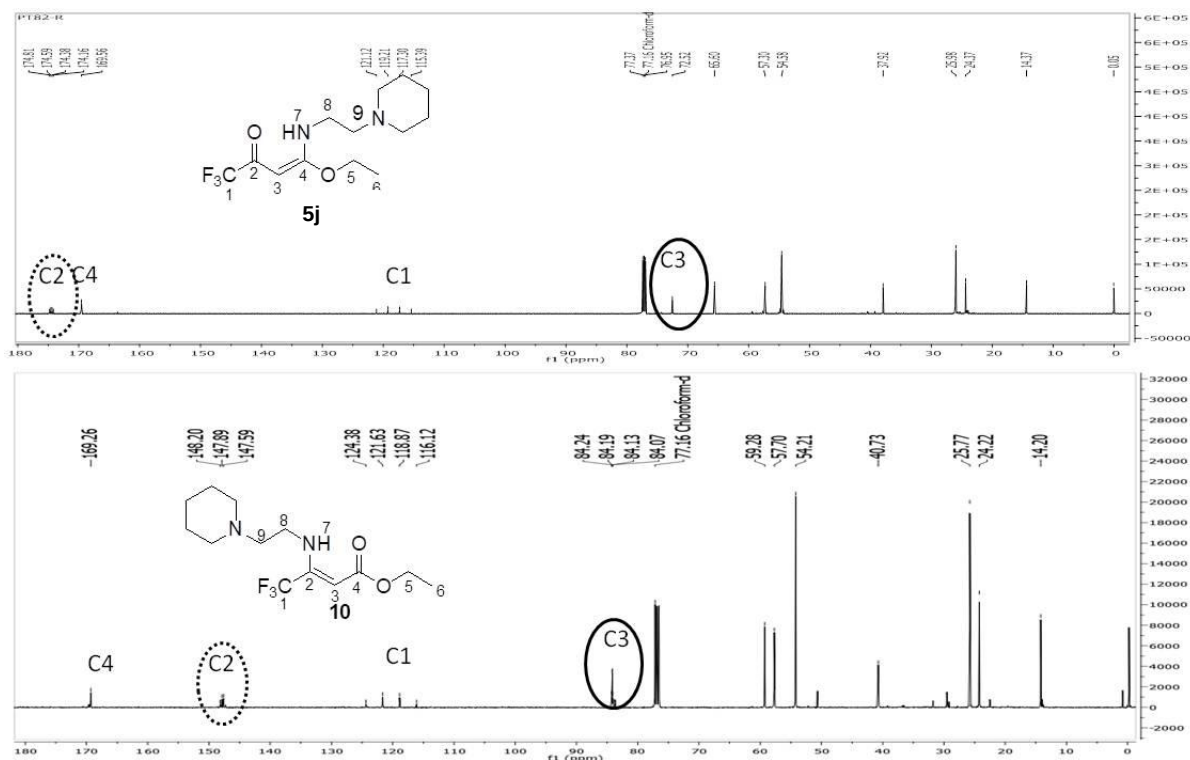


Figura 23. Comparação entre espectro de RMN ^{13}C em CDCl_3 do composto **5h** e **10**.

Assim, a hipótese de ser um isômero do composto **5j** foi confirmada no RMN bidimensional COSY, HSQC e HMBC. No espectro de COSY (anexo III) confirmou a interação dos hidrogênios presentes na estrutura **5j**. Já, o espectro da análise de HSQC, foi importante pra identificar os sinais característicos da molécula e principalmente, confirmar que o C3 na faixa de 80 ppm que está relacionado com o seu H3 na faixa de 5,2 ppm (Figura 24).

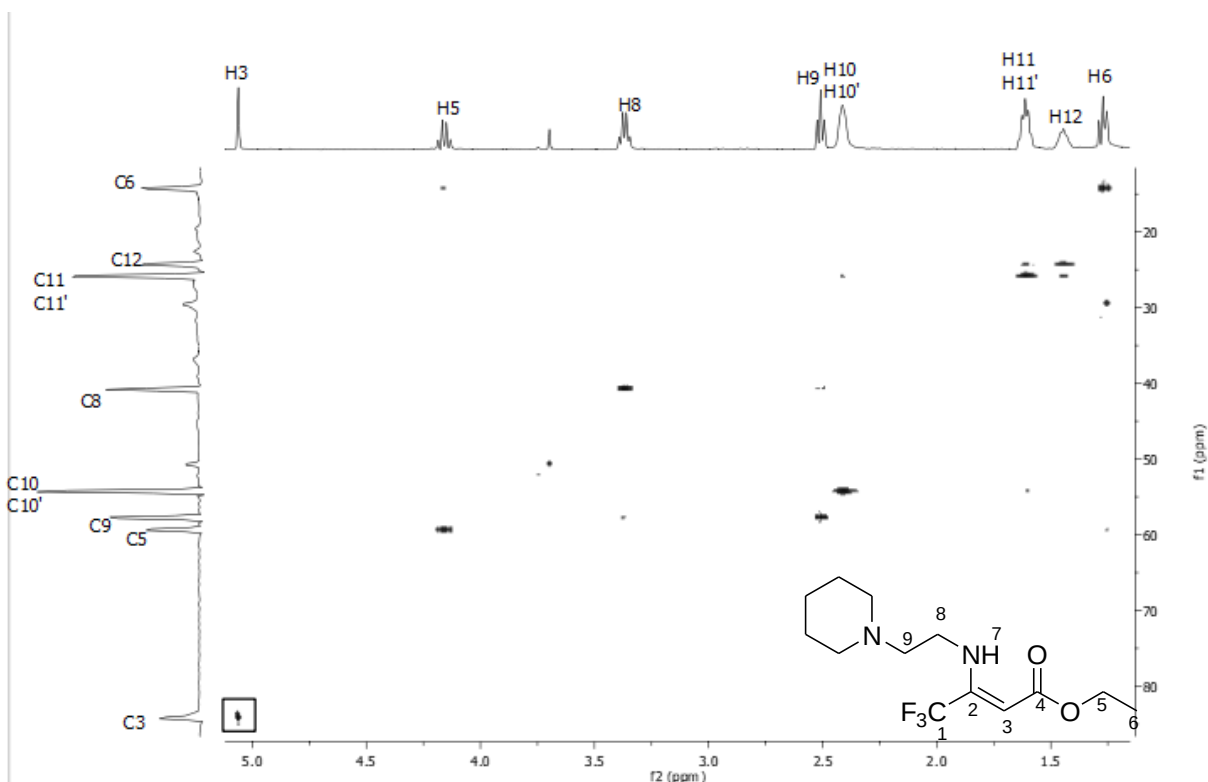


Figura 24. Espectro de RMN em CDCl_3 bidimensional - HSQC da molécula **10** em CDCl_3 .

E no espectro da análise de HMBC verificou-se que H5 está acoplado como C4, confirmado que a estrutura do éster e que houve uma isomerização, modificando a molécula (Figura 25, quadrado A). Pode observar que o H3 está interagindo com C8 e C2, sendo já esperado e por fim, o H8 está acoplado com o C2 (Figura 25, quadrado B), assim conclui-se que é mesmo a estrutura da molécula.

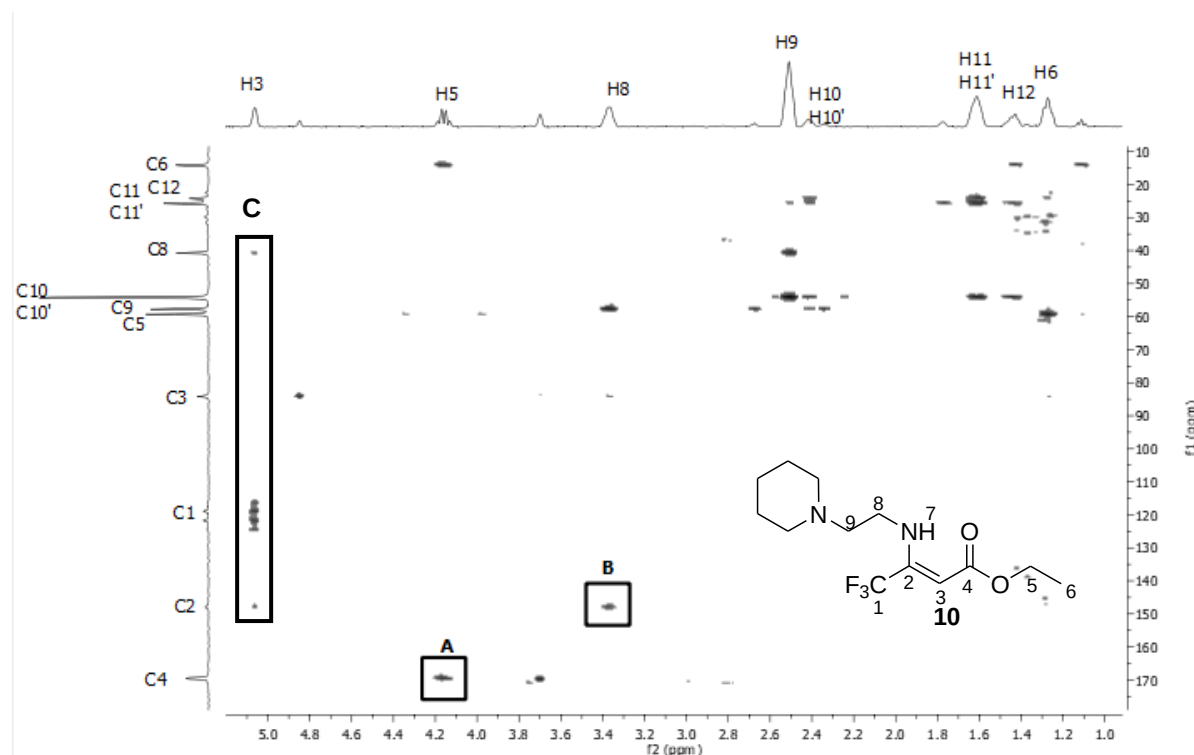


Figura 25. Espectro de RMN bidimensional - HMBC da molécula **10**.

O etil-4,4,4-trifluoro-3-(2-(piperidin-1-na)etilamina)but-2-enoato **10** foi obtido com rendimento de 10% quando utilizou-se pirazol **6**, e rendimento de 31% quando utilizou-se o etil-3-amino-4-carboxilpirazol com menos solvente (Tabela 7, linha 1 e 2). Com outros solventes, como ácido acético e acetonitrila, não houve aumento no rendimento (Tabela 7, linha 3 e 4). Utilizado tolueno com ácido acético como solvente não houve formação de produto **10** e nem utilizando outro tipo de base volumosa, como 2-aminopiridina **8** (Esquema 26).

Esquema 26.

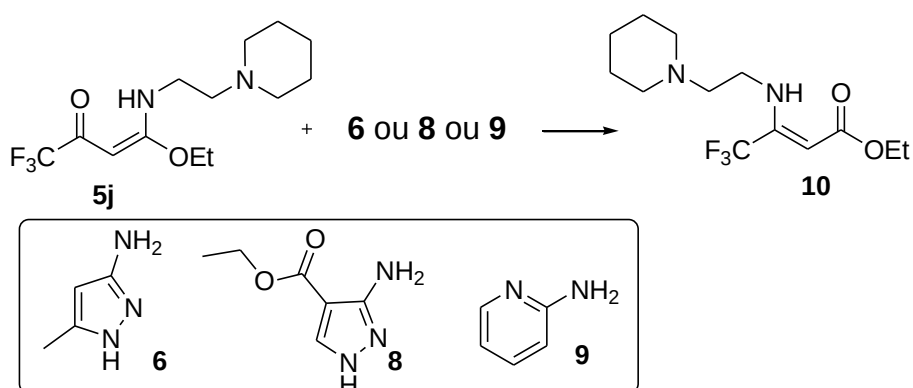
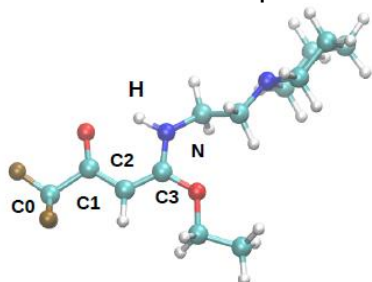


Tabela 7: Condições reacionais para o composto **10** em 72h.

Linha	Reagente	Solvente	Temperatura (°C)	Catalisador	Rendimento (10)
1	6	Etanol	78	-	10%
2	8	Etanol	78	-	31%
3	8	Ácido Acético	118	-	11%
4	8	Acetonitrila	82	-	9%
5	8	Tolueno	110	Ácido Acético	-
6	9	Etanol	78	-	-

– Não foi observado produto

Utilizou-se cálculos de estrutura eletrônica via DFT para propor um mecanismo de reação. Inicialmente foram empregados vários esquemas de análises populacionais e análise das densidades eletrônicas nos orbitais de fronteira como descritores moleculares para a reação. Os valores parciais das cargas Hirshfeld, ADCH e CM5 calculados são apresentados na Tabela 8. Valores mais positivos de carga podem ser associados à maior chance de um ataque nucleofílico. Demonstra-se, através dos valores parciais de ADCH e CM5, a possibilidade de um hidrogênio sofrer um ataque, sendo suscetível à extração.

Tabela 8: Valores parciais de Hirshfeld, ADCH e CM5 calculados para a molécula **5j**.

	Hirshfeld	ADCH	CM5
C0	0,269133	0,358467	0,326973
C1	0,092435	0,152131	0,128275
C2	-0,144915	-0,364401	-0,186954
C3	0,158003	0,184711	0,250379
H	0,102350	0,186325	0,311636
N	-0,070391	-0,148641	-0,429217

Analisou-se também a densidade eletrônica nos orbitais de fronteira HOMO (orbital ocupado de mais alta energia) e LUMO (orbital desocupado de mais baixa energia), que podem ser associados à reatividade da molécula. A distribuição de carga no anel da amina em HOMO foi maior do que na parte da enaminona. Enquanto, no LUMO demonstra a densidade de carga em direção a carbonila e a dupla ligação (Figura 26). Assim, pode-se dizer que há grande possibilidade de o próton do nitrogênio ser abstraído para o começo da reação de isomerização.

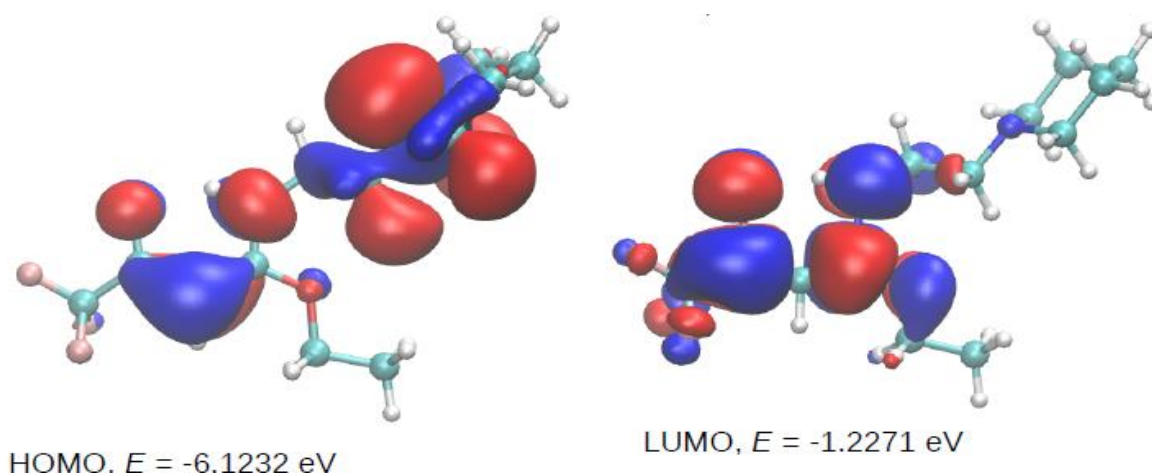
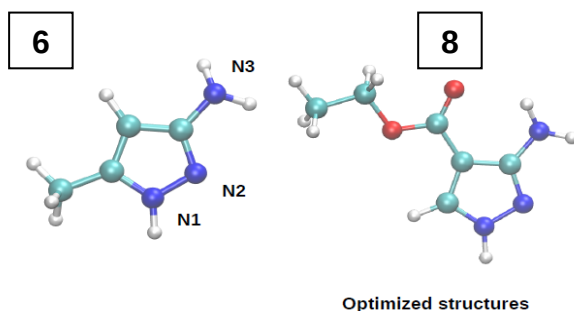


Figura 26: Orbitais moleculares de HOMO e LUMO da molécula **5j**.

Os valores parciais de Hirshfeld, ADCH e CM5 calculados para pirazóis (**6** e **8**) são apresentados na Tabela 9. Valores mais negativos de carga indicam uma maior chance do átomo realizar um ataque nucleofílico. Através desses valores observa-se uma maior carga negativa no nitrogênio N3. Pelo método CM5 o mais reativo tem melhor eficiência para essa reação.

Tabela 9. Valores parciais de Hirshfeld, ADCH e CM5 calculados para a molécula **6** e **8**.



N1	N2	N3
----	----	----

Hirshfeld	6	-0,022982	-0,201873	-0,180891
	8	-0,003597	-0,194882	-0,156799
ADCH	6	0,223758	-0,511142	-0,557136
	8	-0,281927	-0,387014	-0,549679
CM5	6	-0,310894	-0,316451	-0,616311
	8	-0,296378	-0,307766	-0,602894

Também foi analisada a distribuição de carga no anel dos pirazóis via orbitais de fronteira. No HOMO foi deslocalizada entre todo o anel. Enquanto, no LUMO demonstra a densidade de carga também deslocalizada no anel (Figura 27).

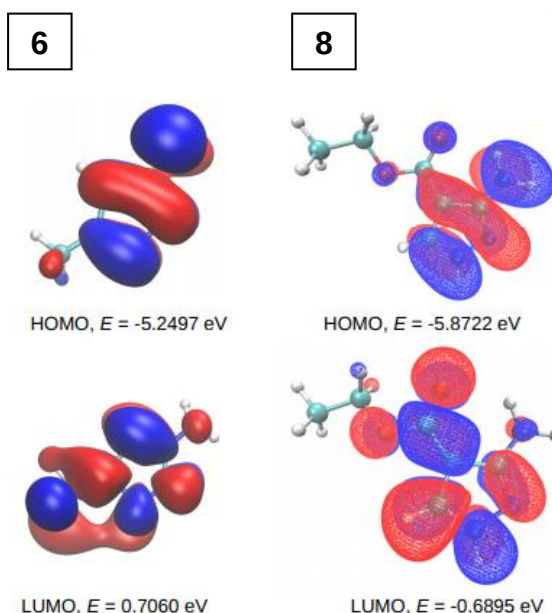
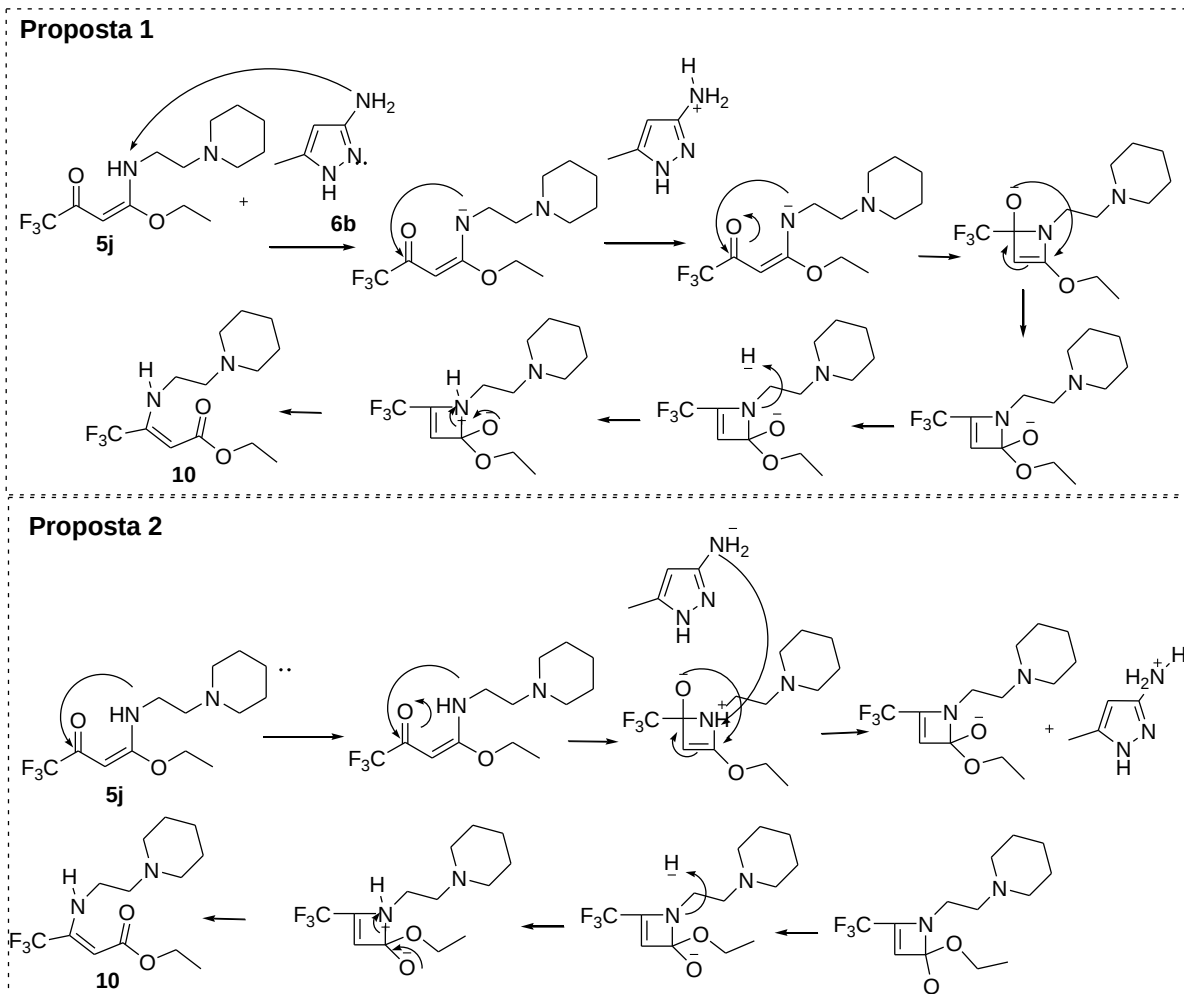


Figura 27: Orbitais moleculares HOMO e LUMO da molécula **6** e **8**, respectivamente.

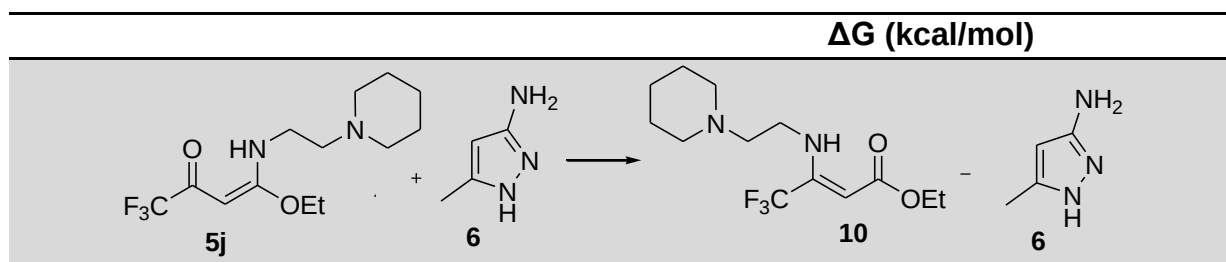
Com isso, este trabalho propôs dois mecanismos. No primeiro, o pirazol **6** desprotona o hidrogênio do nitrogênio da substância **5**, o ânion formado sofreria ciclização, levando ao intermediário cíclico, após o anel se abriria com inversão de grupos (Esquema 27, proposta 1). Na segunda proposta, ocorreria o ataque do nitrogênio na carbonila primeiro formando o ciclo, após o pirazol retiraria o hidrogênio do nitrogênio, por fim abriria o anel (Esquema 26, proposta 2). Porém, não se obteve estruturas estáveis dos intermediários propostos nas simulações de estrutura eletrônica, sugerindo que esses não são de fato intermediários dessa reação, demonstrando a necessidade de mais estudo dessa reação.

Esquema 27



O produto **10** foi encontrado quando foi realizada reação com solvente etanol e também quando foi utilizado o líquido iônico. Assim foram calculadas energias livres de Gibbs (ΔG) que estão apresentadas na Tabela 10 para compreender a formação desse produto em comparação à formação do produto **7**. Ambos são processos espontâneos, e como a reação para formar o composto **7** tem um ΔG mais negativo o composto é considerado o produto termodinâmico, enquanto o composto **10** pode ser considerado o produto cinético.

Tabela 10: Energia livre de Gibbs para reação de formação do composto **10** e **7**.



	Gás	-7,43
	EtOH	-2,98
	Líquido iônico	-3,32
	Gás	-8,92
	EtOH	-12,2
	Líquido iônico	-12,1

Conclui-se que o aumento de temperatura ajudou a produzir os compostos **7a-i** de forma eficiente. Em contrapartida, quando é utilizada a β -enaminona **5j** há uma tendência para a formação do produto cinético.

3.3. Avaliação da atividade antglioma e citotoxicidade

O tratamento do glioblastoma é um sério desafio para os cientistas e é eficaz e bem-sucedido o mais rápido possível. Com isso, várias moléculas têm sido descritas como potencialmente inibidoras de várias células de glioma (UZIEL et al., 2005). Na literatura, os derivados de pirazol têm demonstrado propriedade antiproliferativa muito eficaz *in vivo* e têm atividade antitumoral *in vivo* em modelos animais (Liu et al., 2020). Assim, com ajuda de um laboratório parceiro, Laboratório de Neuroquímica, Inflamação e Câncer (Neurocan), foi realizado teste em linhagem celular de rato no qual mostrou potencial inibidor de crescimento de quatro pirazol [1,5-a]pirimidinas (**7b**, **7g**, **7f** e **7i**) contra células C6 em uma dose dependente da dose. Os resultados da triagem a 25, 50, 100, 175 e 200 μ M em 72h de exposição são mostrados na Figura 28, como porcentagem de viabilidade celular considerando a média do grupo de controle DMSO como 100%. O composto **7i** (20%) foi o único que apresentou diferença estatística em relação ao controle positivo DMS em 25 μ M. No entanto, os compostos **7b** (30%), **7f** (25%) e **7g** (25%) também mostraram atividade inibidora em células tumorais em 100 μ M.

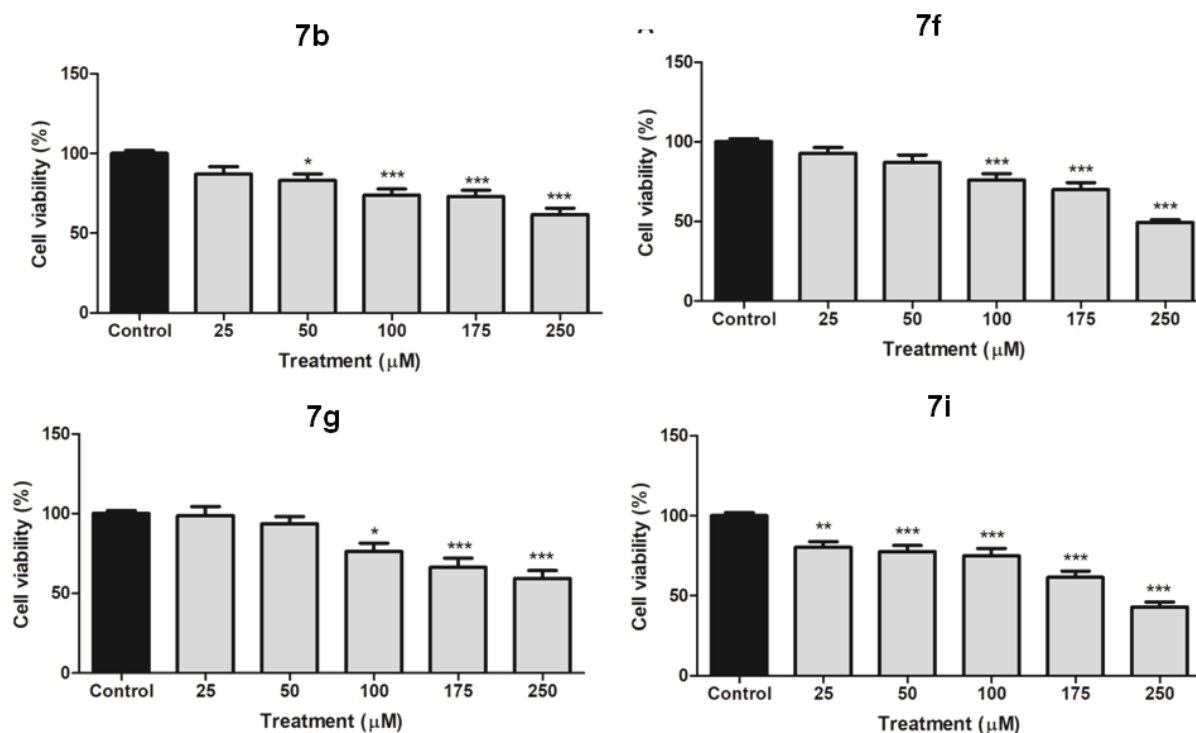


Figura 28: Resultados de teste em linha celular de glioblastoma C6 em rato. *

P<0,01; ** P<0,001; *** P<0,0001

Portanto, todas as moléculas têm potenciais como alvos para a atividade antiglioma, sendo o melhor resultado o composto **7i**, com um substituinte fenil. Além disso, observou-se que o composto **7i** não possui cadeia de carbono no substituinte 5-amino e nota-se que a uma concentração de 100 μM reduziu 40% das células C6. Na literatura em WERRY *et al.*, (2017) relataram que algumas pirazolo[1,5-a]piridina acetamidas substituídas por vários éteres alquílicos com grupo benzila induzem efeitos pró-apoptóticos e citostáticos de 4,3 nM em células de glioblastoma humano. Neste trabalho também foi evidenciado que o aumento da cadeia carbônica nessas moléculas paea 6 carbonos induz a apoptose das células antiglioma. Isso foi verificado no resultado do composto **7b** com substituinte 3- (piperidin-1-il) propil) amina que reduziu a viabilidade celular em concentrações de 100 uM (30%) e 50 uM (15%).

Além disso, foi avaliado o efeito citotóxico de todos os compostos por meio do ensaio de MTT em células primárias de astrócitos. A Figura 29 mostra que quatro compostos (**7b**, **7g**, **7f** e **7i**) não apresentaram diferenças estatísticas quando comparado ao controle DMSO em 72h a 250 μM. Assim, é possível afirmar que esses compostos não foram citotóxicos para células saudáveis do sistema nervoso central.

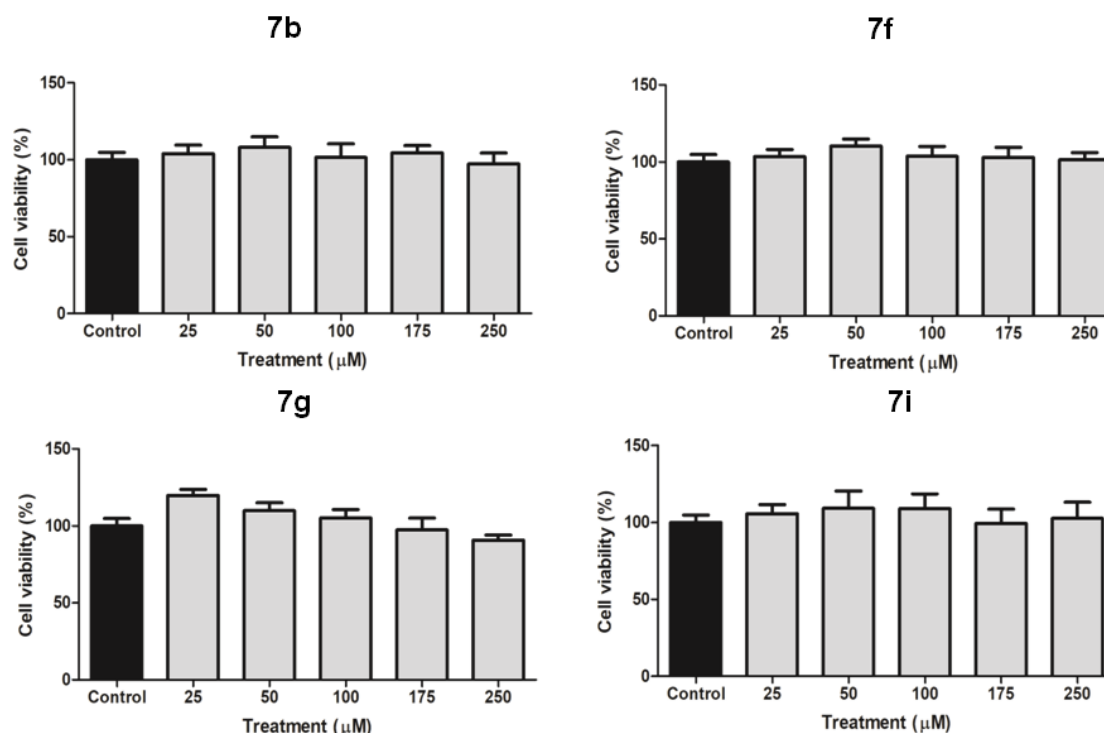


Figura 29: Resultados de citotoxicidade em linhagem celular astrócitos.

4. Conclusão

De acordo com os objetivos apresentados neste trabalho, pode-se concluir que foi eficiente a síntese devido a ser possível obter nove pirazolo[1,5-a]pirimidinas **7a-i** inéditas na literatura com rendimentos de moderados a excelentes (42-86%). Também foi identificado um novo enaminoéster **10**, inédito na literatura, a partir de isomerização de uma β -enaminona **5j** com rendimento de 31%. No trabalho foi estudado proposta de mecanismo para o composto **7**, chegando a um mecanismo no qual o líquido iônico, atua como mediador, em conjunto com reagentes formam um complexo e isso favorece o acontecimento da reação. Por fim, as análises de CG/EM e RMN ^1H , ^{13}C e análises bidimensionais de RMN comprovaram a formação dos produtos esperados. No laboratório Neurocan, foram realizados testes de atividade antiglioma e de citotoxicidade em astrócitos em quatro compostos da série **7** (**7b**, **7g**, **7f** e **7i**) e demonstraram a não citotoxicidade até 250 μM e potencial atividade antiglioma, sendo o melhor resultado para o composto **7i** reduzindo a linhagem celular de glioblastoma em 20% na concentração 25 μM .

5. Materiais e métodos

5.1. Reagentes e Solventes utilizados

Os reagentes e os solventes utilizados para síntese dos compostos desta dissertação foram de qualidade técnica ou P.A.

5.2. Equipamentos utilizados

5.2.1. Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

Os cromatogramas e os espectros de massas foram obtidos pela Universidade Federal de Pelotas, em um aparelho de *Shimadzu GCMS-QP2010-Plus*, com injetor automático *CG-MS-QP2010SE System AOC-20i*, coluna RDS-5MS 30m x 0,32 mm x 0,25 μ m.

5.2.2. Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear

Os dados de ^1H e ^{13}C , foram obtidos na Universidade Federal de Pelotas, no aparelho Bruker BioSpin (400,13 MHz para ^1H e 100,62 MHz para ^{13}C em tubos de 5 mm, temperatura de 298K, concentração 0,05M em clorofórmio deuterado (CDCl_3) ou dimetilsulfóxido per-deuterado ($\text{DMSO}-d_6$) como solvente, utilizando tetrametilsilano (TMS) como referência interna. As condições usadas no espectro foram: 400,13 MHz para ^1H e 100, 62 MHz para ^{13}C ; largura do pulso 11,7 μ s para ^1H e 11,2 μ s para ^{13}C ; tempo de aquisição 6,5 para ^1H e 7,6 para ^{13}C . A interpretação dos espectros ocorreu por meio do programa *Magnetic Resonance Companion* (MestReC e MestReCNova).

5.2.3. Medidor de ponto de fusão

Os pontos de fusão das β -enaminonas e pirazolo[1,5-a]pirimidina foram realizados no laboratório LaQuiABio da Universidade Federal de Pelotas e determinados em um aparelho da marca Fisatom, com três tubos capilares, modelo 430, 230 V, 60 Hz, 50 W. Termômetro até 360 °C. Averiguaram-se os pontos de fusão para os compostos sólidos.

5.3. Métodos experimentais

5.3.1. Procedimento para síntese de 1,1,1-trifluor-4,4-dietoxi-but-3-em-2-ona (3)

Baseado em (HOJO; MASUDA; KAMITORI, 1976) em um balão de 100 mL contendo clorofórmio (20 mL), foi adicionado 30 mmol de trietilortoacetato **1** e 68 mmol de piridina, sob agitação magnética e temperatura de 0° C. Após, com o funil de adição foi gotejada no balão 61 mmol de anidrido trifluoroacético **2** diluído em clorofórmio (10 mL), a mistura foi mantida sob agitação a temperatura ambiente por

24 h. A mistura reacional foi lavada com solução gelada saturada de bicarbonato de sódio 10% (NaHCO₃, 1x 10 mL). A fase orgânica foi lavada com água destilada gelada (H₂O, 2x 10 mL), seca com sulfato de magnésio (MgSO₄), filtrada e o solvente foi removido através do evaporador rotativo. A β -dietoxi **3** foi obtida sem necessidade de purificação.

¹H RMN (600 MHz, CDCl₃) δ (ppm, J_{H-H}= Hz): 5,78(s, 1H, H₃); 4,29(q, 2H, H₅, ³J=7,0); 4,21(q, 2H, H₇, ³J= 7,1); 1,37(t, 3H, H₆, ³J= 7,0); 1,30(t, 3H, H₈, ³J= 7,1). ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ (ppm, J_{C-F}= Hz): 163,6(C₄); 153,2(q, C₂, ²J= 33,4); 119,7(q, C₁, ¹J= 277,3); 102,5(q, C₃, ³J= 3,5); 71,7(C₅); 60,8(C₇); 15,1(C₆); 14,1(C₈). MS m/z(%): 212 (M⁺, 2); 185 (1); 157 (1); 144 (2); 115 (25); 87 (100).

5.3.2. Procedimento para síntese de β -enaminonas (5a-g e 5j-l)

Baseado em GOULART, (2017) em um balão de 50 mL, sob agitação magnética foi adicionado 2 mmol do composto **3** e 15 mL de acetonitrila HPLC, em seguida foi gotejada a solução de 2,1 mmol de aminas substituídas com 15 mL do mesmo solvente. O sistema permaneceu a temperatura ambiente e sob agitação durante 18 horas. Em seguida, a mistura reacional foi lavada com água destilada (H₂O, 6x 10 mL), extraída com clorofórmio (20 mL), a fase orgânica foi seca com sulfato de magnésio (MgSO₄), filtrada e o solvente foi removido através do evaporador rotativo. Os produtos foram obtidos sem necessidade de purificação e por fim, foram analisados por Cromatografia Gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG/EM) e ressonância magnética nuclear (RMN) de hidrogênio ¹H e ¹³C.

(E)-4-etoxi-1,1,1-trifluor-4-((2-morfolinoetil)amino)-but-3-en-2-ona, (**5a**).

¹H RMN (600 MHz, CDCl₃) δ (ppm, J_{H-H}= Hz): 10,55(sl, 1H, H₇); 5,09(s, 1H, H₃); 4,17(q, 2H, H₅, ³J= 7,0); 3,74(t, 4H, H₁₁ e H_{11'}, ³J= 4,4); 3,45(q, 2H, H₈, ³J= 5,8); 2,56 (t, 2H, H₉, ³J= 6,2); 2,49(sl, 4H, H₁₀ e H_{10'}); 1,42 (t, 3H, H₆, ³J= 7,0). ¹³C RMN (150 MHz, CDCl₃) δ (ppm, J_{C-F}= Hz): 174,5(q, C₂, ²J= 32,4); 169,5(C₄); 118,1(q, C₁, ¹J_{C-F}= 288,1); 72,5(C₃); 66,7(C₁₁ e C_{11'}); 65,5(C₅); 56,7(C₉); 53,4(C₁₀ e C_{10'}); 37,2 (C₈); 14,3 (C₆). EM m/z (%): 249 (M⁺-47, 2); 139 (1); 129 (1); 114 (2); 112 (2); 100 (100).

(E)-4-etoxi-1,1,1-trifluor-4-((3(piperidin-1-il)propil)amino)-but-3-en-2-ona, (**5b**).

¹H RMN (600 MHz, CDCl₃) δ (ppm, J_{H-H}= Hz): 10,55(sl, 1H, H₇); 5,09(s, 1H, H₃); 4,17(q, 2H, H₅, ³J= 7,0); 3,38(q, 2H, H₈, ³J= 6,4); 2,47-2,53(m, H₉, H₁₀ e H_{10'}); 1,72(quint, 2H, H₁₃, ³J= 7,0); 1,41(t, 3H, H₆, ³J= 7,0); 1,02(t, 6H, H₁₁, H_{11'} e H₁₂, ³J= 7,1). ¹³C RMN (150 MHz, CDCl₃) δ (ppm, J_{C-F}= Hz): 174,3(q, C₂, ²J= 27,2);

169,5(C4); 118,3(q, C1, $^1J_{C-F}$ = 287,7); 72,4(C3); 65,4(C5); 49,9(C9); 46,7(C10 e C10'); 38,7(C8), 26,9(C13); 14,2(C6); 11,5(C11 e C11'); 11,4(C12). EM m/z (%): 308 (M+, 10); 279 (20); 196 (5); 141 (100); 110 (5); 98 (100).

(E)-4-((ciclohexilmetil)amino)-4-etoxi-1,1,1-trifluor-but-3-en-2-ona, (**5c**).

1H RMN (600 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm, J_{H-H} = Hz): 10,64(sl, 1H, H7); 5,10(s, 1H, H3); 4,16(q, 2H, H5, 3J = 7,0); 3,18(t, 2H, H8, 3J = 6,3); 1,72 - 1,76(m, 4H, H10 e H10'); 1,51 - 1,54(m 1H, H9); 1,41(t, 3H, H6, 3J = 7,0); 1,15 - 1,27(m, 4H, H11 e H11'); 0,94 - 1,00(m, 2H, H12).

^{13}C RMN (150 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm, J_{C-F} = Hz): 174,4(q, C2, 2J = 32,51); 169,6(C4); 118,4(q, C1, $^1J_{C-F}$ = 287,6); 72,5(C3); 65,4(C5); 46,6(C9); 37,7(C8); 30,6(C10 e C10'); 26,1(C12); 25,7(C11 e C11'); 14,2(C6). EM m/z (%): 279 (M+, 60); 250 (70); 210 (80); 197 (40); 182 (50); 55 (100).

(E)-4-etoxi-1,1,1-trifluor-4-((furan-2-ilmetil)amino)-but-3-en-2-ona, (**5d**).

1H RMN (600 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm, J_{H-H} = Hz): 10,63(sl, 1H, H7); 7,19 - 7,28(m, 1H, furil); 6,24 - 6,25(m, 1H, furil); 6,17(d, 1H, furil, 3J = 2,8); 5,05(s, 1H, H3); 4,42(d, 2H, H8, 3J = 5,7); 4,12(q, 2H, H5, 3J = 7,0); 1,36(t, 3H, H6, 3J = 7,0). ^{13}C RMN (150 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm, J_{C-F} = Hz): 175,0(q, C2, 2J = 32,9); 169,5(C4); 149,7 e 142,6(furil); 117,5(q, C1, $^1J_{C-F}$ = 287,7); 110,3 e 107,8(furil); 72,7(C3); 65,8(C5); 37,3(C8); 14,1(C6). EM m/z (%): 263 (M+, 10); 234 (10); 96 (30); 81 (100); 69 (15).

(E)-4-etoxi-1,1,1-trifluor-4-((piridin-3-ilmetil)amino)-but-3-en-2-ona, (**5e**).

1H RMN (600 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm, J_{H-H} = Hz): 10,82(sl, 1H, H7); 8,48(d, 2H, piridina, 3J = 2,7); 7,56(d, 1H, piridina, 3J = 7,8); 7,23(dd, 1H, piridina, 3J = 4,8 e 3J = 7,8); 5,08(s, 1H, H3); 4,46(d, 2H, H8, 3J = 6,9); 4,10(q, 2H, H5, 3J = 7,0); 1,36(t, 3H, H6, 3J = 7,0). ^{13}C RMN (150 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm, J_{C-F} = Hz): 175,3(q, C2, 2J = 22,9); 169,8(C4); 149,0; 148,9; 135,1; 132,5; 123,6 (py); 117,9 (q, C1, $^1J_{C-F}$ = 287,8); 72,7(C3); 65,9(C5); 41,8(C8); 14,1(C6). EM m/z (%): 274 (M+, 20); 245 (20); 229 (1); 205 (20); 177 (30); 92 (100).

(E)-4-etoxi-1,1,1-trifluor-4-((piridin-2-ilmetil)amino)-but-3-en-2-ona, (**5f**).

1H RMN (600 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm, J_{H-H} = Hz): 11,04(sl, 1H, H7); 8,52(d, 1H, piridina, 3J = 4,4); 7,60(td, 1H, piridina, 4J = 1,5 e 3J = 7,7); 7,16(d, 1H, piridina, 3J = 7,8); 7,14(dd, 1H, piridina, 3J = 5,2 e 3J = 7,1); 5,09(s, 1H, H3); 4,60(d, 2H, H8, 3J = 5,5); 4,10(q, 2H, H5, 3J = 7,0); 1,31(t, 3H, H6, 3J = 7,0). ^{13}C RMN (150 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm, J_{C-F} = Hz): 175,0(q, C2, 2J = 32,8); 169,6(C4); 155,5; 149,5; 136,8; 122,4;

120,9(piridina); 118,0(q, C1, $^1J_{C-F}$ = 288,1) ;72,6(C3); 65,7(C5); 45,7(C8); 14,1(C6). EM m/z (%): 274 (M+, 40); 245 (10); 229 (20); 205 (10); 107 (100); 93 (40).

(E)-4-etoxi-1,1,1-trifluor-4-((2-(pirrolidin-1-il)etil)amino)but-3-en-2-ona, (5g).

1H RMN (600 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm, J_{H-H} = Hz): 10,55(sl, 1H, H7); 5,09(s, 1H, H3); 4,17(q, 2H, H5, 3J = 7,0); 3,48(q, 2H, H8, 3J = 6,4); 2,70(t, 2H, H9, 3J = 6,7); 2,59(sl, 4H, H10 e H10'); 1,81(q, 4H, H11 e H11', 3J = 4,8); 1,42(t, 3H, H6, 3J = 7,0). ^{13}C RMN (150 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm, J_{C-F} = Hz): 174,5(q, C2, 2J = 32,5); 169,5(C4); 118,3(q, C1, $^1J_{C-F}$ = 287,9); 72,5(C3); 65,5(C5); 54,6(C9); 54,1(C10 e C10'); 39,5(C8); 23,5(C11 e C11'); 14,3(C6). EM m/z (%): 233 (M+-47, 5); 139 (1); 113 (2); 97 (2); 97 (2); 84 (100).

(E)-4-etoxi-1,1,1-trifluor-4-((2-(piperidin-1-il)etil)amino)-but-3-en-2-ona, (5j).

1H RMN (600 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm, J_{H-H} = Hz): 10,55(sl, 1H, H7); 5,8(s, 1H, H3); 4,16(q, 2H, H5, 3J = 7,0); 3,44(q, 2H, H8, 3J = 6,1); 2,51(t, 2H, H9, 3J = 6,6); 2,42(sl, 4H, H10 e H10'); 1,60(dt, 4H, H11 e H11', 3J = 5,5 e 3J = 11,1); 1,42(t, 3H, H6, 3J = 7,0). ^{13}C RMN (150 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm, J_{C-F} = Hz): 174,5(q, C2, 2J = 32,4); 169,5(C4); 118,2(q, C1, 1J = 288,1); 72,5(C3); 66,5(C5); 57,3(C9); 54,5(C10 e C10'); 37,9(C8); 25,9(C11 e C11'); 24,3(C12), 14,3(C6). EM m/z (%): 295 (M+, 1); 249 (1); 164 (1); 150 (1); 139 (1); 98 (100).

(E)-4-etoxi-1,1,1-trifluoro-4-((piridin-2-il)amino)-3-buten-2-ona, (5k).

1H RMN (600 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm, J_{H-H} = Hz): 12,36(sl, 1H, H7); 8,36 - 8,37(m, 1H, py); 7,66 - 7,69(m, 1H, piridina); 7,52(d, 1H, piridina, 3J = 8,3 Hz); 7,07(dd, 1H, piridina, 3J = 4,9); 5,26(s, 1H, H3); 4,32(q, 2H, H5, 3J = 7,0); 1,54(t, 3H, H6, 3J = 7,0). ^{13}C RMN (150 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm, J_{C-F} = Hz): 176,1(q, C2, 2J = 33,4); 167,1(C4); 149,8;148,7; 138,0; 119,4; 115,1(piridina); 112,4(q, C1, $^1J_{C-F}$ = 288,8); 73,7(C3); 66,6(C5);14,0(C6). EM m/z (%): 260 (M+, 1); 245 (1); 215 (1); 191 (1); 121 (60); 78 (100).

(E)-4-etoxi-1,1,1-trifluor-4-((2-(piperazin-1-il)etil)amino)-but-3-en-2-ona, (5l).

1H RMN (600 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm, J_{H-H} = Hz): 10,47(sl, 1H, H7); 5,02(s, 1H, H3); 4,09(q, 2H, H5, 3J = 7,0); 3,37(q, 2H, H8, 3J = 6,0); 2,90(t, 4H, H10 e H10', 3J = 4,8); 2,49 (t, 2H, H9, 3J = 6,3); 2,44(sl, 4H, H11 e H11'); 1,35(t, 3H, H6, 3J = 7,0). ^{13}C RMN (150 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm, J_{C-F} = Hz): 174,5(q, C2, 2J = 32,57); 169,4(C4); 118,1(q, C1, $^1J_{C-F}$ = 288,1); 72,4(C3); 65,5(C5); 56,6(C9); 52,3(C10 e C10'); 45,5(C11 e C11'); 37,3(C8); 14,2 (C6). EM m/z (%): 296 (M+, 10); 250 (1); 113 (10); 110 (5); 99 (100); 85 (2).

5.3.3. Procedimento para síntese de β -enaminonas (5h-i)

Baseado em STEFANI *et al.*, (2005) em um balão de 25 mL, sob agitação magnética foi adicionado 5 mmol do composto **3** e 5 mL de água, em seguida foi gotejada a solução de 5,5 mmol de aminas substituídas com 5 mL do mesmo solvente em temperatura ambiente. A mistura foi colocada em banho de gelo por 40 minutos. Em seguida, a mistura reacional foi extraída com acetato de etila (15 mL), lavada com água (2 x) e a fase orgânica foi seca com sulfato de magnésio (MgSO₄), filtrada e o solvente foi removido através do evaporador rotativo. Os produtos foram obtidos através de cristalização em água gelada e por fim, foram analisados de cromatografia Gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG/EM) e por ressonância magnética nuclear (RMN) de hidrogênio ¹H e ¹³C.

(E)-4-(benzilamino)-4-etoxi-1,1,1-trifluorobut-3-en-2-ona (**5h**)

¹H RMN(400 MHz, CDCl₃) δ (ppm, J_{H-H} = Hz): 10,85(sl,1H,NH); 7,35(m, 5H, Ph); 5,14(s, 1H, H3); 4,51(d, 2H, H8, ¹J = 4,8); 4,17(q, 2H, H5, ²J = 7,0); 1,39(t, 3H, H6, ²J = 7,0). ¹³C RMN(100 MHz, CDCl₃) δ (ppm, J_{H-F} = Hz): 174,8(q, ¹J = 30, C2); 169,8(C4); 136,8; 128,9; 127,8; 127,5 (6c, Ph); 116,6 (q, ²J = 287, CF₃); 72,8(C3); 65,9(C5); 44,5(C8); 14,2(C6). EM m/z (%): 273 (5), 91(100), 69(100).

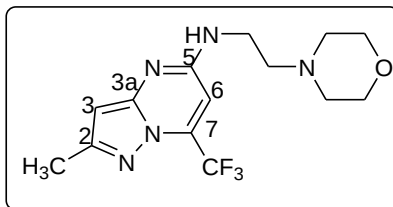
(E)-4-etoxi-1,1,1-trifluoro-4-(fenilamino)but-3-en-2-ona, (**5i**)

¹H RMN(400 MHz, CDCl₃) δ (ppm, J_{H-H} = Hz): 12,42(sl,1H,NH), 7,35(m, 5H, Ph), 5,28(s, 1H, H3), 4,28(q, 2H, H5, ²J = 7,0) 1,48(t, 3H, H6, ²J = 7,0). ¹³C RMN(100 MHz, CDCl₃) δ (ppm, J_{H-F} = Hz): 176,1(q, ¹J = 32, C2); 167,9(C4); 136,1; 129,3; 125,7; 122,3 (6c, Ph); 118,6 (q, ²J = 287, CF₃); 73,8(C3); 66,4(C5); 14,2(C6). EM m/z (%): 259 (8), 93(100), 69(50).

5.3.4. Procedimento para síntese de pirazolo[1,5-a]pirimidina

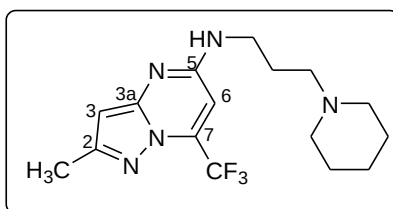
Num balão de 10 mL foi adicionado 1 mmol de 3-amino-5metilpirazol **6** à 2 mmol de β -enaminona **5a-I** diluído em hexafluorofosfato1-butil-3-metilimidazólio [BMIM][BP₆], logo foi deixado em agitação numa temperatura de 100 °C por 24 horas. Em sequência, a mistura foi extraída com extraída com clorofórmio (20 mL) e lavada com água destilada (H₂O, 3x 10 mL), e a fase orgânica foi seca com MgSO₄, filtrada e o solvente foi removido através do evaporador rotativo. Os compostos **7c** e **7h** foram purificado em coluna cromatográfica de sílica gel utilizando eluente hexano/clorofórmio 8:2 para **7c** e hexano/acetato 7:3 para **7h**; já os compostos **7a**, **7f**, **7g** e **7i** foram recristalizados em hexano/clorofórmio (8:2); por fim **7b** foi

recristalizado em hexano à quente; as moléculas **7d** e **7e** não necessitaram de purificação. Todas moléculas foram analisados por CG/EM e RMN de ^1H ^{13}C . O líquido iônico, [BMIM][BP₆], foi recuperado.



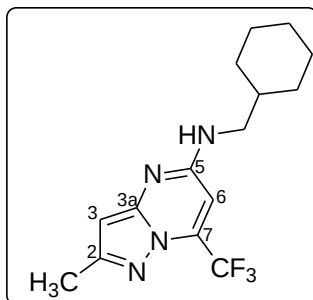
2-metil-5-(2-morfolinoetil)amino-7-(trifluorometil)pirazolo[1,5-a]pirimidina (7a)

^1H RMN(400 MHz, CDCl_3) δ (ppm, $J_{\text{H-H}}$ = Hz): 7,08(sl, 1H, NH); 6,43(s, 1H, H3); 6,17(s, 1H, H6); 3,77(t, $^2J=4,5$, 4H, morfolina); 3,51(q, $^3J=11,5$; 5,4, 2H, -NHCH₂CH₂N-); 2,77(t, $^1J=6,0$, 2H, -NHCH₂CH₂N-); 2,53(t, $^2J=4,5$, 4H, morfolina); 2,51(s, 3H, CH₃). ^{13}C RMN(100 MHz, CDCl_3) δ (ppm, $J_{\text{H-F}}$ = Hz): 155,5(C2); 148,5(C3a); 147,5(q, $^2J=35,2$, C7); 146,9(C5); 121,3(q, $^1J=275,3$, CF₃); 97,0(C3); 80,7(C6); 67,0(morfolina); 56,1(-NHCH₂CH₂N-CH₂); 53,3(morfolina); 38,4(-NHCH₂CH₂N-)14,7(CH₃). EM m/z (%): 329 (1), 207(3), 113(17), 100(100), 70(9), 56(18).



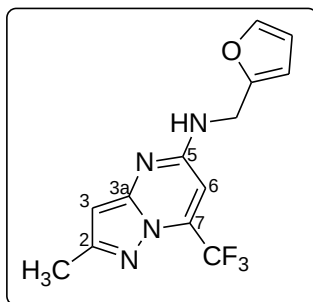
2-metil-5-(3-(piperidin-1-o)propilamino)-7-(trifluorometil)pirazolo[1,5-a]pirimidina (7b)

^1H RMN(400 MHz, CDCl_3) δ (ppm, $J_{\text{H-H}}$ = Hz): 7,26(sl, 1H, NH); 6,38(s, 1H, H3); 6,09(s, 1H, H6); 3,53(q, 2H, $^3J=5,4$, -NHCH₂CH₂CH₂N); 2,58(t, 2H, $^2J_{\text{H-H}}=11,2$ Hz, $^3J_{\text{H-H}}=5,6$ Hz -NHCH₂CH₂CH₂N-); 2,47(s, 3H, CH₃); 1,92(q, 2H, $^2J_{\text{H-H}}=11,2$ Hz, $^3J_{\text{H-H}}=5,6$ Hz, NHCH₂CH₂CH₂N-), 1,85-1,26(m, 10H, piperidina). ^{13}C RMN(100 MHz, CDCl_3) δ (ppm, $J_{\text{H-F}}$ = Hz): 154,9 (C2), 148,6(C3a), 147,2 (q, $^2J=31,0$, C7), 147,3 (C5), 120,9(q, $^1J=304,1$, CF₃), 96,4 (C3), 80,1(C6), 58,8(NHCH₂CH₂CH₂N-), 55,1(piperidina), 43,4(-NHCH₂CH₂CH₂N-), 25,5; 24,7 (piperidina); 23,8 (-NHCH₂CH₂CH₂N-); 14,6(CH₃). EM m/z (%): 341(26), 232(12), 124(20), 98(100), 70(8), 41(13).



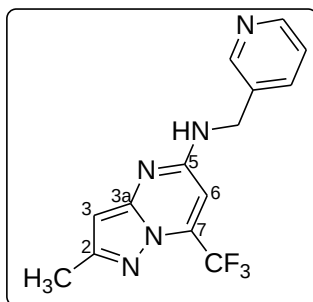
2-metil-5-(ciclometilhexano)amino-7-(trifluorometil)pirazolo[1,5-a]pirimidina (7c)

^1H RMN(400 MHz, CDCl_3) δ (ppm, $J_{\text{H-H}}$ = Hz): 6,55(sa, 1H, NH); 6,34(s, 1H, H3); 6,09(s, 1H, H6); 3,20(t, 2J = 6,5, 2H, CH_2); 2,42(s, 3H, CH_3); 1,81-1,34(m, 10H, ciclohexano). ^{13}C RMN(100 MHz, CDCl_3) δ (ppm, $J_{\text{C-F}}$ = Hz): 155,3(C2); 148,5(C3a); 147,4(q, 2J = 275, C7); 147,0(C5); 121,4(q, 1J = CF_3); 97,0(C3); 80,5(C6); 48,6(CH_2); 37,7; 36,8; 30,5; 25,7(ciclohexano); 14,7(CH_3). EM m/z (%): 312(21), 229(62), 216(100), 147(2), 55(30), 41(25).



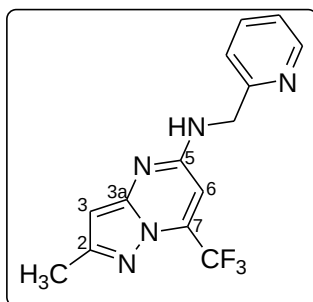
2-metil-5-(furan-2-ometil)amino-7-(trifluorometil)pirazolo[1,5-a]pirimidina (7d)

^1H RMN(400 MHz, CDCl_3) δ (ppm, $J_{\text{H-H}}$ = Hz): 7,40(s, 1H, furil); 6,96(sa, 1H, NH); 6,44(s, 1H, H3); 6,36(s, 2H, H6 e furil); 6,32(s, 1H, furil); 4,61(d, 1J = 6,0 Hz, 2H, CH_2); 2,48(s, 3H, CH_3). ^{13}C RMN(100 MHz, CDCl_3) δ (ppm, $J_{\text{H-F}}$ = Hz): 155,6(C2); 148,9(furil); 148,5(C3a); 147,6(q, 2J = 35,2, C7); 146,7(C5); 143,2(furil); 121,2(q, 1J = 275,5, CF_3); 110,7(furil); 108,9(furil); 97,2(C3); 80,9(C6); 39,3(CH_2); 14,7(CH_3). EM m/z (%): 296(14), 226(1), 81(100), 69(2), 53(25), 42(3).



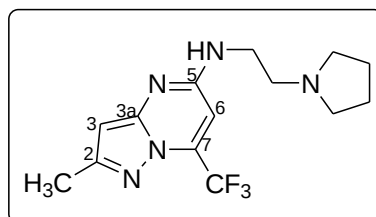
2-metil-5-(metilpiridin-3-na) amino-7-(trifluorometil)pirazolo[1,5-a]pirimidina (7e)

^1H RMN(400 MHz, CDCl_3) δ (ppm, $J_{\text{H-H}}$ = Hz): 8,67(s, 1H, piridina); 8,61 (d, 2J = 4,6, 1H, piridina); 7,71 (d, 2J = 7,8, 1H, piridina), 7,36 – 7,32 (m, 1H, piridina); 7,11 (sa, 1H, NH); 6,46 (s, 1H, H3); 6,21 (s, 1H, H6); 4,69 (d, 2J = 6,0, 2H, $-\text{NHCH}_2-$); 2,49 (s, 3H, CH_3). ^{13}C RMN(100 MHz, CDCl_3) δ (ppm, $J_{\text{H-F}}$ = Hz): 155,7(C2); 149,9(piridina); 148,9(C3a); 147,6(q, 2J = 35,28, C7); 146,7(C5); 135,1(piridina); 131,5(piridina); 124,0(piridina); 123,8(piridina), 123,8(q, 1J = 212,0 CF_3); 97,3(C3); 80,8(C6); 43,9($-\text{NHCH}_2-$); 14,6 (CH_3). EM m/z (%): 307(70), 281(5), 201(11), 107(11), 92(100), 55(46).



2-metil-5-(metilpiridin-2-na)amino-7-(trifluorometil)pirazolo[1,5-a]pirimidina (7f)

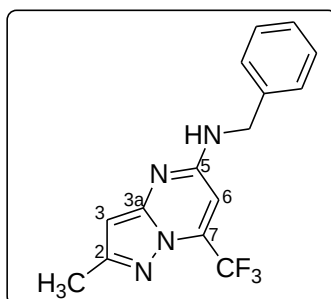
^1H RMN(400 MHz, CDCl_3) δ (ppm, $J_{\text{H-H}}$ = Hz): 7,74(sa, 1H, NH); 7,73(td, 2J = 7,7, 1H, Piridina); 7,34(d, 2J = 7,9, 1H, Piridina); 7,30(dd, J = 7.9, 6.1 Hz, 2H, Piridina); 6,46(s, 1H, H3); 6,24(s, 1H, H6); 4,75(d, 2J = 5,2; 2H, $-\text{NHCH}_2-$); 2,53(s, 3H, CH_3). ^{13}C RMN(100 MHz, CDCl_3) δ (ppm, $J_{\text{H-F}}$ = Hz): 155,7(C2); 154,3(Piridina); 149,7(Piridina); 149,1(C3a); 147,6(q, 2J = 35,0, C7); 147,1(C5); 137,2(Piridina); 123,2(Piridina); 122,5(q, 1J = 212,0 CF_3); 121,6(Piridina); 97,1(C3); 81,1(C6); 46,7($-\text{NHCH}_2-$); 14,8(CH_3). EM m/z (%): 307 (100), 281(9), 229(25), 145(45), 92(17), 65(11).



2-metil-5-(2-(pirrolidin-1-na)etilamino)-7-(trifluorometil)pirazolo[1,5-a]pirimidina (7g)

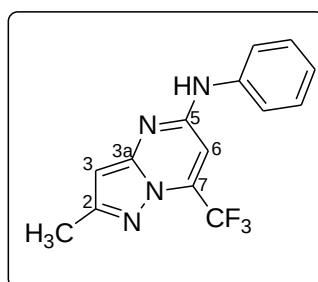
^1H RMN(400 MHz, CDCl_3) δ (ppm, $J_{\text{H-H}}$ = Hz): 7,28(sa, 1H, NH); 6,42(s, 1H, H3); 6,17(s, 1H, H6); 3,52(t, 2H, 3J = 6,1, $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2-$); 2,87(t, 2H, $^3J_{\text{H-H}}$ = 6,1, $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2-$); 2,61(d, 4H, 2J = 6,3, pirrolidina); 2,50(s, 3H, CH_3); 1,84(d, 4H, 2J = 3,4, pirrolidina). ^{13}C RMN(100 MHz, CDCl_3) δ (ppm, $J_{\text{C-F}}$ = Hz): 155,4(C2); 148,5 (C3a); 147,5(q, 2J = 35,0 C7); 147,0 (C5); 121,3(q, 1J = 212,0 CF_3); 96,9(C3); 80,6(C6); 53,9(pirrolidina); 53,9($-\text{NHCH}_2\text{CH}_2-$).

NHCH₂CH₂-); 40,9(-NHCH₂CH₂-); 23,6(pirrolidina); 14,7(CH₃).EM m/z (%): 313 (2), 281(1), 97(19), 84(100), 69(5), 42(24).



2-metil-5-benzanoamino-7-(trifluorometil)pirazolo[1,5-a]pirimidina (7h)

¹H RMN(400 MHz, CDCl₃) δ (ppm, *J*_{H-H}= Hz): 7,31-7,38(m,5H,fenil); 7,01(sa, 1H, NH); 6,42(s, 1H, H3); 6,21(s, 1H, H6); 4,60(d, 2H, ²*J*= 5,2 CH₂); 2,46(s, 3H, CH₃). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm, *J*_{C-F}= Hz): 155,5(C2); 148,4(C3a); 147,6(q, ²*J*= 35,2, C7); 146,9 (C5); 121,2(q, ¹*J*= 275,2, CF₃); 129,1; 129,0; 128,4; 128,2; 128,0; 127,4(fenil). 97,0(C3); 80,9(C6); 46,3(CH₂); 14,6(CH₃). EM m/z (%): 306 (31), 229(4), 143(2), 91(100) 65(18), 42(4).



2-metil-5-fenilamino-7-(trifluorometil)pirazolo[1,5-a]pirimidina (7i)

¹H RMN(400 MHz, CDCl₃) δ (ppm, *J*_{H-H}= Hz): 8,26(sa, 1H, NH); 7,44-7,19(m, 5H, fenil); 6,44(s,2H, H3 e H6); 2,47(s, 3H, CH₃). ¹³C RMN(100 MHz, CDCl₃) δ (ppm, *J*_{C-F}= Hz): 156,1(C2); 149,0(C3a); 145,6(q, ²*J*= 35,0 C7); 145,6(C5); 136,0-124,4(fenil); 124,4(q, ¹*J*= 212,0 CF₃); 97,8(C3); 82,3(C6); 15,0 (CH₃). EM m/z (%): 292(100), 223(19), 130(6), 116(7), 77(37), 51(12).

5.4. Métodos teóricos

As simulações foram realizadas com o pacote ORCA (NEESE, 2017), com o funcional B3LYP (BECKE, 1993; LEE; YANG; PARR, 1988; VOSKO; WILK; NUSAIR, 1980) e a função de base def2-TZVP (WEIGEND; AHLRICHS, 2005), com a base auxiliar def2/J (WEIGEND, 2006). A aproximação da resolução da identidade (NEESE et al., 2009) e a correção de dispersão de Grimme (CRIMME; EHRLICH;

GOERIGK, 2011; GRIMME et al., 2010) foram utilizadas em todos os cálculos. Todas as estruturas otimizadas foram confirmadas como mínimos à medida que nenhuma frequência imaginária foi encontrada. Os cálculos de carga do tipo Hirshfeld (HIRSHFELD, 1977), ADCH (LU; CHEN, 2012a) e CM5 (MARENICH et al., 2012) foram realizados com o programa Multiwfn (LU; CHEN, 2012b).

5.5. Testes biológicos e análise experimental

5.5.1. Procedimentos gerais de cultura de células

5.5.1.1 Culturas de células

A linhagem de células de glioblastoma C6 de rato foi obtida da *American Type Cell Collection* (Rockville, Maryland, EUA). As células foram cultivadas em frascos de cultura e mantidas em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (pH 7,4) contendo 1% de DMEM (Gibco BRL), 8,4 mM de HEPES, 23,8 mM de NaHCO₃, 0,1% de fungizona, 0,5 U / mL de penicilina / estreptomicina e suplementado com 10% de FBS.

5.5.1.2 Culturas primárias de astrócitos

As culturas de astrócitos foram preparadas conforme descrito anteriormente por Da Frota *et al.* (2009). Resumidamente, o córtex de ratos Wistar recém-nascidos (1-3 dias de idade) foi removido e dissociado mecanicamente em solução salina balanceada livre de Ca⁺² e Mg⁺² (CMF) (pH 7,4) contendo NaCl 137 mM, KCl 5,36 mM, 0,27 mM Na₂HPO₄, KH₂PO₄ 1,1 mM e glicose 6,1 mM. O tecido dissociado foi submetido a centrifugação a 1.000 g durante 5 min. Posteriormente, o sedimento foi suspenso em DMEM (pH 7,6) suplementado com FBS a 10%. Em seguida, as células (3 x 10³) foram semeadas em placas de 96 poços revestidas com poli-L-lisina. As culturas foram deixadas crescer até a confluência por 15-20 dias e o meio foi substituído a cada 5 dias. Todos os procedimentos utilizados no presente estudo seguiram os “*Principles of Laboratory Animal Care*” do *National Institutes of Health* (NIH) e foram aprovados pelo Comitê de Ética da UFPel (46528-2018).

5.5.2. Tratamento de cultura de células in vitro

A linhagem de células C6 de glioblastoma foi semeada em 5x10³ células (placas de 96 poços) para experimentos de viabilidade celular e deixada crescer por 24 h. As culturas de astrócitos foram preparadas como descrito acima. As culturas celulares foram tratadas com **7b**, **7g**, **7f** e **7i** (25, 50, 100, 175 e 250 µM) por 48 h. As células expostas a DMSO (concentração final de 0,05%) foram consideradas controle.

5.5.3. Ensaio de viabilidade celular

A redução do brometo de 3-(4,5-dimetil) -2,5difênil tetrazólio (MTT) dependente de desidrogenases foi usada para estimar a viabilidade de culturas de células como descrito por Mossmann (1983). Este método é baseado na capacidade das células viáveis de reduzir o MTT e formar um produto formazan azul. A solução de MTT foi adicionada ao meio de incubação nos poços a uma concentração final de 0,5 mg / mL. As células foram deixadas durante 90 min a 37 ° C numa atmosfera humidificada com 5% de CO₂. O meio foi então removido e o precipitado foi eluído com DMSO. A densidade óptica de cada poço foi medida a 492 nm em um leitor de microplaca (SpectraMAX 190). Os resultados foram expressos como porcentagem de controle.

5.5.4. Análise Estatística

A análise estatística foi realizada com o software GraphPad Prism 5. Os dados foram expressos como média ± erro padrão (EPM) e submetidos à análise de variância (ANOVA) seguida do teste post-hoc de Tukey para comparações múltiplas. As diferenças entre os valores médios foram consideradas significativas quando $P < 0,05$.

6. Referências Bibliográficas

- AGGARWAL, R. et al. Synthesis and biological evaluation of 7-trifluoromethylpyrazolo[1,5-a]pyrimidines as anti-inflammatory and antimicrobial agents. **Journal of Fluorine Chemistry**, 2014.
- ALCAIDE, B. et al. Base-promoted isomerization of cis-4-formyl-2-azetidinones: Chemoselective C4-epimerization vs rearrangement to cyclic enamines. **Journal of Organic Chemistry**, v. 65, n. 11, p. 3453–3459, 2000.
- BARREIRO, E.; FRAGA, C. A. M. **Química medicinal**. Artmed; 3^a ed. São Paulo: [s.n.].
- BECKE, A. D. Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. **The Journal of Chemical Physics**, v. 98, n. 7, p. 5648–5652, 1993.
- BRINCHI, L.; GERMANI, R.; SAVELLI, G. Ionic liquids as reaction media for esterification of carboxylate sodium salts with alkyl halides. **Tetrahedron Letters**, v.

44, n. 10, p. 2027–2029, 2003.

BURIOL, L. et al. Ultrasound Sonochemistry Resourceful synthesis of pyrazolo [1,5-a] pyrimidines under ultrasound irradiation. **Ultrasonics - Sonochemistry**, v. 20, n. 5, p. 1139–1143, 2013.

CHERUKUPALLI, S. et al. An insight on synthetic and medicinal aspects of pyrazolo[1,5a]pyrimidine scaffold. **European Journal of Medicinal Chemistry**, p. 298–354, 2017.

CRIMME, S.; EHRLICH, S.; GOERIGK, L. Software News and Updates Gabedit — A Graphical User Interface for Computational Chemistry Softwares. **Journal of computational chemistry**, v. 32, n. Sfb 858, p. 1456–1465, 2011.

DI GRANDI, M. J. et al. Novel pyrazolopyrimidines as highly potent B-Raf inhibitors. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, n. 24, p. 6957–6961, 2009.

DOLBIER, W. **Guide to fluorine NMR for organic chemists**. Hoboken ed. New Jersey: [s.n.].

DREV, M. et al. Regioselective synthesis of 1- and 4-substituted 7-oxopyrazolo[1,5-a]pyrimidine-3-carboxamides. **Tetrahedron**, v. 70, n. 44, p. 8267–8279, 2014.

DRUZHININ, S. V.; BALENKOVA, E. S.; NENAJDENKO, V. G. Recent advances in the chemistry of α,β -unsaturated trifluoromethylketones. **Tetrahedron**, v. 63, n. 33, p. 7753–7808, 2007.

EICHER, T.; HAUPTMANN, S.; SPEICHER, A. **The Chemistry of Heterocycles**. Wiley-VCH; ed. Weinheim: [s.n.].

FILYANKOVA, V. I.; PASHKEVICH, K. I.; POSTOVSKII, I. Y. Isomerization of fluorine-containing β -aminovinyl ketones. v. 136, n. 2, p. 2207, 1982.

FRIZZO, C. **Estrutura Molecular e Supramolecular de Pirazol[1,5-a]Pirimidinas**, 2010, 261. Tese de doutorado na Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.

GOULART, T. B. **SÍNTESE DE β -ENAMINONAS E AMINOPIRAZÓIS TRIFLUORMETILADOS**, 2017, 101. Dissertação de mestrado na Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.

GRIMME, S. et al. A consistent and accurate ab initio parametrization of density functional dispersion correction (DFT-D) for the 94 elements H-Pu. **Journal of Chemical Physics**, v. 132, n. 15, 2010.

HASSAN, A. S. et al. Synthesis and antitumor activity of some new pyrazolo [1,5-a] pyrimidines. **Chinese Chemical Letters**, p. 1–6, 2016.

HASSAN, A. S.; HAFEZ, T. S.; OSMAN, S. A. Synthesis, characterization, and cytotoxicity of some new 5-aminopyrazole and pyrazolo[1,5-a]pyrimidine derivatives. **Scientia Pharmaceutica**, v. 83, n. 1, p. 27–39, 2015.

HIRSHFELD, F. L. Bonded-atom fragments for describing molecular charge densities. **Theoretica Chimica Acta**, v. 44, n. 2, p. 129–138, 1977.

HOJO, M.; MASUDA, R.; KAMITORI, Y. Electrophilic substitutions of olefinic hydrogens I. Acylation of vinyl sulfides. **Tetrahedron Letters**, v. 17, n. 13, p. 1009–1012, 1976.

HUANG, Z. et al. Efficient one-pot three-component synthesis of fused pyridine derivatives in ionic liquid. **ACS Combinatorial Science**, v. 13, n. 1, p. 45–49, 2021.

KAMAL, A. et al. Synthesis of pyrazolo[1,5-a]pyrimidine linked aminobenzothiazole conjugates as potential anticancer agents. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 23, n. 11, p. 3208–3215, 2013.

KASCHERES, C. M. The Chemistry of Enaminones, Diazocarbonyls and Small Rings: Our Contribution. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 14, n. 6, p. 945–969, 2003.

KASWAN, P. et al. Synthesis of 5,7-diarylpyrazolo[1,5-a]pyrimidines via KOH mediated tandem reaction of 1H-pyrazol-3-amines and chalcones. **Tetrahedron Letters**, v. 56, n. 3, p. 549–553, 2015.

KATO, N. et al. Discovery and pharmacological characterization of N-[2-({2-[(2S)-2-cyanopyrrolidin-1-yl]-2-oxoethyl}amino)-2-methylpropyl]-2-methylpyrazolo[1,5-a]pyrimidine-6-carboxamide hydrochloride (anagliptin hydrochloride salt) as a potent and selective DPP-IV inh. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 23, p. 7221–7227, 2011.

LEE, C.; YANG, W.; PARR, R. Maintaining a healthy rhythm. **PHYSICAL REVIEW B**, v. 37, n. 2, p. 784–789, 1988.

LI, Y. et al. An in silico exploration of the interaction mechanism of pyrazolo[1,5-a]pyrimidine type CDK2 inhibitors. **Molecular BioSystems**, v. 9, n. 9, p. 2266–2281, 2013.

LIU, Y. et al. Inhibition of glioma cell growth and apoptosis induction through targeting wnt10B expression by Pyrazolo[4,3-c]pyridine-4-one. **Medical Science Monitor**, v. 26, p. 1–7, 2020.

LU, T.; CHEN, F. Atomic dipole moment corrected Hirshfeld population method. **Journal of Theoretical and Computational Chemistry**, v. 11, n. 1, p. 163–183, 2012a.

LU, T.; CHEN, F. Multiwfn: A multifunctional wavefunction analyzer. **Journal of Computational Chemistry**, v. 33, n. 5, p. 580–592, 2012b.

MARENICH, A. V. et al. Charge model 5: An extension of hirshfeld population analysis for the accurate description of molecular interactions in gaseous and condensed phases. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 8, n. 2, p. 527–541, 2012.

MARTINS, M. A. P. et al. Ionic liquids in heterocyclic synthesis. **Chemical Reviews**, v. 108, n. 6, p. 2015–2050, 2008.

MARTINS, M. A. P. et al. 2-Methyl-7-substituted pyrazolo[1,5-a]pyrimidines: Highly regioselective synthesis and bromination. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 2, p. 205–213, 2009.

MATHISON, C. J. N. et al. Efficacy and Tolerability of Pyrazolo[1,5-a]pyrimidine RET Kinase Inhibitors for the Treatment of Lung Adenocarcinoma. **ACS Med. Chem Lett**, v. 11, n. 558–565, 2020.

MOHAREB, R. M. et al. Uses of dimedone to synthesis pyrazole, isoxazole and thiophene derivatives with antiproliferative, tyrosine kinase and Pim-1 kinase inhibitions. **Medicinal Chemistry Research**, v. 29, n. 8, p. 1536–1551, 2020.

NEESE, F. et al. Efficient, approximate and parallel Hartree-Fock and hybrid DFT calculations. A “chain-of-spheres” algorithm for the Hartree-Fock exchange. **Chemical Physics**, v. 356, n. 1–3, p. 98–109, 2009.

NEESE, F. Software update: the ORCA program system, version 4.0. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science**, v. 8, n. 1, p. 1–6, 2017.

OJIMA, I. In **Medicinal Chemistry and Chemical Biology**. Wiley-Blac ed. New York: [s.n.].

PURSER, S. et al. Fluorine in medicinal chemistry. **Chemical Society Reviews**, v. 37, n. 2, p. 320–330, 2008.

ROSTANIZADEH, S. et al. An Efficient One-Pot Procedure for the Preparation of 1,3,4-Thiadiazoles in Ionic Liquid [Bmim]BF₄ as Dual Solvent and Catalyst. **Heteroatom Chemistry**, v. 20, n. 4, p. 232–234, 2009.

SELLERI, S. et al. 2-Arylpyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl acetamides. New potent and selective peripheral benzodiazepine receptor ligands. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 9, n. 10, p. 2661–2671, 2001.

SELLERI, S. et al. A novel selective GABAA α 1 receptor agonist displaying sedative

and anxiolytic-like properties in rodents. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 48, n. 21, p. 6756–6760, 2005.

SHI, D.; ZHOU, Y.; LIU, H. Synthetic Communications : An International Journal for Rapid Communication of Synthetic Organic Chemistry An Efficient Synthesis of Pyrazolo [3 , 4- b] pyridine Derivatives in Ionic Liquid. p. 37–41, 2015.

SINGSARDAR, M. et al. Brønsted Acidic Ionic Liquid-Catalyzed Regioselective Synthesis of Pyrazolopyrimidines and Their Photophysical Properties. **Chemistry Select**, p. 1404–1410, 2018.

STEFANI, H. A. et al. Synthesis of trifluoroacetylketene O,N-acetals in water. **Arkivoc**, v. 2005, n. 6, p. 19–24, 2005.

UZIEL, O. et al. Imatinib mesylate (Gleevec) downregulates telomerase activity and inhibits proliferation in telomerase-expressing cell lines. **British Journal of Cancer**, v. 92, n. 10, p. 1881–1891, 2005.

VOSKO, S. H.; WILK, L.; NUSAIR, M. Accurate spin-dependent electron liquid correlation energies for local spin density calculations: a critical analysis. **Canadian Journal of Physics**, v. 58, n. 8, p. 1200–1211, 1980.

WANG, S. M. et al. A solvent-free facile synthesis of (E)-bis(phosphonium)ethylenes from organo-phosphines and TfOCH₂CF₂H reagent. **Tetrahedron Letters**, v. 56, n. 45, p. 6219–6222, 2015.

WASSERSCHIED, P.; WELTON, T. W. **Ionic Liquids in Synthesis**. Wiley-VCH ed. Weinheim: [s.n.].

WEIGEND, F. Accurate Coulomb-fitting basis sets for H to Rn. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 8, n. 9, p. 1057–1065, 2006.

WEIGEND, F.; AHLRICHS, R. Balanced basis sets of split valence, triple zeta valence and quadruple zeta valence quality for H to Rn: Design and assessment of accuracy Electronic supplementary information (ESI) available:[DETAILS]. See [http://dx. doi. org/10.1039/b508541a](http://dx.doi.org/10.1039/b508541a). **Phys. Chem. Chem. Phys.**, v. 7, p. 3297–3305, 2005.

WERRY, E. L. et al. Derivatives of the pyrazolo[1,5-a]pyrimidine acetamide DPA-713 as translocator protein (TSPO) ligands and pro-apoptotic agents in human glioblastoma. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 96, p. 186–192, 2017.

YU, P. B. et al. Dorsomorphin inhibits BMP signals required for embryogenesis and iron metabolism. **Nature Chemical Biology**, v. 4, n. 1, p. 33–41, 2008.

ANEXO I – Espectros de CG/EM

ANEXO I – Espectros de CG/EM

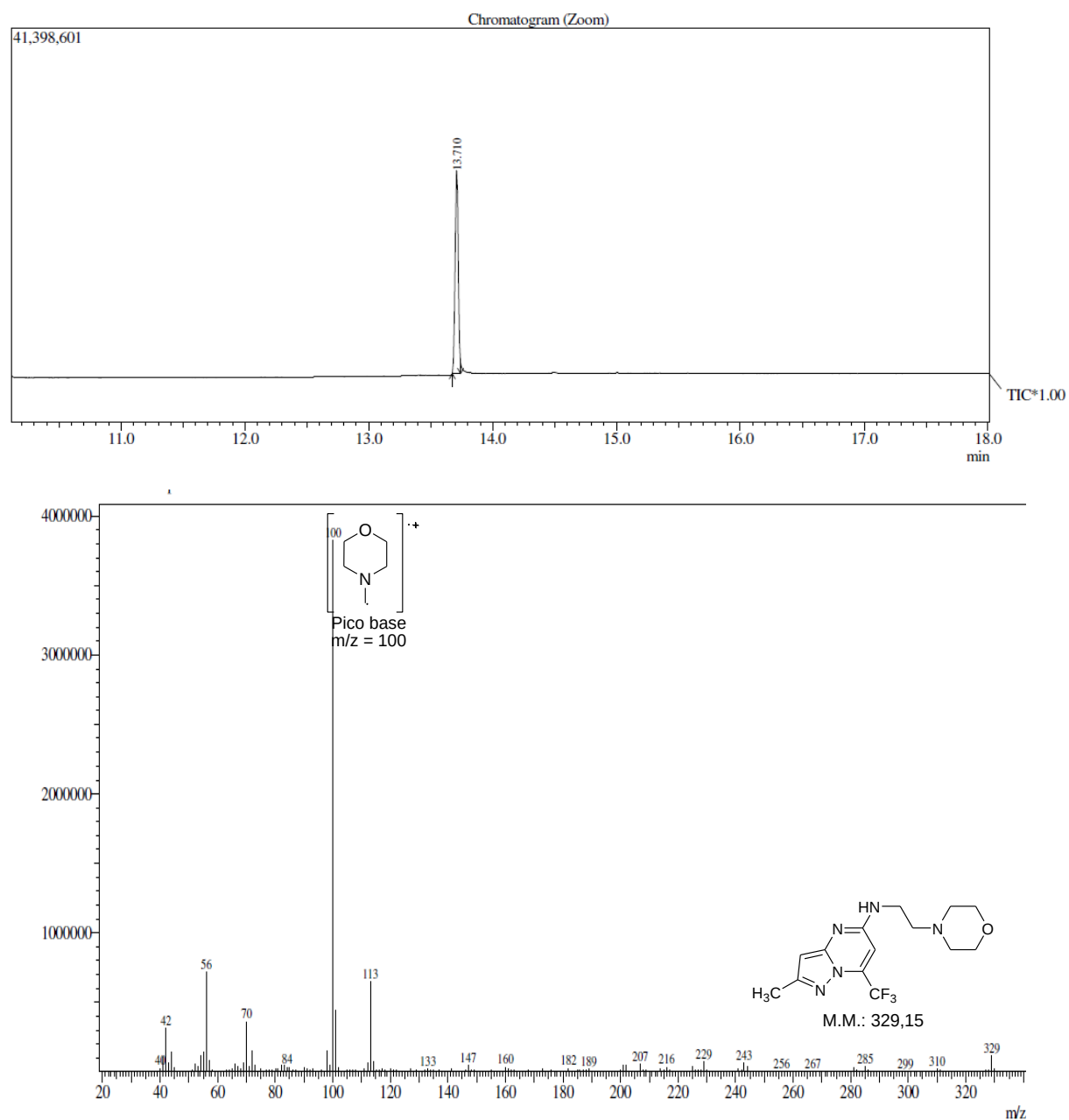
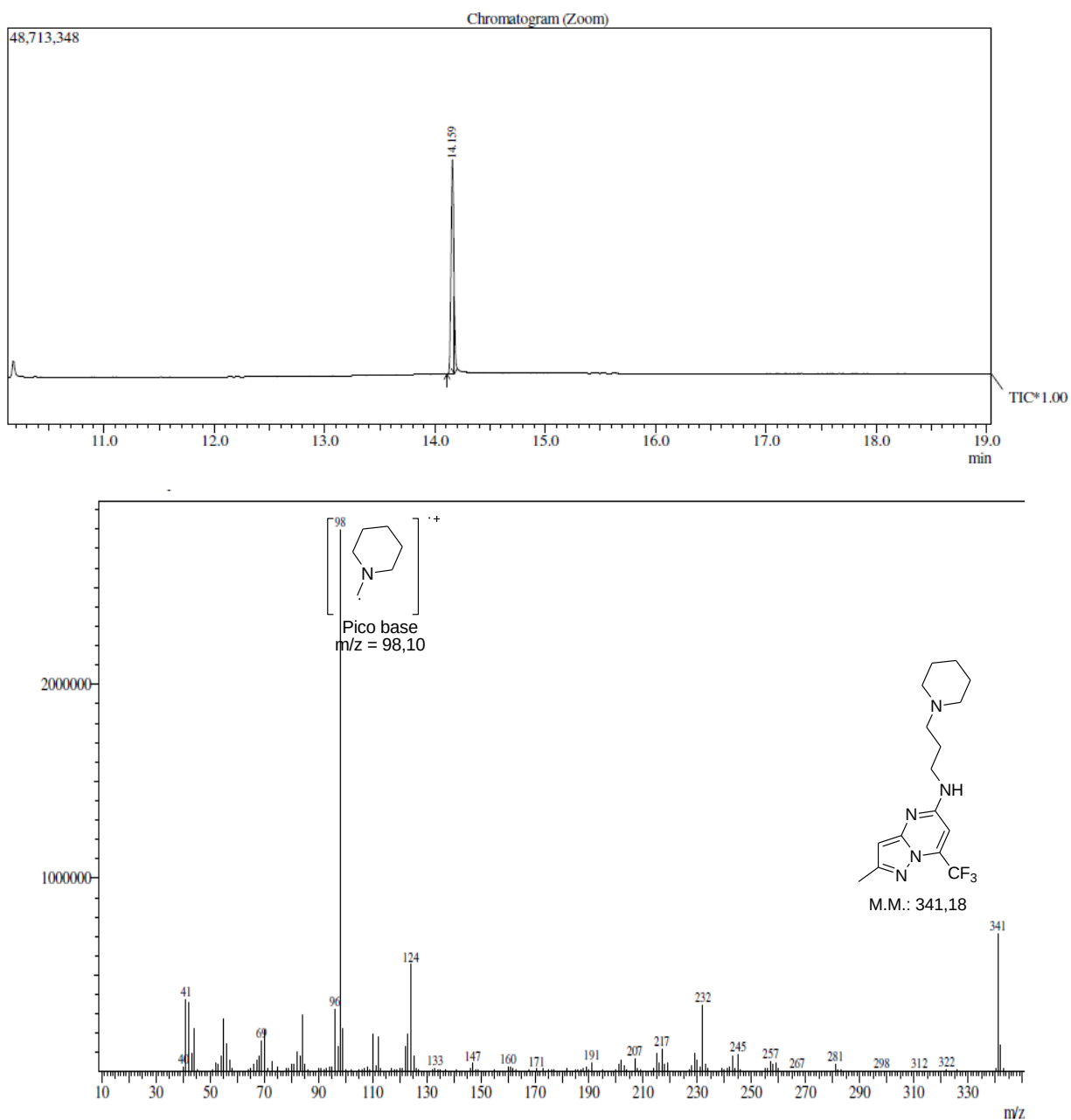
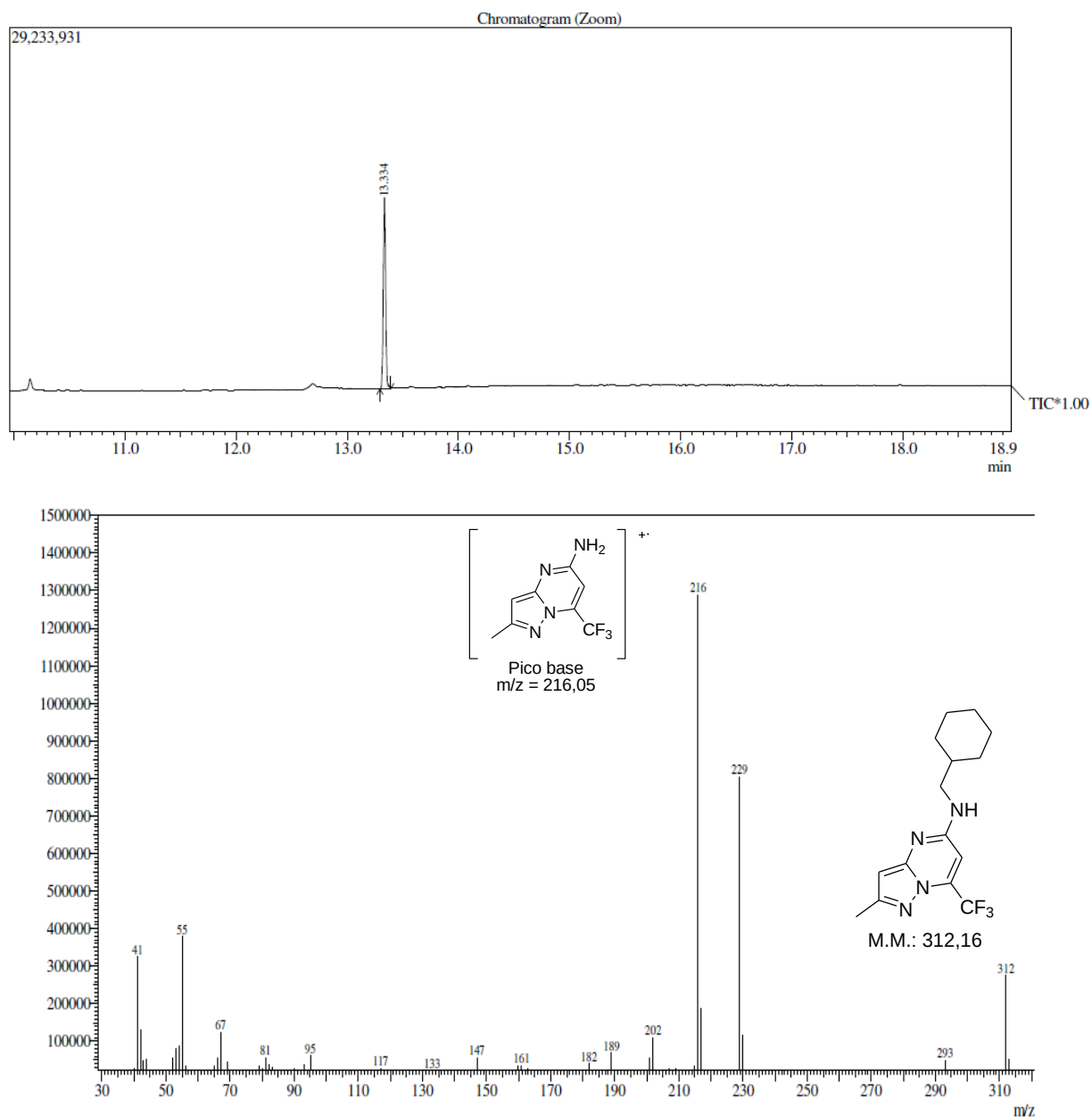


Figura 30: Espectro de CG/EM da pirazolo[1,5-a]pirimidina 7a.

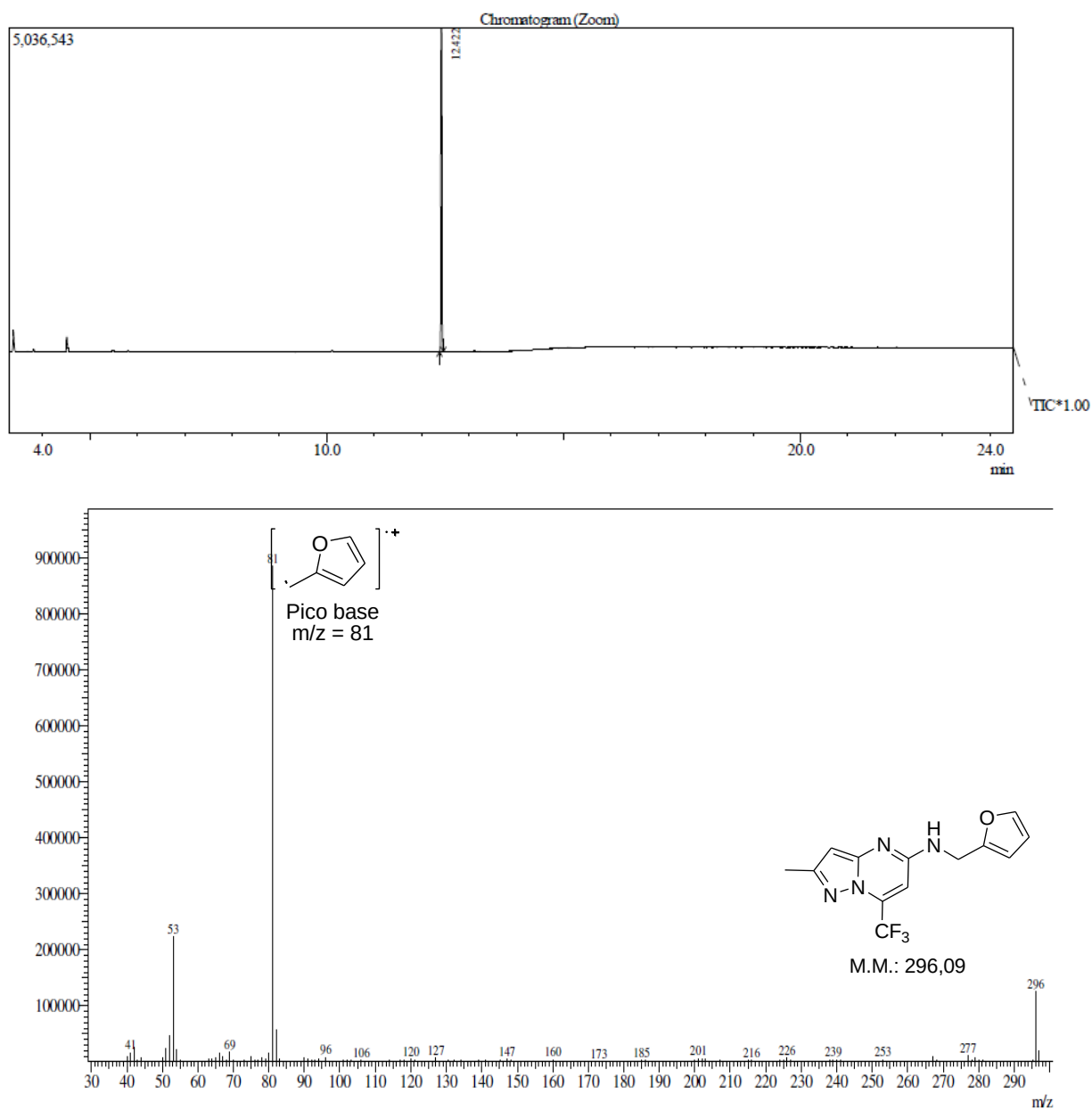
ANEXO I – Espectros de CG/EM

Figura 31: Espectro de CG/EM da pirazolo[1,5-a]pirimidina **7b**.

ANEXO I – Espectros de CG/EM

Figura 32: Espectro de CG/EM da pirazolo[1,5-a]pirimidina **7c**.

ANEXO I – Espectros de CG/EM

**Figura 33:** Espectro de CG/EM da pirazolo[1,5-a]pirimidina **7d**.

ANEXO I – Espectros de CG/EM

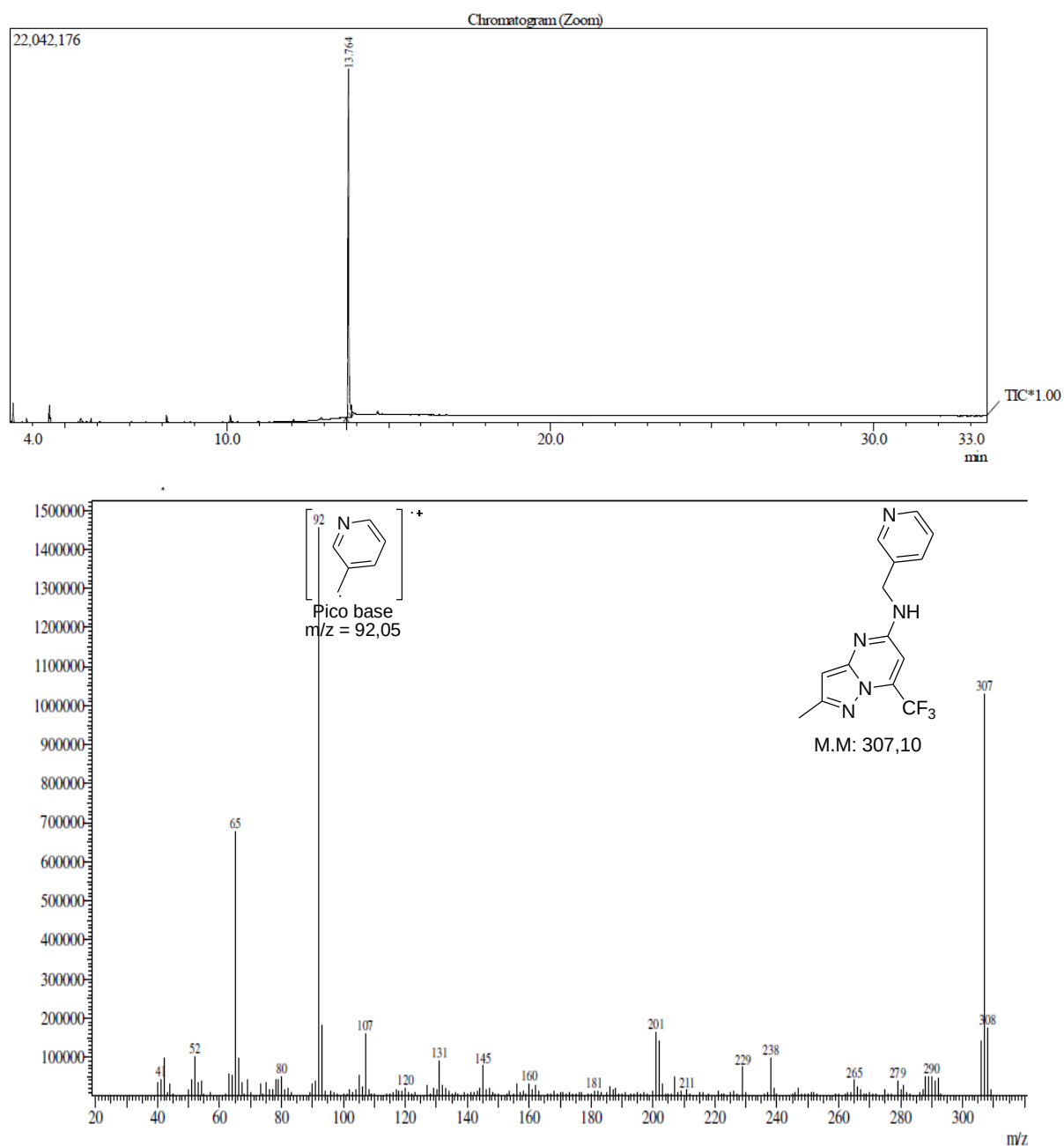
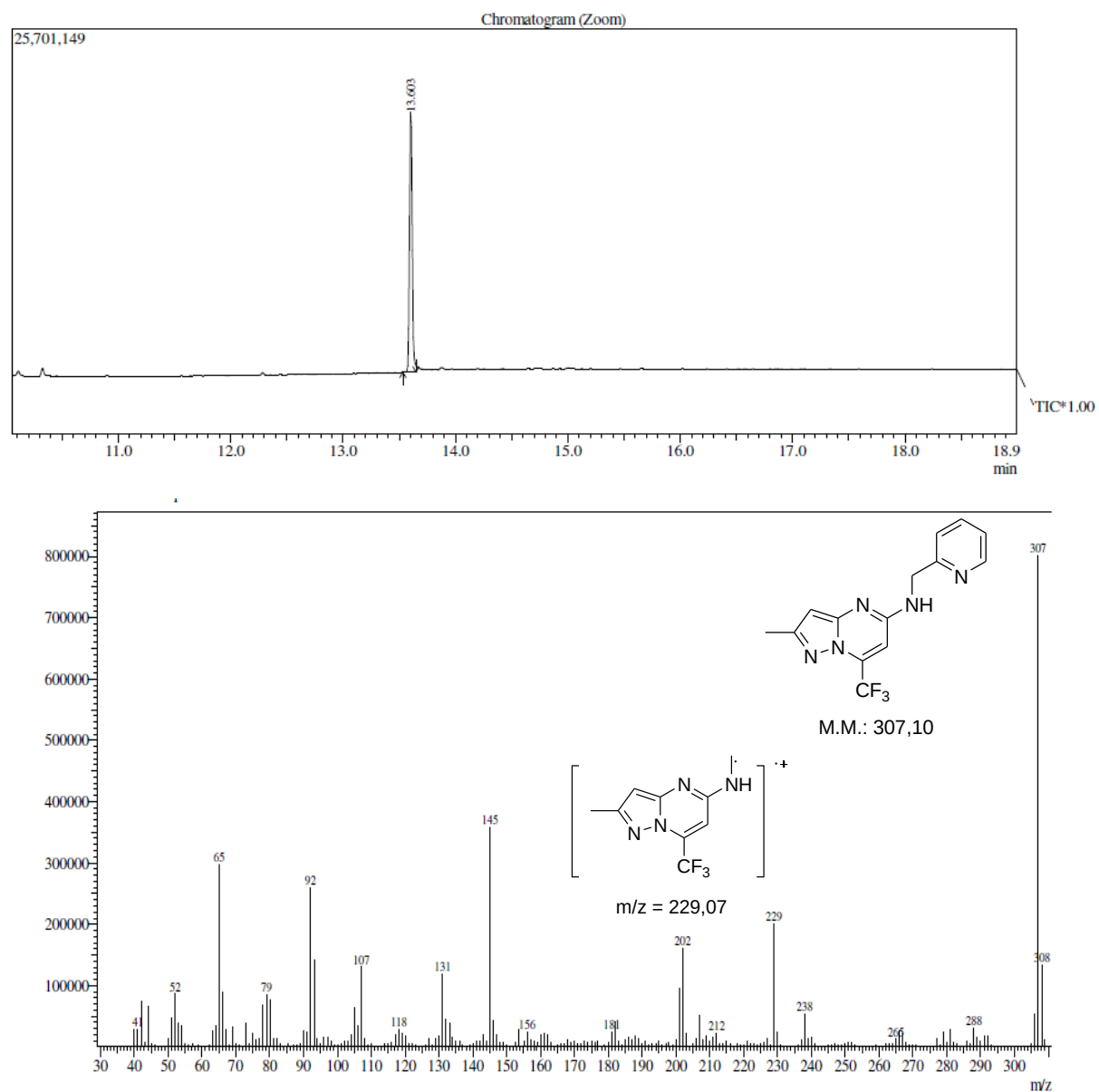
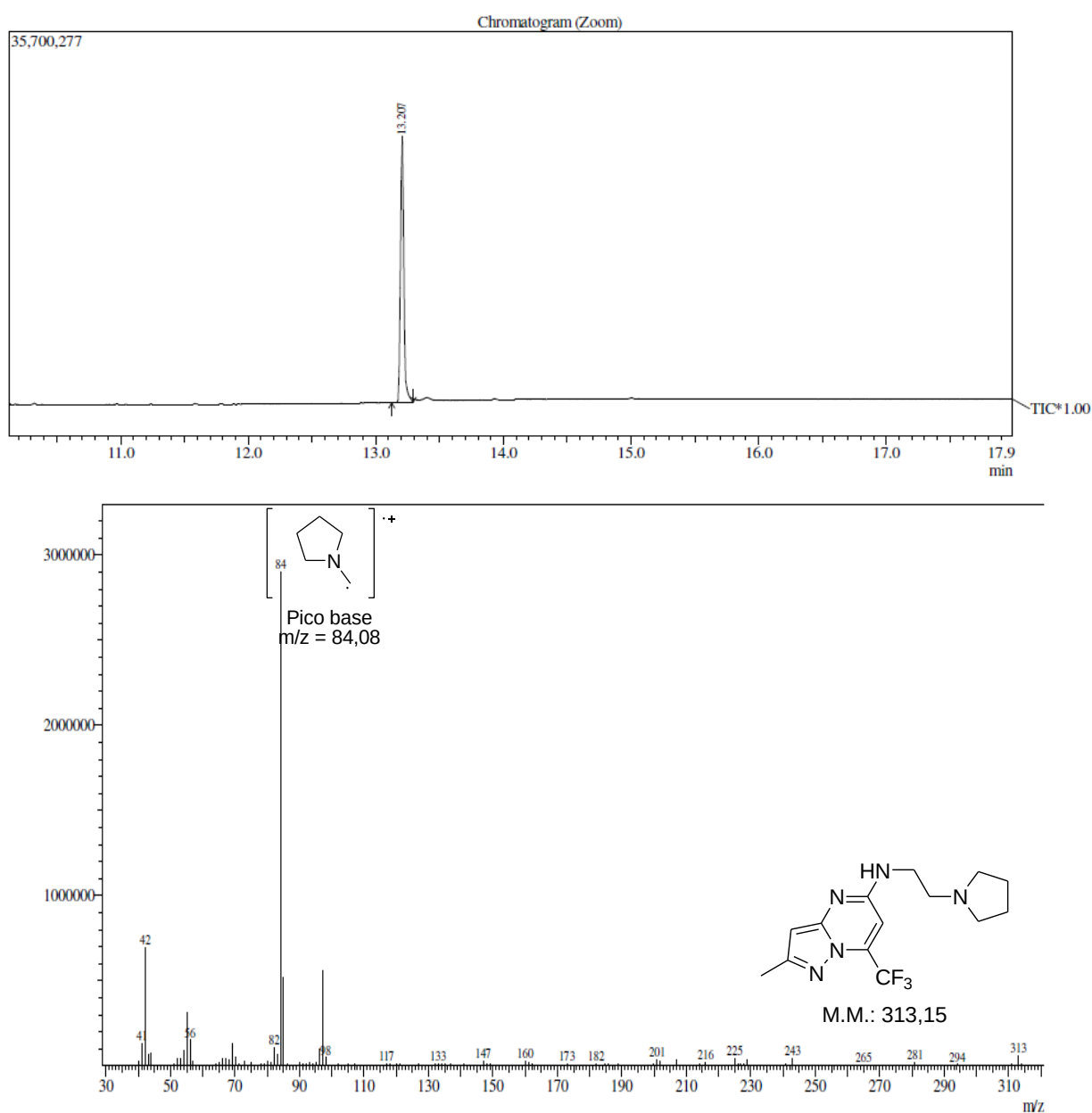


Figura 34: Espectro de CG/EM da pirazolo[1,5-a]pirimidina 7e.

ANEXO I – Espectros de CG/EM

Figura 35: Espectro de CG/EM da da pirazolo[1,5-a]pirimidina **7f**.

ANEXO I – Espectros de CG/EM

Figura 36: Espectro de CG/EM da pirazolo[1,5-a]pirimidina **7g**.

ANEXO I – Espectros de CG/EM

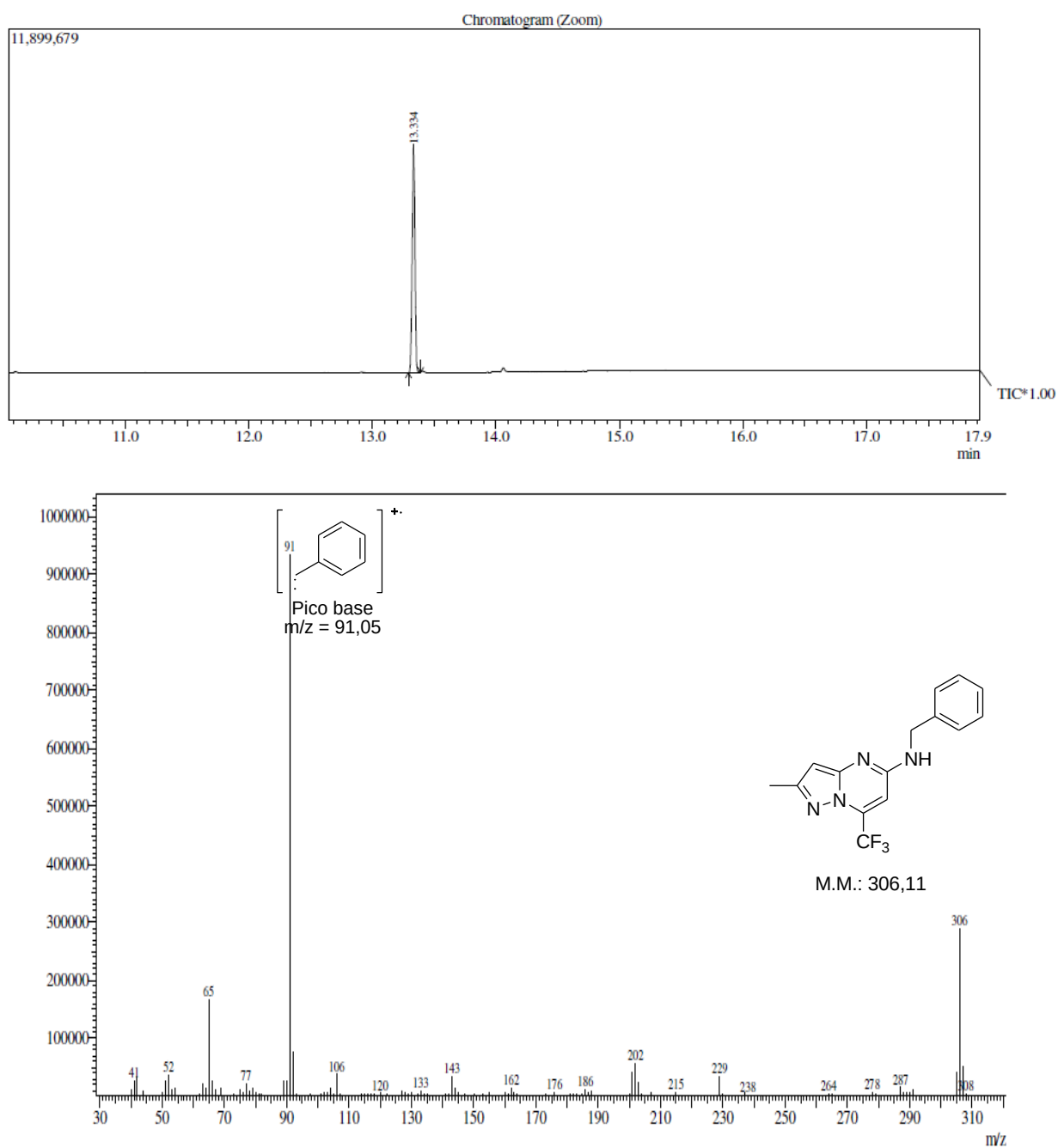


Figura 37: Espectro de CG/EM da pirazolo[1,5-a]pirimidina 7h.

ANEXO I – Espectros de CG/EM

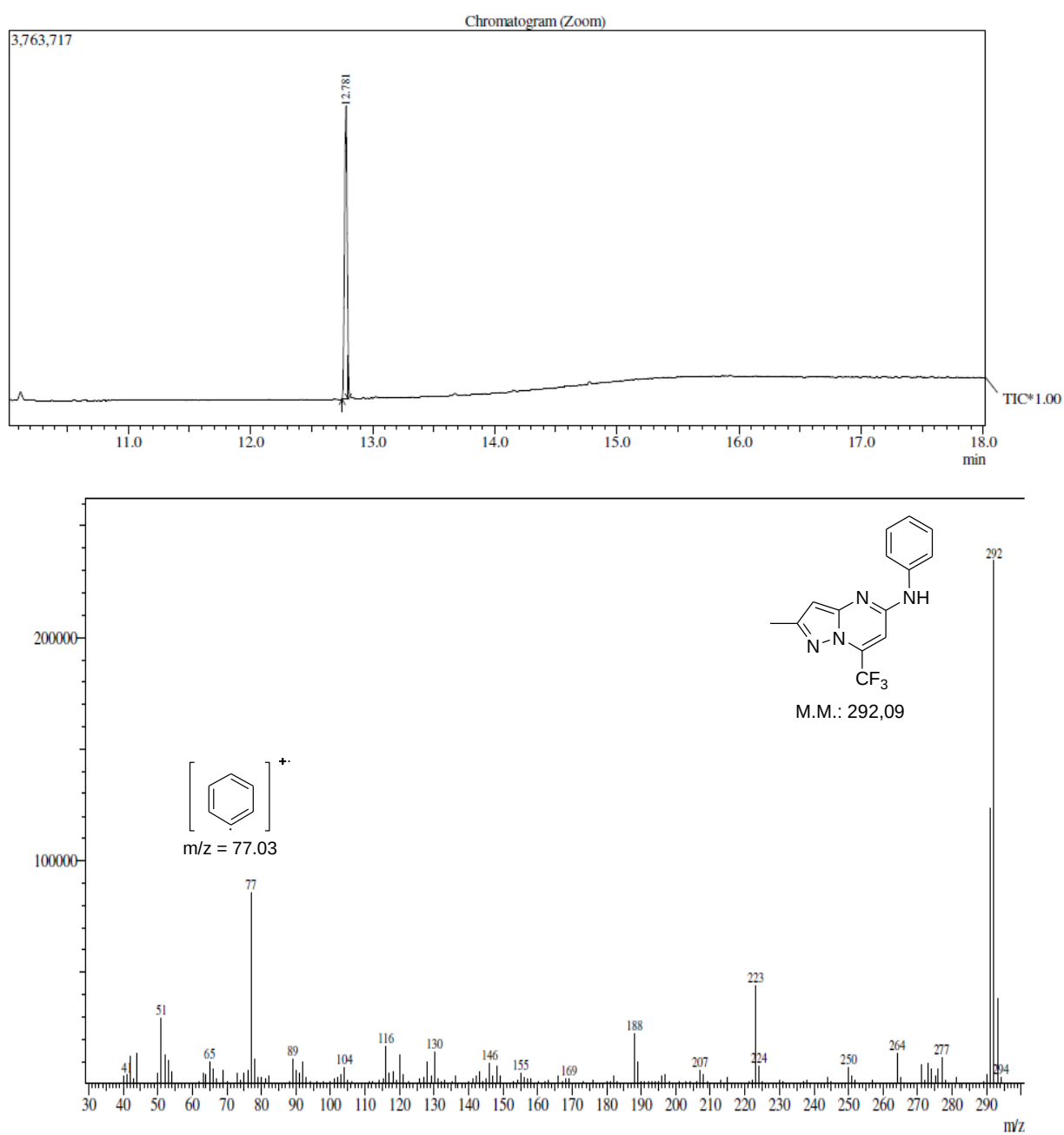


Figura 38: Espectro de CG/EM da pirazolo[1,5-a]pirimidina 7i.

ANEXO II – Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C

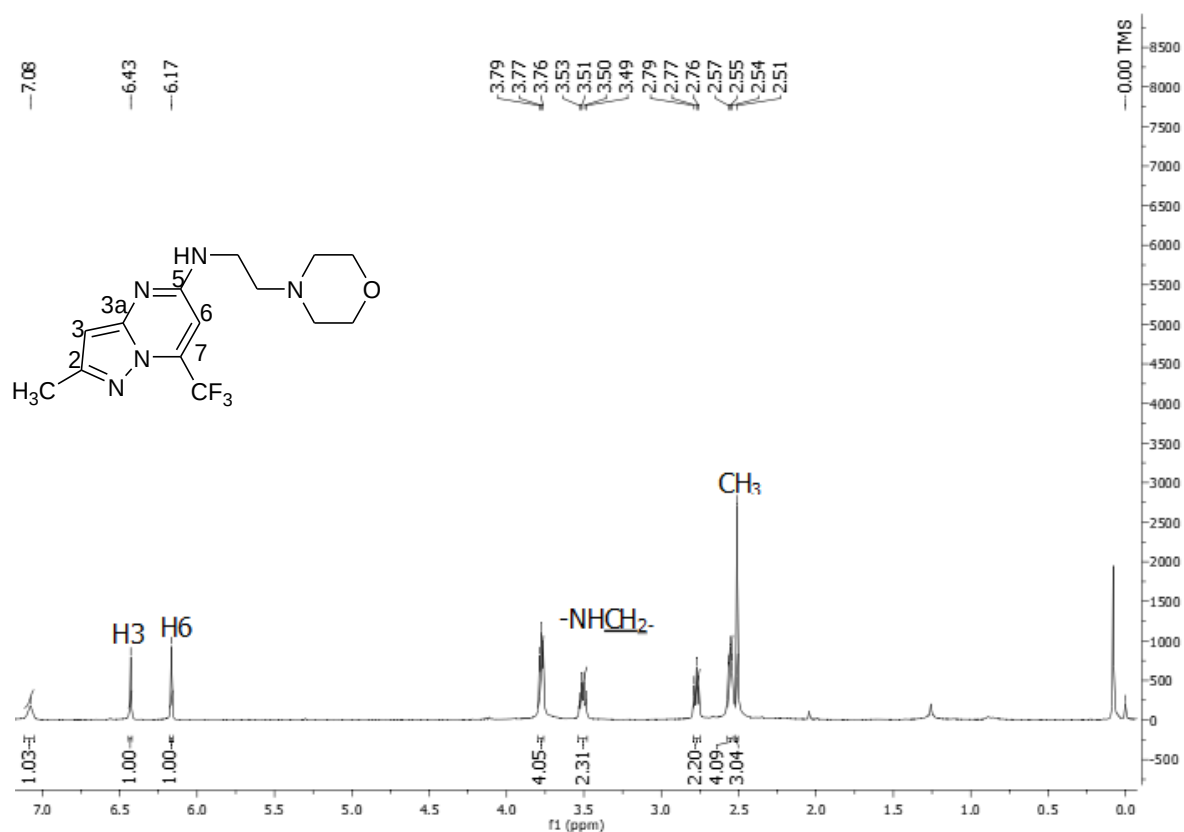


Figura 39: Espectro de RMN de ¹H da pirazolo[1,5-a]pirimidina **7a** (400 MHz em CDCl₃).

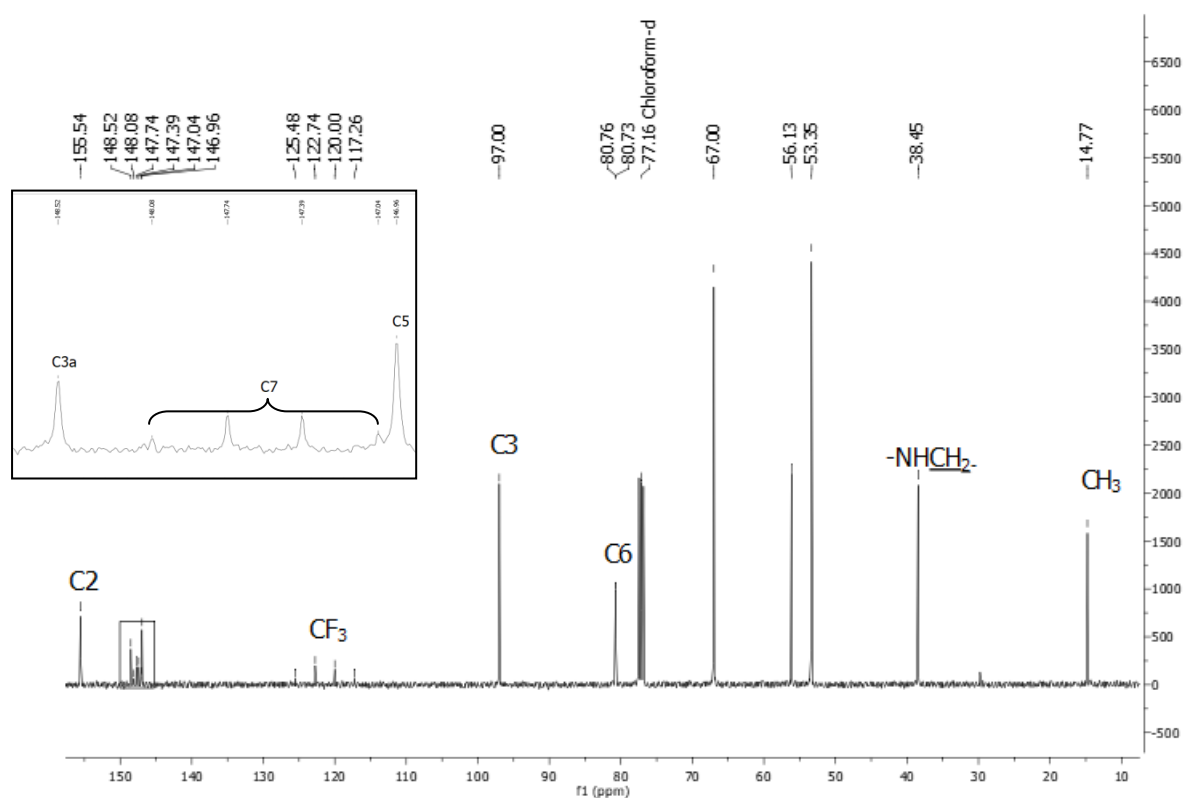


Figura 40: Espectro de RMN de ^{13}C da pirazolo[1,5-a]pirimidina **7a** (100 MHz em CDCl_3).

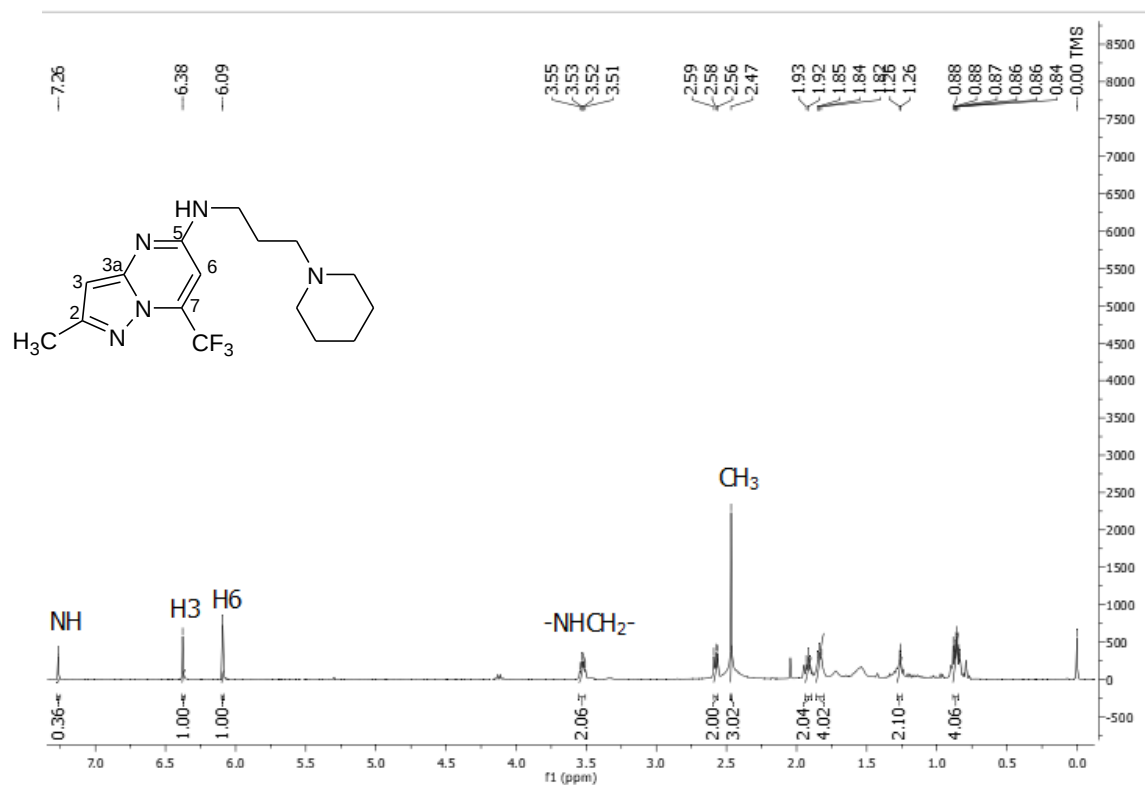


Figura 41: Espectro de RMN de ^1H da pirazolo[1,5-a]pirimidina **7b** (400 MHz em CDCl_3).

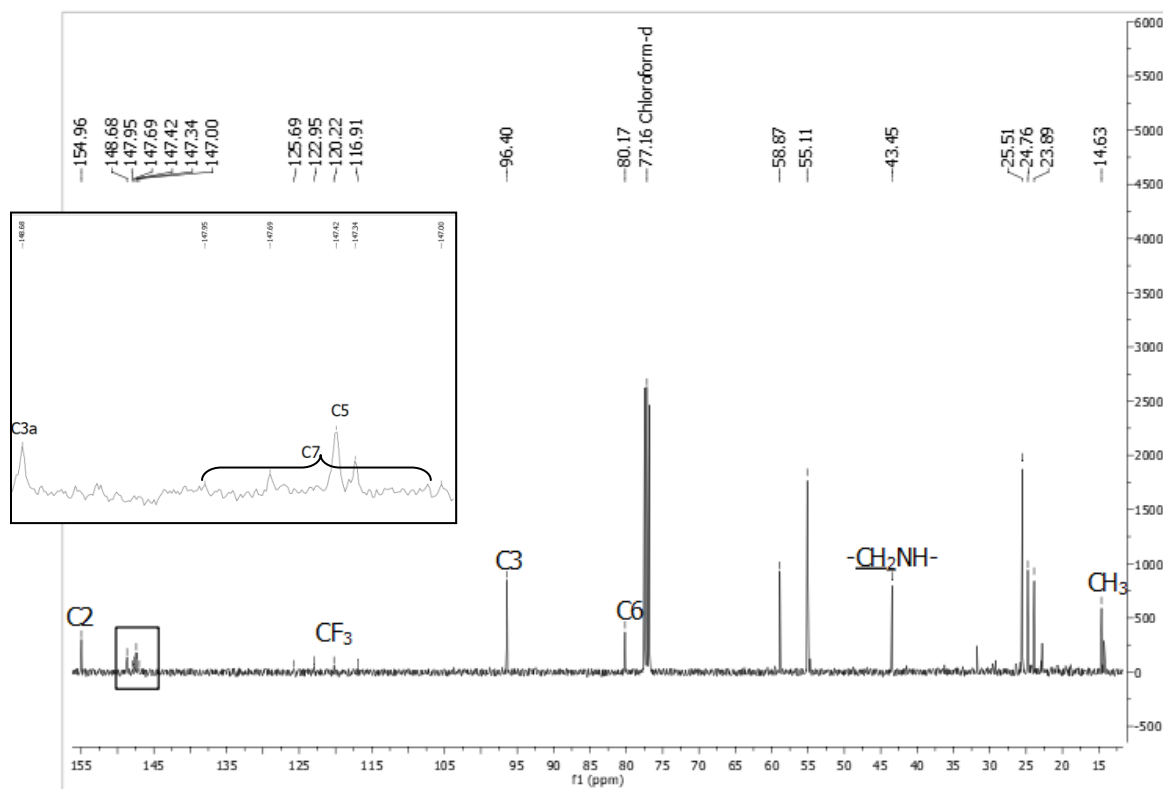


Figura 42: Espectro de RMN de ^{13}C da pirazolo[1,5-a]pirimidina **7b** (100 MHz em CDCl_3).

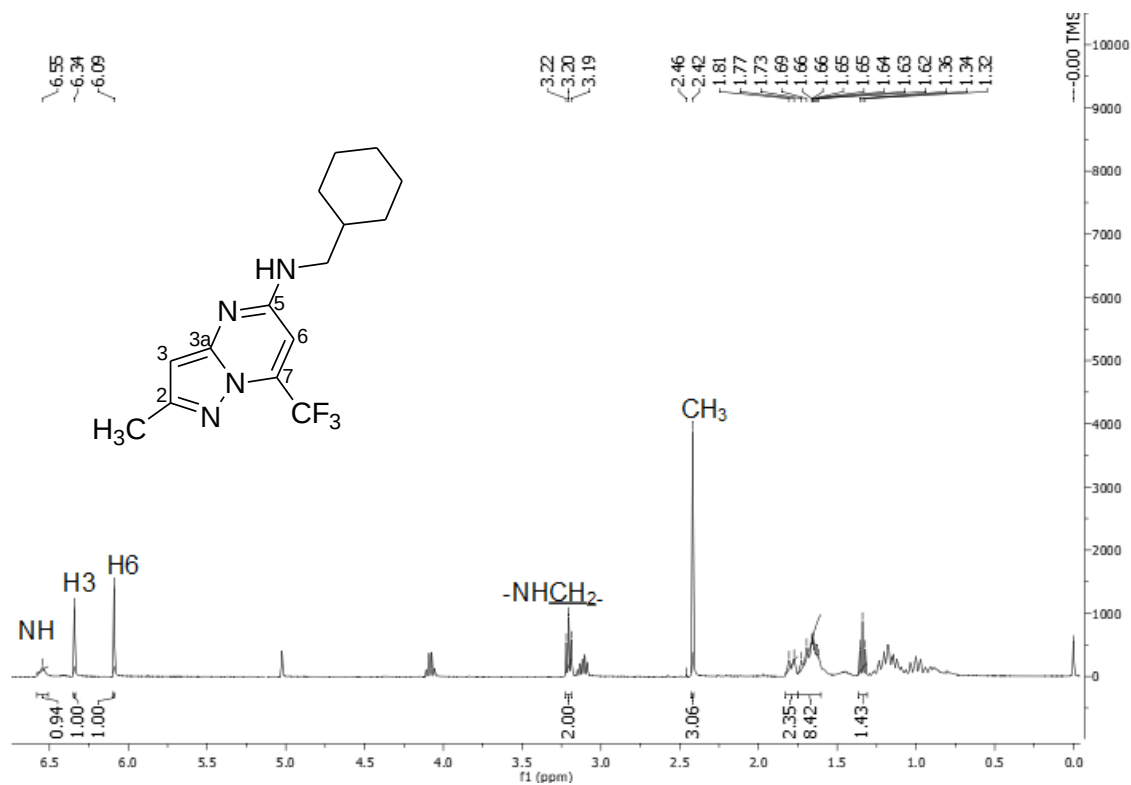


Figura 43: Espectro de RMN de ^1H da pirazolo[1,5-a]pirimidina **7c** (400 MHz em CDCl_3).

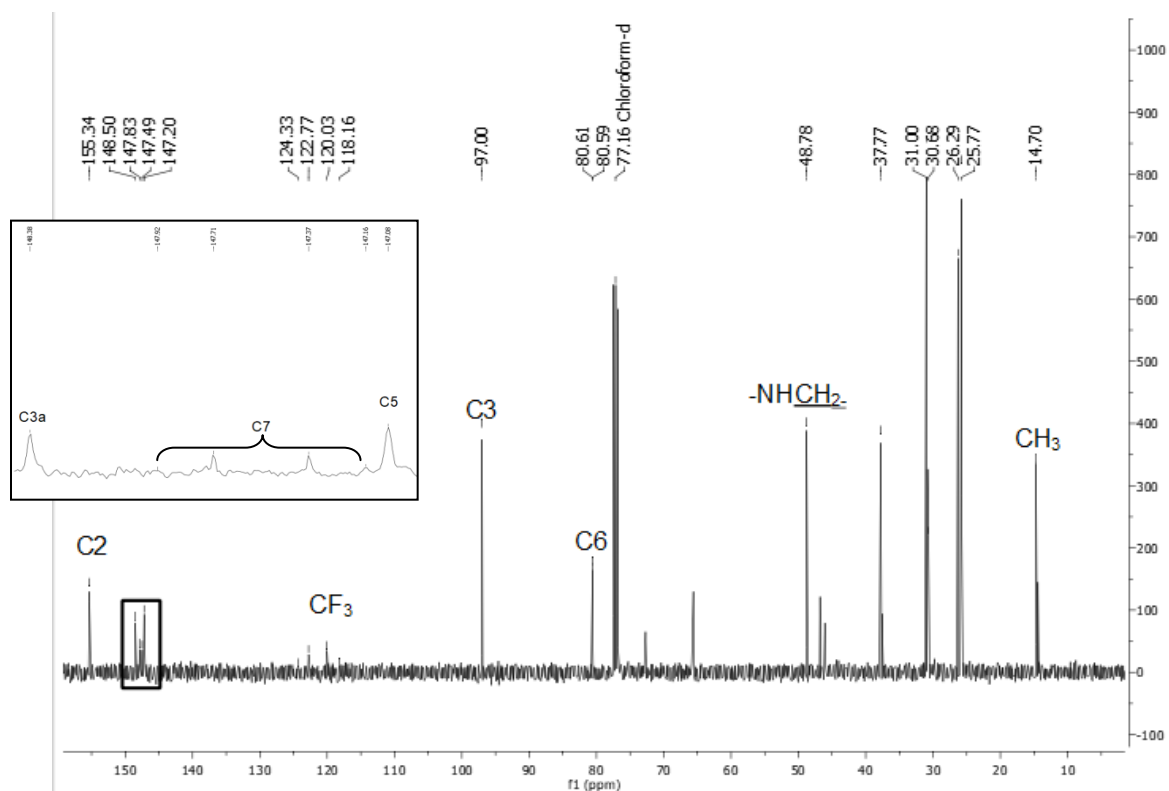


Figura 44: Espectro de RMN de ¹³C da pirazolo[1,5-a]pirimidina **7c** (100 MHz) em CDCl₃).

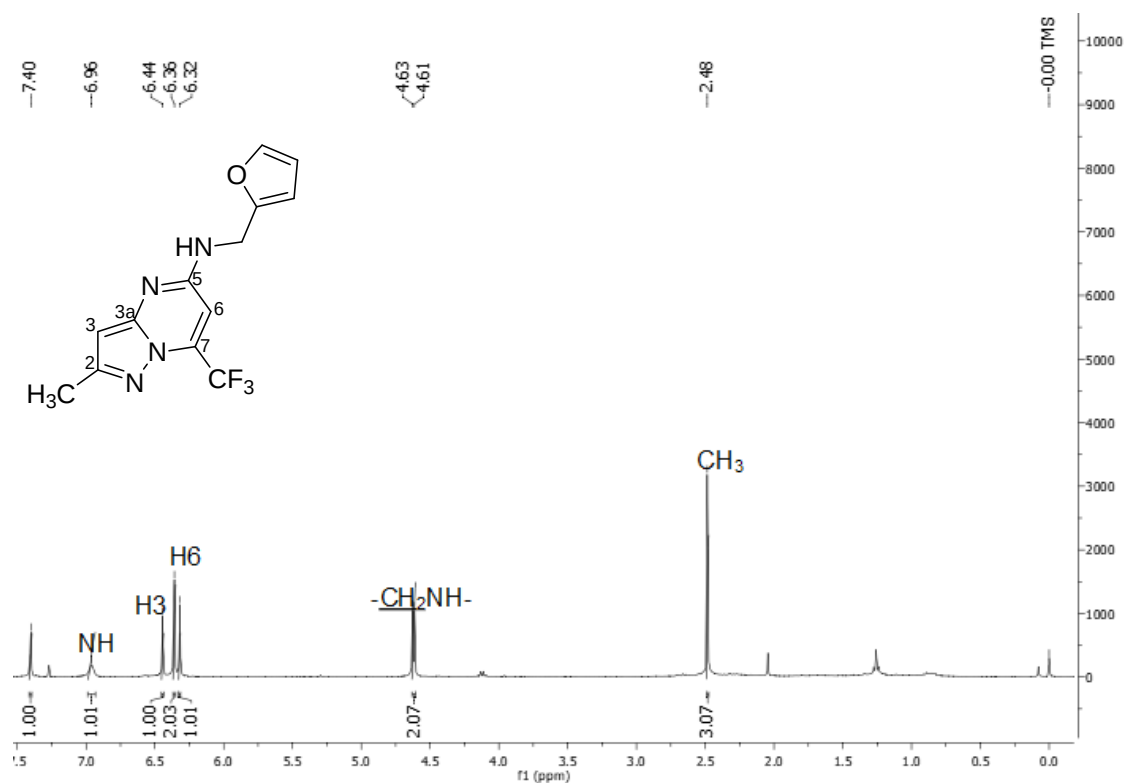


Figura 45: Espectro de RMN de ¹H da pirazolo[1,5-a]pirimidina **7d** (400 MHz) em CDCl₃).

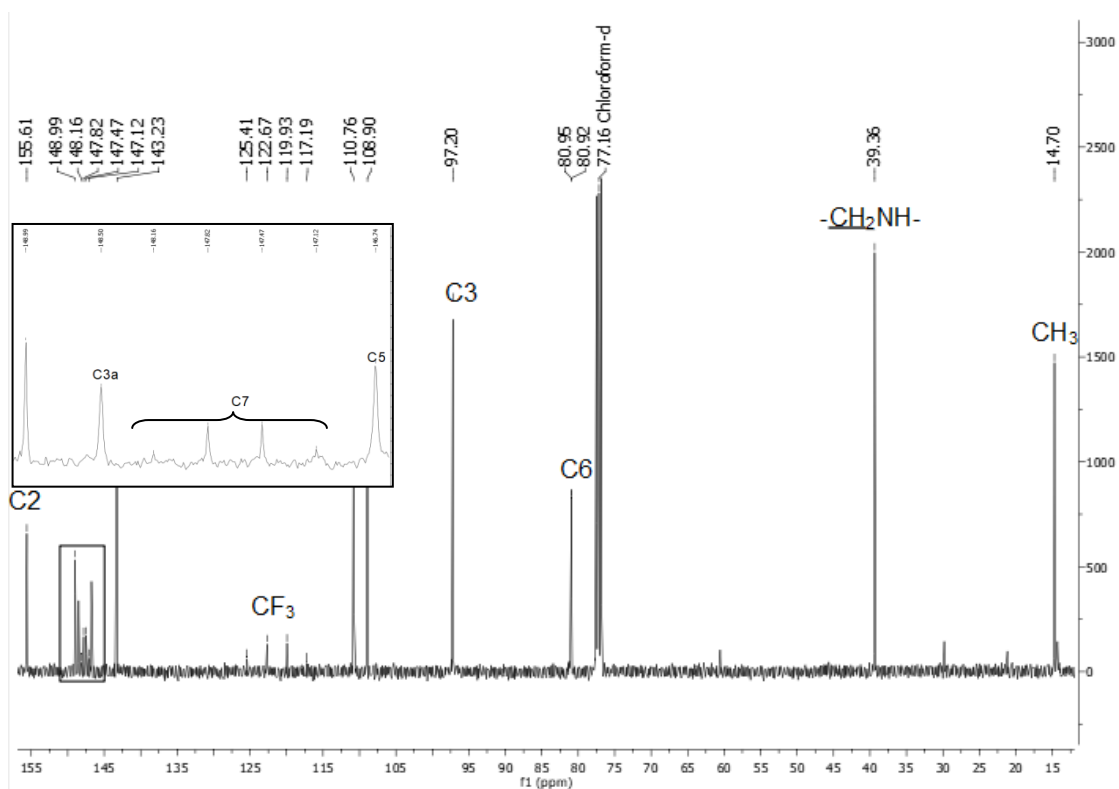


Figura 46: Espectro de RMN de ¹³C da pirazolo[1,5-a]pirimidina **7d** (100 MHz em CDCl₃).

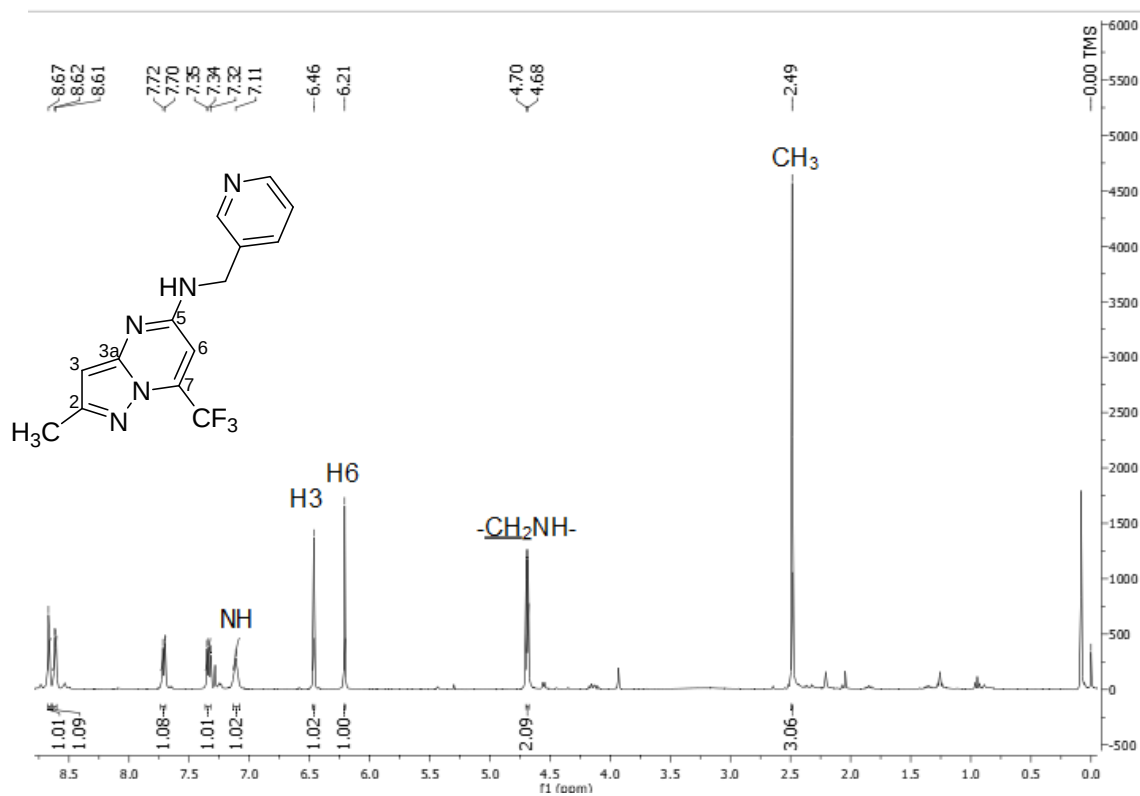


Figura 47: Espectro de RMN de ^1H da pirazolo[1,5-a]pirimidina **7e** (400 MHz em CDCl_3).

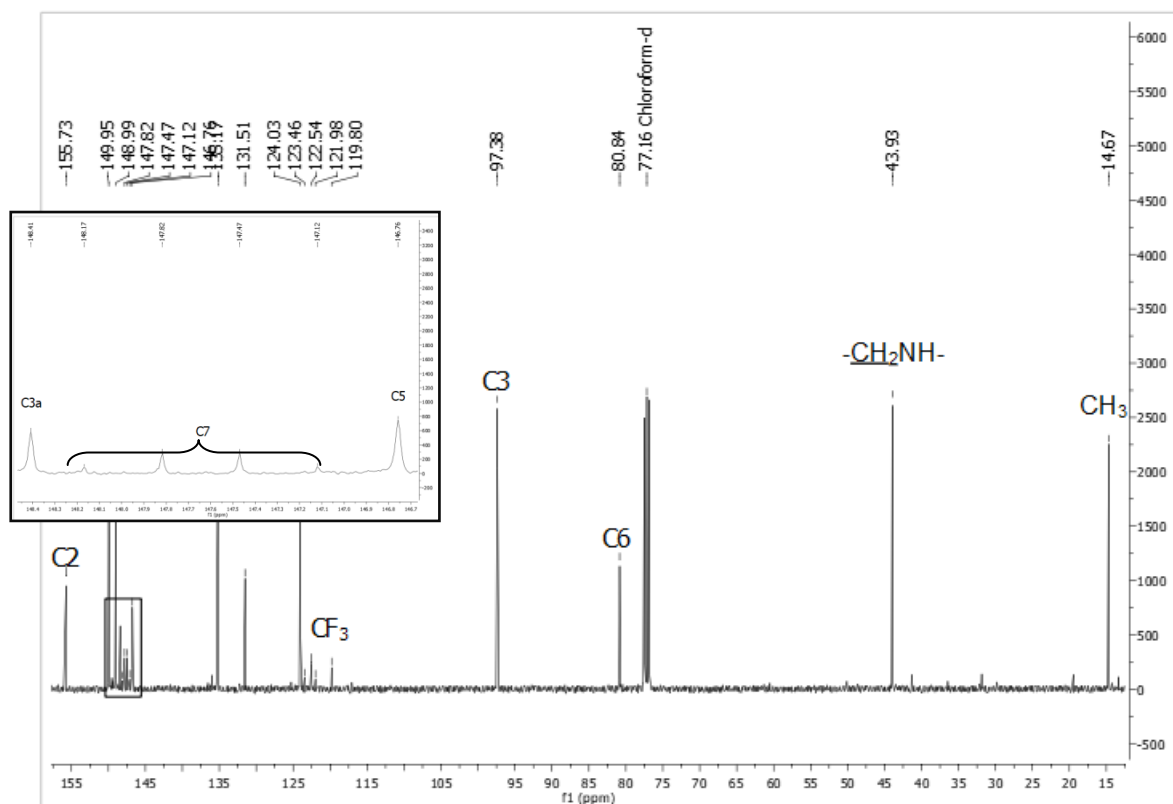


Figura 48: Espectro de RMN de ^{13}C da pirazolo[1,5-a]pirimidina **7e** (100 MHz em CDCl_3).

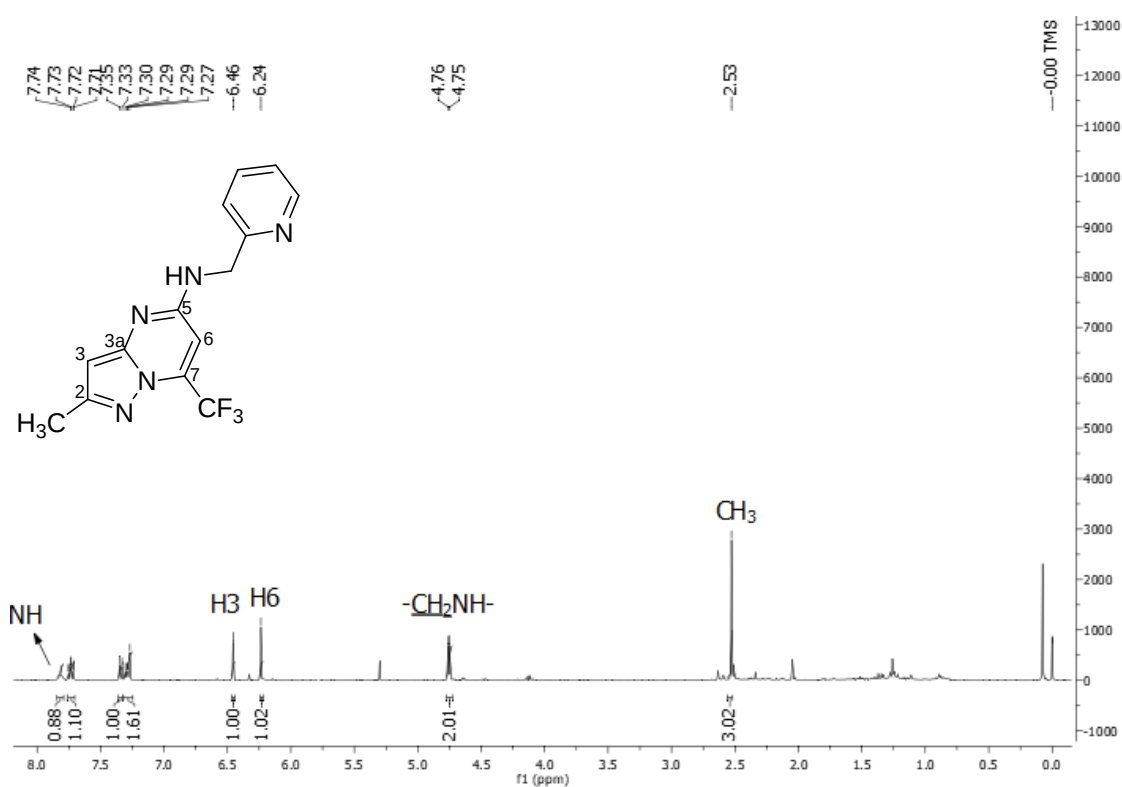


Figura 49: Espectro de RMN de ^1H da pirazolo[1,5-a]pirimidina **7f** (400 MHz em CDCl_3).

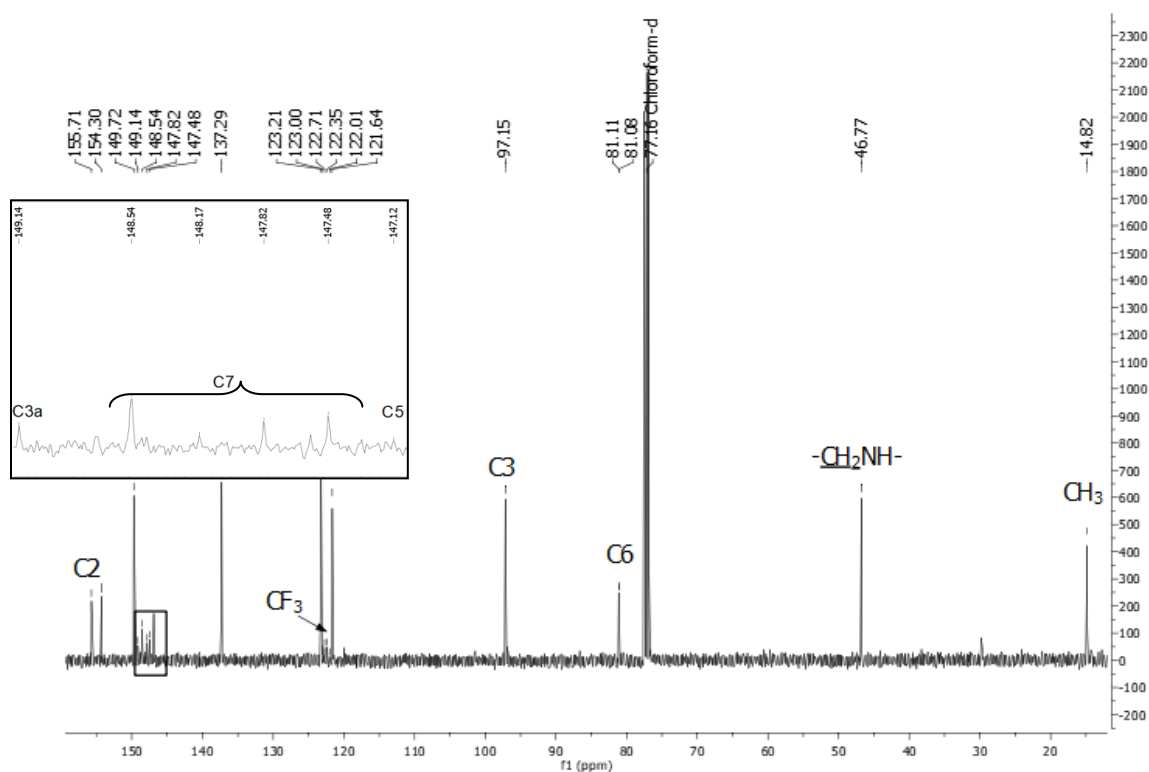


Figura 50: Espectro de RMN de ^{13}C da pirazolo[1,5-a]pirimidina **7f** (100 MHz em CDCl_3).

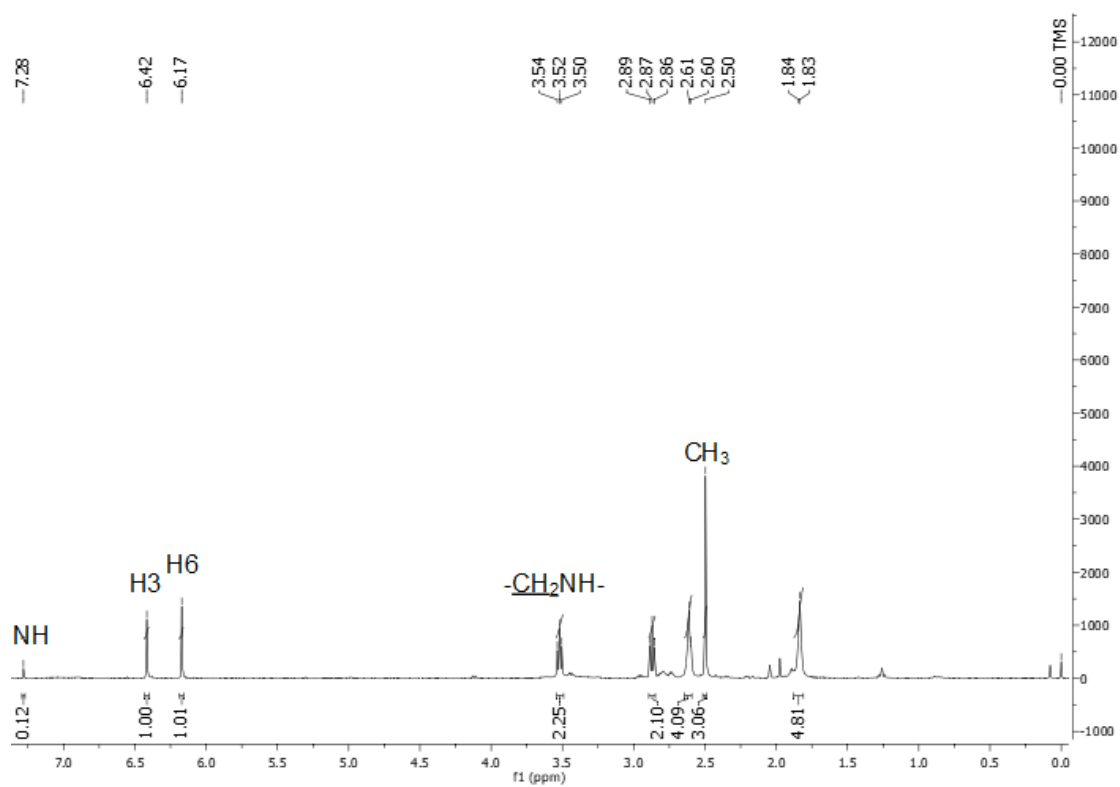


Figura 51: Espectro de RMN de ^1H da pirazolo[1,5-a]pirimidina **7g** (400 MHz em CDCl_3).

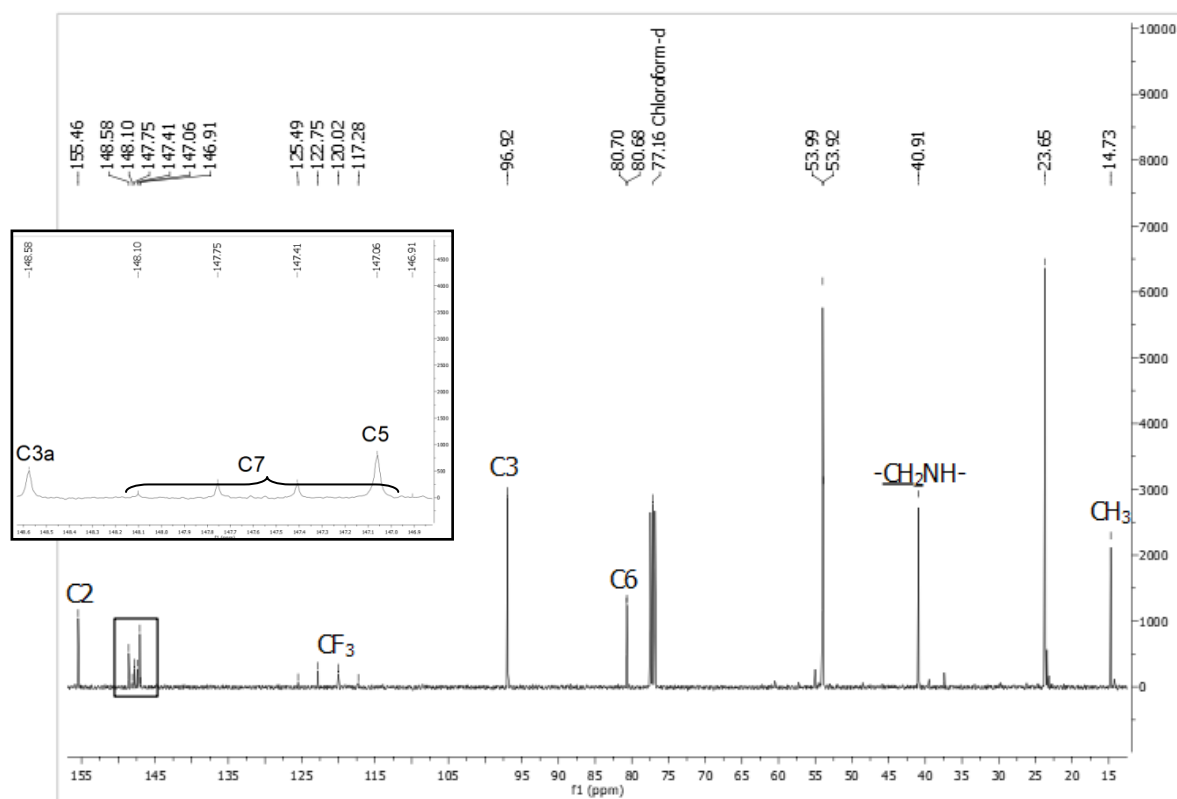


Figura 52: Espectro de RMN de ^{13}C da pirazolo[1,5-a]pirimidina **7g** (100 MHz em CDCl_3).

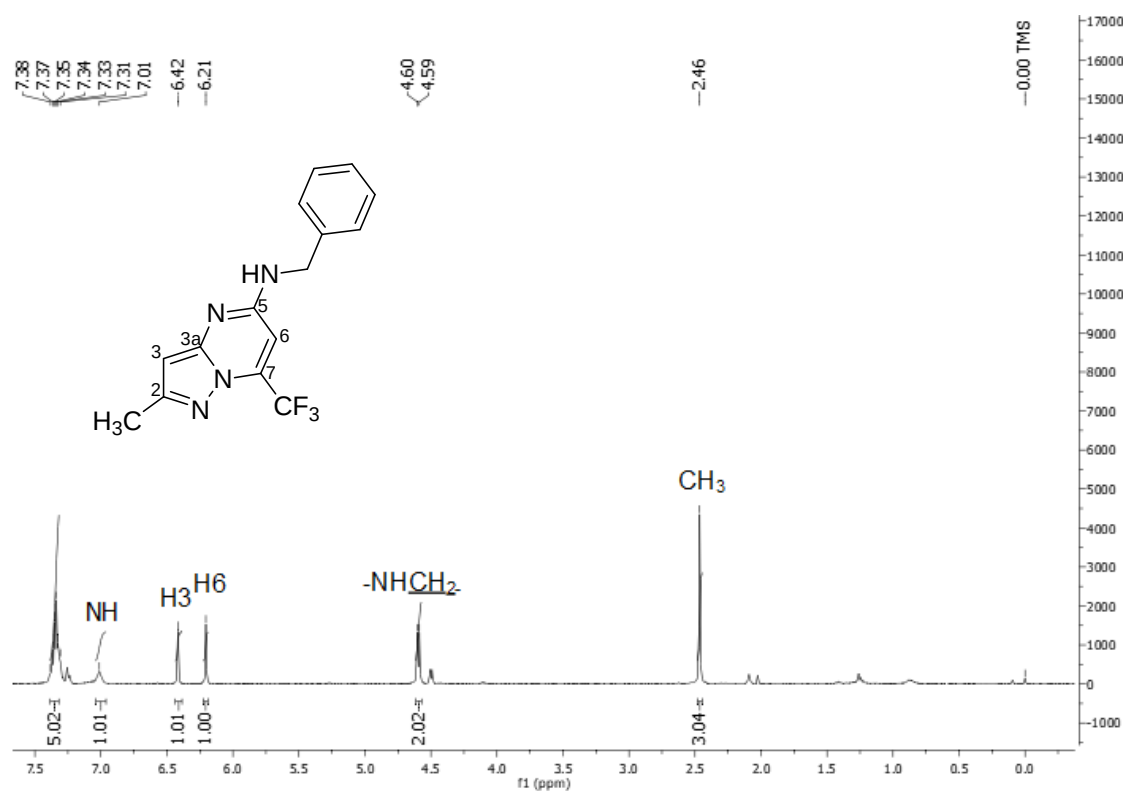


Figura 53: Espectro de RMN de ^1H da pirazolo[1,5-a]pirimidina **7h** (400 MHz em CDCl_3).

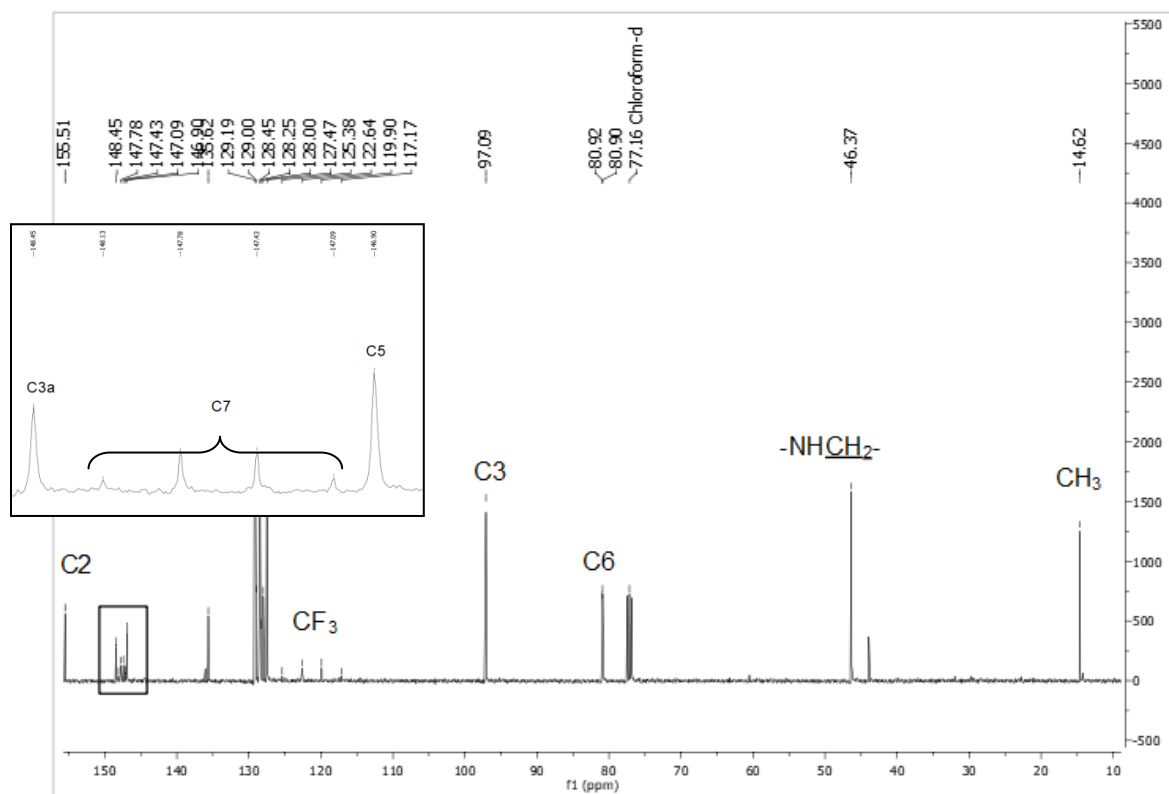


Figura 54: Espectro de RMN de ^{13}C da pirazolo[1,5-a]pirimidina **7h** (100 MHz em CDCl_3).

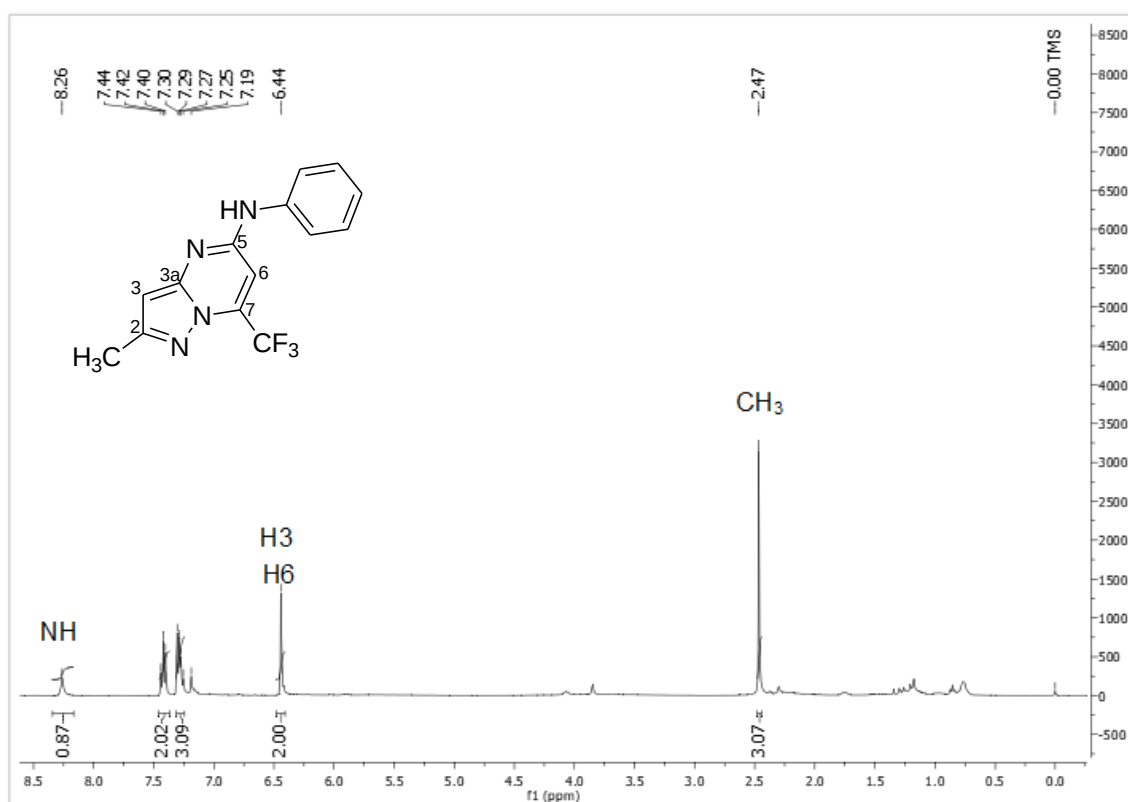


Figura 55: Espectro de RMN de ¹H da pirazolo[1,5-a]pirimidina **7i** (400 MHz em CDCl₃).

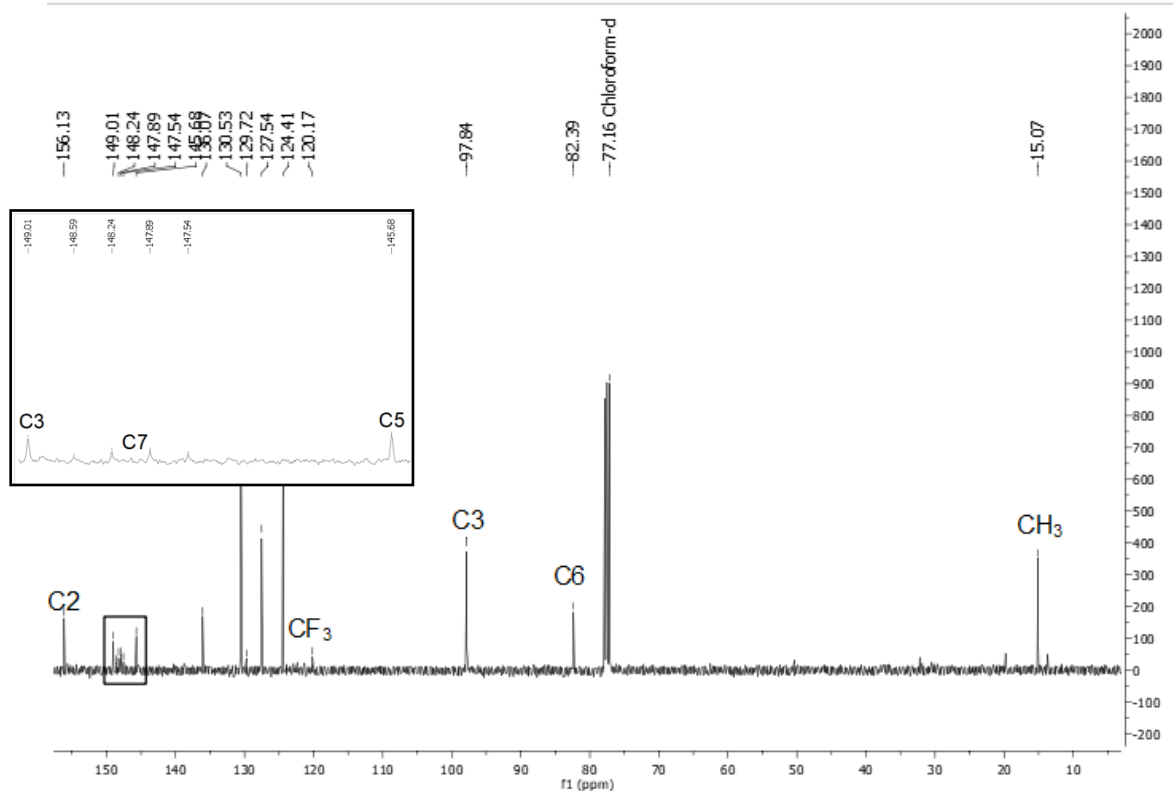


Figura 56: Espectro de RMN de ¹³C da pirazolo[1,5-a]pirimidina **7i** (100 MHz em CDCl₃).

ANEXO III – Espectros de RMN bidimenssional

ANEXO III – Espectros de RMN bidimenssional

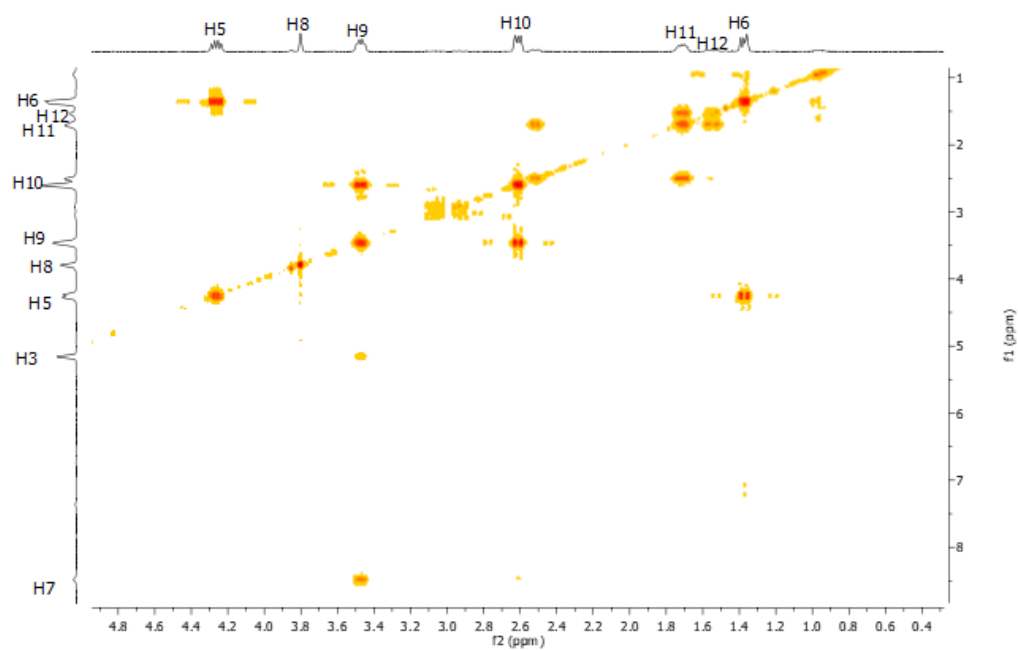


Figura 57: Espectro de COSY, composta **10** (CDCl_3).