

## Estudo de Métodos de Obtenção de Derivados Pirrólicos e Avaliação da Atividade Anti-*Trypanosoma cruzi*

**Study of Methods for the Synthesis of Pyrrole Derivatives and Evaluation of anti-*Trypanosoma cruzi* Activity**

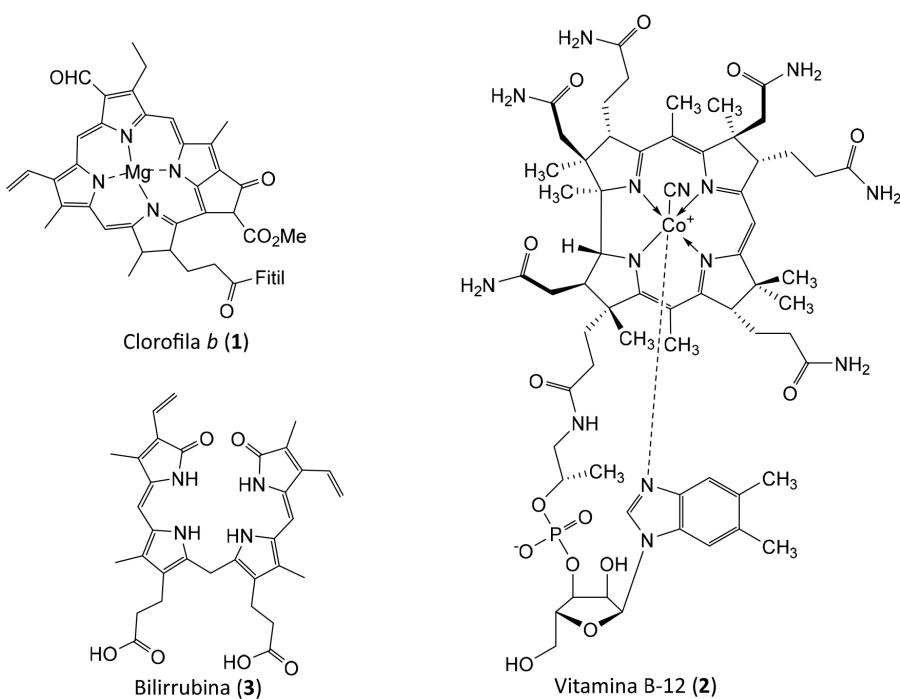
Eduardo Barbieri,<sup>a,b</sup> Policarpo Ademar Sales Junior,<sup>c</sup> Silvane Maria Fonseca Murta,<sup>c</sup> Bárbara V. Silva<sup>a,\*</sup>

In this paper, pyrrole compounds were synthesized based on the Knorr method consisting of a cyclocondensation reaction between  $\alpha$ -amino- $\beta$ -ketoester with  $\beta$ -ketoesters and  $\beta$ -diketone. Different pyrrole derivatives were obtained by varying the composition of the ester group into  $\beta$ -ketoesters through transesterification reactions. Furthermore, after the synthesis of pyrrole nuclei, acid hydrolysis reactions, decarboxylation of the *tert*-butyl group, electrophilic aromatic substitution using *N*-bromosuccinimide or reaction with thiosemicarbazide were explored to vary the composition of the  $\alpha$  group in relation to the nitrogen heteroatom of the pyrrole nuclei. Regarding the anti-*Trypanosoma cruzi* activity of pyrrole derivatives, 4 compounds synthesized were active, with  $IC_{50}$  ranging between 14.1 and  $>50 \mu\text{M}$ .

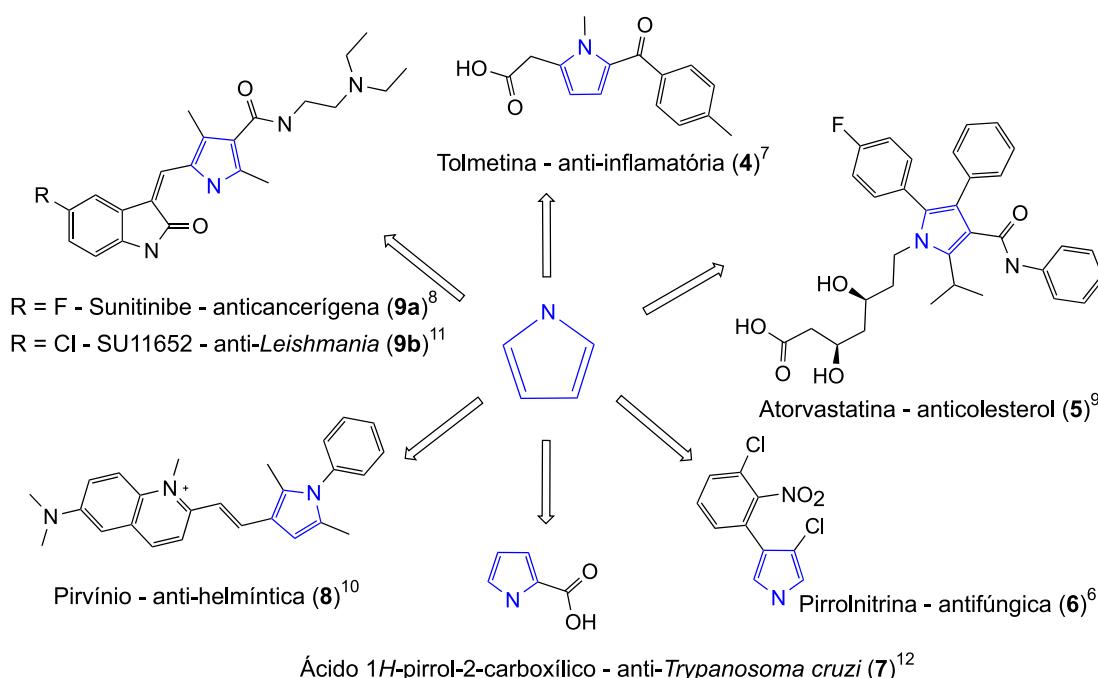
**Keywords:** Pyrrole; Chagas disease;  $\beta$ -ketoesters; chemical transformations

### 1. Introdução

O pirrol, assim como o furano e o tiofeno, é um heterociclo de 5 membros aromático contendo apenas um heteroátomo.<sup>1</sup> Compostos pirrólicos são classicamente obtidos através de rotas sintéticas utilizando os métodos de Paal-Knorr, síntese de Hantzsch, síntese de Knorr ou reações multicomponentes.<sup>2-5</sup> Pirróis estão presentes na estrutura química de produtos naturais, como clorofila *b* (**1**), vitamina B-12 (**2**) e bilirrubinoides (**3**) (Figura 1).<sup>1,2</sup>



**Figura 1.** Exemplos de compostos com o núcleo pirrólico encontrados em produtos naturais, clorofila em plantas, vitamina B-12 em alimentos de origem animal, e bilirrubina, substância produzida pelo fígado



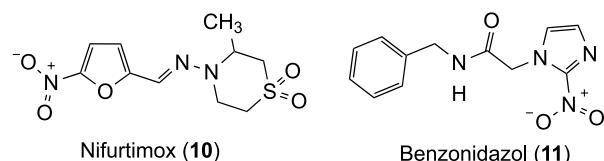
**Figura 2.** Exemplos de compostos contendo núcleo pirrólico destacado em azul, e suas respectivas atividades farmacológicas

Em termos de aplicações farmacológicas, o núcleo pirrólico é encontrado em compostos com atividade antifúngica (**6**),<sup>6</sup> anti-inflamatória (**4**),<sup>7</sup> anticancerígena (**9a**),<sup>8</sup> anticoletosterol (**5**),<sup>9</sup> e anti-helmíntica (**8**) (Figura 2).<sup>10</sup> Destacam-se ainda as atividades anti-*Leishmania* (**9b**) e anti-*Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) (**7**). O composto SU11652 (**9b**), por exemplo, apresentou atividade anti-*Leishmania* através da inibição de enzimas nucleosídeo difosfato quinases presente em protozoários.<sup>11</sup> O ácido 1*H*-pirrol-2-carboxílico (**7**) reduziu a taxa de infecção de células Vero pelo protozoário *T. cruzi* em estudos *in vitro*.<sup>12</sup>

O *T. cruzi* é o protozoário causador da doença de Chagas, uma doença negligenciada, que de acordo com a Organização Mundial da Saúde, afeta aproximadamente 6-7 milhões de pessoas no mundo, sendo a maioria dos casos localizados na América Latina.<sup>13</sup> A transmissão da doença de Chagas para humanos ocorre através da contaminação de pele ou mucosas por fezes de insetos da subfamília *Triatominae* infectados por *T. cruzi*. Muitos pacientes em estados avançados da doença de Chagas desenvolvem alterações cardíacas, digestivas e neurológicas. Atualmente, a doença de Chagas é tratada utilizando os fármacos nifurtimox (**10**) ou benzonidazol (**11**) (Figura 3), ambos desenvolvidos nos anos 60-70.<sup>14</sup> Porém, além de diversos efeitos colaterais, esses fármacos são eficientes apenas para o tratamento dos estágios iniciais da doença, evidenciando a falta de tratamentos para pacientes em estados avançados. Outro agravante é a falta de investimento pela indústria farmacêutica no desenvolvimento de novos tratamentos para combater a doença de Chagas.<sup>15</sup>

Baseado neste cenário de falta de tratamentos eficazes para a doença de Chagas e potencial atividade anti-parasitária de compostos pirrólicos, o objetivo deste

trabalho foi a síntese e avaliação da atividade anti-*T. cruzi* de compostos contendo o núcleo pirrol, variando os grupos funcionais nas posições  $\alpha$  e  $\beta$  com relação ao heteroátomo de nitrogênio.



**Figura 3.** Estruturas químicas dos compostos nifurtimox e benzonidazol usados no tratamento da doença de Chagas

## 2. Resultados e Discussão

### 2.1. Reações de transesterificação de $\beta$ -cetoésteres utilizando zinco metálico ou sulfato de cobre como catalisador

Para a obtenção de pirróis com diferentes grupos ésteres na posição  $\beta$  do anel aromático, primeiramente foi realizada as reações de transesterificação do acetoacetato de metila ou etila, conforme descrito na Tabela 1. O acetoacetato de metila (**12**) reagiu com propanol, butanol e pentanol, separadamente, na presença de zinco em pó e em aquecimento sob refluxo, fornecendo os compostos **13a-c** em rendimento de 78%, 91% e 94%, respectivamente. Já para a preparação dos compostos **15a-c** utilizou-se acetoacetato de etila (**14**) como material de partida de acordo com procedimento descrito por Bandgar *et al.* (2001),<sup>16</sup> que o reagiu com álcool benzílico, 4-hidroximetil-nitrobenzeno e 3-hidroximetil-nitrobenzeno, separadamente, na presença

**Tabela 1.** Reagentes, condições e rendimentos para a síntese de  $\beta$ -cetoésteres

$\beta$ -cetoésteres alifáticos	$R_1$	Tempo (h)	Rendimento (%)
13a	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	3,5	78
13b	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH <sub>3</sub>	3,5	91
13c	(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> CH <sub>3</sub>	3,5	94
$\beta$ -cetoésteres aromáticos	$R_2, R_3$	Tempo (h)	Rendimento (%)
15a	$R_2 = H, R_3 = H$	6	98
15b	$R_2 = H, R_3 = NO_2$	8	57
15c	$R_2 = NO_2, R_3 = H$	8	66

de sulfato de cobre e em aquecimento sob refluxo, gerando os produtos em rendimentos de 98%, 57% e 66%, respectivamente.

O zinco em pó foi efetivo para a síntese de **13a-c**, porém, para o composto **15a** a reação não se completou mesmo após 10 horas em agitação e em aquecimento sob refluxo. O catalisador sulfato de cobre anidro possibilitou a obtenção dos produtos **15a-c** em menores tempos de reação (6-8 horas). No caso da síntese de **15b**, a presença do catalisador reduziu o tempo de 15 horas, descrito na literatura,<sup>17</sup> para 8 horas. Além disso, em todas as reações utilizou-se um sistema de refluxo acoplado a um condensador, que permitiu a remoção contínua de metanol ou etanol gerado ao decorrer da reação deslocando o equilíbrio no sentido dos produtos. Os rendimentos apresentados na Tabela 1 foram obtidos após remoção dos catalisadores através de filtração simples e metanol ou etanol utilizando rota-evaporador.

As análises de ressonância magnética nuclear (RMN) e infravermelho (IV) revelaram que todos os  $\beta$ -cetoésteres sintetizados apresentam-se na forma de um equilíbrio tautomérico entre a forma cetônica e a forma enólica. Pode-se sugerir que o equilíbrio entre os dois tautômeros ocorre porque na forma enólica há a possibilidade de formação de uma ligação de hidrogênio intramolecular entre o hidrogênio da hidroxila e o oxigênio da carbonila de éster, gerando um ciclo de 6 membros. A Figura 4 mostra o espectro de hidrogênio para o acetoacetato de butila (**13b**) e o equilíbrio tautomérico entre a forma cetônica e enólica. Os sinais característicos da forma enólica são os simpletos em 12,08 ppm e 4,96 ppm, correspondentes aos hidrogênios ligados da hidroxila e à dupla ligação C-C, respectivamente.

Com relação à caracterização por infravermelho, os dados da Tabela 2, juntamente com o espectro exemplificado na Figura 5, mostram duas bandas características de carbonilas na região entre 1713 e 1749 cm<sup>-1</sup>, correspondente à carbonila de éster e de cetona, respectivamente, presente

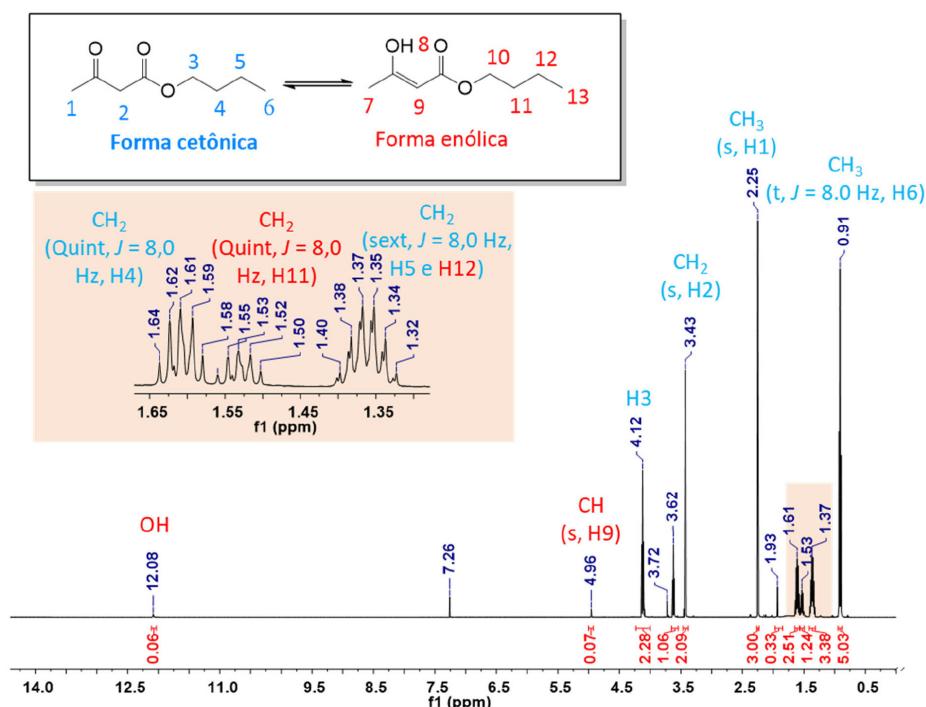
na estrutura dos  $\beta$ -cetoésteres. Além disso, observou-se bandas de menor intensidade na região em torno de 1620-1649 cm<sup>-1</sup> e na forma de dupletos que são características da carbonila do tautômero enólico.<sup>18</sup> Outra evidência da forma enólica é a presença de bandas na região entre 3400 e 3600 cm<sup>-1</sup> que podem ser atribuídas a um estiramento da ligação O-H. Os espectros de RMN, IV e massas de todos os  $\beta$ -cetoésteres podem ser encontrados na Informação Suplementar (Figuras S1-S41).

Além de análises por RMN e IV, os  $\beta$ -cetoésteres **13a-c** e **15a** foram caracterizados por espectrometria de massas. Para exemplificar, a proposta de fragmentação do acetoacetato de butila (**13b**) está descrita na Informação Suplementar - Esquema S1.

## 2.2. Síntese dos núcleos pirrólicos

Uma vez sintetizados os  $\beta$ -cetoésteres, o próximo passo foi a síntese dos núcleos pirrólicos. Conforme mostra o Esquema 1, inicialmente, preparou-se um precursor de reação contendo o grupo oxima (**17**), reagindo acetoacetato de *terc*-butila (**16**) com nitrito de sódio em meio ácido por 12 horas. Após obtenção do precursor (**17**), na etapa seguinte, foi utilizado o método de Knorr para síntese de núcleos pirrólicos. Neste método, o grupo oxima no composto **17** foi reduzido utilizando paládio suportado em carvão e hidrogênio em meio ácido e aquecimento, gerando um grupo amino que reagiu com  $\beta$ -cetoésteres (Esquema 1) ou 2,4-pentanodiona (Esquema 2). Após 7 horas de reação, obteve-se os compostos **18a-e** e **19** com rendimentos iguais a 61%, 55%, 84%, 76%, 87% e 85%, respectivamente.

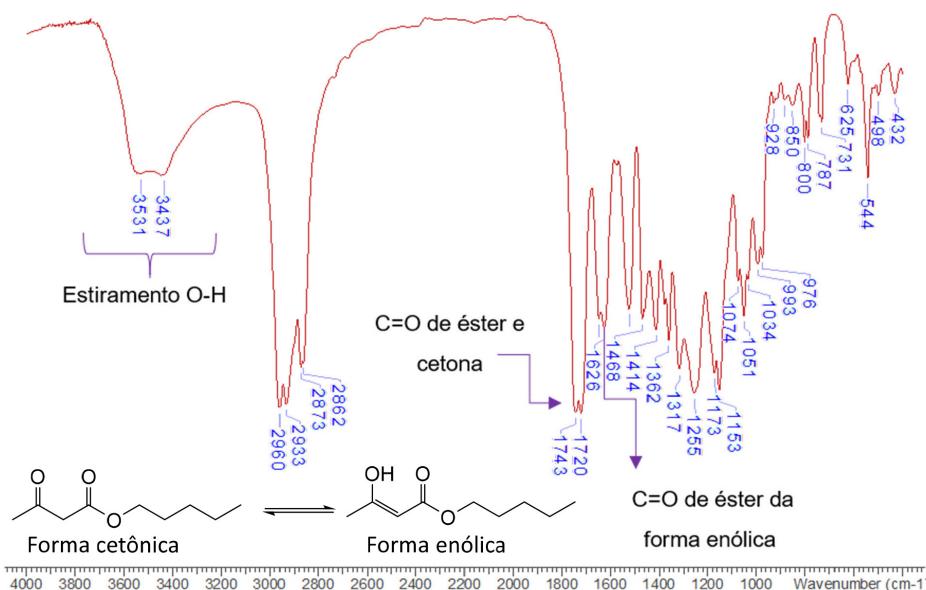
O mesmo procedimento mostrado no Esquema 1 foi investigado para geração de compostos pirrólicos utilizando  $\beta$ -cetoésteres aromáticos (**15a-c**) como material de partida. Como pode ser observado na Tabela 3, não houve formação de compostos pirrólicos quando paládio foi utilizado como agente redutor. Por exemplo,



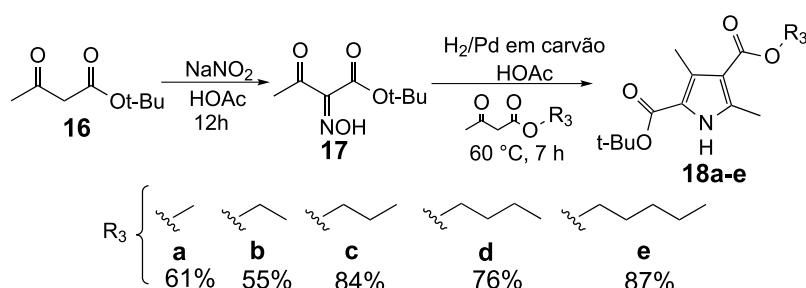
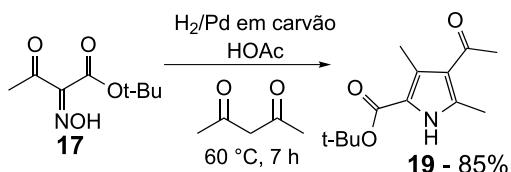
**Figura 4.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do acetoacetato de butila (**13b**) com destaque da expansão na região entre 1,64 e 1,32 ppm

**Tabela 2.** Dados do IV dos  $\beta$ -cetoésteres **13a-13c** e **15a-15c**

Composto	$\nu \text{C=O}$ de cetona e éster (tautômero cetônico) ( $\text{cm}^{-1}$ )	$\nu \text{C=O}$ do tautômero enólico
<b>13a</b>	1718	1741
<b>13b</b>	1720	1743
<b>13c</b>	1716	1743
<b>15a</b>	1716	1743
<b>15b</b>	1716	1749
<b>15c</b>	1713	1740



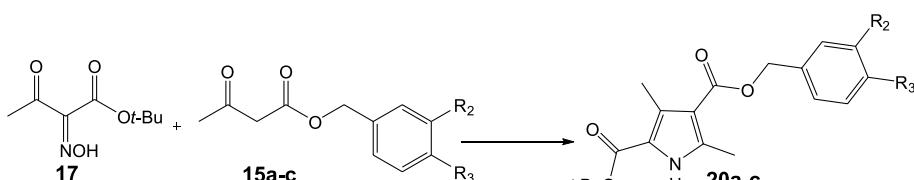
**Figura 5.** Espectro de IV (KBr) do acetoacetato de pentila (**13c**)

Esquema 1. Método para a obtenção de compostos pirrólicos (**18a-e**) partindo de  $\beta$ -cetoésteresEsquema 2. Método para obtenção do derivado pirrólico **19**, utilizando o substrato **17** e 2,4-pentanodiona como materiais de partida

na tentativa de síntese do composto **20a** (Tabela 3), após 2 horas de reação, formou-se um óleo alaranjado, cuja análise por espectrometria de massas não revelou nenhum composto com massa molecular igual ao esperado para **20a**. Uma provável explicação para o insucesso desta reação é a ocorrência da clivagem da ligação C-O da benzila do grupo éster, por hidrogenólise, formando um ácido carboxílico, o qual não sofre o ataque nucleofílico da forma reduzida do precursor **17**.<sup>19</sup> Portanto, outra tentativa foi explorada utilizando zinco em pó e ácido acético como meio redutor para síntese de núcleos pirrólicos.<sup>20</sup> No caso de acetooacetato de benzila (**15a**) como material de partida, obteve-se uma mistura dos compostos **20a** e **23** (2,4-dimetil-1*H*-pirrol-3-carboxilato de benzila), de acordo com análise por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) (Informação Suplementar – Figura S77-S78). As tentativas de síntese de pirróis utilizando **15b-c** e zinco em pó como redutor não foram bem-sucedidas. Análise do meio reacional por

cromatografia em camada delgada mostrou consumo do material de partida e formação de uma mistura de produtos com polaridade maior do que a esperada para compostos pirrólicos.

Os espectros de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C apresentaram todos os sinais esperados para os compostos **18a-e** e **19**. A título de ilustração, a Figura 6 mostra o espectro de RMN <sup>1</sup>H para o composto **18e**, no qual observa-se um sinal correspondente ao hidrogênio ligado ao heteroátomo nitrogênio do núcleo pirrólico em 12,82 ppm. Além disso, dois simples correspondentes às duas metilas ligadas ao anel aromático em 2,98 e 2,68 ppm, e um simples com integração para 9 hidrogênios referente aos hidrogênios do grupo *terc*-butila. Outros sinais que corroboram a obtenção da molécula desejada possuem deslocamento químico menor que 4,5 ppm e referem-se aos hidrogênios da cadeia alifática do éster, cuja multiplicidade, deslocamento químico e constante de acoplamento são mostrados na expansão do espectro de RMN <sup>1</sup>H em azul.

Tabela 3. Reagentes e condições para a síntese de compostos pirrólicos utilizando  $\beta$ -cetoésteres aromáticos

$\beta$ -cetoésteres aromáticos	Condições de reação	Tempo (h)	Resultado
<b>15a</b>	R <sub>2</sub> = H, R <sub>3</sub> = H	Pd/C 60 °C	2,0 Consumo do material de partida, mas produto gerado não corresponde a <b>20a</b>
<b>15a</b>	R <sub>2</sub> = H, R <sub>3</sub> = H	Zn/HOAc 60 °C	2,0 Formação de uma mistura dos produtos <b>20a</b> e <b>23</b>
<b>15b</b>	R <sub>2</sub> = H, R <sub>3</sub> = NO <sub>2</sub>	Zn/HOAc 60 °C	2,0 Consumo do material de partida, com formação de uma mistura de produtos
<b>15c</b>	R <sub>2</sub> = NO <sub>2</sub> , R <sub>3</sub> = H	Zn/HOAc 60 °C	2,0 Consumo do material de partida, com formação de uma mistura de produtos

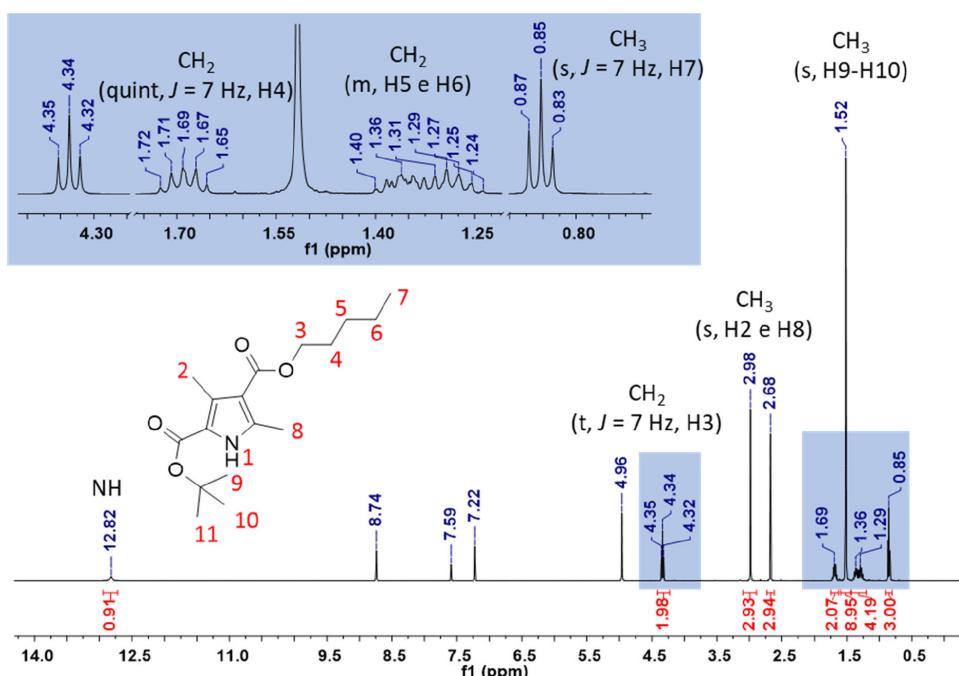


Figura 6. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, piridina- $d_5$ ) do 3,5-dimetil-1*H*-pirrol-2,4-dicarboxilato de 2-*terc*-butila-4-pentila (**18e**), com destaque da expansão na região entre 0,83 e 4,35 ppm

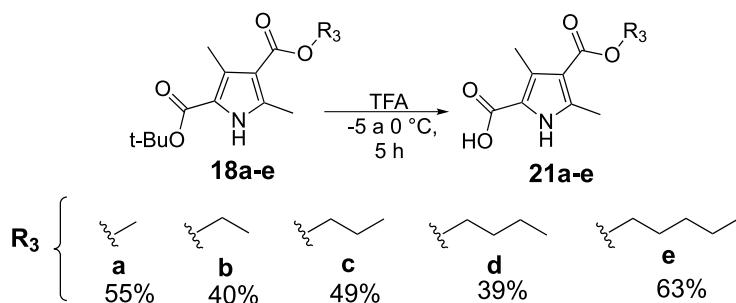
Na análise por CG-EM observou-se que o pico correspondente ao íon molecular mostrou a massa esperada para os compostos **18a-e** e **19**. A proposta de fragmentação de massas para o composto **18d** pode ser encontrada na Informação Suplementar, Esquema S2. Todos os espectros de RMN, IV, massas dos compostos **18a-e** e **19** estão disponíveis na Informação Suplementar, Figuras S42-S84.

### 2.3. Reações de hidrólise em meio ácido dos compostos **18a-e**

As reações de hidrólise foram realizadas em meio ácido utilizando ácido trifluoroacético (TFA) e temperatura entre -5 e 0 °C, conforme descrito no Esquema 3. Após 5 horas, foi adicionado gelo picado ao meio de reação, e os compostos **21a-e** foram isolados através de filtração a vácuo do precipitado gerado, em 55%, 40%, 49%, 39% e 63% de rendimento, respectivamente.

Como evidência da formação dos compostos ácido 4-(alquilcarbonil)-3,5-dimetil-1*H*-pirrol-2-carboxílico

(**21a-e**) na análise de RMN, verificou-se o desaparecimento do simpleto com área 9 em 1,56 ppm, conforme esperado, após a hidrólise áida do grupo *terc*-butila dos compostos **18a-e**. A título de exemplificação, o espectro de RMN  $^1\text{H}$  do 2,4-dimetil-1*H*-pirrol-3-carboxilato de metila (**21c**) está representado na Figura 7. Nesta figura é possível observar o hidrogênio ligado ao nitrogênio como um simpleto em 11,75 ppm, os sinais das metilas ligadas ao anel aromático em 2,45 e 2,39 ppm como simpletos com área de aproximadamente 3 para cada um. Já os sinais dos hidrogênios da butila encontram-se entre 4,11 e 0,91 ppm como um triplete ( $\delta$  4,12; 3H;  $J = 6,5 \text{ Hz}$ ), um quinteto ( $\delta$  1,63; 2H;  $J = 6,5 \text{ Hz}$ ), um sexteto ( $\delta$  1,39; 2H;  $J = 6,5 \text{ Hz}$ ) e um outro triplete ( $\delta$  0,91; 3H;  $J = 6,5 \text{ Hz}$ ). Conforme esperado, os hidrogênios de  $-\text{CH}_2-$  ligado ao átomo de oxigênio do grupo éster apresentam maior deslocamento químico que o restante da cadeia alifática devido à maior desblindagem causada pelo átomo de oxigênio. Com relação aos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$ , também pode-se observar o desaparecimento de dois sinais de carbono quando comparado aos espectros



Esquema 3. Reagentes e condições para hidrólise áida e descarboxilação dos compostos pirrólicos **4a-e**

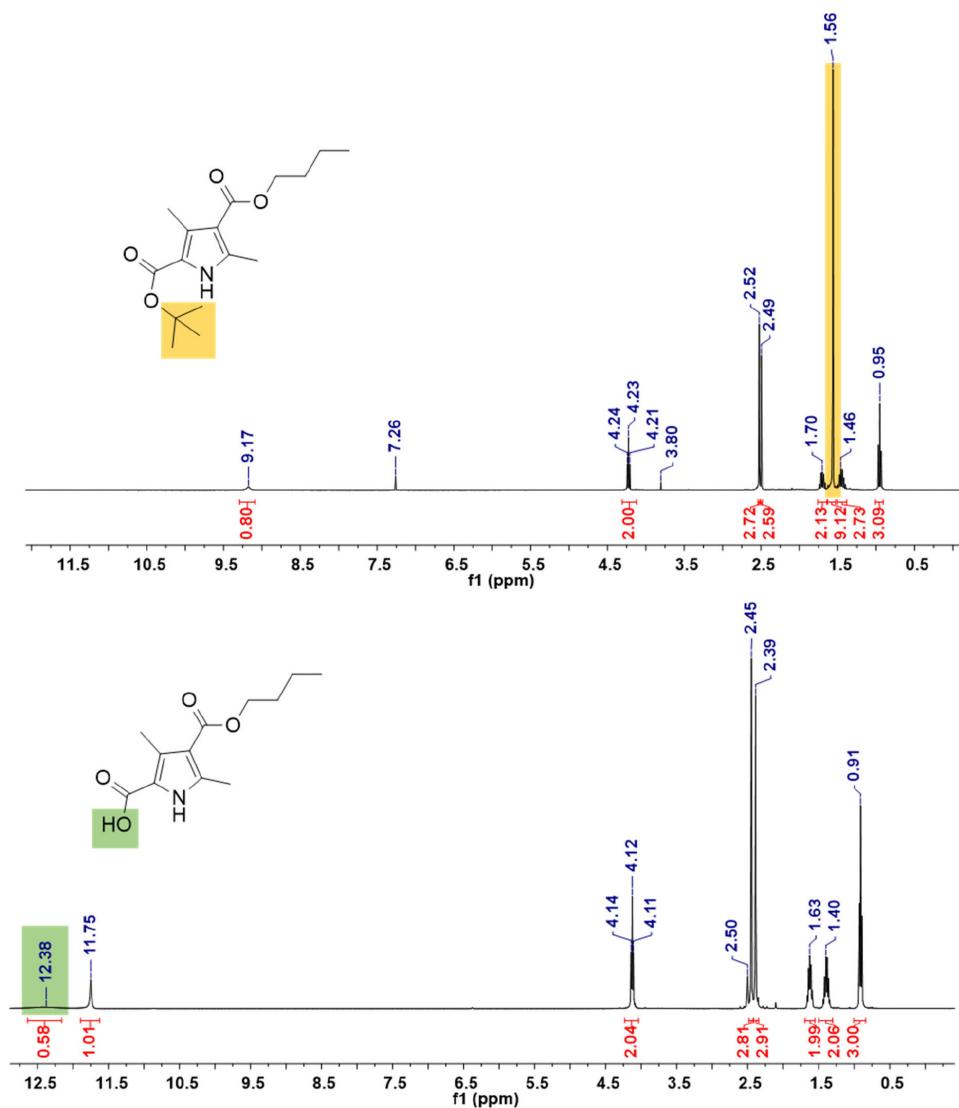
dos compostos **18a-e**, um sinal de um carbono quaternário e outro bem intenso correspondente às metilas, ambos do grupo *terc*-butila. Todos os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e IV dos compostos **21a-e** estão disponíveis na Informação Suplementar, Figuras S85-S110.

#### 2.4. Reações de descarboxilação dos compostos **18a-f** em meio ácido e aquecimento

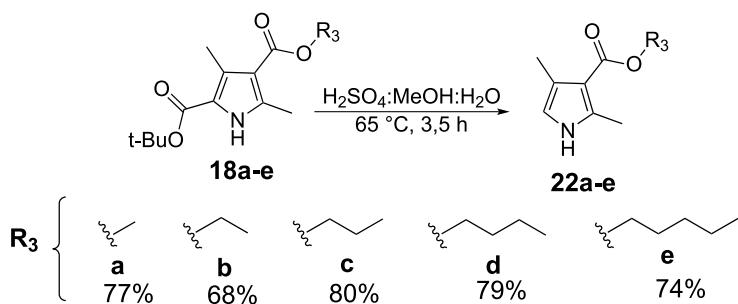
As reações de descarboxilação dos 3,5-dimetil-1*H*-pirrol-2,4-dicarboxilato de 2-*terc*-butila-4-alquilas foram conduzidas na presença de ácido sulfúrico e em aquecimento, mantendo a temperatura entre 55-60 °C por 3,5 horas (Esquema 4). O mesmo procedimento foi utilizado para converter a mistura de **20a** e **23**, descrita no item 2.2, em um único produto **23** (Esquema 5). Tradicionalmente reações de descarboxilação de grupos *terc*-butila são conduzidas utilizando ácido clorídrico em etanol e aquecimento.<sup>21</sup>

Porém, estudos realizados por Manley *et al.*<sup>22</sup> mostraram que essas condições aplicadas para descarboxilação de **18b** levaram a formação de subprodutos. Isso não foi observado pelos autores quando se utilizou uma solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , água e metanol sob aquecimento. Portanto, ao se utilizar as condições descritas por Manley *et al.*<sup>22</sup>, obteve-se os compostos **22a-e** e **23** com rendimentos iguais a 77%, 68%, 80%, 79%, 74% e 67%, respectivamente.

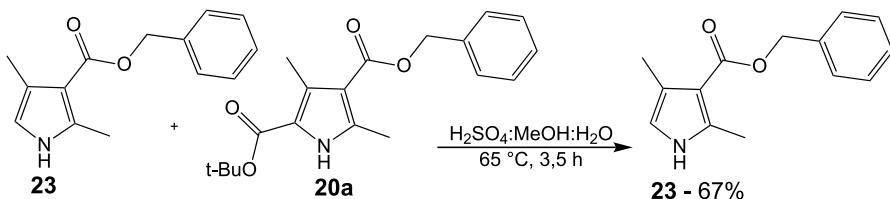
Assim como nos compostos **21a-e**, os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  dos compostos descarboxilados (**22a-e**) mostraram a perda do simpleto com integração para 9 hidrogênios. Já com relação aos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$ , observou-se a ausência de três sinais de carbono, um correspondente as três metilas equivalentes do grupo *terc*-butila, um do carbono quaternário também do grupo *terc*-butila e outro do carbono da carbonila de éster. Essas diferenças entre o espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **18d** e **22d** podem ser visualizadas na Figura 8. No espectro de IV



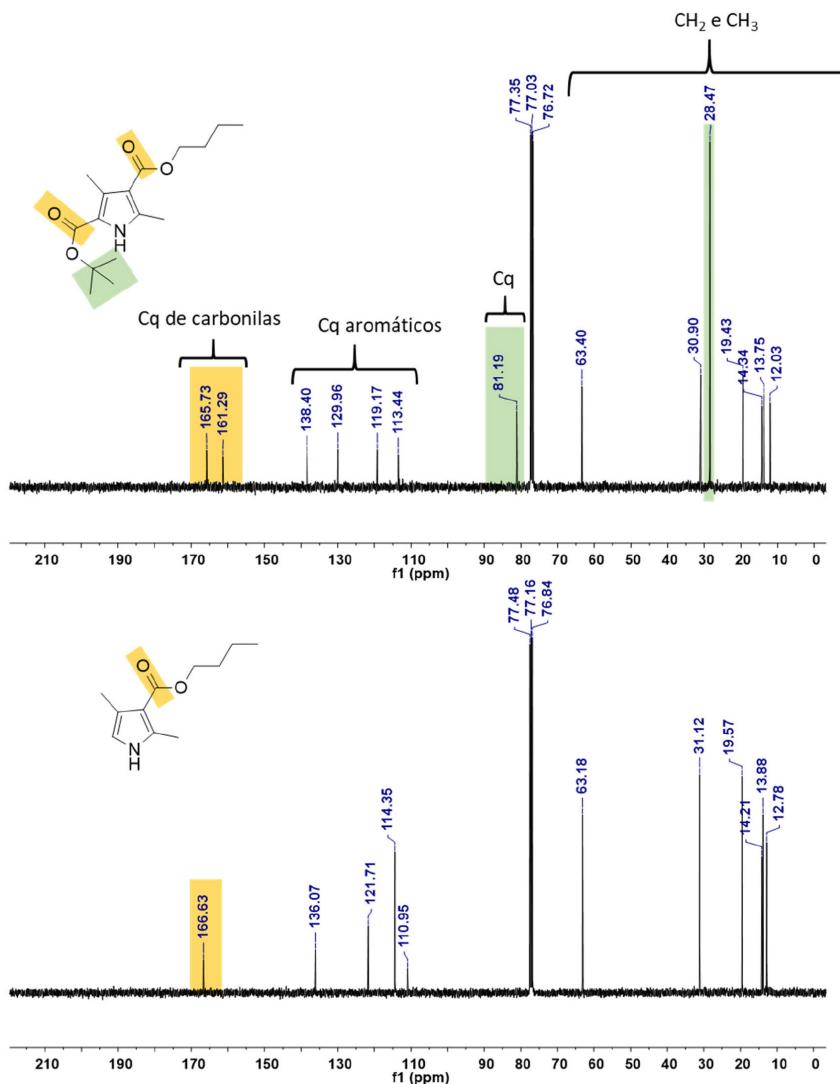
**Figura 7.** Espectros de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ) do 3,5-dimetil-1*H*-pirrol-2,4-dicarboxilato de 2-*terc*-butila-4-pentila (**18d**) (espectro superior) e ácido 4-(butoxicarbonil)-3,5-dimetil-1*H*-pirrol-2-carboxílico (**21d**) (espectro inferior)



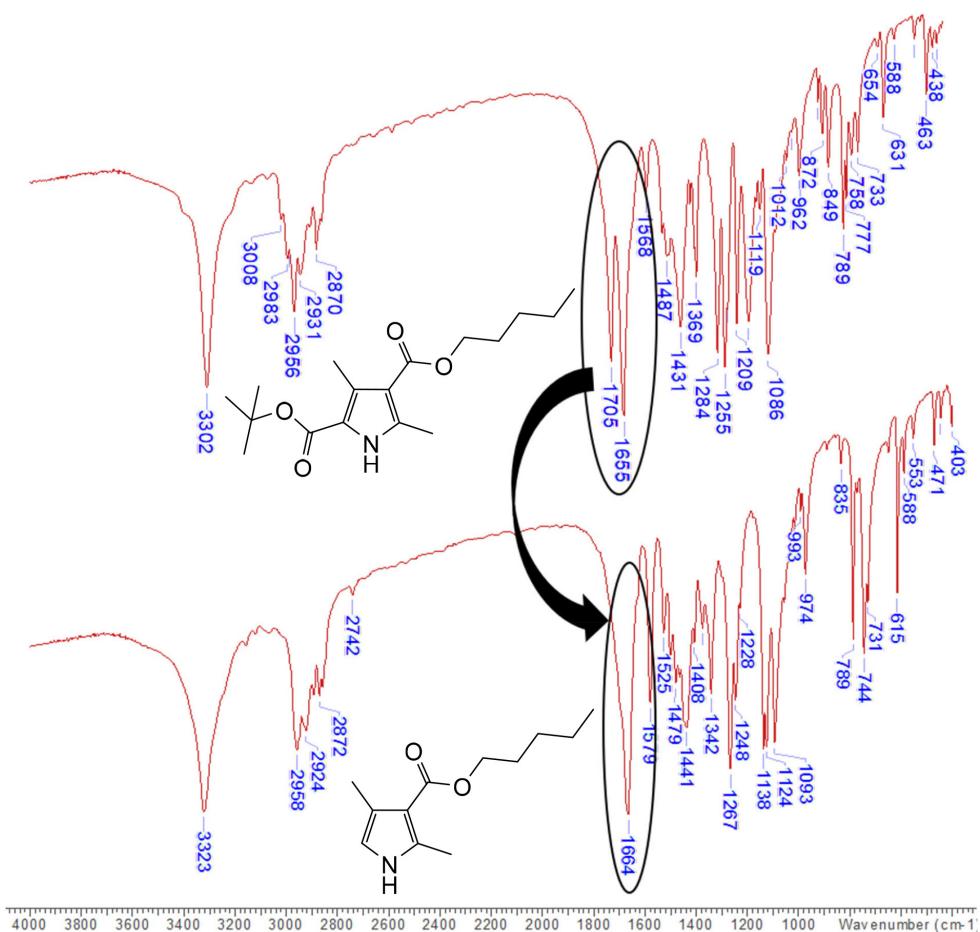
**Esquema 4.** Reagentes, condições e rendimentos para descarboxilação dos compostos pirrólicos **22a-e**



**Esquema 5.** Reagentes, condições e rendimentos para descarboxilação do composto pirrólico **20a**



**Figura 8.** Espectros de RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) dos 3,5-dimetil-1*H*-pirrol-2,4-dicarboxilato de 2-*terc*-butila-4-pentila (**18d**) (espectro superior) e 2,4-dimetil-1*H*-pirrol-3-carboxilato de pentila (**22d**) (espectro inferior)



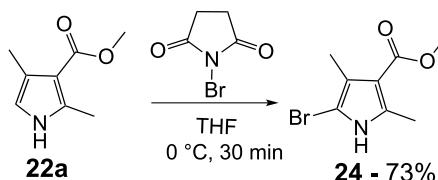
**Figura 9.** Espectros de IV (KBr) do 3,5-dimetil-1*H*-pirrol-2,4-dicarboxilato de 2-*terc*-butila-4-pentila (**18d**) na posição superior 2,4-dimetil-1*H*-pirrol-3-carboxilato de pentila (**22d**) na posição inferior

foi possível observar a ausência de uma das bandas de estiramento característica da carbonila de éster do grupo *terc*-butila conforme representado na Figura 9. Todos os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , IV, massas dos compostos **22a-e** e 23 estão disponíveis na Informação Suplementar, Figuras S111-S152.

## 2.5. Estudos de transformações químicas de compostos pirrólicos utilizando N-bromo-succinimida e tiossemi-carbazona

Outras modificações químicas foram exploradas para incorporar diferentes grupos funcionais na posição alfa ao nitrogênio do núcleo pirrólico. Uma delas foi a reação de bromação do composto **22a**, empregando *N*-bromo-succinimida como fonte de bromo eletrofílico (Esquema 6). O composto **24** foi obtido em 73% de rendimento. Observou-se que **24** é sensível à luz e apresenta sinais de degradação após 24 horas se o frasco que o armazena não for envolvido em papel alumínio.

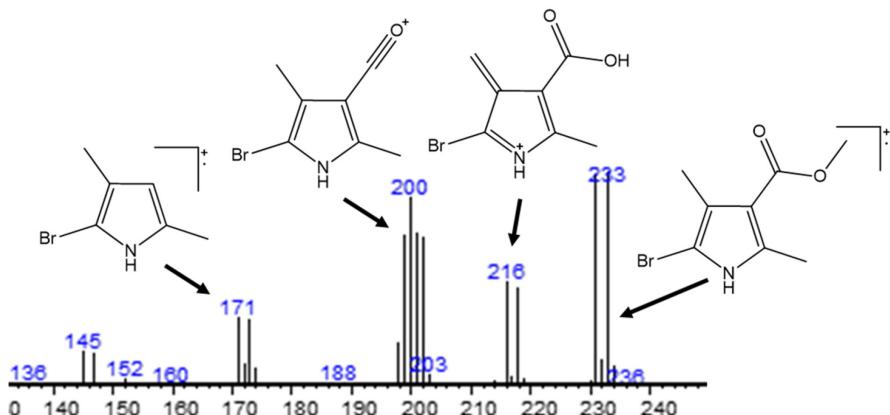
O espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto **24** mostrou o desaparecimento do sinal de área 1 encontrado em 6,34 ppm no espectro do composto **22a** (Informação Suplementar – Figura S153), indicando que houve transformação química.



**Esquema 6.** Método de obtenção do 5-bromo-2,4-dimetil-1*H*-pirrol-3-carboxilato de metila (**24**)

Outro dado que corroborou a obtenção do 5-bromo-2,4-dimetil-1*H*-pirrol-3-carboxilato de metila (**24**) foi a presença de picos com abundâncias aproximadamente iguais no espectro de massas (Figura 10). Isso ocorre porque o bromo é encontrado na natureza na forma de dois isótopos  $^{79}\text{Br}$  e  $^{81}\text{Br}$  com abundância de 50,5 e 49,5%, respectivamente.<sup>23</sup> Portanto, conforme mostra a Figura 10, os picos com  $m/z$  233, 216, 199 e 171 apresentaram-se vizinhos a picos de mesma intensidade com  $m/z$  igual a deles somado 2, confirmando a síntese do produto esperado (**24**).

Outra transformação química explorada foi a reação entre o composto **18a** com ortoformiato de trimetila (TOF) em ácido trifluoracético (TFA) dando origem ao composto **25** (Esquema 7) em 70% de rendimento.<sup>24</sup> O metil-5-formil-2,4-dimetil-1*H*-pirrol-3-carboxilato



**Figura 10.** Expansão do espectro de massas do 5-bromo-2,4-dimetil-1*H*-pirrol-3-carboxilato de metila (**24**). O espectro completo pode ser visto na Informação Suplementar (Figura S158)

(**25**) apresenta um grupo funcional aldeído que foi confirmado pelo espectro de RMN de  $^1\text{H}$  com um sinal de área aproximadamente 1 em 9,58 ppm (Informação Suplementar – Figuras S159-161). Análise por CG-EM também confirmou a síntese do composto apresentando pico do íon molecular com  $m/z$  igual a 181 (Informação Suplementar – Figura S163-S164).

Na etapa seguinte, **25** reagiu com tiossemicarbazida para gerar tiossemicarbazona **26** em 82% de rendimento (Esquema 7). A condução da reação em radiação de micro-ondas permitiu a obtenção do composto **26** em apenas 20 minutos e alto rendimento. Portanto, esse procedimento显著mente reduziu o tempo de reação se comparado com Sardari *et al.* (2017),<sup>25</sup> que reagiu tiossemicarbazidas e derivados de benzaldeído em metanol a temperatura ambiente durante 24 h. No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto **26** é possível observar os sinais característicos do grupo imina em 11,39 e 11,23 ppm, e a presença de sinais em 8,15, 7,97, e 7,92 ppm dos hidrogênios ligados a nitrogênios da tiossemicarbazona. Com relação ao espectro de IV, observou-se a presença de uma banda intensa em 1259  $\text{cm}^{-1}$  correspondente a ligação C=S, e o desaparecimento de uma banda de carbonila na região em torno de 1650  $\text{cm}^{-1}$  após a reação de **25** com tiossemicarbazida.<sup>26</sup> Todos os espectros de RMN e IV do composto **26** estão disponíveis na Informação Suplementar – Figuras S165-169.

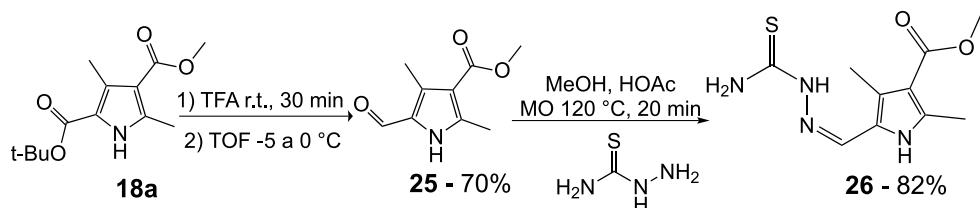
## 2.6. Ensaios biológicos

Os resultados dos ensaios biológicos contra *T. cruzi*

dos compostos **19**, **21a-e**, **22a-f**, **23**, **24**, **25** e **26** estão descritos na Tabela 4. Os compostos **19**, **22e**, **23** e **26** mostraram atividade anti-*T. cruzi*, com concentração inibitória média ( $\text{CI}_{50}$ ) sobre as formas amastigotas e tripomastigotas do parasita iguais a 14,1, 46,3, >50, e 39,7  $\mu\text{M}$ , respectivamente. De forma geral, ao se comparar os compostos ativos, com os que não apresentaram atividade biológica, a presença do grupo cetônico (**19**), ausência do grupo ácido carboxílico e presença dos ésteres de pentila ou benzila (**22e** e **23**), ou presença do tiossemicarbazona (**26**) indicam que estes grupos funcionais contribuem para atividade anti-*T. cruzi* dos compostos pirrólicos.

Ao analisar apenas os compostos ativos, o valor de  $\text{CI}_{50}$  de **19** sugere que o grupo éster *terc*-butila em C-3 desempenha um papel importante para a atividade, uma vez que este composto foi mais ativo do que **22e** e **23**, que não possuem substituintes nesta posição. Além disso, a atividade de **22e** e **23**, que possuem os grupos pentila e benzila, respectivamente, sugere que cadeia apolar alquílica saturada longa e anel aromático é outro fator que pode modular a atividade anti-chagásica, pois a maior lipofilicidade influencia na capacidade do composto de atravessar a membrana celular do parasita.

A presença do grupo tiossemicarbazona, composto **26**, conduziu ao menor valor de  $\text{CI}_{50}$ , conforme também foi observado por Silva *et al.*<sup>27</sup> em 2019. Embora seja menos potente e menos seletivo do que fármaco de referência benzonidazol, **26** pode ser um protótipo para a obtenção de composto mais ativos.



**Esquema 7.** Método de obtenção de metil-5-formil-2,4-dimetil-1*H*-pirrol-3-carboxilato (**25**) seguido de reação com tiossemicarbazida para gerar a tiossemicarbazona (**26**)

**Tabela 4.** Resultados dos ensaios biológicos contra *T. cruzi*

Composto	CI <sub>50</sub> sobre o parasita <sup>1</sup> (μM)	CC <sub>50</sub> sobre as células <sup>2</sup> (μM)	Índice de Seletividade <sup>3</sup>
19	14,1 ± 5,7	> 200	> 14,2
21a	Inativo	-	-
21b	Inativo	-	-
21c	Inativo	-	-
21d	Inativo	-	-
21e	Inativo	-	-
22a	Inativo	-	-
22b	Inativo	-	-
22c	Inativo	-	-
22d	Inativo	-	-
22e	46,3 ± 5,2	154,9 ± 0,9	3,3
23	> 50	-	-
24	Inativo	-	-
25	Inativo	-	-
26	39,7 ± 19,8	> 200	> 5,0
Benzonidazol	3,81 μM	2.381 μM	625

<sup>1</sup>Concentração do composto que reduz em 50% o crescimento parasitário. <sup>2</sup>Concentração do composto que induz 50% de morte celular. Os valores de CI<sub>50</sub> e CC<sub>50</sub> foram calculados através de interpolação linear. <sup>3</sup>CC<sub>50</sub> do composto sobre as células dividido pelo CI<sub>50</sub> do composto sobre o parasita (IS = CC<sub>50</sub>/CI<sub>50</sub>). Em CI<sub>50</sub> e CC<sub>50</sub>, os valores mostrados são média ± desvio-padrão

### 3. Conclusão

Neste artigo, diferentes transformações químicas envolvendo o núcleo pirrônico foram exploradas resultando na síntese e caracterização de 5 compostos inéditos (**18e**, **21c-e**, e **26**). Além disso, metodologias sintéticas envolvendo o núcleo pirrônico foram otimizadas, reduzindo tempo de reação, como no caso do compostos **15a-c**, **25** e **26**. Finalmente, 4 compostos mostraram atividade anti-*T. cruzi*, evidenciando que a presença dos grupos cetona, tiosemicarbazona ou ésteres com cadeia alifática longa ou aromática em núcleos pirrônicos pode contribuir para outros estudos no desenvolvimento de novos compostos pirrônicos bioativos.

### 4. Parte Experimental

#### 4.1. Reagentes

Paládio suportado em carvão 10% (m/m), acetoacetato de metila, acetoacetato de *terc*-butila, acetoacetato de etila, cloreto de potássio (KCl), ácido trifluoracético (TFA), borohidreto de sódio (NaBH<sub>4</sub>), tiosemicarbazona, ortoformiato de trimetila (TOF) foram compradas da empresa Sigma-Aldrich (São Paulo, Brasil). Os demais reagentes foram *p*-nitrobenzaldeído e *N*-bromosuccinimida da empresa Merck (São Paulo, Brasil), *m*-nitrobenzaldeído de Baker & Adamson (Nova York, Estados Unidos), 1-pentanol

de Riedel-de Haën (Nova Jersey, Estados Unidos), álcool benzílico da Quimibrás Indústrias Químicas S. A (Rio de Janeiro, Brasil), sulfato de sódio anidro (NaSO<sub>4</sub>), cloreto de sódio (NaCl), hidróxido de sódio (NaOH) e ácido clorídrico (HCl) da empresa Vetec (Rio de Janeiro, Brasil), sulfato de cobre II (CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O) e zinco metálico em pó da Controltec Química Fina (Rio de Janeiro, Brasil), e nitrito de sódio (NaNO<sub>2</sub>) da Montedison Farmacêutica S. A. (São Paulo, Brasil). Os solventes éter dietílico anidro, tolueno, metanol, 1-butanol, hexano, ácido acético glacial, hexano, acetato de etila e tetrahidrofurano (THF) foram compradas da empresa Tedia (Rio de Janeiro, Brasil). Por fim, os solventes deuterados clorofórmio (CDCl<sub>3</sub>), piridina e dimetilformamida (DMF) foram adquiridos da Cambridge Isotopo Laboratories, Inc. (Cambridge, Estados Unidos).

Nitrobenzaldeídos foram reduzidos a álcoois utilizando NaBH<sub>4</sub> como agente redutor seguindo procedimento descrito anteriormente.<sup>28</sup> O sulfato de cobre penta hidratado foi previamente desidratado em estufa a 330 °C durante 4 horas antes de ser utilizado como catalisador. Todos os demais reagentes e solventes foram utilizados sem nenhuma purificação ou modificação antes das etapas de síntese.

#### 4.2. Equipamentos, métodos cromatográficos, espectros-cópicos e espectrométricos

O progresso das reações foi acompanhado por cromatografia de camada delgada utilizando cromatofolhas de alumínio cobertas por sílica gel (F-254) com espessura de 250 μm da marca Silicycle® (Quebec, Canadá). As placas

foram reveladas utilizando uma lâmpada de ultravioleta. As colunas cromatográficas foram preparadas utilizando sílica-gel flash Silicycle® (230-400 mesh) como fase estacionária e misturas de hexano e acetato de etila como eluente. Para remoção de solventes a pressão reduzida foi utilizado uma bomba a vácuo modelo V-855 da marca Buchi® (Suíça) e rotaevaporador IKA® modelo RV10 basic (São Paulo, Brasil). As temperaturas de ponto de fusão (P.F.) foram determinadas utilizando aparelho Mel-Temp colocando-se uma pequena porção de cada composto sintetizado em um capilar de vidro. As temperaturas não foram corrigidas.

As análises por CG-EM foram feitas em cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas QP 2010 Ultra, Shimadzu (Kyoto, Japan) com detector quadrupólo. As amostras foram preparadas na concentração aproximada de 1 mg.mL<sup>-1</sup>, solubilizadas em acetato de etila, com volume de injeção igual a 1 µL e divisão de fluxo na razão de 1:10. No forno do CG foi utilizado uma coluna capilar DB-1 (30 m X 0,25mm X 0,25 µm) (J&M, Scientific), gás de arraste hélio e temperatura de injeção igual a 280 °C. No espectrômetro de massas a temperatura da fonte de íons foi de 230 °C e a temperatura de interface 290 °C. Para os compostos **18a-e**, **19**, **22a-e**, **23**, **24** e **25**, a temperatura inicial do forno foi configurada para 95 °C e temperatura final 290 °C durante 12 minutos com um fluxo de hélio de 1,95 mL.min<sup>-1</sup>. Para os β-cetoésteres (**13a-c** e **15a**), a temperatura de injeção inicial foi de 80 °C seguido por um gradiente de temperatura mostrado na Tabela 5, o fluxo de hélio foi mantido a 2,09 mL min<sup>-1</sup>. Em ambos os métodos a taxa de aquecimento do forno foi igual a 12 °C min<sup>-1</sup>.

**Tabela 5.** Programa de temperatura do forno do CG para análise dos compostos **13a-c** e **15a**

Temperatura (°C)	Tempo (min)
80	1
100	4
150	5
200	5

As análises de infravermelho foram conduzidas em um aparelho Nicolet Magna IR 760. Nesta análise, os compostos sólidos foram inicialmente misturados com brometo de potássio (KBr) anidro formando uma pastilha que teve seus valores de absorção na região de IV medidos e expressos em números de onda (cm<sup>-1</sup>). Os espectros obtidos foram editados na versão teste do software ACD/Spectrus Processor.

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN <sup>1</sup>H) e de carbono (RMN <sup>13</sup>C) foram realizados em aparelho Bruker (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha), modelo DPX 200, operando a 500 MHz ou 400 MHz para os núcleos de <sup>1</sup>H e 125 MHz ou 100 MHz para os de <sup>13</sup>C. Como solventes deuterados foram utilizados dimetil-sulfóxido deuterado (DMSO-*d*<sub>6</sub>), clorofórmio deuterado (CDCl<sub>3</sub>) ou piridina deuterada (Piridina-*d*<sub>5</sub>). Os núcleos de hidrogênio residuais destes solventes foram

utilizados como referencial interno. Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e os valores das constantes de acoplamento (*J*) em Hertz (Hz). As áreas relativas dos sinais de hidrogênio foram obtidas por integração eletrônica e a multiplicidade das bandas de absorção foi indicada segundo a convenção: simpleto (s); duplet (d); duplo duplet (dd); tripleto (t); duplo tripleto (dt); quinteto (quint); sexteto (sext) ou multipleto (m). A abreviação q foi utilizada para descrever átomos de carbono quaternário nos espectros de RMN <sup>13</sup>C. Os fids adquiridos foram editadas com o software MestReNova.

#### 4.3. Síntese de 3-oxobutanoatos de alquila e arila (**13a-c**; **15a-c**)<sup>16,17,29</sup>

Para síntese dos compostos **13a-c**, em um balão de fundo redondo foram adicionados 60 mmol de acetoacetato de metila (**12**) juntamente com 1,2 g de zinco metálico em pó e 360 mmol do respectivo álcool (Tabela 1). O balão foi acoplado a um condensador para remoção do metanol gerado no meio e mantido sob refluxo e agitação magnética por 3,5 horas. O progresso da reação foi acompanhado por cromatografia de camada delgada (CCD) utilizando hexano: acetato de etila (80:20% v/v) como eluente. Ao final da reação, o meio foi resfriado a temperatura ambiente, o zinco foi removido através de filtração simples e o álcool à pressão reduzida, conduzindo aos compostos **13a-c**.

Para os acetoacetatos de arila (**15a-c**), utilizou-se 30 mmols de acetoacetato de etila (**14**) juntamente com 32 mmols do respectivo álcool (Tabela 2), 100 mL de tolueno e 600 mg de CuSO<sub>4</sub> desidratado. Semelhante ao procedimento no parágrafo anterior, os reagentes foram adicionados a um balão de fundo redondo acoplado a um condensador para remoção do etanol gerado no meio e mantido sob refluxo e agitação magnética por 6-8 horas. Ao final da reação, confirmado por CCD, o meio foi resfriado a temperatura ambiente, o catalisador foi removido utilizando filtração simples, e os álcoois e o tolueno à pressão reduzida. Para os compostos **15b-c** foi feito uma etapa de cristalização com a adição de 1 mL de éter dietílico/g de produto bruto a temperatura ambiente, seguido de resfriamento do meio a 0 °C e filtração a vácuo.

3-oxobutanoato de propila (**13a**): RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) Forma cetônica  $\delta$  4,08 (t; *J* 8,0 Hz; 2H), 3,43 (s; 2H), 2,25 (s; 3H), 1,65 (sext; *J* 8,0 Hz; 2H), 0,94-0,90 (m; 4H). Forma enólica  $\delta$  12,08 (s; OH), 4,97 (s), 3,58 (t), 1,57 (quint); RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  200,73 (Cq); 167,32 (Cq); 67,09 (CH<sub>2</sub>); 50,22 (CH<sub>2</sub>); 30,20 (CH<sub>3</sub>); 21,96 (CH<sub>2</sub>); 10,38 (CH<sub>3</sub>); IV (KBr) v/cm<sup>-1</sup>: 1651 (C=O), 1720 (C=O), 1740 (C=O), 2970-2881 (C-H), 3440 (OH); CG-EM (70 eV): *m/z* 144 [M]<sup>+</sup> Líquido amarelo; rendimento: 78%.

3-oxobutanoato de butila (**13b**): Forma cetônica RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  4,12 (t; *J* 8,0 Hz; 2H), 3,43 (s; 2H), 2,25 (s; 3H), 1,61 (quint; *J* 8,0 Hz; 2H), 1,37 (sext; *J* 8,0 Hz; 2H), 0,91 (t; *J* 8,0 Hz; 5H). Forma enólica RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  12,08 (s), 4,96 (s), 3,62 (t,

*J* 5Hz), 1,93 (s), 1,53 (quint, *J* 5Hz). RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  201,41 (Cq); 167,99 (Cq); 66,05 ( $\text{CH}_2$ ); 63,45 ( $\text{CH}_2$ ); 50,89 ( $\text{CH}_2$ ); 35,62 ( $\text{CH}_2$ ); 31,25 ( $\text{CH}_2$ ); 30,87 (CH); 19,79 ( $\text{CH}_3$ ); 19,64 ( $\text{CH}_2$ ); 14,60 ( $\text{CH}_3$ ); 14,38 ( $\text{CH}_3$ ); IV (KBr)  $\nu/\text{cm}^{-1}$ : 1649 (C=O), 1721 (C=O), 1718 (C=O), 2962-2875 (C-H), 3548 (OH); CG-EM (70 eV):  $m/z$  159 [M] $^+$  Líquido amarelo; rendimento: 91%.

3-oxobutanoato de pentila (**13c**): Forma cetônica RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  4,11 (t; *J* 7,0 Hz; 2H), 3,43 (s; 2H), 2,25 (s; 3H), 1,63 (quint; *J* 7,0 Hz; 2H), 1,33 – 1,29 (m; 7H), 0,88 (t; *J* 7,0 Hz; 5H). Forma enólica RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  12,08 (s; OH), 4,96 (s), 3,65 – 3,68 (m), 1,93 (s), 1,57 - 1,52 (m). RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  200,58 (Cq); 167,20 (Cq); 89,76 (CH); 65,56 ( $\text{CH}_2$ ); 64,07 ( $\text{CH}_2$ ); 63,00 ( $\text{CH}_2$ ); 50,12 ( $\text{CH}_2$ ); 32,47 ( $\text{CH}_2$ ); 30,07 ( $\text{CH}_3$ ); 28,15 ( $\text{CH}_2$ ); 27,93 ( $\text{CH}_2$ ); 22,46 ( $\text{CH}_2$ ); 22,23 ( $\text{CH}_2$ ); 21,23 ( $\text{CH}_3$ ); 14,00 ( $\text{CH}_3$ ); 13,88 ( $\text{CH}_3$ ); IV (KBr)  $\nu/\text{cm}^{-1}$ : 1626 (C=O), 1720 (C=O), 1743 (C=O), 2960-2862 (CH), 3531 (OH); CG-EM (70 eV):  $m/z$  172 [M] $^+$  Líquido amarelo; rendimento: 94%.

3-oxobutanoato de benzila (**15a**): Forma cetônica RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,36-7,38 (m; 9H), 5,18 (s; 2H), 3,50 (s; 2H), 2,25 (s; 3H). Forma enólica RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  12,03 (s; OH), 5,11 (s), 2,10 (s). RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  200,43 (Cq); 167,06 (Cq); 129,15 – 125,42 (CH aromático); 67,27 ( $\text{CH}_2$ ); 65,46 ( $\text{CH}_2$ ); 50,16 ( $\text{CH}_2$ ); 30,23 ( $\text{CH}_3$ ); 21,56 ( $\text{CH}_3$ ); IV (KBr)  $\nu/\text{cm}^{-1}$ : 1624 (C=O), 1716 (C=O), 1743 (C=O), 3066-2958 (CH), 3473 (OH). CG-EM (70 eV):  $m/z$  192 [M] $^+$  Líquido amarelo; rendimento: 98%.

3-oxobutanoato de *p*-nitro benzila (**15b**): Forma cetônica RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,22 (d; *J* 8,0 Hz; 2H), 7,53 (d; *J* 8,0 Hz; 2H), 5,27 (s; 2H), 3,56 (s; 2H), 2,27 (s; 3H). Forma enólica RMN  $^1\text{H}$   $\delta$  11,86 (s; OH), 4,97 (s), 1,98 (s). RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  200,09 (Cq); 166,73 (Cq); 147,95 (Cq); 142,67 (Cq); 128,59 (CH); 123,95 (CH); 65,60 ( $\text{CH}_2$ ); 49,91 ( $\text{CH}_2$ ); 30,40 ( $\text{CH}_3$ ); IV (KBr)  $\nu/\text{cm}^{-1}$ : 1605 (C=O), 1716 (C=O), 1743 (C=O), 3412 (OH); pf 44-45 °C. Sólido branco; rendimento: 57%

3-oxobutanoato de *m*-nitro benzila (**15c**): Forma cetônica RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,22 (s; 1H), 8,19 (d; *J* 8,0 Hz; 1H), 7,70 (d; *J* 8,0 Hz; 1H), 7,55 (t; *J* 8,0 Hz; 1H), 5,26 (s; 2H), 3,56 (s; 2H), 2,27 (s; 3H). Forma enólica RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  11,87 (s; OH), 4,96 (s), 1,98 (s); RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  200,09 (Cq); 166,79 (Cq); 148,53 (Cq); 137,58 (Cq); 134,09 (CH); 129,82 (CH); 123,46 (CH); 123,03 (CH); 65,66 ( $\text{CH}_2$ ); 49,92 ( $\text{CH}_2$ ); 30,38 ( $\text{CH}_3$ ); IV (KBr)  $\nu/\text{cm}^{-1}$ : 1630 (C=O), 1716 (C=O), 1749 (C=O), 3413 (OH); pf 68-69 °C. Sólido branco; rendimento: 66%.

#### 4.4. Síntese dos núcleos pirrólicos (**18a-e**)<sup>20,22</sup>

##### Etapa 1: Síntese do intermediário 2-hidroximino-3-oxobutirato de *terc*-butila (**17**).

Em um balão de fundo redondo adicionou-se 10 g de acetoacetato de *terc*-butila (**16**) e 10 mL de ácido acético

glacial. O meio de reação foi resfriado a 0-5 °C em banho de gelo e sal grosso e sob agitação magnética adicionou-se gota a gota uma solução de 7,0 g de nitrito de sódio ( $\text{NaNO}_2$ ) solubilizado em 12 mL de água, mantendo o meio a uma temperatura menor do que 10 °C. Após o término da adição da solução de  $\text{NaNO}_2$ , o sistema foi lentamente conduzido a temperatura ambiente e mantido nessas condições durante 12 horas.

##### Etapa 2: Método para síntese dos compostos **18a-e**

Neste procedimento, o primeiro passo foi a extração do intermediário (**17**) produzido na etapa 1. O meio de reação da etapa 1 (partindo de 10 g de acetoacetato de *terc*-butila (**16**)) foi vertido num funil de separação juntamente com 15 mL de éter dietílico e 10 mL de uma solução saturada de cloreto de potássio ( $\text{KCl}$ ). A fase aquosa foi lavada mais três vezes com 10 mL de éter dietílico. Depois, as fases orgânicas foram combinadas e lavadas três vezes com água, seca com sulfato de sódio e levada a um rotaevaporador, restando um óleo de coloração amarelo claro.

Em um reator acoplado a um cilindro de hidrogênio, adicionou-se 3,5 g da oxima, 33 mmols do respectivo  $\beta$ -cetoéster ou acetilacetona, 3 mL de ácido acético glacial e 0,28 g de paládio suportado em carvão. O reator foi parcialmente imerso num banho maria a 70 °C e mantido sob agitação por 7 horas. Ao final da reação, confirmada por CCD (80:20 hexano:acetato de etila v/v como eluente), o meio foi filtrado para remoção do catalisador, e lavado duas vezes com 5 mL de ácido acético glacial pré-aquecido a 60 °C. O meio foi neutralizado com solução de  $\text{NaOH}$  50% (m/m), formando um precipitado que foi filtrado a vácuo e lavado com água gelada.

3-oxobutanoato de 3,5-dimetil-1*H*-pirrol-2,4-dicarboxilato de 2-*terc*-butila-4-metila (**18a**): RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9,32 (s; 1H; NH), 3,80 (s; 3H), 2,52 (s; 3H), 2,49 (s; 3H), 1,56 (s; 9H); RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  166,17 (Cq); 161,46 (Cq); 138,67 (Cq); 130,11 (Cq); 119,36 (Cq); 113,32 (Cq); 81,35 (Cq); 50,76 ( $\text{CH}_3$ ); 28,58 ( $\text{CH}_3$ ); 14,39 ( $\text{CH}_3$ ); 12,09 ( $\text{CH}_3$ ); IV (KBr)  $\nu/\text{cm}^{-1}$ : 1649 (C=O), 1705 (C=O), 2985-2968 (CH), 3317 (NH); CG-EM (70 eV):  $m/z$  253 [M] $^+$ ; pf 145-146 °C. Cristais brancos; rendimento: 61%

3-oxobutanoato de 3,5-dimetil-1*H*-pirrol-2,4-dicarboxilato de 2-*terc*-butila-4-etila (**18b**): RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9,18 (s; NH), 4,27 (q; *J* 8,0 Hz; 2H), 2,52 (s; 3H), 2,50 (s; 3H), 1,56 (s; 9H), 1,34 (t; *J* 8,0 Hz; 3H); RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  165,74 (Cq); 161,41 (Cq); 138,49 (Cq); 130,12 (Cq); 119,30 (Cq); 113,52 (Cq); 81,31 (Cq); 59,55 ( $\text{CH}_2$ ); 28,59 ( $\text{CH}_3$ ); 14,55 ( $\text{CH}_3$ ); 14,45 ( $\text{CH}_3$ ); 12,11 ( $\text{CH}_3$ ); IV (KBr)  $\nu/\text{cm}^{-1}$ : 1702 (C=O), 1691 (C=O), 3018-2931 (CH), 3301 (NH). CG-EM (70 eV):  $m/z$  267 [M] $^+$ ; pf 131-132 °C. Cristais brancos; rendimento: 55%.

3-oxobutanoato de 3,5-dimetil-1*H*-pirrol-2,4-dicarboxilato de 2-*terc*-butila-4-propila (**18c**): RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9,18 (s; 1H; NH), 4,19 (t; *J* 8,0 Hz; 2H), 2,53 (s; 3H), 2,50 (s; 3H), 1,75 (sext; *J* 8,0 Hz; 2H),

1,57 (s; 9H), 1,01 (t;  $J$  8,0 Hz; 3H). RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  165,85 (Cq); 161,42 (Cq); 138,53 (Cq); 130,11 (Cq); 119,30 (Cq); 113,57 (Cq); 81,32 (Cq); 65,37 ( $\text{CH}_2$ ); 28,60 ( $\text{CH}_3$ ); 22,32 ( $\text{CH}_2$ ); 14,48 ( $\text{CH}_3$ ); 12,16 ( $\text{CH}_3$ ); 10,91 ( $\text{CH}_3$ ); IV (KBr)  $\nu/\text{cm}^{-1}$ : 1659 (C=O), 1705 (C=O), 2877-3012 (CH), 3309 (NH). CG-EM (70 eV):  $m/z$  281 [M] $^+$ ; pf 100 - 101 °C. Cristais brancos; rendimento: 84%.

3-oxobutanoato de 3,5-dimetil-1*H*-pirrol-2,4-dicarboxilato de 2-*terc*-butila-4-butila (**18d**): RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9,17 (s; 1H; NH), 4,23 (t;  $J$  7,5 Hz; 2H), 2,52 (s; 3H), 2,49 (s; 3H), 1,70 (quint;  $J$  7,5 Hz; 2H), 1,56 (s; 9H), 1,45 (sext;  $J$  7,5 Hz; 3H), 0,95 (t;  $J$  7,5 Hz; 3H); RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  165,73 (Cq); 161,29 (Cq); 138,40 (Cq); 129,96 (Cq); 119,17 (Cq); 113,44 (Cq); 81,19 (Cq); 63,40 ( $\text{CH}_2$ ); 30,90 ( $\text{CH}_2$ ); 28,47 ( $\text{CH}_3$ ); 19,43 ( $\text{CH}_2$ ); 14,34 ( $\text{CH}_3$ ); 13,75 ( $\text{CH}_3$ ); 12,03 ( $\text{CH}_3$ ); IV (KBr)  $\nu/\text{cm}^{-1}$ : 1655 (C=O), 1697 (C=O), 2976-2873 (CH), 3315 (NH); CG-EM (70 eV):  $m/z$  295 [M] $^+$ , pf 110 - 111 °C. Sólido amarelo; rendimento: 76%.

3-oxobutanoato de 3,5-dimetil-1*H*-pirrol-2,4-dicarboxilato de 2-*terc*-butila-4-pentila (**18e**): RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, piridina)  $\delta$  12,82 (s; 1H; NH), 4,33 (t;  $J$  7,0 Hz; 2H), 2,98 (s; 3H), 2,67 (s; 3H), 1,69 (quint;  $J$  7,0; 2H), 1,52 (s; 9H; H8), 1,40 - 1,23 (m; 4H), 0,85 (t;  $J$  7,0 Hz; 3H); RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz, piridina)  $\delta$  166,29 (Cq); 161,91 (Cq); 139,85 (Cq); 130,62 (Cq); 120,88 (Cq); 114,11 (Cq); 80,80 (Cq); 64,04 ( $\text{CH}_2$ ); 29,34 ( $\text{CH}_2$ ); 29,07 ( $\text{CH}_2$ ); 28,85 ( $\text{CH}_3$ ); 23,02 ( $\text{CH}_2$ ); 14,56 ( $\text{CH}_3$ ); 14,44 ( $\text{CH}_3$ ); 13,13 ( $\text{CH}_3$ ); IV (KBr)  $\nu/\text{cm}^{-1}$ : 1655 (C=O), 1705 (C=O), 3008-2870 (CH), 3302 (NH); CG-EM (70 eV):  $m/z$  309 [M] $^+$ ; pf 100-102 °C. Sólido amarelo; rendimento: 87%.

3-oxobutanoato de 3,5-dimetil-1*H*-pirrol-2,4-dicarboxilato de 2-*terc*-butila-4-acetila (**19**): RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9,25 (s; 1H), 2,55 (s; 3H), 2,50 (s; 3H), 2,43 (s; 3H), 1,57 (s; 9H). RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  195,75 (Cq); 161,36 (Cq); 137,77 (Cq); 128,54 (Cq); 123,59 (Cq); 119,34 (Cq); 81,51 (Cq); 31,41 ( $\text{CH}_3$ ); 28,58 ( $\text{CH}_3$ ); 15,26 ( $\text{CH}_3$ ); 12,79 ( $\text{CH}_3$ ); IV (KBr)  $\nu/\text{cm}^{-1}$ : 1651 (C=O), 1662 (C=O), 2931-2981 (CH), 3309 (NH). CG-EM (70 eV):  $m/z$  237 [M] $^+$ , pf 145-146 °C. Sólido branco; rendimento: 85%.

#### 4.5. Transformação dos núcleos pirrólicos

##### 4.5.1. Síntese dos derivados ácido 4-(alquil-carbonil)-3,5-dimetil-1*H*-pirrol-2-carboxílico (**21a-e**)

Em um balão de fundo redondo, adicionou-se 10 mL de TFA resfriando-o entre -5 e 0 °C em banho de gelo, sal grosso e etanol. Ao TFA resfriado e sob agitação magnética adicionou-se 3,75 mmols do pirrol (**18a-e**) e o sistema foi mantido sob agitação e resfriamento durante 5 horas. No fim da reação, confirmado por CCD (50:50 hexano:acetato de etila v/v), adicionou-se 6 mL de gelo picado e água gelada formando um precipitado que foi filtrado a vácuo, lavado com água gelada seguido de lavagem com hexano até adquirir uma coloração branca.

Ácido 4-(metoxicarbonil)-3,5-dimetil-1*H*-pirrol-2-carboxílico (**21a**): RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  12,42 (s; 1H), 11,76 (s; 1H), 3,70 (s; 3H), 2,44 (s; 3H), 2,38 (s; 3H); RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  165,62 (Cq); 162,69 (Cq); 139,39 (Cq); 129,46 (Cq); 118,72 (Cq); 112,45 (Cq); 50,84 ( $\text{CH}_3$ ); 13,89 ( $\text{CH}_3$ ); 12,16 ( $\text{CH}_3$ ); IV (KBr)  $\nu/\text{cm}^{-1}$ : 1668 (C=O), 1699 (C=O), 3284 (NH); pf deg. 193-194 °C. Sólido branco; rendimento: 55%.

Ácido 4-(etoxicarbonil)-3,5-dimetil-1*H*-pirrol-2-carboxílico (**21b**): RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  11,74 (s; 1H), 4,16 (q;  $J$  7,1 Hz; 2H), 2,45 (s; 3H), 2,39 (s; 3H), 1,26 (t;  $J$  7,1 Hz; 3H); RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  164,74 (Cq); 162,28 (Cq); 138,91 (Cq); 129,05 (Cq); 118,22 (Cq); 112,14 (Cq); 58,80 ( $\text{CH}_2$ ); 14,31 ( $\text{CH}_3$ ); 13,48 ( $\text{CH}_3$ ); 11,72 ( $\text{CH}_3$ ); IV (KBr)  $\nu/\text{cm}^{-1}$ : 1666 (C=O), 1697 (C=O), 3302 (NH); pf deg. 190-191 °C. Sólido branco; rendimento: 40%.

Ácido 4-(propoxicarbonil)-3,5-dimetil-1*H*-pirrol-2-carboxílico (**21c**): RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  11,75 (s; 1H), 4,08 (t;  $J$  6,0 Hz; 2H), 2,45 (s; 3H), 2,39 (s; 3H), 1,66 (sext;  $J$  6,0 Hz; 2H), 0,94 (t;  $J$  6,0 Hz; 3H); RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  164,80 (Cq); 162,26 (Cq); 138,92 (Cq); 129,04 (Cq); 118,22 (Cq); 112,14 (Cq); 64,48 ( $\text{CH}_2$ ); 21,74 ( $\text{CH}_2$ ); 13,50 ( $\text{CH}_2$ ); 11,73 ( $\text{CH}_2$ ); 10,66 ( $\text{CH}_2$ ); IV (KBr)  $\nu/\text{cm}^{-1}$ : 1662 (C=O), 1674 (C=O), 3325 (NH); pf deg. 187-188 °C. Sólido branco; rendimento: 49%.

Ácido 4-(butoxicarbonil)-3,5-dimetil-1*H*-pirrol-2-carboxílico (**21d**): RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  12,38 (s; 1H), 11,75 (s; 1H), 4,12 (t;  $J$  7,0 Hz; 2H), 2,45 (s; 3H), 2,39 (s; 3H), 1,63 (quint;  $J$  7 Hz; 2H), 1,39 (sext;  $J$  7,0 Hz; 2H), 0,91 (t;  $J$  7,0 Hz; 3H); RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  165,23 (Cq); 162,70 (Cq); 139,35 (Cq); 129,46 (Cq); 118,67 (Cq); 112,59 (Cq); 63,01 ( $\text{CH}_2$ ); 30,89 ( $\text{CH}_2$ ); 19,37 ( $\text{CH}_2$ ); 14,047 ( $\text{CH}_3$ ); 13,94 ( $\text{CH}_3$ ); 12,17 ( $\text{CH}_3$ ); IV (KBr)  $\nu/\text{cm}^{-1}$ : 1678 (C=O), 2964-2875 (CH), 3340-3323 (NH); pf 164-165 °C. Sólido branco; rendimento: 39%.

Ácido 4-(pentoxicarbonil)-3,5-dimetil-1*H*-pirrol-2-carboxílico (**21e**): RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  12,40 (s; 1H), 11,75 (s; 1H), 4,11 (t;  $J$  7,0 Hz; 2H), 2,45 (s; 3H), 2,39 (s; 3H), 1,64 (quint;  $J$  7,0 Hz; 2H), 1,39 - 1,27 (m; 4H), 0,87 (t;  $J$  7,0 Hz; 3H); RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  165,22 (Cq); 162,70 (Cq); 139,34 (Cq); 129,46 (Cq); 118,68 (Cq); 112,59 (Cq); 63,30 ( $\text{CH}_2$ ); 28,46 ( $\text{CH}_2$ ); 28,32 ( $\text{CH}_2$ ); 22,22 ( $\text{CH}_2$ ); 14,31 ( $\text{CH}_3$ ); 13,93 ( $\text{CH}_3$ ); 12,17 ( $\text{CH}_3$ ); IV (KBr)  $\nu/\text{cm}^{-1}$ : 1660 (C=O), 1676 (C=O), 2953-2860 (CH), 3352 (NH); pf 165-166 °C. Sólido branco; rendimento: 63%.

##### 4.5.2. Síntese dos derivados 2,4-dimetil-1*H*-pirrol-3-carboxilato de alquila e arila (**22a-e** e **23**)<sup>21</sup>

Em um balão de fundo redondo, adicionou-se 2,0 mL de metanol e 1,12 mmols do respectivo pirrol (**18a-e**) sob agitação magnética. À temperatura ambiente, gota a gota, adicionou-se 22 mL de uma solução composta de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ /água/metanol 0,05/0,24/0,71 (v/v). Após o término da adição, o sistema foi aquecido até 65 °C e mantido nesta

temperatura durante 3,5 horas. Durante esse tempo o progresso da reação foi acompanhado por CCD utilizando hexano:acetato de etila (80:20 v/v) como eluente. O meio de reação foi resfriado e deixado no refrigerador (-14 °C) por um dia ocorrendo a precipitação do produto de interesse que foi filtrado a vácuo. O composto **22e** não precipitou mesmo após 2 dias sob refrigeração, neste caso realizou-se uma extração líquido-líquido 3 vezes com 7 mL de diclorometano seguido da lavagem da fase orgânica 3 vezes com 5 mL de água. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e o solvente removido a pressão reduzida.

Para síntese do composto **23**, adicionou-se em um balão de fundo redondo 10 mmols de acetooacetato de benzila, 13 mL de ácido acético glacial e 6,34 g de Zn em pó até atingir a temperatura de 60 °C. Nesta temperatura, gota a gota adicionou-se 30 mmols do intermediário oxima (**17**) produzido na etapa 1 (seção 4.4) sem purificação prévia. Com o término da adição, o meio de reação foi mantido em refluxo a 75 °C durante 2 horas. O progresso da reação foi acompanhado por CCD utilizando hexano:acetato de etila (80:20 v/v) como eluente. Com o término da reação, o meio foi vertido em gelo picado, solubilizado em acetato de etila e filtrado para remoção do zinco residual. O filtrado foi vertido em um funil de separação para separar a fase orgânica da aquosa que foi seca com sulfato de sódio anidro. Uma vez seca, o acetato de etila foi removido a pressão reduzida obtendo um sólido gelatinoso. Após, realizou-se uma recristalização em uma mistura de água:metanol (1:2,6 v/v) na proporção de 0,12 g de produto/mL de solução obtendo uma mistura dos compostos **20a** e **23**. Essa mistura foi submetida às mesmas condições usadas para descarboxilação, seguindo o mesmo procedimento descrito anteriormente, para obtenção de um produto final contendo apenas **23**.

**2,4-dimetil-1*H*-pirrol-3-carboxilato de metila (22a):** RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,27 (s; 1H; NH), 6,34 (s; 1H), 3,80 (s; 3H), 2,47 (s; 3H), 2,23 (s; 3H); RMN <sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 167,00 (Cq); 136,20 (Cq); 121,65 (Cq); 114,43 (CH); 110,67 (Cq); 50,55 (CH<sub>3</sub>); 14,14 (CH<sub>3</sub>); 12,66 (CH<sub>3</sub>); IV (KBr) v/cm<sup>-1</sup>: 1668 (C=O), 3267 (NH); CG-EM (70 eV): m/z 153 [M]<sup>+</sup>; pf deg. 101-102 °C. Sólido amorfo e rosa; rendimento: 77%

**2,4-dimetil-1*H*-pirrol-3-carboxilato de etila (22b):** RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,27 (s; 1H; NH), 6,34 (s; 1H), 4,27 (q; J = 7,1 Hz; 2H), 2,48 (s; 3H), 2,24 (s; 3H), 1,35 (t; J = 7,1 Hz; 3H); RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 166,58 (Cq); 136,09 (Cq); 121,66 (Cq); 114,37 (CH); 110,84 (Cq); 59,20 (CH<sub>2</sub>); 14,61 (CH<sub>3</sub>); 14,15 (CH<sub>3</sub>); 12,71 (CH<sub>3</sub>); IV (KBr) v/cm<sup>-1</sup>: 1662 (C=O), 3307 (NH); CG-EM (70 eV): m/z 167 [M]<sup>+</sup>; pf 73-74 °C. Sólido amorfo e rosa; rendimento: 68%

**2,4-dimetil-1*H*-pirrol-3-carboxilato de propila (22c):** RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,03 (s, 1H; NH), 6,35 (s, 1H), 4,18 (t; J 6,0 Hz, 2H), 2,49 (s, 3H), 2,24 (s, 3H), 1,74 (sext; J 6,0 Hz, 2H), 1,02 (t; J 6,0 Hz, 3H); RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 166,73 (Cq); 136,16 (Cq); 121,63 (Cq); 114,40 (CH); 110,83 (Cq); 65,06 (CH<sub>2</sub>); 22,36 (CH<sub>2</sub>); 14,18 (CH<sub>3</sub>);

12,78 (CH<sub>3</sub>); 10,92 (CH<sub>3</sub>); IV (KBr) v/cm<sup>-1</sup>: 1670 (C=O), 3317 (NH); CG-EM (70 eV): m/z 181 [M]<sup>+</sup>; pf 49-50 °C. Sólido amarelado; rendimento: 80%.

**2,4-dimetil-1*H*-pirrol-3-carboxilato de butila (22d):** RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,18 (s; 1H; NH), 6,35 (s; 1H), 4,22 (t; J 7,5 Hz; 2H), 2,48 (s; 3H), 2,24 (s; 3H), 1,71 (quint; J 7,5 Hz, 2H), 1,46 (sext; J 7,5 Hz, 2H), 0,96 (t; J 7,5 Hz; 3H); RMN <sup>13</sup>C (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 166,63 (Cq); 136,07 (Cq); 121,71 (Cq); 114,35 (CH); 110,95 (Cq); 63,18 (CH<sub>2</sub>); 31,12 (CH<sub>2</sub>); 19,57 (CH<sub>2</sub>); 14,21 (CH<sub>3</sub>); 13,88 (CH<sub>3</sub>); 12,78 (CH<sub>3</sub>); IV (KBr) v/cm<sup>-1</sup>: 1659 (C=O), 1672 (C=O), 2958-2873 (CH), 3319 (NH); CG-EM (70 eV): m/z 195 [M]<sup>+</sup>; pf 44-45 °C. Sólido amorfo branco; rendimento: 79%.

**2,4-dimetil-1*H*-pirrol-3-carboxilato de pentila (22e):** RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,12 (s; 1H; NH), 6,35 (s; 1H), 4,21 (t; J 7,0 Hz; 2H), 2,48 (s; 3H), 2,24 (s; 3H), 1,72 (quint; J 7,0 Hz; 2H), 1,45 - 1,32 (m; 4H), 0,91 (t; J = 7,0 Hz; 3H); RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 166,61 (Cq); 136,08 (Cq); 121,74 (Cq); 114,33 (CH); 110,99 (Cq); 63,47 (CH<sub>2</sub>); 28,74 (CH<sub>2</sub>); 28,53 (CH<sub>2</sub>); 22,48 (CH<sub>2</sub>); 14,22 (CH<sub>3</sub>); 14,12 (CH<sub>3</sub>); 12,78 (CH<sub>3</sub>); IV (KBr) v/cm<sup>-1</sup>: 1664 (C=O), 2958-2872 (CH), 3323 (NH). CG-EM (70 eV): m/z 209 [M]<sup>+</sup>; pf 45-46 °C. Sólido rosa; rendimento: 74%.

**2,4-dimetil-1*H*-pirrol-3-carboxilato de benzila (23):** RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,09 (s; 1H; NH), 7,44 – 7,29 (m; 5H), 6,35 (s; 1H), 5,30 (s; 2H), 2,48 (s; 3H) 2,25 (s; 3H); RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 166,14 (Cq); 137,17 (Cq); 136,43 (Cq); 128,56 (CH); 128,05 (CH); 127,88 (CH); 121,87 (Cq); 114,44 (CH); 110,60 (Cq); 65,19 (CH<sub>2</sub>); 14,35 (CH<sub>3</sub>); 12,87 (CH<sub>3</sub>); (KBr) v/cm<sup>-1</sup>: 1668 (C=O), 2918-2947 (CH), 3302 (NH); CG-EM (70 eV): m/z 229 [M]<sup>+</sup>; pf 87-88 °C. Sólido rosa; rendimento: 67%.

#### 4.5.3. Síntese do 5-bromo-2,4-dimetil-1*H*-pirrol-3-carboxilato de metila (24)

Adicionou-se 1,3 mmol (0,2 g) do composto **22a** em um balão de fundo redondo com 5 mL de THF a 0 °C em banho de gelo. A este balão adicionou-se gota a gota uma solução de 1,3 mmol de NBS, 0,5 mL de piridina e 5 mL de THF. O sistema foi mantido em agitação magnética e resfriamento por 30 minutos. Após o consumo do material de partida, confirmado por CCD (80:20 hexano:acetato de etila v/v), o meio reação foi vertido num funil de separação juntamente com 10 mL de acetato de etila e 10 mL de uma solução aquosa de 0,1 g/mL de sulfato de cobre pentahidratado. A fase orgânica foi lavada mais uma vez com a solução de CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O e três vezes com 10 mL de água. Finalmente, a fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e o solvente foi removido a pressão reduzida obtendo um precipitado marrom. O produto obtido foi armazenado a temperatura ambiente protegido da luz.

**5-bromo-2,4-dimetil-1*H*-pirrol-3-carboxilato de metila (24):** RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,34 (s; 1H; NH), 3,80 (s; 3H), 2,46 (s; 3H), 2,17 (s; 3H). RMN <sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 165,96 (Cq); 136,45 (Cq); 120,31 (Cq); 111,85 (Cq); 96,65 (Cq); 50,85 (CH<sub>3</sub>); 14,05 (CH<sub>3</sub>); 12,14 (CH<sub>3</sub>);

(KBr)  $\nu/\text{cm}^{-1}$ : 1678 (C=O), 2953 (CH), 3259 (NH). CG-EM (70 eV):  $m/z$  231 [M]<sup>+</sup>, 233 [+2]<sup>+</sup> pf não determinado (sensível a luz). Sólido amorfo marrom; rendimento: 73%.

#### 4.5.4. Síntese do metil-5-formil-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxilato (25)

Em um balão de fundo redondo contendo um 1 mL de TFA adicionou-se 0,1 g do composto **18a**. O meio permaneceu sob agitação magnética durante 30 minutos a temperatura ambiente. Decorrido esse período, o meio de reação foi resfriado a -5 – 0 °C utilizando-se um banho de gelo, sal grosso e etanol. Nesta temperatura, 0,2 mL de TOF foram adicionados de uma única vez seguido da adição imediata de gelo e água gelada formando um precipitado. Esse precipitado foi filtrado a vácuo e lavado com água gelada, conduzindo ao composto **25**.

**Metil-5-formil-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxilato (25):** RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 10,61 (s; 1H; NH), 9,58 (s; 1H), 3,82 (s; 3H), 2,57 (s; 3H), 2,53 (s; 3H); RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 177,54 (Cq); 165,56 (Cq); 144,20 (Cq); 136,69 (Cq); 128,42 (Cq); 114,10 (Cq); 50,98 (CH<sub>3</sub>); 14,35 (CH<sub>3</sub>); 10,75 (CH<sub>3</sub>); (KBr)  $\nu/\text{cm}^{-1}$ : 1639 (C=O), 1705 (C=O), 3251 (NH); CG-EM (70 eV):  $m/z$  181 [M]<sup>+</sup>; pf deg. 167-168 °C. Sólido amarelo; rendimento: 70%.

#### 4.5.5. Síntese do 2-hidrazinocarbotioamida-2,4-dimetil-1H-pirrol-4-carboxilato de metila (26)

Em um vial G-10 adicionou-se 2 mL de metanol, 1,1 mmols do composto **25**, quantidade equimolar de tiosemicarbazona e 50 µL de ácido acético. O meio foi submetido à irradiação por micro-ondas a 120 °C durante 20 minutos em reator Monowave (Anton Paar, Graz, Austria). O consumo total do material de partida foi confirmado por CCD e o metanol foi removido a pressão reduzida, levando à formação de um sólido bege.

**2-hidrazinocarbotioamida-2,4-dimetil-1H-pirrol-4-carboxilato de metila (26):** RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 11,39 (s; 1H), 11,23 (s; 3H; 1H), 8,15 (s; 1H), 7,97 (s; 1H), 7,92 (s; 1H), 3,69 (s; 3H), 2,42 (s; 3H), 2,17 (s; 3H); RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 177,18 (Cq); 165,15 (Cq); 138,96 (Cq); 131,57 (CH); 123,99 (Cq); 123,51 (Cq); 111,25 (Cq); 50,37 (CH<sub>3</sub>); 13,60 (CH<sub>3</sub>); 10,63 (CH<sub>3</sub>); (KBr)  $\nu/\text{cm}^{-1}$ : 1259-1267 (C=S), 1686 (C=O), 3136-3373 (NH); pf deg. 230-231 °C. Sólido bege; rendimento: 82%.

### 4.6 Procedimentos para os Ensaios Biológicos

#### 4.6.1. Ensaio tripanocida in vitro

Foi utilizado o ensaio da beta-galactosidase desenvolvido por Buckner e colaboradores (1996),<sup>30</sup> com modificações (Romanha *et al.*, 2010).<sup>31</sup> Este ensaio utiliza a cepa Tulahuen de *T. cruzi* que expressa o gene da beta-galactosidase de *Escherichia coli*. Resumidamente, para a realização dos ensaios, fibroblastos de camundongos da linhagem L929 foram semeados em placas de 96 poços e incubados por 24 horas a 37 °C para a adesão e, infecção com

10 parasitas/célula. Após 2 h, o meio contendo os parasitas extracelulares foi substituído por meio novo e a placa novamente incubada a 37 °C por 48 horas. Após esse período, o meio de cultura foi substituído por meio novo, além compostos em concentrações decrescentes, a partir de 200 µM, até se chegar ao CI<sub>50</sub>. Após 96 horas de incubação, foi adicionado o substrato CPRG, a placa incubada a 37 °C, e a leitura realizada após 16-20 h em espectrofotômetro utilizando um filtro de 570 nm. O benzonidazol no seu CI<sub>50</sub> (1 µg/mL = 3,81 µM) foi utilizado como controle positivo. Os resultados foram expressos como a porcentagem de inibição do crescimento parasitário.

#### 4.6.2. Ensaio de citotoxicidade sobre células de vertebrado com os compostos ativos

Os compostos com atividade tripanocida foram testados contra as células L929 para determinação da citotoxicidade (Romanha *et al.*, 2010)<sup>31</sup> através da utilização do indicador de viabilidade celular alamarBlue™. As amostras foram testadas em concentrações crescentes a partir da CI<sub>50</sub> encontrada sobre o parasita, utilizando o mesmo número de células, tempo de desenvolvimento celular e tempo de exposição aos compostos usados no ensaio da betagalactosidase. Após a adição do alamarBlue™, a placa foi incubada por 6 h e a leitura realizada a 570 e 600 nm. Os resultados foram expressos como a diferença na porcentagem de redução entre células tratadas (CT) e células não tratadas (CNT), através da seguinte equação:

$$\frac{(117,216) * (\text{Abs}570 \text{ CT}) - (80,586) * (\text{Abs}600 \text{ CT})}{(117,216) * (\text{Abs}570 \text{ CNT}) - (80,586) * (\text{Abs}600 \text{ CNT})} \times 100$$

O Índice de Seletividade (IS) foi calculado dividindo-se o CC<sub>50</sub> dos compostos sobre as células L929 (concentração citotóxica para 50% das células) pelo CI<sub>50</sub> encontrado sobre o *T. cruzi*. Somente compostos que apresentam IS ≥ 50 são recomendados a ensaios *in vivo*.

### Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) pelo suporte financeiro para realização deste projeto, e à Plataforma Tecnológica do Instituto René Rachou (Ensaios Pré-Clínicos de Triagem de Drogas Anti-Trypanosoma cruzi (PlaBio Tc) pelos serviços oferecidos.

### Referências Bibliográficas

- Pozharkii, A. F.; Soldatenkov, A. T.; Katritzky, A. R.; *Heterocycles in Life and Society: An Introduction to Heterocyclic Chemistry, Biochemistry and Applications*, 2a. ed., John Wiley & Sons, Ltd.: Reino Unido, 2011.

2. Stefani, H. A.; *Introdução à química de compostos heterocíclicos*, 1<sup>a</sup>. ed., Editora Guanabara Koogan S.A.: Rio de Janeiro, 2009.
3. Beatriz, A.; Mondino, M. G.; Compostos Heterocíclicos: Estudo e aplicações sintéticas, 1<sup>a</sup> ed., Editora Atheneu: São Paulo, 2014.
4. Bienaymé, H.; Zhu, J.; *Multicomponent Reactions*, 1a. ed., Wiley-VHC Verlag GmbH & Co: França, 2005.
5. Kumar, M.; Padmini, V.; Bhuvanesh, N. Stereo-selective green protocol for the synthesis of highly substituted 1-phenyl-tetrahydro indeno [a,2-b]pyrroles. *Research on Chemical Intermediates* **2017**, *43*, 4517. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
6. Keum, Y. S.; Zhu, Y. Z.; Kim, J. H.; Structure-inhibitory activity relationships of pyrrolonitrin analogues on its biosynthesis. *Applied Microbiology Biotechnology* **2011**, *89*, 781. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
7. Sítio National Library of Medicine. Pubchem – Tolmetin. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Tolmetin>>. Acesso em 22 junho 2021.
8. Tourneau, C. Le.; Raymond, E.; Faivre, S.; Sunitinib: a novel tyrosine kinase inhibitor. A brief review of its therapeutic potential in the treatment of renal carcinoma and gastrointestinal stromal tumors (GIST). *Therapeutics and Clinical Risk Management* **2007**, *3*, 341. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
9. Tzitzikas, T. Z.; Neochoritis, C. G.; Domling, A.; Atorvastatin (lipitor) by MCR. *ACS Medicinal Chemistry Letters* **2019**, *10*, 389. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
10. Sítio da Agência Nacional Vigilância Sanitária – ANVISA. Farmacopeia Brasileira, Volume II – Monografias Insumos Farmacêuticos e Especialidades, 6a. ed., Brasília, 2019. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33832/259143/IFA+e+ESP+Pronto.pdf/1d16f9e9-affc-495b-bb8f-6806c2cef0fe>>. Acesso em: 5 maio 2020.
11. Vieira, P. S.; Souza, T. A. C. B.; Honorato, R. V.; Zanphorlin, L. M.; Severiano, K. U.; Rocco, S. A.; Oliveira, A. H. C.; Cordeiro, A. T.; Oliveira, P. S. L.; Giuseppe, P. O.; Murakami, M. T.; Pyrrole-indolinone SU11652 targets the nucleoside diphosphate kinase from Leishmania parasites. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2017**, *488*, 461. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
12. Coutinho, L.; Ferreira, M. A.; Cosson, A.; Batista, M. M.; Batista, D. G. J.; Minoprio, P.; Degrave, W. M.; Berneman, A.; Soeiro, M. N. C.; Inhibition of *Trypanosoma cruzi* proline racemase affects host-parasite interactions and the outcome of in vitro infection. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **2009**, *104*, 1055. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
13. Sítio World Health Organization. Chagas disease (also known as American trypanosomiasis). Disponível em: <[https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))>. Acesso em: 22 junho 2021.
14. Andrade, Z. A.; Patologia da doença de Chagas: história e desafios. Disponível em: <<http://chagas.fiocruz.br/patologia/>>. Acesso em: 22 junho 2021.
15. Silva, B. V.; Silva, B. N. M.; Thio- and semicarbazones: hope in the search for treatment of leishmaniasis and chagas disease. *Medicinal Chemistry* **2017**, *13*, 110. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
16. Bandgar, B. P.; Sadavarte, V. S.; Uppalla, L. S.; Metal Salts as novel catalysts for efficient transesterification of beta-ketoesters. *Synthetic Communications* **2001**, *31*, 2063. [[Crossref](#)]
17. Yasutsugu, U.; Roberge, G.; Vinet, V.; A simple method of preparing trimethylsilyl- and *tert*-butyldimethylsilyl-enol ethers of alfa-diazoacetoxacetates and their use in the synthesis of a chiral precursor to thienamycin analogs. *Canadian Journal of Chemistry* **1984**, *62*, 2936. [[Crossref](#)]
18. Paiva, D. L.; Lampman, G. M.; Kriz, G. S.; *Introduction to spectroscopy: a guide for students of organic chemistry*, 3a ed., Thomson Learning, Inc.: Estados Unidos, 2001.
19. Rastogi, S.; Marchal, E.; Uddin, I.; Groves, B.; Colpitts, J.; McFarland, S. A.; Davis, J. T.; Thompson, A.; Synthetic prodigiosenes and the influence of C-ring substitution on DNA cleavage, transmembrane chloride transport and basicity. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2013**, *11*, 3834. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
20. Fischer, H.; 2,4-dimethyl-3,5-dicarbethoxypyrrole. *Organic Syntheses* **1943**, *2*, 202. [[Crossref](#)]
21. Rastogi, S.; Marchal, E.; Uddin, I.; Groves, B.; Colpitts, J.; McFarland, S. A.; Davis, J. T.; Thompson, A.; Synthetic prodigiosenes and the influence of C-ring substitution on DNA cleavage, transmembrane chloride transport and basicity. *Organic and Biomolecular Chemistry* **2013**, *11*, 3834. [[Crossref](#)]
22. Manley, J. M.; Kalman, M. J.; Conway, B. G.; Ball, C.C.; Havens, J. L.; Vaidyanathan, R. Early amidation approach to 3-[(4-amido)pyrrol-2-yl]-2-indolinones. *Journal of Organic Chemistry* **2003**, *68*, 6447. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
23. Williams, D. H.; Fleming, I.; *Spectroscopic Methods in Organic Chemistry*, 5a. ed., McGraw-Hill: Reino Unido, 1995.
24. Sun, L.; Lieang, C.; Shirazian, S.; Zhou, Y.; Miller, T.; Cui, J.; Fukuda, J. Y.; Chu, J.; Nematalla, A.; Wang, X.; Chen, H.; Sistla, A.; Luu, T. C.; Tang, F.; Wei, J.; Tang, C. Discovery of 5-[5-fluoro-2-oxo-1,2- dihydroindol-(3Z)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrole-3-carboxylic acid (2-diethylaminoethyl) amide, a novel tyrosine kinase inhibitor targeting vascular endothelial and platelet-derived growth factor receptor tyrosine kinase. *Journal of Medicinal Chemistry* **2003**, *46*, 1116. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
25. Sardari, S.; Feizi, S.; Rezayan, A. H.; Azerang, P.; Shahcheragh, S. M.; Ghavami, G.; Habibi, A.; Synthesis and biological evaluation of thiosemicarbazide derivatives endowed with high activity toward Mycobacterium Bovis. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* **2017**, *16*, 1128. [[PubMed](#)]
26. Silva, B. N. M.; *Tese de doutorado*, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2017. [[Link](#)]
27. Silva, B. N. M. ; Sales Junior, P. A. ; Romanha, A. J. ; Murta, Silvane M. F. ; Lima, Camilo H.S. ; Albuquerque, M. G. ; D'elia, E. ; Rodrigues, J. G.A. ; Ferreira, V. F. ; Silva, F. C. ; Pinto, A. C. ; Silva, B. V.; Synthesis of New Thiosemicarbazones and Semicarbazones Containing the 1,2,3-1*H*-triazole-isatin Scaffold: Trypanocidal, Cytotoxicity, Electrochemical Assays, and Molecular Docking. *Medicinal Chemistry* **2019**, *15*, 240. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
28. Alves, P. B.; Victor, M. M. Reação da cânfora com boroidreto de sódio: uma estratégia para o estudo da estereoquímica da reação de redução. *Química Nova* **2010**, *33*, 2274. [[Crossref](#)]
29. Bandgar, B. P.; Sadavarte, V. S.; Uppalla, L. S. Zn mediated

- transesterification of beta-ketoesters. *Journal of Chemical Research (S)* **2001**, 16. [[Crossref](#)]
30. Buckner, F. S.; Verlinde, C. L. M. J.; La Flamme, A. C.; Van Voorhis, W. C. Efficient technique for screening drugs for activity against *Trypanosoma cruzi* using parasites expressing  $\beta$ -galactosidase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapies* **1996**, 40, 2592. [[PubMed](#)]
31. Romanha, A. J.; De Castro, S. L.; Soeiro, M. D. N. C.; Lannes- Vieira, J.; Ribeiro, I.; Talvani, A.; Bourdin, B.; Blum, B.; Olivieri, B.; Zani, C.; Spadafora, C.; Chiari, E.; Chatelain, E.; Chaves, G.; Calzada, J. E.; Bustamante, J. M.; Freitas-Júnior, L. H.; Romero, L. I.; Bahia, M. T.; Lotrowska, M.; Soares, M.; Andrade, S. G.; Armstrong, T.; Degrave, W.; Andrade, Z. A. In vitro and in vivo experimental models for drug screening and development for Chagas disease. *Memorias Instituto Oswaldo Cruz* **2010**, 105, 233. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]