

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ADRIANO CARLOS VIEIRA DOS SANTOS

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE 3-ARIL-2-
ISOXAZOLINA[5,4-*d*]PIRROLIDINAS NA FORMA DE BASE LIVRE E DE SEUS
SAIS CLORIDRATOS.**

Recife,

2014

ADRIANO CARLOS VIEIRA DOS SANTOS

SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE 3-ARIL-2-ISOXAZOLINA[5,4-*d*]PIRROLIDINAS NA FORMA DE BASE LIVRE E DE SEUS SAIS CLORIDRATOS.

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Síntese e planejamento de fármacos.

ORIENTADOR: ANTÔNIO RODOLFO DE FARIA

Recife,
2014

Ficha catalográfica elaborada pela
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

S237s Santos, Adriano Carlos Vieira dos.
Síntese e avaliação da atividade antimicrobiana de 3-aril-2-Isoxazolina [5,4-d]pirrolidinas na forma de base livre e de seus sais cloridratos / Adriano Carlos Vieira dos Santos. – Recife: O autor, 2014.
104 f.: il.; tab.; 30 cm.

Orientador: Antônio Rodolfo de Faria.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2013.
Inclui referências e anexos.

1. Isoxazol. 2. Cicloadição. 3. Cloridratos. 4. Antimicrobianos. 5. 2-isoxazolina. I. Faria, Antônio Rodolfo de (Orientador). II. Título.

615.3 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2014-214)

ADRIANO CARLOS VIEIRA DOS SANTOS

**Síntese e avaliação da atividade antimicrobiana de 3-iril-2-isoxazolina
[5,4-d]pirrolidinas na forma de base livre e de seus sais cloridratos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em: 30/ 05/ 2014.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Antônio Rodolfo de Faria (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Sebastião José de Melo (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof.^a Dr.^a Ivani Malvestiti (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

REITOR

Prof. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Prof. Silvio Romero de Barros Marques

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Francisco de Souza Ramos

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. Nicodemos Teles de Pontes Filho

VICE-DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof.a Vânia Pinheiro Ramos

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Prof. Antônio Rodolfo de Faria

VICE-CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Prof. Dalci José Brandini

**COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Prof. Almir Gonçalves Wanderley

**VICE-COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Prof.a Ana Cristina Lima Leite

Dedico este trabalho aos
meus pais e irmãs pelo
amor, apoio e orientação
que sempre me deram.

AGRADECIMENTOS

É chegado o momento de expressar o objetivo e o esforço de muitos, pois foi somente assim que conseguimos realizar este trabalho, não foi sozinho, mas sim com a participação de vários amigos, sobretudo aqueles que compõem o Laboratório de Síntese Orgânica Aplicada à Fármacos (LASOF), que esta pesquisa pode ser efetivada.

Agradeço primeiramente a Deus pela oportunidade de realizar mais este trabalho em minha vida, durante todos os momentos tenho plena certeza que Ele esteve sempre ao meu lado abençoando-me para que eu pudesse caminhar a cada dia na certeza de concretizar esta pesquisa.

Agradeço a minha família pelo amor, compreensão e incentivo ao longo desta jornada, apoiando-me todos os dias para que eu pudesse alcançar todos os objetivos por mim pretendidos. A minha mãe Julia, meu pai José Carlos, minhas irmãs Damiana, Adriana e Danúbia, minha avó Angelita, meu tio José Vieira e minhas sobrinhas Emilly e Luisa sou profundamente agradecido a Deus por eles fazerem parte da minha vida.

Ao meu orientador, o professor Antônio Rodolfo de Faria, sou muito grato pela oportunidade de poder integrar o seu grupo de pesquisas. O professor Rodolfo, que assim o chamamos, tem sido um modelo a ser seguido pela sua grande dedicação ao que faz e ao seu ótimo caráter não só como profissional, mas também como pessoa. Com o professor Rodolfo participei de monitoria de disciplina, iniciação científica e agora concluo o mestrado.

Aos amigos da família LASOF, com estes vivi momentos inesquecíveis em minha vida. Períodos de aprendizado durante a execução de nossas pesquisas e também boas ocasiões de descontração onde em nosso laboratório pudemos estar em bastante harmonia. Agradeço aqueles que fizeram parte do LASOF durante o período em que estive: Charles, Marlene, Lucas, Natanael, Ronmilson, Leilane, Juliana, Gleybson, Helen, Hugo, Rafaela, Otoni, Victor, Jessica e Eduarda (aluna de IC que muito ajudou nesta reta final) sou muito grato pela contribuição de todos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF), pela oportunidade de realização de trabalhos em minha área de pesquisa e a secretária da Pós Graduação Nerilin Trajano por todos os momentos de atenção e ajuda.

Aos técnicos da Central Analítica do DQF, Eliete e Elias, pelas análises de RMN H^1 , C^{13} e Massas, respectivamente. Ao amigo Lourenço do Laboratório de Tecnologia de Medicamentos (LTM) pela atenção e realização das análises de infravermelho.

A professora Kêsia Xisto e aos membros do seu grupo de pesquisas do Laboratório de Fármacos e Ensaio Antimicrobianos do Departamento de Antibióticos da UFPE pela realização dos testes antimicrobianos de nossas moléculas.

A CAPES pelo financiamento do projeto e concessão da bolsa de mestrado durante o período em que recebi.

E, quando orardes, não sereis como os hipócritas; porque gostam de orar em pé nas sinagogas e nos cantos das praças, para serem vistos dos homens. Em verdade vos digo que eles já receberam a recompensa.

Tu, porém, quando orares, entra no teu quarto e, fechada a porta, orarás a teu Pai, que está em secreto; e teu Pai, que vê em secreto, te recompensará.

E, orando, não useis de vãs repetições, como os gentios; porque presumem que pelo seu muito falar serão ouvidos.

Não vos assemelheis, pois, a eles; porque Deus, o vosso Pai, sabe o de que tendes necessidade, antes vos que lho peçaís.

(Mateus 6. 5-8)

RESUMO

A química medicinal é uma ferramenta importantíssima para o planejamento e o desenvolvimento de moléculas orgânicas, a fim de verificar as possíveis atividades biológicas destas. Dentre as inúmeras classes de compostos orgânicos, tem ganhado muito destaque o núcleo isoxazolinico, especialmente a 2-isoxazolina, devido a sua ampla utilização não só nas áreas científicas, mas também tecnológica. O núcleo isoxazolinico vem sendo obtido, na grande maioria das vezes, através das reações de cicloadição do tipo 1,3-dipolar. Nestas reações, duas espécies químicas envolvidas, um dipolo e um dipolarófilo, reagem entre si através de seus orbitais de fronteira, HOMO e LUMO, formando-se então o núcleo 2-isoxazolina – heterociclo de cinco membros. No estudo utilizaram-se como dipolarófilos os enecarbamatos endocíclicos de cinco membros **41** e **43**, obtidos pelo método da sonicação em um curto intervalo de tempo, e como dipolos os óxidos de nitrila **37** formados a partir da cloração das aril-oximas com NCS. As aril-oximas, por sua vez, foram obtidas a partir dos respectivos benzaldeídos *para*-substituídos com rendimentos entre 93 e 95%. Obtiveram-se nas reações de cicloadição 1,3-dipolar, realizadas a temperatura ambiente, rendimentos entre 42 e 77%. O cicloaduto **44b**, resultante da reação de cicloadição, após sua purificação foi submetido à hidrogenólise em meio ácido, obtendo-se então os cloridratos de isoxazolina aril substituídos **46** com rendimento entre 53 e 64%. Estes, após basificação com solução aquosa de bicarbonato de sódio, foram transformados em suas respectivas aril isoxazolinias na forma de base livre em N6 **45**, apresentando rendimento quantitativo. Dentre as atividades biológicas relatadas na literatura, inúmeros estudos mostram a 2-isoxazolina como bons agentes anti-inflamatórios, antitumorais, antivirais e com grande destaque para a atividade antimicrobiana, através de testes realizados em bactérias e fungos. Sendo assim, as séries de moléculas obtidas **45** e **46** foram testadas contra bactérias gram positivas e gram negativas através do método de difusão em disco para averiguar a atividade antimicrobiana dos compostos em suas formas de aminas livres e dos seus sais de cloridratos. Neste estudo, observou-se, que boa parte dos compostos testados não exibiu expressivos valores de halos de inibição, quando comparados ao padrão utilizado, ampicilina. Teve destaque o cloridrato de aril isoxazolina *p*-Cloro **46b** que exibiu halo de inibição de 26 mm frente à *Mycobacterium smegmatis* DAUFPE 71 (álcool ácido resistente), enquanto que a ampicilina apresentou para o mesmo micro-organismo apenas 14 mm de halo de inibição. Já a base livre da aril isoxazolina *p*-Cloro, o composto **45b**, não apresentou inibição para o mesmo micro-organismo. Os demais compostos com maiores valores de halos de inibição foi o **45a** frente à *Escherichia coli* DAUFPE 224 (12,5 mm) e *M. smegmatis* DAUFPE 71 (14 mm) e os compostos **45b**, **46a** e **46b** que apresentaram halos de 11,5, 13,5 e 13,5 mm, respectivamente, contra *Micrococcus luteus* DAUFPE 06.

Palavras-chaves: 2-isoxazolina, cicloadição 1,3-dipolar, cloridratos, antimicrobianos.

ABSTRACT

The medicinal chemistry is an important tool for the planning and development of organic molecules in order to determine possible biological activities of these. Among the many classes of organic compounds, has gained much prominence isoxazolínico the core, especially the 2-isoxazoline, due to its wide use not only in scientific fields, but also technological. The isoxazolínico core has been obtained, in most cases, through the cycloaddition reactions of 1,3-dipolar type. In these reactions, two chemical species involved, a dipole and dipolarophile react among themselves through their frontier orbital, HOMO and LUMO, then forming the core 2-isoxazoline – five membered heterocycle. In the study were used as dipolarophiles the endocyclic enecarbamates five members **41** and **43**, obtained by the method of sonication in a short period of time, and as the dipoles nitrile oxide **37** formed from the chlorination with NCS aryl oximes. The aryl oximes, in turn, were obtained from the corresponding *para*-substituted benzaldehydes with yields between 93 and 95%. Were obtained in 1,3-dipolar cycloaddition reactions, carried out at room temperature, yields between 42 and 77%. The cycloadducts **44b** resulting from cycloaddition reactions after purification was subjected to hydrogenolysis in an acid medium, so obtaining hydrochlorides aryl substituted isoxazoline **46** in a yield between 53 and 64%. These after basification with aqueous sodium bicarbonate, were transformed into their respective aryl isoxazolines in the form of free base N6 **45**, with quantitative yield. Among the biological activities reported in the literature, numerous studies show the 2-isoxazoline as a good anti-inflammatory, antitumor, antirival, and with great emphasis on the antimicrobial activity through tests conducted on bacteria and fungi. Thus, the series of molecules obtained **45** and **46** were tested against gram positive and gram negative bacteria by disk diffusion method to determine the antimicrobial activity of the compounds in their free forms of amines and their hydrochloride salts. In this study, it was observed that most the tested compounds showed no significant values on inhibition zones compared to the standard used, ampicillin. Hydrochloride was highlighted aryl isoxazoline *p*-Chloro **46b** which exhibited inhibition zone of 26 mm across the *Mycobacterium smegmatis* DAUFPE 71 (acid alcohol resistant), whereas ampicillin presented to the same microorganism only 14 mm zone of inhibition. Already the free base of the aryl isoxazoline *p*-chloro, compound **45b**, showed no inhibition at the same microorganism. The other compounds with higher values on inhibition halos was the **45a** against *Escherichia coli* DAUFPE 224 (12.5 mm) and *M. smegmatis* DAUFPE 71 (14 mm) and the compounds **45b**, **46a** and **46b** which showed halos 11.5, 13.5 and 13.5 mm, respectively, against *Micrococcus luteus* DAUFPE 06.

Key-words : 2-isoxazoline, 1,3-dipolar cycloaddition, hydrochlorides, antimicrobials.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

ESQUEMAS

	Pág.
Esquema 1	Representação de derivados isoxazolínicos utilizados como bioisóteros da função amida e avaliados como agentes anti tuberculose. 07
Esquema 2	Exemplificação das modificações estruturais dos derivados da isoxazina 13 . 10
Esquema 3	Síntese de espiroisoxazolínas oxindoles através da cicloadição 1,3-dipolar. 14
Esquema 4	Síntese de análogos isoxazolínicos de nucleotídeos através da cicloadição 1,3-dipolar. 15
Esquema 5	Síntese de 2-isoxazolína a partir de ésteres alilícos. 15
Esquema 6	Mecanismo de formação de 2-isoxazolina através da adição do cátion NO^+ . 16
Esquema 7	Síntese de 2-isoxazolínas através de método catalilítico com sal de anilina. 17
Esquema 8	Síntese de 2-isoxazolínas através da reação de oximação/ ciclização. 17
Esquema 9	Mecanismo de formação de 2-isoxazolina a partir de cetonas β , γ -insaturada com hidroxilamina. 18
Esquema 10	2-isoxazolinas utilizadas como intermediários na síntese de isoxazóis 3,5-dissubstituídos. 18
Esquema 11	Ilustração geral de uma reação de cicloadição, passando pelo estado de transição. 19
Esquema 12	Rota sintética de obtenção dos cloridratos de isoxazolína aril substituídos. 28
Esquema 13	Síntese do trímero da 1-pirrolina. 31
Esquema 14	Obtenção dos <i>N</i> -óxidos de nitrila a partir dos benzaldeídos em sucessivas etapas. 31
Esquema 15	Obtenção das benzaldoximas através do método tradicional. 32

Esquema 16	Obtenção das benzaldoximas via ultrassom.	32
Esquema 17	Obtenção dos cloretos de hidroximinoflas.	34
Esquema 18	Proposta de mecanismo de formação dos cloretos de hidroximinoflas com a utilização do NCS.	35
Esquema 19	Proposta de formação do dímero dos <i>N</i> -óxidos de nitrila.	35
Esquema 20	Rota de obtenção dos enecarbamatos endocíclicos 41 e 43 .	37
Esquema 21	Rota de obtenção dos derivados isoxazolínicos aril substituídos na forma de base livre em N6 e de suas formas de cloridratos.	38
Esquema 22	Cicloadição 1,3-dipolar entre os enecarbamatos endocíclicos e os <i>N</i> -óxidos de nitrila.	39
Esquema 23	Ilustração do giro da ligação sigma N-C da porção carbamídica dos cicloadutos, favorecendo o desenvolvimento de diferentes ambientes químicos e magnéticos que favorecem o aparecimento de rotamêros no espectro de RMN ¹ H.	44
Esquema 24	Proposta de mecanismo não concertado da cicloadição 1,3-dipolar.	45
Esquema 25	Desproteção nitrogênio N6. Remoção dos protetores.	46
Esquema 26	Abertura do anel isoxazolínico piperidínico 47 .	47
Esquema 27	Abertura do anel isoxazolínico pirrolidínico.	48
Esquema 28	Obtenção dos cloridratos de aril isoxazolina através da hidrogenólise em meio ácido.	48
Esquema 29	Obtenção das aril isoxazolininas base livre N6 através da basificação dos respectivos cloridratos.	49

FIGURAS

	Pág.
Figura 1 Representação da estrutura química das isoxazolinas bicíclicas-pirrolidínicas aril-substituídas na forma de base livre em N6 e dos seus respectivos sais de cloridratos.	03
Figura 2 Nomenclatura das isoxazolinas segundo a posição da ligação dupla no anel.	05
Figura 3 Isoxazolinas de ocorrência natural: calafianin, arothionin, homoarothionin e aerophobin.	06
Figura 4 Principais estruturas isoeletrônicas dos anions alenila e alila.	20
Figura 5 Estruturas de ressonância e os orbitais <i>p</i> da espécie 1,3-dipolar do tipo alila e propargila.	20
Figura 6 Classificação de Sustmann das reações de cicloadição através dos orbitais de fronteira.	21
Figura 7 Estrutura básica do heterobiciclo 2-isoxazolina[5,4- <i>d</i>]pirrolidina.	25
Figura 8 Deslocamento químico dos hidrogênios do cicloaduto protegido com boc.	40
Figura 9 Espectro de RMN de ^1H do cicloaduto 42 .	41
Figura 10 Deslocamento químico dos hidrogênios do cicloaduto protegido com cbz.	42
Figura 11 Espectro de RMN de ^1H do cicloaduto 42a .	43
Figura 12 Deslocamentos químicos dos átomos de carbonos da aril isoxazolína <i>p</i> -Cl base livre em N6 45b RMN ^{13}C .	50
Figura 13 Espectro de RMN de ^{13}C da aril isoxazolína <i>p</i> -Cl base livre em N6 45b .	51
Figura 14 Deslocamentos químicos dos átomos de hidrogênios da aril isoxazolína <i>p</i> -Cl base livre em N6 46b .	52
Figura 15 Espectros de RMN ^1H da aril isoxazolína <i>p</i> -Cl base livre em N6 45b .	53
Figura 16 Deslocamento químico dos átomos de hidrogênios da aril isoxazolína <i>p</i> -Cl na forma de cloridrato.	54
Figura 17 Espectro de RMN ^1H do cloridrato de aril isoxazolína <i>p</i> -Cl.	55

Figura 18	Espectro de infravermelho da aril isoxazolina <i>p</i> -Cl na forma de base livre.	57
Figura 19	Espectro de Massas da aril isoxazolina <i>p</i> -Cl na forma de base livre.	58
Figura 20	Placas de difusão dos principais halos de inibição das aril isoxazolinás na forma de base livre e de cloridratos frentes a bactérias gram positivas e gram negativas.	61
Figura 21	Espectro de infravermelho da aril isoxazolina <i>p</i> -F na forma de base livre.	98
Figura 22	Espectro de RMN ¹³ C da aril isoxazolína <i>p</i> -F base livre em N6.	99
Figura 23	Espectro de RMN ¹ H da aril isoxazolína <i>p</i> -F base livre em N6.	100
Figura 24	Espectro de infravermelho da aril isoxazolina <i>p</i> -CH ₃ na forma de base livre.	101
Figura 25	Espectro de RMN ¹³ C da aril isoxazolína <i>p</i> -CH ₃ base livre em N6.	102
Figura 26	Espectro de RMN ¹ H da aril isoxazolína <i>p</i> -CH ₃ base livre em N6.	103
Figura 27	Espectros de Massas da aril isoxazolina <i>p</i> -F na forma de base livre.	104
Figura 28	Espectros de Massas da aril isoxazolina <i>p</i> -CH ₃ na forma de base livre.	104

GRÁFICO E TABELAS

	Pág.
Gráfico 1 Valores dos halos de inibição, em milímetros (mm), das aril isoxazolinás nas formas de base livre e de cloridratos.	60
Tabela 1 Comparação dos rendimentos da síntese das benzaldoximas obtidas pelo método tradicional e através do ultrassom.	33
Tabela 2 Comparação dos métodos empregados para a obtenção do enecarbamato endocíclico de cinco membros 43 .	37
Tabela 3 Valores dos halos de inibição em mm das substâncias <u>45a-c</u> e <u>46a-c</u> frente a bactérias gram positivas e gram negativas.	59

SIGLAS E ABREVIATURAS

- BOC** - Dicarbonato de di-terc-butila
- CBZ** - Benzilóxicarbonila
- CCD** - Cromatografia em camada delgada
- CEFNO** - Óxido de carboetoxiformonitrila
- CH₃CN** - Acetonitrila
- CMI** - Concentração Mínima Inibitória
- COX** - Cicloxigenase
- COX-1** - Cicloxigenase 1
- COX-2** - Cicloxigenase 2
- DAUFPE** - Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco
- DBIs** - Benzodiazepínicos fundidos com o anel isoxazolina
- DMAP** - Di-metil amino piridina
- DMF** - Dimetilformamina
- DMSO** - Dimetilsulfóxido
- EC₅₀** - Metade da concentração máxima eficaz
- FMO** - Orbitais Moleculares de Fronteira
- GABA** - Ácido gama amino butírico
- HOMO** - Orbital Molecular Ocupado de Maior Energia
- HRMS** - Massas de Alta Resolução
- IC₅₀** - Metade da concentração mínima inibitória
- IV-FT** – Infra Vermelho com Transformada de Fourier
- LM8G7** - Invasão do osteossarcoma
- LUMO** - Orbital Vazio de Menor Energia
- MDA-MB-231** - Células de câncer de mama humano
- MDM2** - Murine double minute-2
- MIF** - Fator inibitório da migração de macrófagos
- NaH** - Hidreto de sódio
- NCS** - *N*-cloro succinimida
- NOBF₄** - Tetrafluoroborato de nitrosônio
- NO⁺** - Íon nitrosônio
- OVSAHO** - Células cancerosas ovarianas humanas

PLA2 - Fosfolipase A2

PPGCF - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

p53 - Proteína antiproliferativa

QSAR - Relação Quantitativa Estrutura Atividade

RMN - Ressonância Magnética Nuclear

RF - Fator de retenção

TFA - Ácido trifluoroacético

THF - Tetrahydrofurano

SUMÁRIO

1.0	INTRODUÇÃO	02
2.0	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	05
2.1	Isoxazolinás	05
2.1.1	Ocorrência natural, atividades biológicas e aplicações terapêuticas de 2-isoxazolinás	06
2.1.2	Métodos de obtenção de 2-isoxazolinás	13
2.1.3	Cicloadição 1,3-dipolar	19
2.1.4	Antimicrobianos e sua penetração tecidual	22
2.1.5	Principais fatores que afetam a penetração tecidual dos antimicrobianos	22
3.0	OBJETIVOS	25
3.1	Objetivo geral	25
3.2	Objetivo específico	25
4.0	METODOLOGIA	27
4.1	Parte química	27
4.2	Parte biológica	29
5.0	RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
5.1	Parte química	31
5.1.1	Síntese do trímero da 1-pirrolina 40	31
5.1.2	Obtenção dos <i>N</i> -óxidos de nitrila 37	31
5.1.2.1	Síntese das benzaldoximas <i>p</i> -substituídas 35	30
5.1.2.2	Síntese do cloreto de hidroximiinoílas 36	34
5.1.3	Obtenção dos enecarbamatos endocíclicos 41 e 43	36
5.1.4	Obtenção das isoxazolinás bicíclicas-pirrolidínicas aril-substituídas na forma de base livre em N6 45 e dos seus respectivos sais de cloridratos 46	38
5.1.5	Cicloadição 1,3-dipolar entre os enecarbamatos endocíclicos 41 e 43 com os <i>N</i> -óxidos de nitrila 37	39
5.1.6	Desproteção da amina secundária em N6 para formação das isoxazolinás aril substituídas como base livre em N6	46
5.1.7	Obtenção dos cloridratos de aril isoxazolinás 46 através da hidrogenólise em meio ácido, com posterior basificação dos mesmos para formação das aril isoxazolinás na forma de base livre em N6 45	48
5.1.8	Análises espectrométricas de RMN de ¹³ C, ¹ H, IV-FT e HRMS das isoxazolinás aril substituídas na forma de base livre em N6 e de seus respectivos sais cloridratos	50
5.2	Parte biológica	59
6.0	PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	63
6.1	Parte química	63
6.1.1	Síntese do trímero da 1-pirrolina 40	64
6.1.2	Síntese do <i>N</i> -(<i>t</i> -butoxicarbonil)-2-pirrolina 41	65
6.1.3	Síntese do <i>N</i> -(benzilcarbonil)-2-pirrolina 43	66

6.1.4	Síntese da 4-fluorobenzaldoxima <u>35a</u>	67
6.1.5	Síntese da 4-fluorobenzaldoxima através da sonicação	68
6.1.6	Síntese da 4-clorobenzaldoxima <u>35b</u>	68
6.1.7	Síntese da 4-clorobenzaldoxima através da sonicação	69
6.1.8	Síntese da 4-toluilbenzaldoxima <u>35c</u>	69
6.1.9	Síntese da 4-toluilbenzaldoxima através da sonicação	70
6.1.10	Síntese do cloreto de 4-fluorofenilhidroxiiminoíla <u>36a</u>	71
6.1.11	Síntese do cloreto de 4-clorofenilhidroxiiminoíla <u>36b</u>	71
6.1.12	Síntese do cloreto de 4-toluilfenilhidroxiiminoíla <u>36c</u>	72
6.1.13	Síntese do 6-tert-butoxicarbonil-3-(4-fluorofenil)-3a,4,5,6a-tetrahidropirrol[3,2- <i>d</i>]isoxazol) <u>42a</u>	72
6.1.14	Síntese do 6-tert-butoxicarbonil-3-(4-clorofenil)-3a,4,5,6a-tetrahidropirrol[3,2- <i>d</i>]isoxazol) <u>42b</u>	73
6.1.15	Síntese do (6-benziloxicarbonil)-(3-fluorofenil-3a,4,5,6a-tetrahidropirrol[3,2- <i>d</i>]isoxazol) <u>44a</u>	74
6.1.16	Síntese do (6-benziloxicarbonil)-(3-clorofenil-3a,4,5,6a-tetrahidropirrol[3,2- <i>d</i>]isoxazol) <u>44b</u>	75
6.1.17	Síntese do (6-benziloxicarbonil)-(3-toluilfenil-3a,4,5,6a-tetrahidropirrol[3,2- <i>d</i>]isoxazol) <u>44c</u>	76
6.1.18	Síntese do 3-(4-fluorofenil)-4,5,6,6a-tetrahidro-3a <i>H</i> -pirrol[3,2- <i>d</i>]isoxazol-6-íon cloreto <u>46a</u> através da hidrogenólise em meio ácido	77
6.1.19	Síntese do 3-(4-clorofenil)-4,5,6,6a-tetrahidro-3a <i>H</i> -pirrol[3,2- <i>d</i>]isoxazol-6-íon cloreto <u>46b</u> através da hidrogenólise em meio ácido	78
6.1.20	Síntese do 3-(4-toluilfenil)-4,5,6,6a-tetrahidro-3a <i>H</i> -pirrol[3,2- <i>d</i>]isoxazol-6-íon cloreto <u>46c</u> através da hidrogenólise em meio ácido	79
6.1.21	Síntese do 3-(4-fluorofenil)-4,5,6,6a-tetrahidro-3a <i>H</i> -pirrol[3,2- <i>d</i>]isoxazole através da basificação do composto <u>46a</u>	80
6.1.22	Síntese do 3-(4-clorofenil)-4,5,6,6a-tetrahidro-3a <i>H</i> -pirrol[3,2- <i>d</i>]isoxazole através da basificação do composto <u>46b</u>	81
6.1.23	Síntese do 3-(4-toluilfenil)-4,5,6,6a-tetrahidro-3a <i>H</i> -pirrol[3,2- <i>d</i>]isoxazole através da basificação do composto <u>46c</u>	82
7.0	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	84
	REFERÊNCIAS	86
	ANEXOS	98

CAPÍTULO 1

Introdução

1.0 INTRODUÇÃO

A química medicinal é uma ciência tipicamente interdisciplinar, auxiliada por várias áreas do conhecimento, sobretudo a química e a biologia. Juntas, elas agregam valores durante o planejamento e o desenvolvimento de protótipos moleculares voltados a interagir com os receptores biológicos minimamente conhecidos e, assim promover através destes algum tipo de atividade farmacológica^{1,2}.

Uma das ferramentas utilizadas para alcançar os objetivos da química medicinal é a utilização da síntese orgânica de fármacos³. Através deste meio é possível construir moléculas inéditas ou desenvolver apenas algumas modificações em estruturas conhecidas, fazendo-as apresentar configurações e disposições espaciais o mais próximo do idealizado para interagir com os receptores biológicos⁴.

Nestes compostos químicos relatados na literatura por apresentarem alguma atividade biológica, verifica-se em praticamente todos eles - obtidos através de síntese ou de modo natural - a presença de heteroátomos, sobretudo os átomos de nitrogênio, oxigênio e enxofre e, que em boa parte encontram-se inseridos na estrutura de algum ciclo⁵.

Sendo assim, destacamos uma das classes químicas que exibem estrutura heterocíclica e que tem ganhado muito destaque ultimamente: as isoxazolinas, especialmente a 2-isoxazolina^{6,7}, não só por sua utilização na área biológica, mas também na elaboração de produtos tecnológicos⁸.

No desenvolvimento do núcleo 2-isoxazolina, uma das metodologias mais utilizadas pela síntese orgânica é a que ocorre através de uma reação química conhecida por cicloadição 1,3-dipolar ou reação do tipo $[3 + 2]$ ⁹. Nela duas espécies químicas, um dipolo e um dipolarófilo, formam um núcleo denominado de cicloaduto através da participação dos orbitais de fronteira¹⁰ das partes envolvidas. *N*-óxidos de nitrila, gerados a partir de aril-oximas, constituem os dipolos, enquanto que os enecarbamatos endocíclicos constituem o dipolarófilos.

Entre as metodologias utilizadas para a obtenção dos enecarbamatos endocíclicos e das aril-oximas, além de um procedimento tradicionalmente utilizado para cada reação, empregou-se também a técnica da sonicação. Esta que vem sendo bastante recorrente na síntese orgânica por apresentar algumas vantagens como a diminuição do tempo de reação, poder ser realizada sob condições mais suaves e possibilitar que sejam alcançados altos rendimentos.

Dentre as várias aplicações da 2-isoxazolina no campo medicinal, tem muita relevância a utilização desta classe química como agentes antimicrobianos^{11, 12}. Este grupo terapêutico tem merecido atenção, principalmente, por conta dos relatos de resistência microbiana¹³ desenvolvida por alguns micro-organismos em relação a determinados antibióticos, sobretudo pelo uso indiscriminado destes. Muitos fármacos, incluindo os antimicrobianos, apresentam baixa solubilidade em água, o que dificulta, na grande maioria das vezes, em sua taxa de dissolução e, conseqüentemente permeação nos fluidos corporais¹⁴.

Utilizando-se então do planejamento e do desenvolvimento de agentes terapêuticos, este trabalho visou à síntese de isoxazolinias bicíclicas-pirrolidínicas aril-substituídas na forma de bases livres em N6 e dos seus respectivos sais na forma de cloridratos, prevendo-se assim uma melhoria na solubilidade para administração destes potenciais antimicrobianos (**Figura 1**).

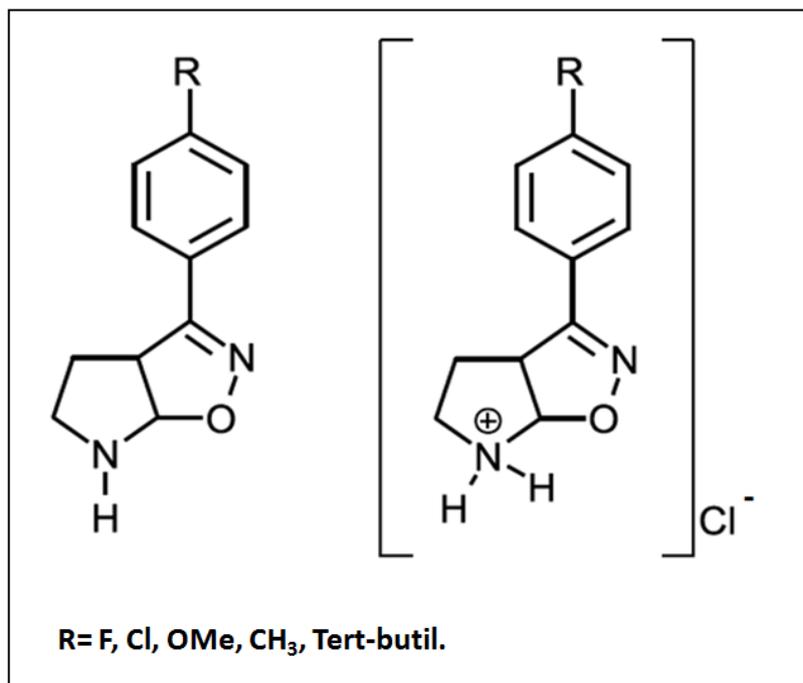


Figura 1. Representação da estrutura química das isoxazolinias bicíclicas-pirrolidínicas aril-substituídas na forma de base livre em N6 e dos seus respectivos sais de cloridratos.

CAPÍTULO 2

Revisão bibliográfica

2.0 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 - Isoxazolinás

Na literatura existem inúmeros relatos de moléculas naturais ou sintéticas que apresentam em suas estruturas heteroátomos^{15, 16}. Estes compostos, em sua maioria, são descritos como bons grupos farmacofóricos e, portanto vem sendo utilizados como arsenal terapêutico no combate as mais variadas enfermidades^{17, 18}.

Dentre estes compostos destaca-se a classe das isoxazolinás, compostos heteropentaciclos insaturados que apresentam um átomo de oxigênio e nitrogênio unidos através de uma ligação simples¹⁹. De acordo com a posição da dupla ligação existente é possível classificar a isoxazolina com diferentes nomenclaturas (**Figura 2**).

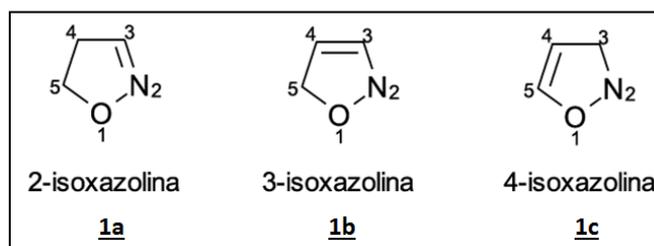


Figura 2. Nomenclatura das isoxazolinás segundo a posição da ligação dupla no anel.

O átomo de oxigênio no núcleo isoxazolinina encontra-se na posição 1 enquanto o átomo de nitrogênio está na posição 2, devido à prioridade do número atômico. Dentre as isoxazolinás existentes, apenas aquela com insaturação na posição 2 do anel apresenta o nitrogênio com hibridização sp^2 formando uma ligação π com o carbono da posição 3, também hibridizado em sp^2 .

A diferença de eletronegatividade existente entre os átomos que compõem a estrutura, assim como a posição do sistema π , conferem as isoxazolinás peculiaridades que somente estão presentes por conta destes heteroátomos, responsáveis por conferir diferentes propriedades em sua reatividade assim como em suas características físico-químicas.

Além da utilização biológica deste heterociclo, muitas pesquisas têm sido realizadas para a exploração destes compostos no desenvolvimento de cristais líquidos funcionais²⁰, que são moléculas orgânicas com propriedades anisotrópicas geométricas e várias aplicações nas áreas científica e tecnológica^{21, 22}.

Ainda no campo medicinal tem sido relatada a utilização de moléculas contendo o núcleo isoxazolina como transportadores e reguladores da liberação de fármacos a ele incorporados, a exemplo de algumas drogas utilizadas para combater o câncer²³.

2.1.1 – Ocorrência natural, atividades biológicas e aplicações terapêuticas de 2-isoxazolininas

Isoxazolininas são relatadas em muitos estudos como uma classe única de farmacóforos com aplicações em várias atividades terapêuticas^{24, 25}. Algumas isoxazolininas de ocorrência natural merecem destaque por serem produtos naturais biologicamente ativos, a exemplo da classe das espiroisoxazolininas, onde se tem como exemplos o calafianin **2**, aerothionin **3**, homoaerothionin **4** e aerophobin **5**^{26, 27} (Figura 3).

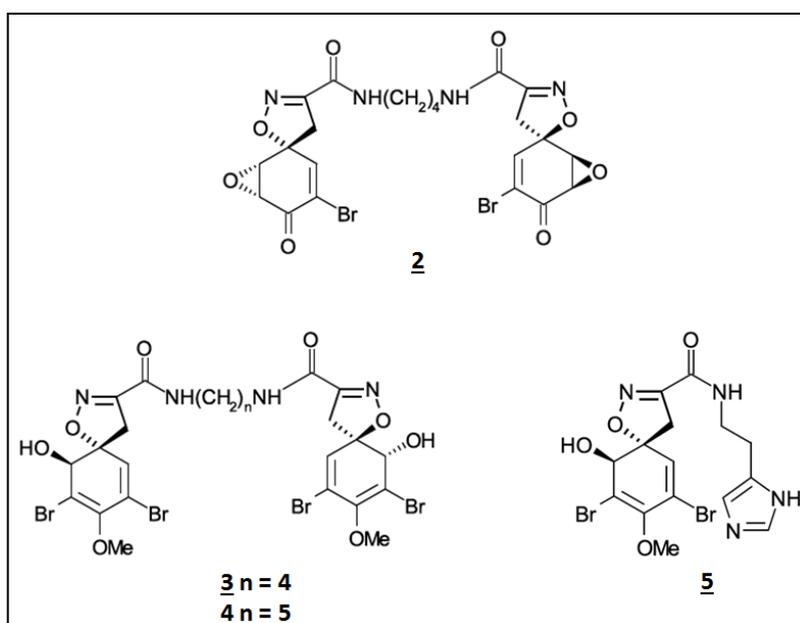
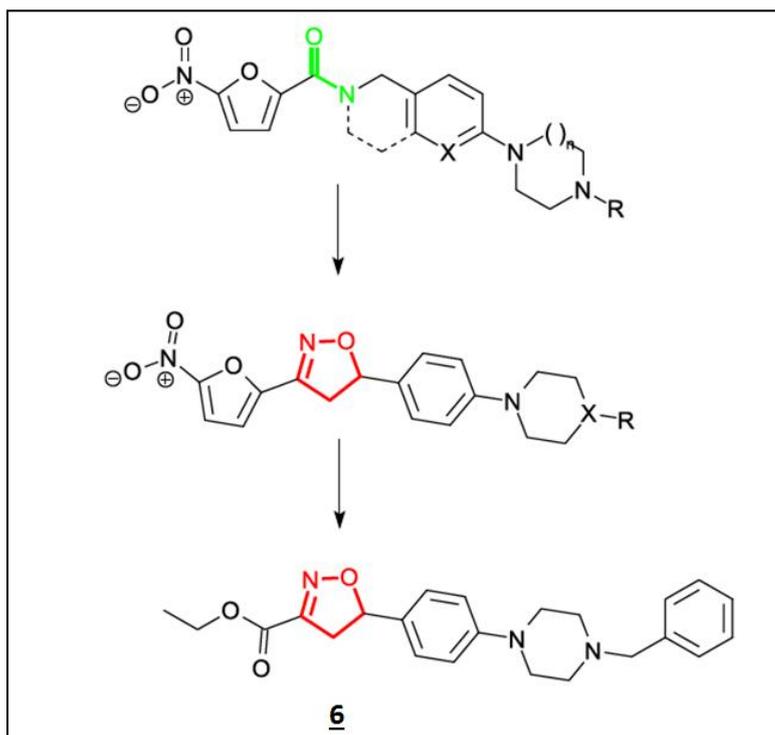


Figura 3. Isoxazolininas de ocorrência natural: calafianin, aerothionin, homoaerothionin e aerophobin.

Além da utilização de isoxazolininas naturais, derivados sintéticos desta classe química também têm sido frequentemente desenvolvidos e utilizados como agentes antimicrobianos²⁸, antitumorais, antivirais, anticonvulsivantes, anti-inflamatórios, antifúngicos, entre outras atividades biológicas^{29, 30, 31, 32}.

No combate à tuberculose alguns compostos nitro aromáticos tem sido uma das poucas classes de antibióticos que tem demonstrado alguma atividade contra *Mycobacterium tuberculosis*³³. Uma serie de isoxazolininas, a exemplo da estrutura **6**, foram sintetizadas e revelaram uma potente atividade anti tuberculose *in vitro*, além de uma maior estabilidade quando comparadas com amidas nitro aromáticas desenvolvidas em uma série anterior. Neste

estudo pôde verificar-se, além da não inserção do grupo nitro furano nestes novos compostos, a aplicação do núcleo isoxazolínico como um bioisótero da função amida. Ou seja, mesmo com a substituição de uma função química por outra a resposta biológica promovida foi semelhante devido à presença de átomos com estrutura eletrônica e propriedades físico-química parecidas (**Esquema 1**). A molécula **6** destacou-se como bom agente anti tuberculose apresentando um valor de MIC₉₀ de 1,56 mg/ mL³⁴.

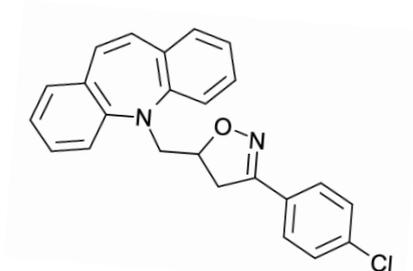


Esquema 1. Representação de derivados isoxazolínicos utilizados como bioisóteros da função amida e avaliados como agentes anti tuberculose.

A atividade anti câncer de estruturas híbridas de benzodiazepínicos fundidos com o anel isoxazolína (DBIs)³⁵ foi verificada contra a proliferação do osteossarcoma LM8G7. Entre as moléculas testadas, o composto **7**, nas concentrações de 1 e 5 μ M foi o que inibiu mais fortemente o desenvolvimento das células de LM8G7 em cerca de 67 e 85%, respectivamente. Verificou-se também a ação inibitória desta molécula frente a proliferação de células de câncer de mama humano (MDA-MB-231) *in vitro* na concentração de 10 μ M. Os resultados do estudo revelaram que o composto **7** suprimiu completamente a multiplicação de MDA-MB-231 *in vitro*, em um efeito dose dependente.

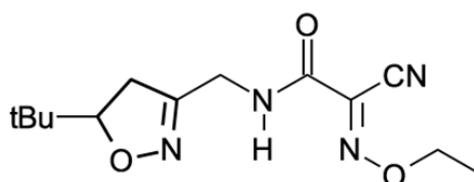
Além da propriedade anti-proliferativa o derivado **7** também inibiu a migração de células de LM8G7 e de células cancerosas ovarianas humanas (OVSAHO). Revelando,

portanto, que a atividade do composto **7** em inibir a proliferação das células de LM8G7 e de OVSAHO pode ser comparável à da cisplatina³⁶ e suramin³⁷.

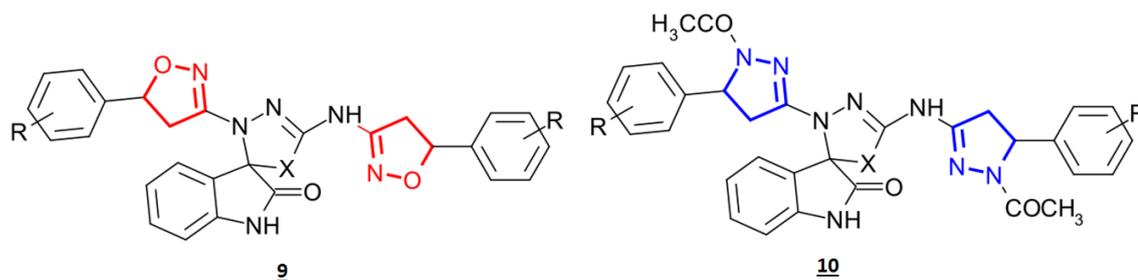
**7**

Através de um estudo de relação estrutura atividade, Kai e colaboradores obtiveram uma série de derivados isoxazolínicos e verificaram suas potências contra o vírus A da gripe humana³⁸. Identificou-se uma forte atividade antiviral, quando na posição 5 do anel isoxazolínico, em alguns derivados, esta presente o grupo tert-butil como substituínte. Nesta mesma posição, os grupos metil, di-etil e fenil apresentaram baixa atividade, sendo que o grupo fenil mostrou-se citotóxico. Derivados apresentando os grupamentos metila, etila e isopropila na posição alcoxi-imina também exibiram boa atividade antiviral.

Dentre os isômeros geométricos, obtidos através de vias distintas, os isômeros *E* foram mais ativos que os isômeros *Z*. Nesta serie, o composto **8** foi o inibidor mais ativo, com um valor de EC₅₀ de 3 mg/ mL *in vitro*, apresentando atividade superior à da amantadina e, portanto, altamente eficaz contra o vírus A da gripe humana.

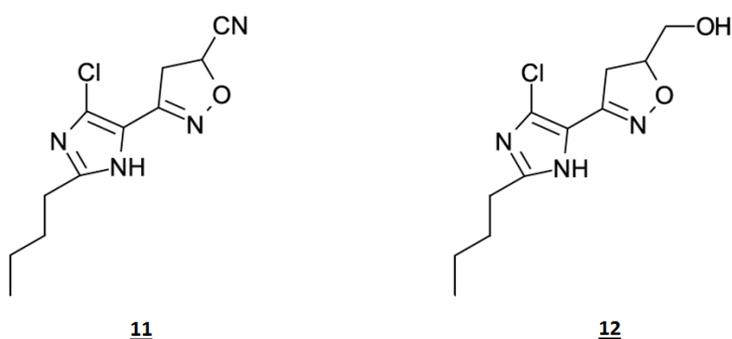
**8**

Kumar relatou a atividade antipsicótica e anticonvulsivante de um série de derivados isoxazolínicos **9** e pirazolinicos **10** testados *in vivo* nas doses de 30 mg/ kg³⁹. Apesar dos derivados pirazolinicos mostrarem melhor atividade anticonvulsivante do que os derivados isoxazolínicos, estes apresentaram valores de indução desta atividade entre 40 e 80%.



Rangappa observou uma significativa ação inibitória da enzima fosfolipase A2 (PLA2) em uma série de novas imidazolil isoxazolinicas⁴⁰. A verificação da atividade *in vivo* destes compostos mostrou que as isoxazolinicas **11** e **12** apresentaram-se como bons agentes anti-inflamatórios, exibindo atividade comparável à do ácido ursólico utilizado como padrão.

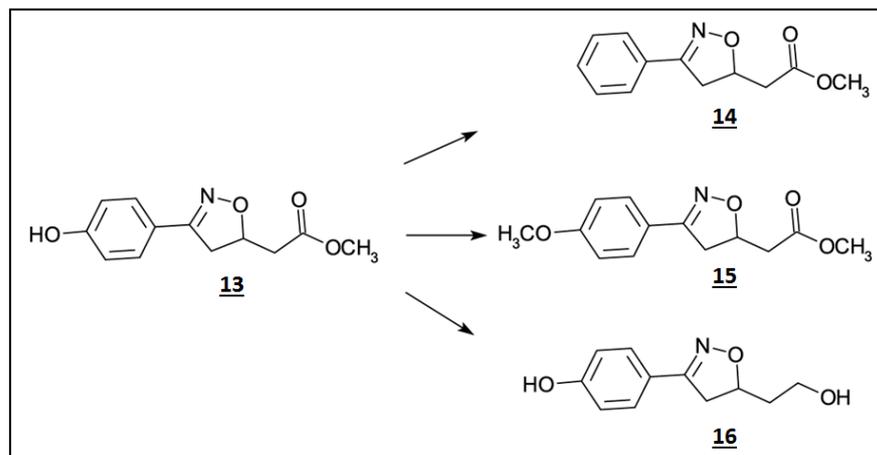
Em outro estudo, Rangappa relatou ainda o composto **12**, dentre uma série de novas imidazolil isoxazolinicas, que expressaram potente atividade antifúngica⁴¹. Este derivado exibiu valores da Concentração Mínima Inibitória (CMI) bastante significativos: 11 e 15 nM, respectivamente, frente a *Aspergillus flavus* e *Fusarium moniliform*, quando comparado com a nistatina, fármaco padrão do estudo, que apresentou para os mesmos micro-organismos valores de 27 e 32 nM (CMI), respectivamente. Deste modo, verifica-se que o composto **12** apresentou valor de CMI menor em mais do que a metade daqueles desenvolvidos pela nistatina, comprovando-se então a sua excelente potência.



A citocina pró-inflamatória, fator inibitório da migração de macrófagos (MIF), desempenha papel fundamental na respostas imune e inata. Além de ter sido implicado no crescimento e na angiogênese de tumores.

Em um estudo realizado por Lóránd, uma série de derivados da isoxazolinica **13** mostraram boa atividade inibitória do MIF ($IC_{50} < 5 \mu M$). Eles foram obtidos variando-se as substituições no anel aromático e na porção éster da estrutura da isoxazolinica **13**. Os novos

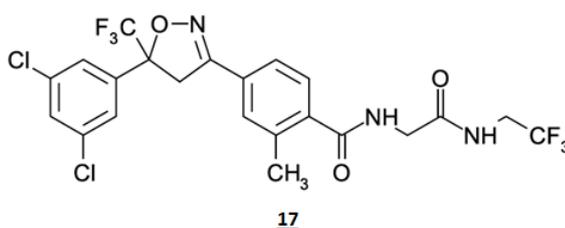
compostos **14**, **15** e **16**, também avaliados, apresentaram valores de potencial de inibição do fator de migração de macrófagos próximo ao da isoxazolina **13** (IC_{50} abaixo de $7 \mu M$)⁴².



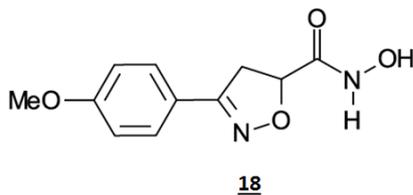
Esquema 2. Exemplificação das modificações estruturais dos derivados da isoxazolina **13**.

A atividade ectoparasítica da isoxazolina **17** (fluralaner) foi investigada por Gasel em testes *in vitro* contra quatro tipos de parasitas de insetos e três espécies de carrapatos. Os resultados foram comparados com alguns acaricidas e inseticidas utilizados no mercado⁴³. No estudo, o derivado **17** mostrou atividade superior aos compostos fipronil e imidacloprid, ambos comercializados, quanto à sua atividade de matar pulgas e também mais potente que todos os compostos de referência, quando aplicado em larvas de mosca varejeira e contra *Aedes aegypti*. De um modo geral, fluralaner mostrou potência superior em comparação com os inseticidas imidacloprid e dieldrin, e também superou a potência do fipronil e deltametrina para a maioria dos artrópodes testados.

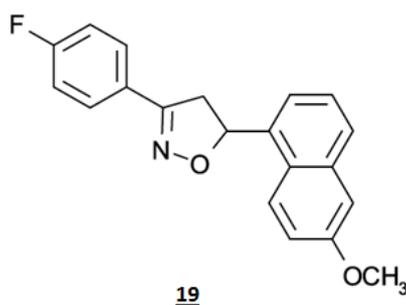
Em outro estudo, Ozoë relatou também a isoxazolina **17** como um potente antiparasitário, apresentando valor de IC_{50} de $455 pM$ ⁴⁴. Esta molécula atua como um bloqueador de canais de íons cloreto inibindo a ligação do GABA ao seu receptor, demonstrando assim atividade contra pulgas de gatos e carrapatos de cães, comparável ao fipronil utilizado comercialmente.



A 2-isoxazolina **18**, em um estudo sobre ação de alguns compostos inibidores da biossíntese de lipídeos em bactérias gram negativas, foi o derivado que apresentou resultado mais significativo com ação sobre *Escherichia coli*⁴⁵.

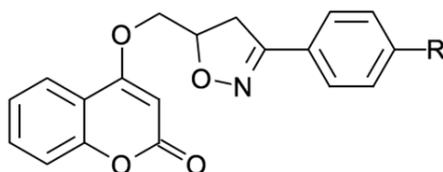


O composto **19** destacou-se entre uma série de derivados isoxazolínicos avaliados quanto à atividades antimicrobiana e antifúngica frente às bactérias *Echerichia coli*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e os fungos *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium chrysogenum* e *Fusarium moneliforme* tendo, respectivamente, a penicilina e a griseofulvina como padrões⁴⁶.



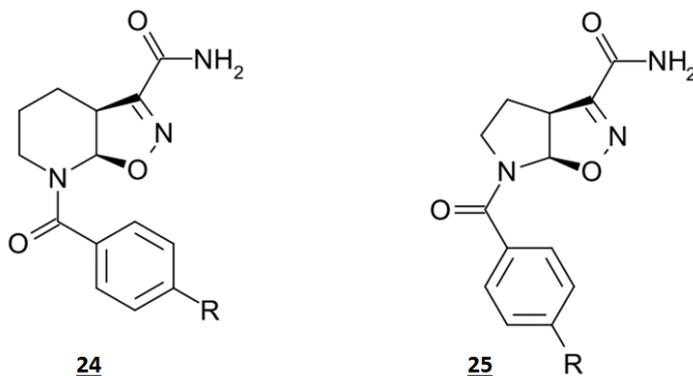
As atividades antimicrobina e anticoagulante de uma série de novas isoxazolininas foi relatada por Jannet através da síntese regioespecifica destes compostos⁴⁷. Os derivados **20**, **21** e **22** apresentaram valores de CIM = 0,03 mg/ mL, bastante expressivos contra *Pseudomonas aeruginosa* em relação a gentamicina utilizada como droga de referência (CIM = 0,5 mg / mL).

Com relação ao o efeito anticoagulante, Jannet destacou os derivados **20** e **23**. Eles foram os que exibiram os maiores efeitos através da medição do tempo de tromboplastia parcial: 111 e 104,5 segundos, respectivamente, para a concentração de 1000 µg/ mL.

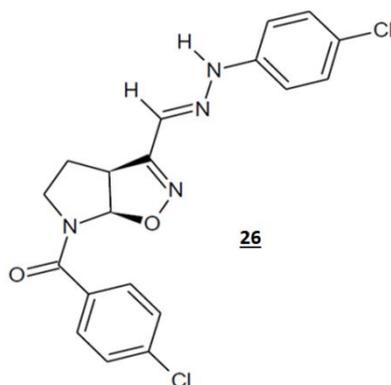


20, R = H; **21**, R = CH₃; **22**, R = NO₂ e **23**, R = pirrol

De Almeida relatou significativas atividades analgésica e anti-inflamatória de derivados isoxazolínicos desenvolvidos em nosso grupo de pesquisa. Dentre os componentes da série destacaram-se os biciclos isoxazolínico piperidínico **24** e isoxazolínico pirrolidínico **25**, obtidos através de uma reação de cicloadição 1,3-dipolar, entre enecarbamatos e *N*-óxidos de nitrila⁴⁸.

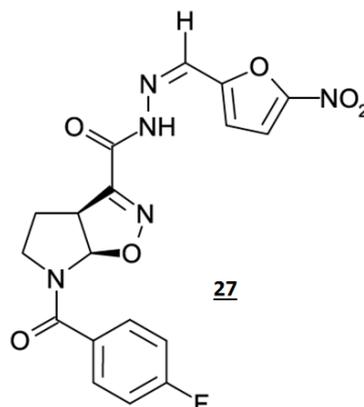


A avaliação da atividade antinociceptiva foi relatada por Reis em uma série de isoxazolinas-aryl-hidrazonas, desenvolvidas também em nosso grupo de pesquisa. Todos os derivados, administrados por via intraperitoneal, na dose de 150 mmol/kg, inibiram significativamente as contorções abdominais induzidas por ácido acético em relação ao controle (salina), tendo como padrão a dipirona. O composto **26** apresentou significativo percentual de inibição (85,8%), muito superior ao padrão utilizado (59,3%)⁴⁹.



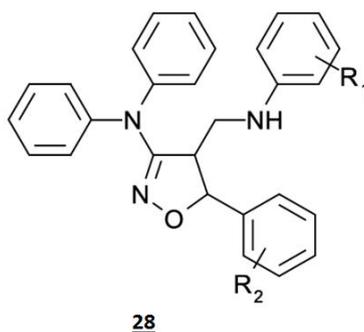
Almeida, ainda em nosso grupo científico, verificou a atividade antimicrobiana e antichagásica de alguns derivados isoxazolínicos. Todos os compostos mostraram-se ativos em baixas concentrações, com destaque para a nitrofurfuril-hidrazona isoxazolínica *p*-F substituída **27**, com valores de citotoxicidade de 25 µg/mL e IC₅₀ igual a 1,17 µg/mL, demonstrando ser mais ativo que o benznidazol (citotoxicidade de 25 µg/mL e IC₅₀ igual a

1,73 $\mu\text{g/mL}$), em testes *in vitro*, além de possuir um alto potencial bactericida (halo de inibição em média 20 mm)⁵⁰.



A cicloxigenase (COX), enzima envolvida na bioconversão do ácido aracdônico em prostaglandinas e tromboxanos, apresenta duas isoformas a COX-1 e a COX-2⁵¹. Muitos anti-inflamatórios por não serem seletivos a uma destas isoformas ocasionavam vários efeitos adversos que só foram minimizados com a descoberta de agentes seletivos para a COX-2, como o celecoxib⁵² e o rofecoxib⁵³.

Sendo assim, uma serie de vinte isoxazolininas estruturalmente semelhantes ao composto **28** foram sintetizadas a partir de um estudo de Relação Quantitativa de Estrutura Atividade (QSAR) e verificadas as suas potenciais atividades anti-inflamatórias⁵⁴. A maioria dos derivados apresentou atividade superior ao fármaco ibuprofeno *in vivo*.

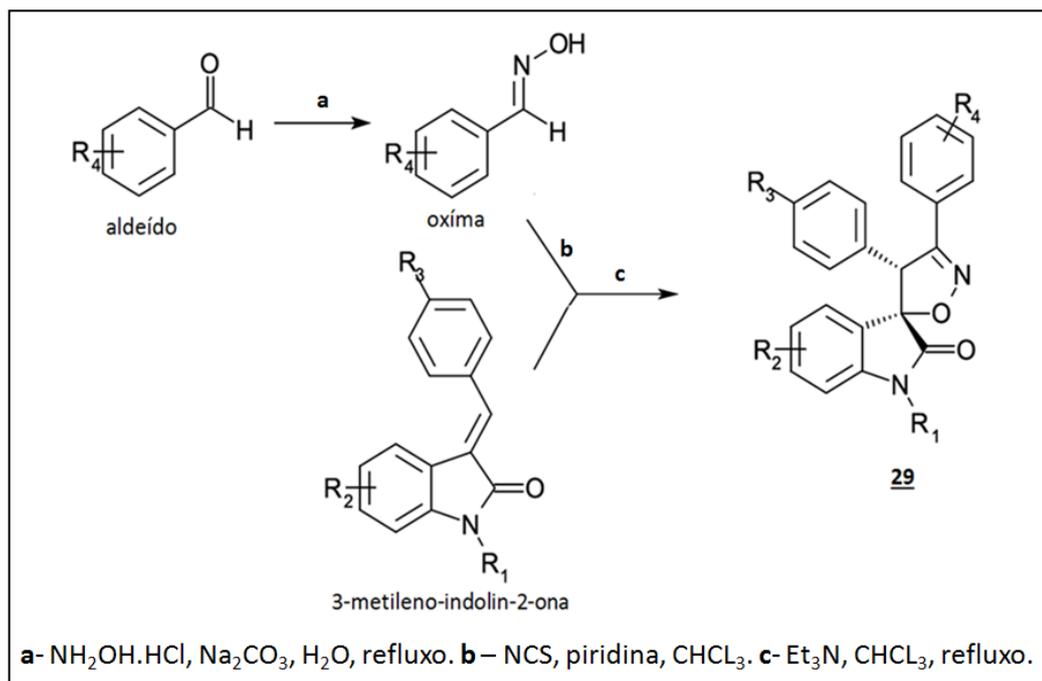


2.1.2 – Métodos de obtenção de 2-isoxazolininas

Existem várias metodologias utilizadas para a formação de compostos cíclicos. Chama atenção as adições aldólicas⁵⁵, que ocorrem de forma intramolecular. De outra forma, partindo-se de duas espécies diferentes tem-se uma grande utilização, principalmente, da

reação de Diels-Alder e da cicloadição 1,3-dipolar para formação, respectivamente, de anéis de 6 e de 5 membros.

Sendo assim, por meio da reação de cicloadição 1,3-dipolar é possível sintetizar o anel de 5 membros 2-isoxazolina. Atualmente este método vem sendo um dos mais utilizado para este fim⁵⁶. Seguindo este procedimento, Santos e colaboradores obtiveram dezoito derivados espiroisoxazolínicos oxíndoles **29** com diferentes substituintes nos anéis aromáticos (**Esquema 3**)⁵⁷.



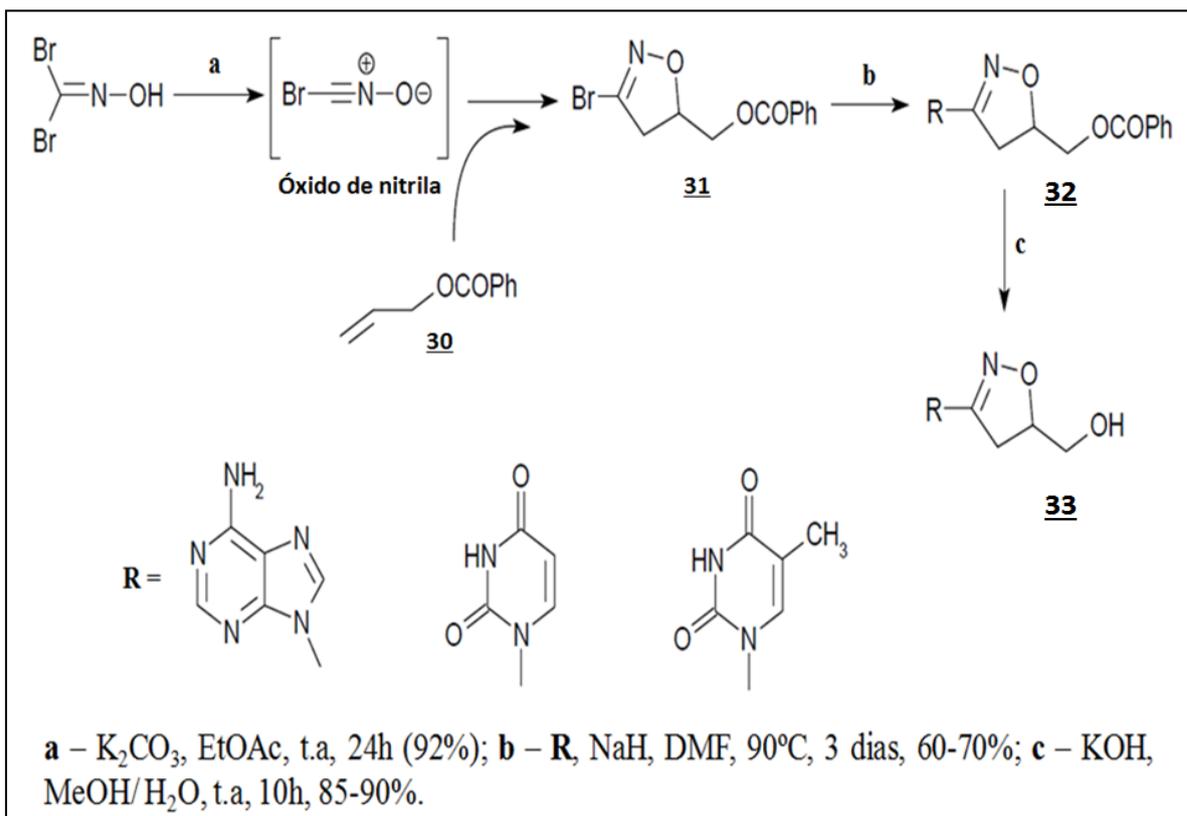
Esquema 3. Síntese de espiroisoxazolinóis oxíndoles através da cicloadição 1,3-dipolar.

Os derivados estruturalmente semelhantes ao composto **29** foram sintetizados com rendimentos entre 43 a 76% através da cicloadição entre o 3-metileno-indolin-2-ona e os óxidos de nitrila, sendo estas espécies 1,3-dipolar obtidas *in situ* na presença de trietilamina (etapa c). As aldoximas foram preparadas a partir de seus aldeídos correspondentes (etapa a) e, depois elas foram tratadas com *N*-cloro succinimida (NCS) para formação dos cloretos de hidroximiinoílas (etapa b).

No estudo biológico foram avaliadas as atividades anti câncer destes agentes como inibidores da interação entre uma proteína antiproliferativa (p53) e o seu agente inibidor, murine double minute-2 (MDM2)⁵⁸, onde alguns dos compostos apresentaram atividades bastante significativas.

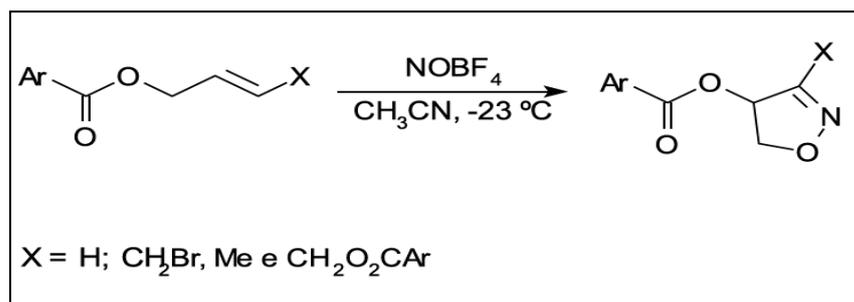
A cicloadição 1,3-dipolar também foi empregada por Argyropoulou com um meio de se obter análogos isoxazolinólicos de nucleosídeos (**Esquema 4**)⁵⁹. A reação ocorre entre um

óxido de nitrila, obtido *in situ* a partir de uma aldoxima, com o alqueno **30**, etapa **a**, formando a 2-isoxazolina **31** com rendimento de 92%. Na etapa **b**, utiliza-se o NaH em dimetilformammina (DMF), promovendo-se uma substituição nucleofílica que inseriu o nucleosídeo correspondente em lugar do grupo de saída para obtenção do composto **32a**. No estudo ainda realizou-se a obtenção dos derivados hidroxilados **32b** através de um procedimento de hidrólise básica (etapa **c**).



Esquema 4. Síntese de análogos isoxazólicos de nucleotídeos através da cicloadição 1,3-dipolar.

Kim e Chang⁶⁰ relataram o desenvolvimento de um novo método para a síntese de 2-isoxazolininas através do tratamento de ésteres alílicos com tetrafluoroborato de nitrosônio (NOBF_4) em acetonitrila à -23 °C (**Esquema 5**).

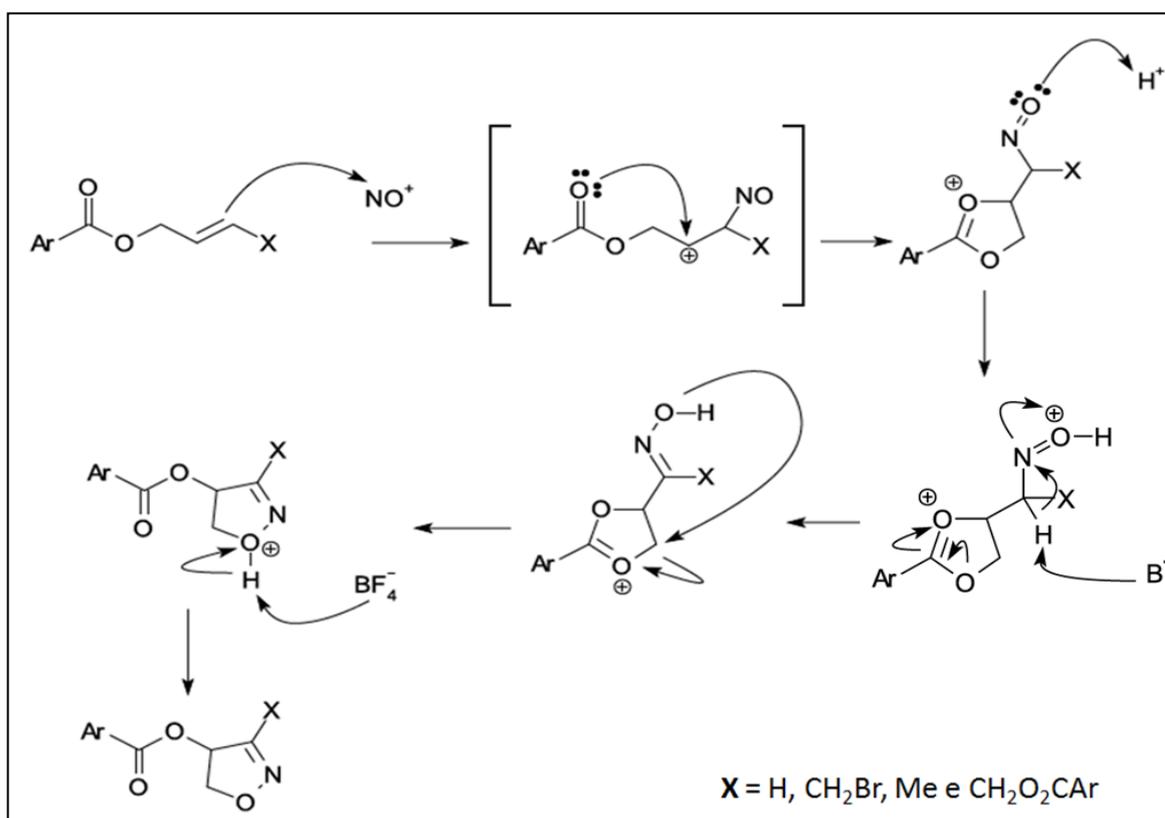


Esquema 5. Síntese de 2-isoxazolinina a partir de ésteres alílicos.

A obtenção do anel isoxazolínico é explicada por Kim e Chang através da formação de um intermediário que surge pela adição do cátion NO^+ à ligação dupla $\text{C}=\text{C}$ e, conseqüente estabilização da carga pelo grupo carbonila do éster. Posteriormente, ocorre a protonação do oxigênio do NO ao mesmo tempo em que um hidrogênio é capturado da estrutura e assim ocorrendo um deslocamento do par eletrônico em direção ao oxigênio da hidroxila.

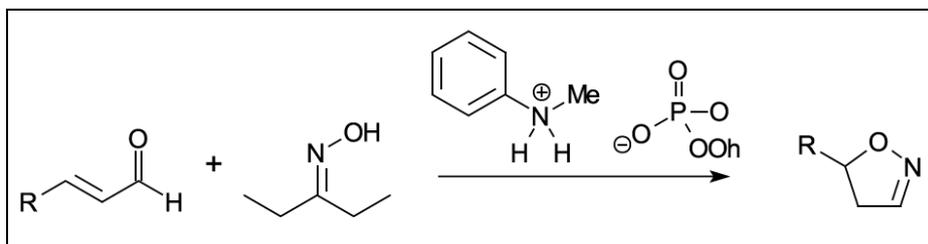
A ressonância existente entre os átomos de oxigênio do anel de cinco membros (íon oxonium) faz com que surja no carbono 5 do mesmo uma certa deficiência eletrônica que é corrigida pelo ataque nucleofílico do grupo hidroxila nesta posição e, conseqüentemente promovendo a clivagem da ligação $\text{C}-\text{O}$ do anel para obter-se a 2-isoxazolina.

Observa-se que o ataque ao carbono 5 do anel ocorre pelo grupo hidroxila ao invés do nitrogênio pelo fato do oxigênio estar localizado em uma distância que permite um ataque mais favorável ao surgimento de um novo anel com geometria mais estável do que se ocorresse por um ataque do par eletrônico do nitrogênio. Ao mesmo tempo, durante a quebra do anel e deslocamento do par eletrônico para o oxigênio a função éster é restabelecida e forma-se então o anel isoxazolínico (**Esquema 6**).



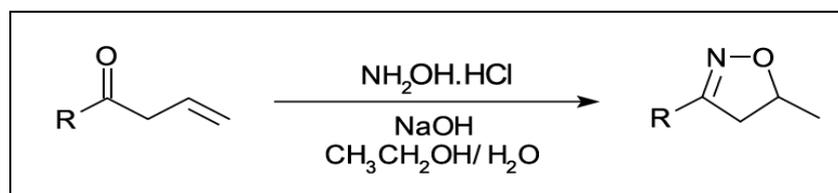
Esquema 6. Mecanismo de formação de 2-isoxazolina através da adição do cátion NO^+ .

Pihko em um estudo preparou uma série de derivados 2-isoxazolina substituídos na posição 5 do anel isoxazolínico através do desenvolvimento de um novo método catalítico⁶¹. Oximas foram tratadas com aldeídos α , β -insaturados na presença de um sal de anilina utilizado como catalizador apresentando rendimentos de 55 a 86% (**Esquema 7**).



Esquema 7. Síntese de 2-isoxazolina através de método catalítico com sal de anilina.

Uma reação de oximação e ciclização foi descrita por Moscher⁶² para obtenção de 2-isoxazolininas. Cetonas β , γ -insaturadas foram tratadas na presença de cloridrato de hidroxilamina e hidróxido de sódio, apresentando rendimentos entre 30 e 63% (**Esquema 8**).

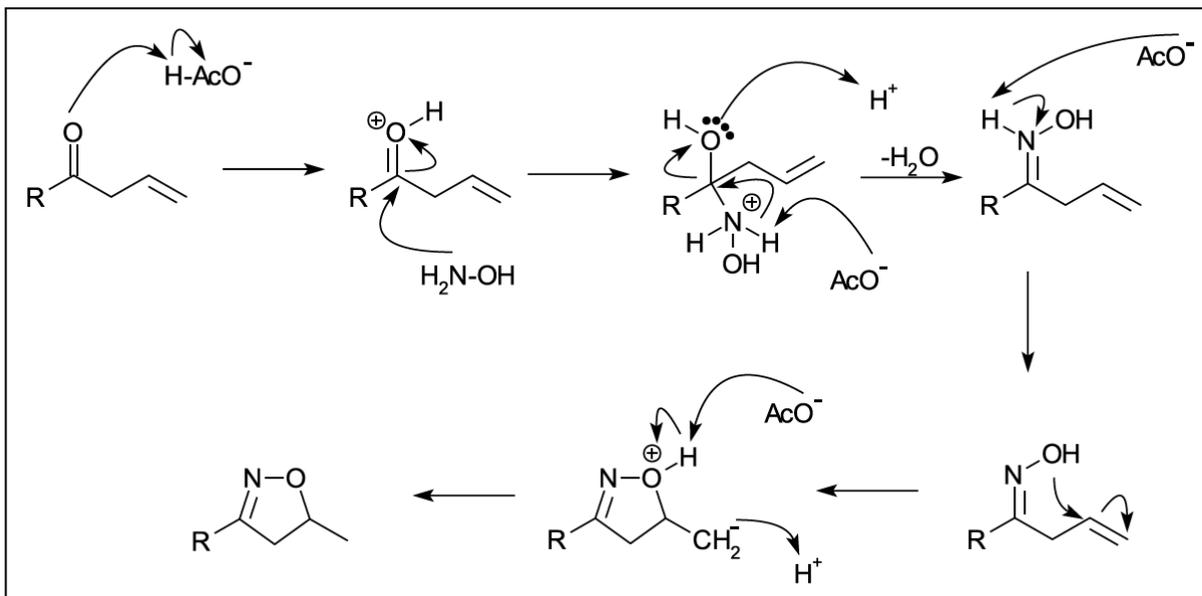


Esquema 8. Síntese de 2-isoxazolininas através da reação de oximação/ ciclização.

Esta reação inicia-se com a protonação da carbonila da cetona β , γ -insaturada (**Esquema 9**). Isto promove a ativação da carbonila e, conseqüentemente um ataque nucleofílico à mesma pelo nitrogênio da hidroxilamina, havendo deslocamento eletrônico em direção ao oxigênio da ligação C=O.

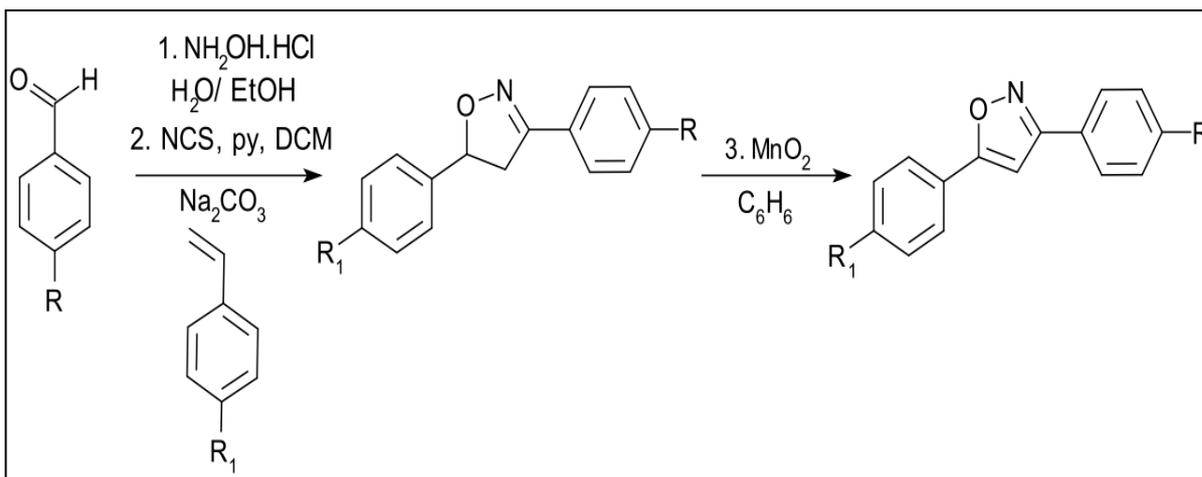
Em seguida ocorre a protonação da hidroxila ao mesmo tempo em que a base existente no meio promove a captura do próton do nitrogênio, promovendo um deslocamento do par eletrônico e então eliminando água.

Posteriormente acontece uma segunda captura de um próton do nitrogênio carregado positivamente. Depois acontece um ataque da hidroxila a ligação C=C e com a captura e doação de próton da estrutura resultante, forma-se o núcleo 2-isoxazolina.



Esquema 9. Mecanismo de formação de 2-isoxazolina a partir de cetonas β,γ -insaturada com hidroxilamina.

2-isoxazolininas foram utilizadas por Merlo como intermediárias da síntese de isoxazóis 3,5-dissubstituídos (**Esquema 10**). Para a síntese das isoxazolininas ele partiu de aldeídos aromáticos *p*-substituídos, transformando-os nas suas respectivas oximas usando hidroxilamina e das oximas obtidas ele realizou a formação dos cloretos de hidroxiiminoíla com NCS. Após isto, promoveu a reação destes com estirenos aromáticos *p*-substituídos e consequente formação das 2-isoxazolininas 3,5-dissubstituídas⁶³.

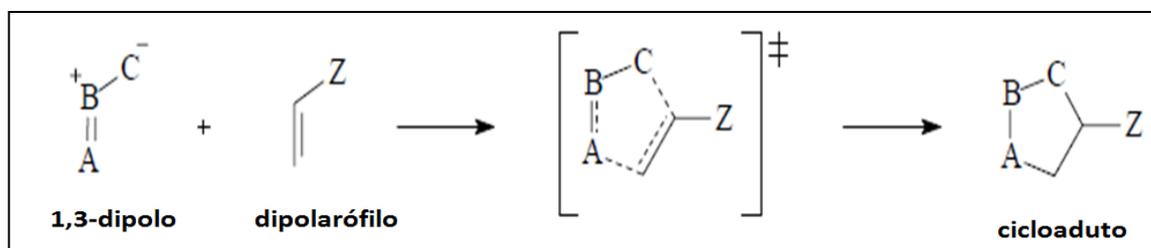


Esquema 10. 2-isoxazolininas utilizadas como intermediários na síntese de isoxazóis 3,5-dissubstituídos.

2.1.3 – Cicloadição 1,3-dipolar

A cicloadição é um tipo clássico de reação química pericíclica⁶⁴ utilizada para a formação de compostos cíclicos. Estas reações incrementaram a funcionalização de muitas estruturas orgânicas através da inserção de heteroátomos e formação de cicloadutos⁶⁵.

As reações de cicloadição ocorrem pela sobreposição dos orbitais moleculares de fronteira de duas espécies envolvidas através de seus elétrons π , desfazendo-se duas ligações π e originando duas novas ligações sigma⁶⁶. Quando concertada⁶⁷ a cicloadição passa apenas por um estado de transição durante a obtenção do ciclo, sem a formação de intermediários (Esquema 11).



Esquema 11. Ilustração geral de uma reação de cicloadição, passando pelo estado de transição.

O conceito de cicloadição primeiramente foi descrito por Smith em 1938⁶⁸. Depois, por volta de 1960 Huisgen e colaboradores aprimoraram os estudos sobre esta reação, desenvolvendo também a compreensão do mecanismo concertado das reações de cicloadição⁶⁹.

Chama atenção as reações de cicloadição do tipo 1,3 dipolar, muito útil na síntese de anéis heterociclos de cinco membros, como o anel isoxazolina, por exemplo⁷⁰. Estas reações ocorrem geralmente entre um alqueno ou alquino (dipolarófilo) e uma estrutura zwitteriônica denominada 1,3-dipolo.

A espécie 1,3-dipolar pode ser classificada, segundo Huisgen⁷¹, em duas categorias: uma isoeletrônica com o ânion alila e outra isoeletrônica com o ânion propargila/ alenila de acordo com a hibridização do átomo central que pode ser sp ou sp^2 ⁷² (**Figura 4**). Alguns destes compostos devido à sua instabilidade necessitam ser gerados *in situ* durante a reação.

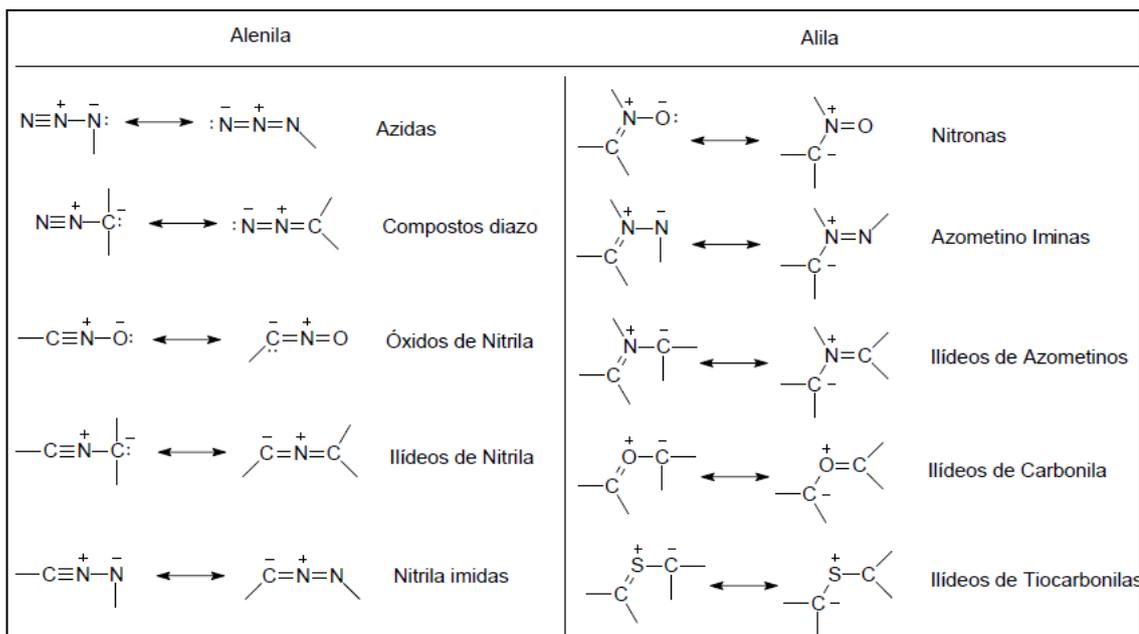


Figura 4. Principais estruturas isoeletrônicas dos ânions alenila e alila.

Na estrutura do 1,3-dipolo estão presentes quatro elétrons π distribuídos, através de seus orbitais p , por três átomos e apresentando estruturas de ressonância que indicam a localização da carga do dipolo (**Figura 5**)⁷³. Desta forma, a cicloadição 1,3-dipolar é conhecida também como uma reação do tipo [3 + 2] por envolver 3 átomos da espécie 1,3-dipolar e 2 átomos do dipolarófilo, participando então um total de 6 elétrons durante a formação do cicloaduto.

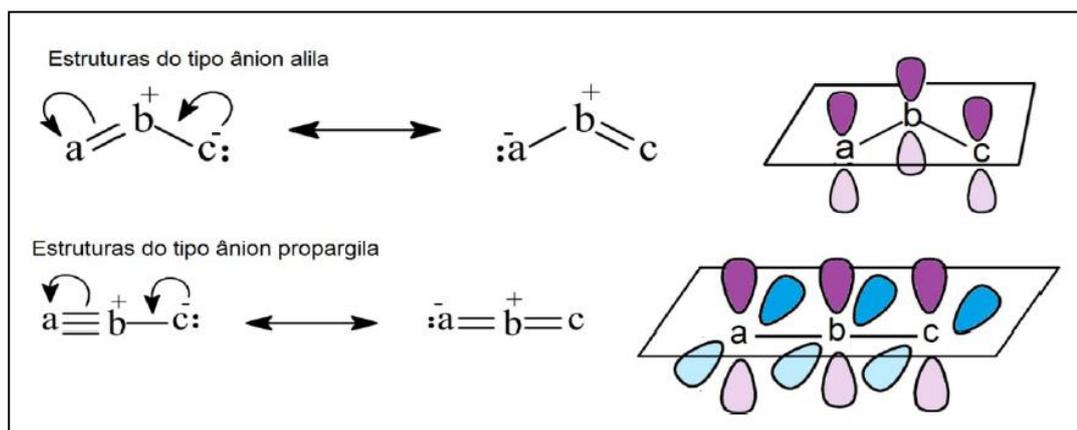


Figura 5. Estruturas de ressonância e os orbitais p da espécie 1,3-dipolar do tipo alila e propargila.

A teoria mais bem aceita, atualmente, para explicar a formação de cicloadutos através das reações de cicloadição 1,3-dipolar é a que envolve os Orbitais Moleculares de Fronteira (FMO) com racionalizações da mecânica quântica⁷⁴.

Nesta teoria são levadas em consideração as energias potenciais dos orbitais atômicos envolvidos⁷⁵. A menor diferença de energia potencial existente entre o Orbital Molecular Ocupado de Maior Energia (HOMO) e o Orbital Molecular Vazio de Menor Energia (LUMO) das espécies 1,3-dipolar e do dipolarófilo envolvidas é responsável pela formação de um núcleo estável denominado cicloaduto.

De um modo geral as cicloadições envolvendo espécies dipolares como os óxidos de nitrila apresentam uma grande regioseletividade, o que é influenciado pelos substituintes presentes tanto nas espécies 1,3-dipolar quanto no dipolarófilo. Estes substituintes, doadores ou retiradores de elétrons, participam diretamente nas energias dos orbitais de fronteira o que auxilia no entendimento da reatividade e seletividade destas reações.

As reações de cicloadição, segundo Sustmann⁷⁶, podem ser classificadas de acordo com a diferença de energia existente entre os orbitais das espécies envolvidas em HO-controladas, quando ocorre entre o HOMO do 1,3-dipolo com o LUMO do dipolarófilo; HO-, LU-controladas, quando envolve o HOMO ou LUMO de ambas as espécies, 1,3-dipolar e do dipolarófilo e a do tipo LU-controladas, ocorrendo entre o LUMO do 1,3-dipolo com o HOMO do dipolarófilo (**Figura 6**).

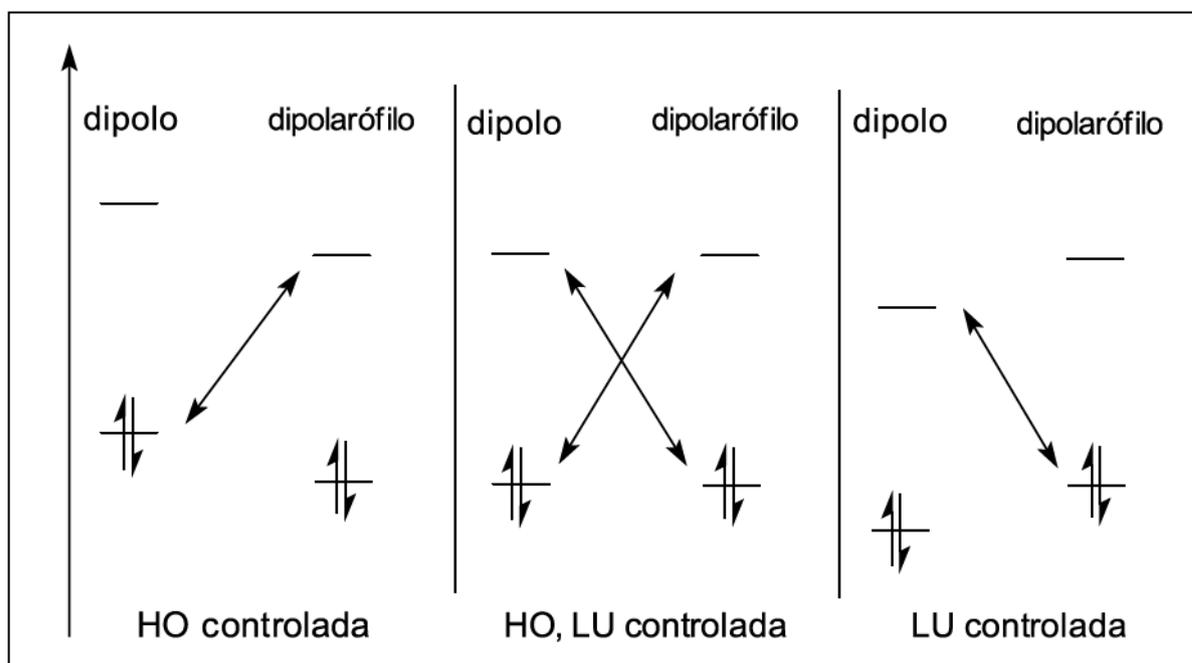


Figura 6. Classificação de Sustmann das reações de cicloadição através dos orbitais de fronteira.

2.1.4 Antimicrobianos e sua penetração tecidual

Para que os antimicrobianos exerçam o seu efeito terapêutico é preciso que eles alcancem os locais de infecções em concentrações suficientes para destruir ou inativar os micro-organismos através de sua ação bactericida ou bacteriostática, respectivamente. Sendo necessário, portanto, estarem em sua forma livre para atravessarem as membranas celulares e interagir com os agentes patógenos⁷⁷.

Muitos fármacos utilizam um processo de difusão passiva envolvendo um gradiente de concentração para atravessarem membranas e exercerem os seus efeitos nos tecidos. Entretanto, alguns deles por interagirem mais fortemente com determinadas proteínas plasmáticas tem o processo dificultado, o que acaba diminuindo a quantidade de fármaco livre e conseqüentemente menor será o seu efeito terapêutico⁷⁸.

Além disso, alguns outros fatores relacionados ao tecido infectado podem influenciar na distribuição tecidual e na eficiência dos agentes antimicrobianos. Por exemplo, a presença de enzimas bacterianas, circulação sanguínea modificada, pH local e baixas concentrações de oxigênio, assim como também fatores relativos ao fármacos e às suas características físico-químicas: o coeficiente de difusão, a lipossolubilidade, o transporte ativo do fármaco e a via de administração contribuem para uma modificação na distribuição do mesmo^{79, 80}.

2.1.5 Principais fatores que afetam a penetração tecidual dos antimicrobianos

Fatores relacionados ao fármaco e a via de administração

Todos os processos relacionados às etapas da farmacocinética (absorção, distribuição, metabolismo e excreção) de um medicamento envolvem membranas celulares. Portanto, é fundamental conhecer todas as características físico-químicas do fármaco para que se possa escolher a melhor via de administração e a forma farmacêutica, nos estudos de formulação, do antibiótico a ser utilizado. Pois, a depender da via a ser administrado, o fármaco poderá sofrer uma pré-metabolização antes de atingir o alvo desejado. Logo, através do estudo físico-químico do mesmo é possível conhecer a influência que cada uma destas fases farmacocinéticas exercerá sobre o ele e conseqüentemente em sua velocidade de absorção e na biodisponibilidade do fármaco⁸¹.

Características físico-químicas dos fármacos

A alta solubilidade lipídica ou em água são fatores importantes na penetração de antibióticos nos tecidos e na passagem deles para dentro das células⁸².

A relação hidrossolubilidade/ lipossolubilidade depende do grau de dissociação do fármaco (pKa) e do seu coeficiente de partição. A maioria dos antibióticos é constituída por ácidos ou bases orgânicas de baixa massa molecular e a depender do valor do pKa do antibiótico e do pH sanguíneo, ele terá uma maior ou menor penetração tecidual⁸³.

Portanto, a avaliação das características de solubilidade dos antibióticos é de grande importância na escolha da terapia adequada para o tratamento de determinadas infecções.

Ligação a proteínas

A ligação às proteínas plasmáticas constitui um dos fatores mais importantes na determinação da penetração tecidual de antimicrobianos. A ligação entre o fármaco e a proteína deve ser reversível, servindo assim como um transportador e, formando um equilíbrio entre a fração livre e a fração ligada. A fração livre é capaz de atravessar os capilares sanguíneos e interagir com os micro-organismos, sendo responsável pela ação farmacológica, enquanto que a fração ligada não consegue atravessar as membranas e funciona como um depósito dinâmico dos fármacos na corrente circulatória⁸⁴.

Fatores relacionados ao local de infecção

A vascularização sanguínea no local da infecção é um aspecto relevante para penetração dos fármacos. Logo, o comprometimento tecidual decorrente de lesão, a modificação do pH e alterações da permeabilidade vascular devido ao um processo inflamatório, assim como a presença de micro-organismos no local, são alguns dos fatores que influenciam no aporte sanguíneo dos tecidos e conseqüentemente na ação dos agentes antimicrobianos em função de toda mudança no local de ação^{85, 86}.

CAPÍTULO 3

Objetivos

3.0 OBJETIVOS

3.1 - Objetivo geral

Ampliar a aplicação sintética para obtenção de novos compostos bioativos derivados da estrutura do heterociclo 2-isoxazolina[5,4-*d*]pirrolidina (**Figura 7**), com variações estruturais nas posições 3 e 6 do mesmo, bem como verificar suas potenciais atividades antimicrobianas.

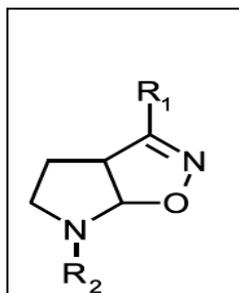


Figura 7. Estrutura básica do heterobicyclo 2-isoxazolina[5,4-*d*]pirrolidina.

3.2 – Objetivos específicos

Sintetizar as isoxazolininas bicíclicas-pirrolidínicas aril-substituídas na forma de bases livres e seus respectivos sais na forma de cloridratos;

Promover a purificação e determinação de propriedades físico-químicas dos compostos sintetizados;

Elucidar as estruturas das novas substâncias através de técnicas espectrométricas RMN de ^1H e ^{13}C (1D), Infra-vermelho (IV-FT) e Massas de Alta Resolução (HRMS);

Determinar as atividades antimicrobianas de todos os compostos sintetizados, comparando as isoxazolininas na forma de bases livres com seus sais de cloridratos.

CAPÍTULO 4

Metodologia

4.0 METODOLOGIA

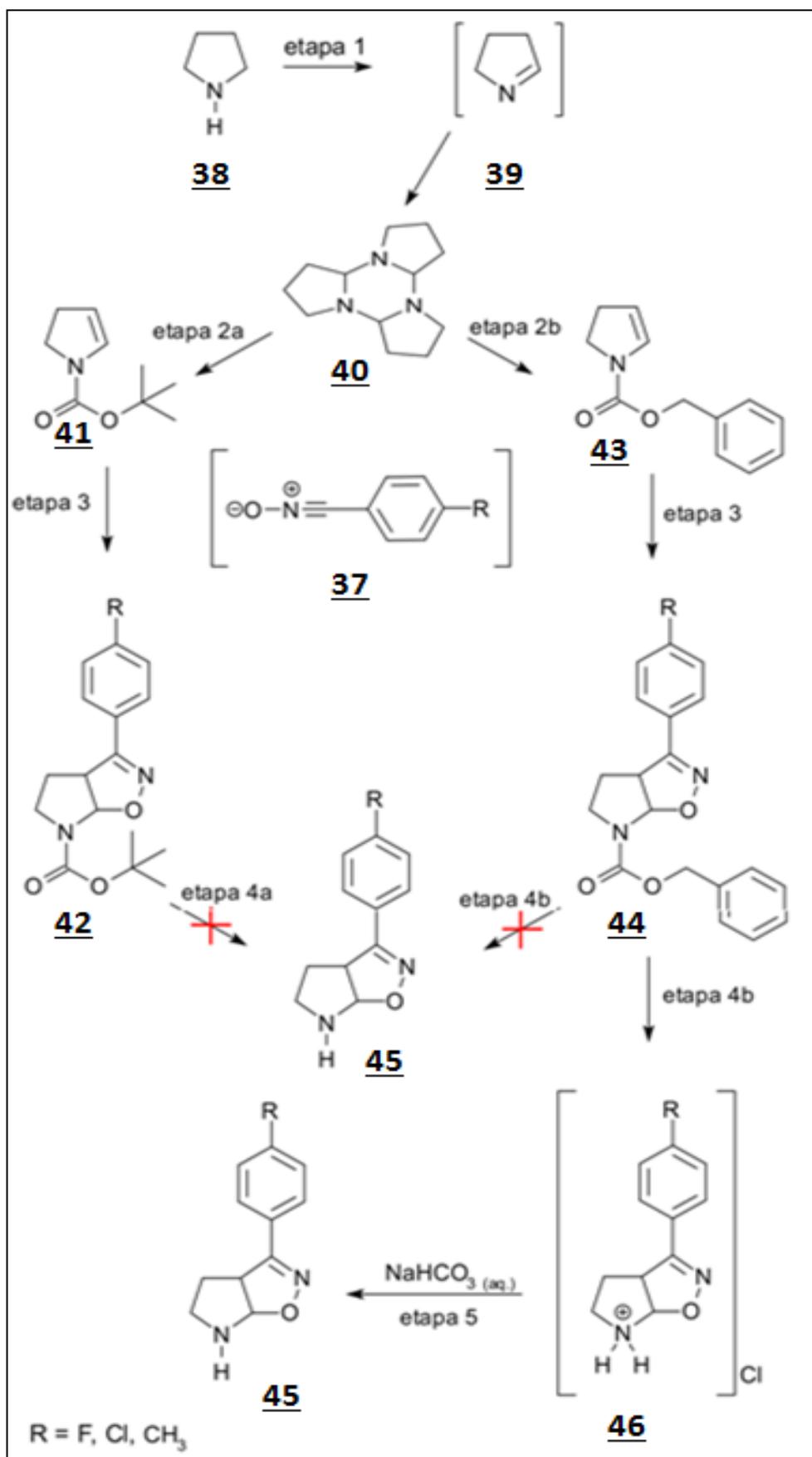
4.1 Parte química:

Neste estudo planejou-se a obtenção de isoxazolinas bicíclicas aril substituídas na forma dos cloridratos **46** (**Esquema 12**). Buscando-se, deste modo, facilitar a solubilidade destas moléculas em água e assim verificar as suas potenciais atividades antimicrobianas, tendo em vista a baixa solubilidade de muitos fármacos empregados em meio aquoso para esta finalidade.

Utilizou-se uma rota sintética onde enecarbamatos endocíclicos de cinco membros **41** e **43**, foram utilizados como intermediários importantes. Os enecarbamatos foram obtidos a partir da acilação do trimero da 1-pirrolina **40** com o dicarbonato de di-*t*-ect-butila (Boc) ou com o cloroformato de benzíla (Cbz), ambos utilizados como grupamentos protetores (**etapas 2a** e **2b**, respectivamente). Subsequentemente realizou-se a cicloadição 1,3-dipolar entre os enecarbamatos e os cloretos de hidroxiiiminoíla aril substituídos, que *in situ* convergem-se nos *N*-óxidos de nitrila **37** (**etapa 3**). Estes reagem com o enecarbamato formando os cicloadutos.

Os substituintes da porção aril dos cloretos de hidroxiiiminoílas apresentam diferentes comportamentos eletrônicos no anel aromático, sendo alguns doadores de elétrons e outros retiradores de elétrons, o que influencia diretamente em suas propriedades químicas e possivelmente biológicas.

As isoxazolinas na forma de bases livre **45** poderiam, em princípio, ser obtidas através da hidrólise do cicloaduto **42** e da hidrogenólise do cicloaduto **44**, para posteriormente serem convertidas nos seus respectivos cloridratos **46**. Outra possibilidade seria a obtenção dos cloridratos **43**, através de uma reação de hidrogenólise em meio ácido, sendo que posterior neutralização poderia levar às isoxazolinas **45**, na forma de bases livres.



Esquema 12. Rota sintética de obtenção dos cloridratos de isoxazolína aril substituídos **46** e de suas bases livres em N6 **45**.

4.2 Parte biológica:

A análise da atividade antimicrobiana das isoxazolinas aril substituídas na forma de base livre em N6 e de seus respectivos sais de cloridratos foi realizada seguindo-se o método de difusão em disco, também conhecido como ensaio de difusão, desenvolvido por Bauer⁸⁷. Este método avalia a sensibilidade ou a resistência do micro-organismo frente ao antibiótico testado.

Neste estudo foram utilizadas cepas provenientes da coleção de micro-organismos do Departamento de Antibióticos da UFPE, sendo escolhidas entre espécies gram positivos e gram negativos, as seguintes:

Staphylococcus aureus (Gram-positivo) – DAUFPE 01

Micrococcus luteus (Gram-positivo) – DAUFPE 06

Bacillus subtilis (Gram-positivo) – DAUFPE 16

Pseudomonas aeruginosa (Gram-negativo) – DAUFPE 39

Micobacterium smegmatis (álcool ácido resistente) – DAUFPE 71

Enterococcus faecalis (Gram-positivo) – DAUFPE 138

Escherichia coli (Gram-negativo) – DAUFPE 224

Serratia marcescens (Gram-negativo) – DAUFPE 398

Os compostos **45a-c** e **46a-c**, foram avaliados quanto a atividade antimicrobiana, através da verificação da inibição do crescimento dos micro-organismos em placas de difusão com 9 cm de diâmetro. Todas as amostras foram realizadas em duplicata e tendo como padrão a ampicilina.

Foram utilizados 8 mg de cada composto e dissolvidos em 0,27 mL de dimetilsulfóxido (DMSO). Desta amostra retiraram-se uma pequena quantidade de 10 µL para embeber os discos de difusão que ficaram com uma concentração de 300 µg de cada substância após secar. Estes, em seguida, foram inseridos cuidadosamente nas placas contendo os meios de culturas com o micro-organismo a ser analisado e, previamente acomodado.

Posteriormente, foram acondicionados em estufa por tempo e temperatura suficientes para o desenvolvimento dos micro-organismos. Decorridos o tempo necessário, registrou-se então os valores observados na leitura dos diâmetros dos halos de inibição observados, em milímetros (mm).

CAPÍTULO 5

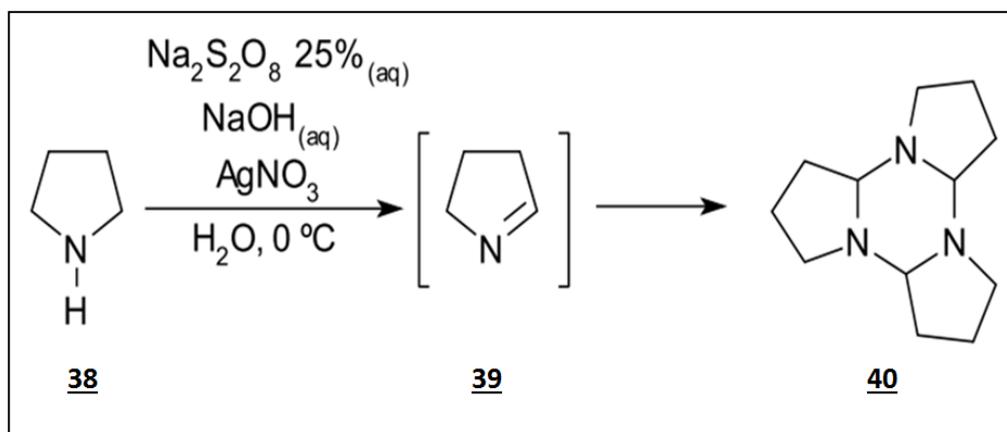
Resultados e discussão

5.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Parte química

5.1.1 – Síntese do trímero da 1-pirrolina **40**

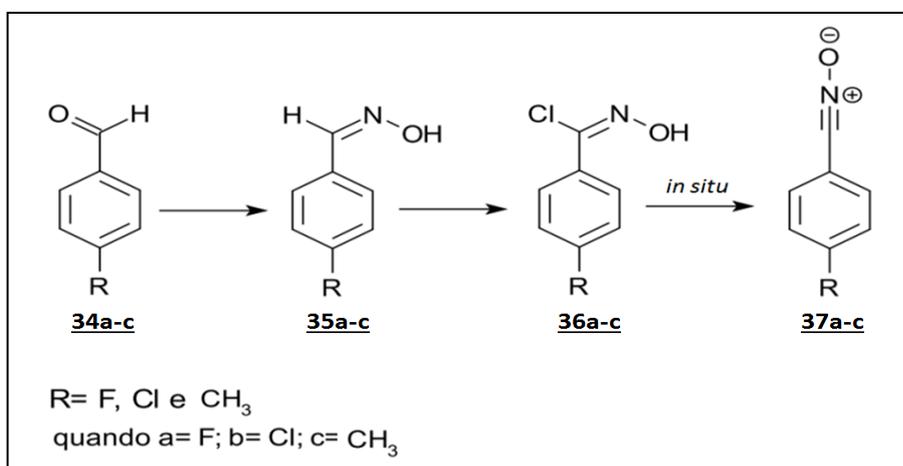
O trímero da 1-pirrolina **40** foi obtido através da oxidação catalítica da pirrolidina **38**, pelo persulfato de sódio, em meio basicado com NaOH e catalisado pelo AgNO₃. Neste processo forma-se um monômero **39**, que devido à sua grande reatividade trimeriza e forma o seu respectivo trímero **40**⁸⁸ (Esquema 13).



Esquema 13. Síntese do trímero da 1-pirrolina.

5.1.2 – Obtenção dos *N*-óxidos de nitrila **37**

Os *N*-óxidos de nitrila foram obtidos através de três etapas que foram otimizadas, neste estudo, em relação ao método usualmente utilizado em nosso laboratório^{89,90}. O procedimento parte de benzaldeídos *p*-substituídos **34a-c**, disponíveis comercialmente. Estes são convertidos em suas respectivas benzaldoximas **35a-c** com posterior formação dos cloretos de hidroximiinoilas **36a-c** que *in situ* convergem-se nos *N*-óxidos de nitrila **37a-c** (Esquema 14).

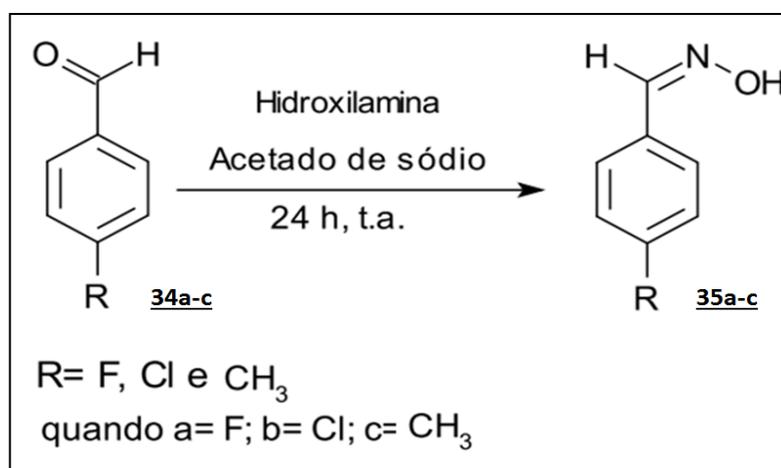


Esquema 14. Obtenção dos *N*-óxidos de nitrila a partir dos benzaldeídos em sucessivas etapas.

5.1.2.1 – Síntese das benzaldoximas *p*-substituídas **35**

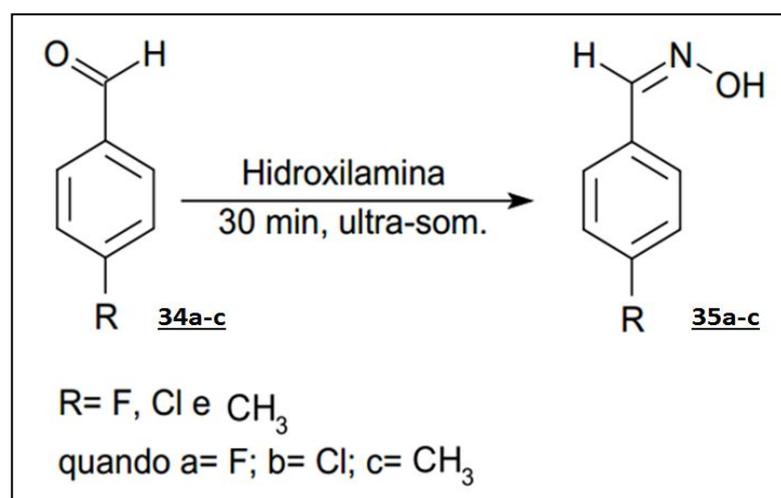
As benzaldoximas *p*-substituídas **35a-c** foram obtidas através de duas metodologias que foram aplicadas neste trabalho. Em ambos os métodos foi utilizado o cloridrato de hidroxilamina e os benzaldeídos *p*-substituídos **34a-c** como reagentes.

O primeiro método, tradicionalmente utilizado e, exemplificado no esquema **15** foi aplicado em trabalhos recentes do nosso grupo de pesquisa. Consiste na formação das benzaldoximas à temperatura ambiente em uma mistura de solventes (THF/MEOH/HO – 2:1:1) por um período de 24 horas sob forte agitação na presença do acetato de sódio anidro, utilizado como base⁹¹



Esquema 15. Obtenção das benzaldoximas através do método tradicional.

Outra metodologia para obtenção das benzaldoximas também foi empregada neste trabalho (**Esquema 16**).



Esquema 16. Obtenção das benzaldoximas via ultrassom.

Neste segundo método foi utilizado um aparelho de ultrassom, promovendo a formação dos produtos desejados **35a-c** após 30 minutos de sonicação dos aldeídos dissolvidos junto com hidroxilamina em etanol⁹². Este método apresentou rendimentos excelentes que são exemplificados de maneira comparativa com os rendimentos obtidos pelo método tradicional na tabela 1.

Substituinte	Rendimento método tradicional	Rendimento método ultrassom	Tempo de reação	
			Met. tradicional	Ultrassom
F	97%	91%	24 horas	30 min
Cl	93%	88.2%	24 horas	30 min
CH₃	95%	90%	24 horas	30 min

Tabela 1. Comparação dos rendimentos da síntese das benzaldoximas obtidas pelo método tradicional e através do ultrassom.

A sonoquímica, ou seja, o uso da radiação ultrassônica em reações químicas vem sendo cada vez mais utilizada e, portanto, relatada na preparação de uma variedade de materiais em função do uso mecânico das ondas do ultrassom quando se propagam no meio. Isto acontece devido ao fenômeno da cavitação em que ocorre à formação, crescimento e colapso de microbolhas em um determinado meio, ocasionando sucessivos ciclos de compressão que podem entrar em colapso violentamente liberando grandes quantidades de energia em torno dessas microbolhas⁹³.

A energia gerada durante a implosão destas microbolhas é estimada pela teoria do “hot-spot” que atinjam temperaturas de até 5000K e também altas pressões atmosféricas durante os colapsos fazendo com que estas reações aconteçam de forma bastante rápidas⁹⁴.

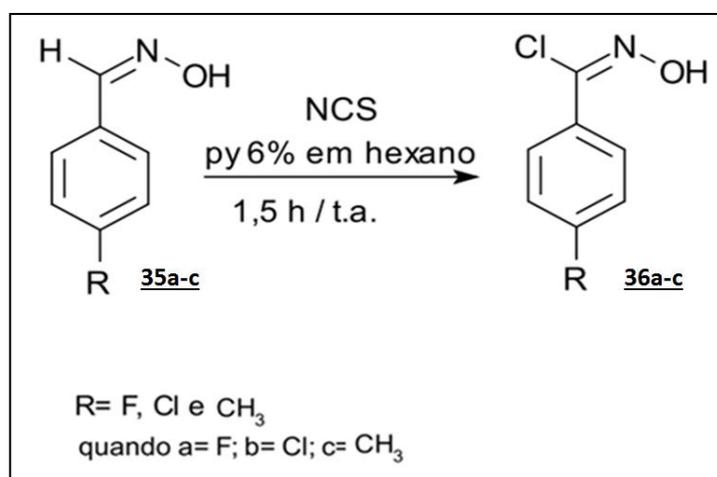
Em alguns estudos Li e colaboradores comprovaram tanto um aumento no rendimento das reações assim como uma diminuição no tempo das mesmas quando utilizou o ultrassom. Por exemplo, ele obteve um rendimento de 87% na eterificação de 2-metoxi-benzaldoxima com brometo de benzila catalisada pelo cloreto benzil-dimetil-tetra-decil-amônio em agitação durante 30 minutos. Quando realizou esta mesma reação, porém, sob a ação do ultrassom, no mesmo intervalo de tempo, obteve 94% de rendimento⁹⁵.

Em outro estudo, assim como fizemos neste trabalho, Li e colaboradores procederam à síntese de oximas por dois métodos, sendo um destes através da sonicação. Ele obteve para uma determinada oxima um rendimento de 89,7%, realizando-a em refluxo por 4 horas na

presença de Na_2SO_4 em etanol. De outro modo, as oximas puderam ser obtidas pela utilização do ultrassom durante 15 minutos entre 25 e 35 °C alcançando rendimentos de 94,6%⁹⁶.

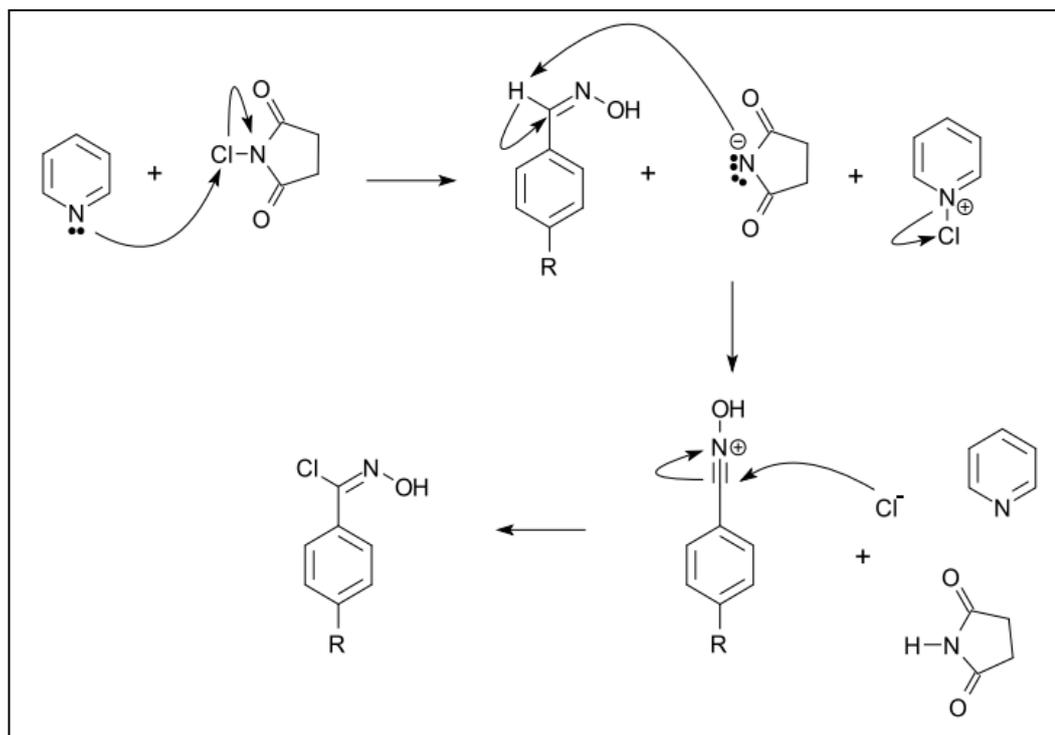
Comparando-se então o método tradicional e o do ultrassom empregado em nosso estudo, percebemos que os rendimentos pelo primeiro foram numericamente maiores do que aqueles com o uso do ultrassom e, que mesmo assim também foram excelentes. No entanto, este propiciou um tempo reacional bem menor, além de consumir uma menor quantidade de reagentes, demonstrando assim uma grande vantagem sobre o método tradicional.

5.1.2.2 – Síntese dos cloretos de hidroxiiiminoílas **36**



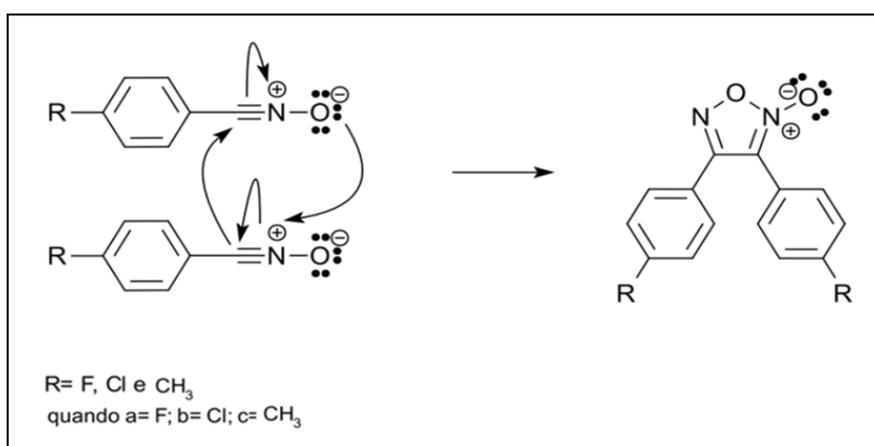
Esquema 17. Obtenção dos Cloretos de Hidroxiiiminoílas.

Os cloretos de hidroxiiiminoíla **36a-c**, usados nas reações de cicloadição como precursores dos *N*-óxidos de nitrila, foram obtidos através da cloração das benzaldoximas **35a-c** (**Esquema 17**). Empregou-se como agente de cloração o *N*-clorosuccinimida (NCS), e uma solução de piridina como catalisador na concentração de 6% em hexano⁹⁷. O mecanismo de reação das clorações das benzaldoximas foi esquematicamente proposto por Marques⁹⁸ – em outro estudo realizado em nosso grupo de pesquisa – conforme exemplificado no **Esquema 18**.



Esquema 18. Proposta de mecanismo de formação dos cloretos de hidroximiinoílas com a utilização do NCS.

A formação dos cloretos de hidroximiinoílas foram etapas que exibiram bastantes complicações devido à rápida degradação dos mesmos. Sendo, portanto, consideradas como limitantes para o andamento do projeto. Estas reações necessitaram de grandes cuidados visando à otimização do processo, o que envolve vidrarias e solventes devidamente secos, além do controle da umidade durante a reação. Pois, devido à alta reatividade destes compostos, observou-se em alguns procedimentos, através de cromatografia em camada delgada (CCD), o surgimento do dímero dos cloretos de hidroximiinoílas. Neste evento duas espécies idênticas reagem entre si através de seus orbitais de fronteira formando um núcleo oxadiazol (**Esquema 19**), comum para alguns precursores de *N*-óxidos de nitrila⁹⁹.



Esquema 19. Proposta de formação do dímero dos *N*-óxidos de nitrila.

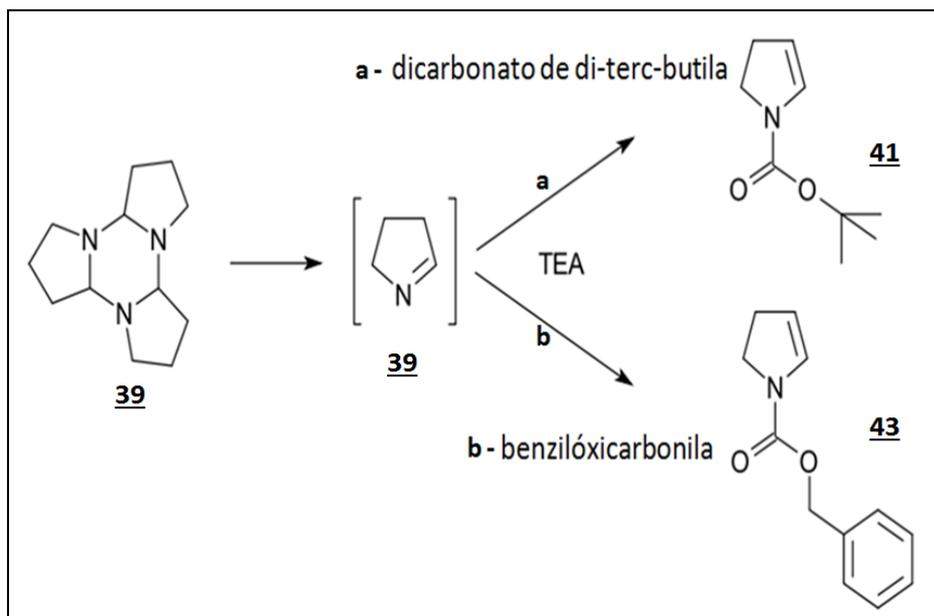
No início deste trabalho, era observada através de CCD, a formação de muitas impurezas, além do dímero, durante estas reações de cloração. A cicloadição, inicialmente, era programada subsequentemente à reação de formação dos cloretos de hidroxiiiminoílas, pois não conseguíamos armazená-los devido a sua rápida degradação.

Posteriormente, com um melhor domínio sobre este procedimento, observamos que após a completa remoção do solvente da reação, os cloretos de hidroxiiiminoílas mostravam-se sólidos. Desta forma, foi possível armazená-los por cerca de 2 dias, sem ocorrer a formação de subprodutos. Esse tempo de degradação foi aumentado para uma semana, quando guardamos os cloretos de hidroxiiiminoílas dissolvidos em diclorometano e, contendo como agente dessecante, o sulfato de sódio anidro. Acreditamos que houve uma contribuição na estabilidade dos cloretos de hidroxiiiminoílas pelo fato de estarem dissolvidos em um solvente aprótico na presença de um agente secante, evitando assim futuros eventos degradativos que eram observados quando armazenados de outras formas.

5.1.3 – Obtenção dos enecarbamatos endocíclicos 41 e 43.

Os enecarbamatos endocíclicos são materiais importantíssimos utilizados com muita frequência em nossas rotas sintéticas. Eles apresentam perfis bem característicos quanto a seu modo de detecção durante as reações em que estão envolvidos. Facilmente são identificados através da observação em cromatografia em camada delgada pelo seu R_f através da radiação ultravioleta no comprimento de onda de 254 nm e, principalmente utilizando o iodo como revelador.

A formação dos enecarbamatos inicia-se a partir da destrimerização do trimero 40 em seu respectivo monômero 39. Isto foi possível através da exploração de dois métodos utilizados neste trabalho: o fornecimento de calor ou a sonicação (**Esquema 20**).



Esquema 20. Rota de obtenção dos enecarbamatos endocíclicos **40a** e **40b**.

Devido à grande reatividade do monômero **39**, facilmente ele reage com os agentes acilantes (boc ou cbz) através do seu nitrogênio heterocíclico. Pelo método tradicional empregando calor a formação do enecarbamato ocorre através de uma reação em refluxo por um tempo maior para ser formado, quando comparamos com o uso da sonicação.

Diante da utilização do ultrassom foi possível diminuir o tempo de reação, além de utilizar-se o trímero em seu estado bruto. Entretanto, empregando-se esta metodologia e com o trímero co-distilado foi possível alcançar valores maiores de rendimentos.

A metodologia na qual se utilizou o ultrassom não foi empregada na síntese do enecarbamato **41** devido falta de estudos prévios sobre o comportamento dos reagentes envolvidos quando submetidos à sonicação. Dessa forma preferiu-se aplicar, na formação do enecarbamato **41**, a metodologia anterior na qual a destrimerização foi realizada através do aquecimento e com a co-distilação do trímero em THF. Por esta razão é exemplificado na tabela 2, apenas a comparação dos métodos utilizados na síntese do enecarbamato **43**.

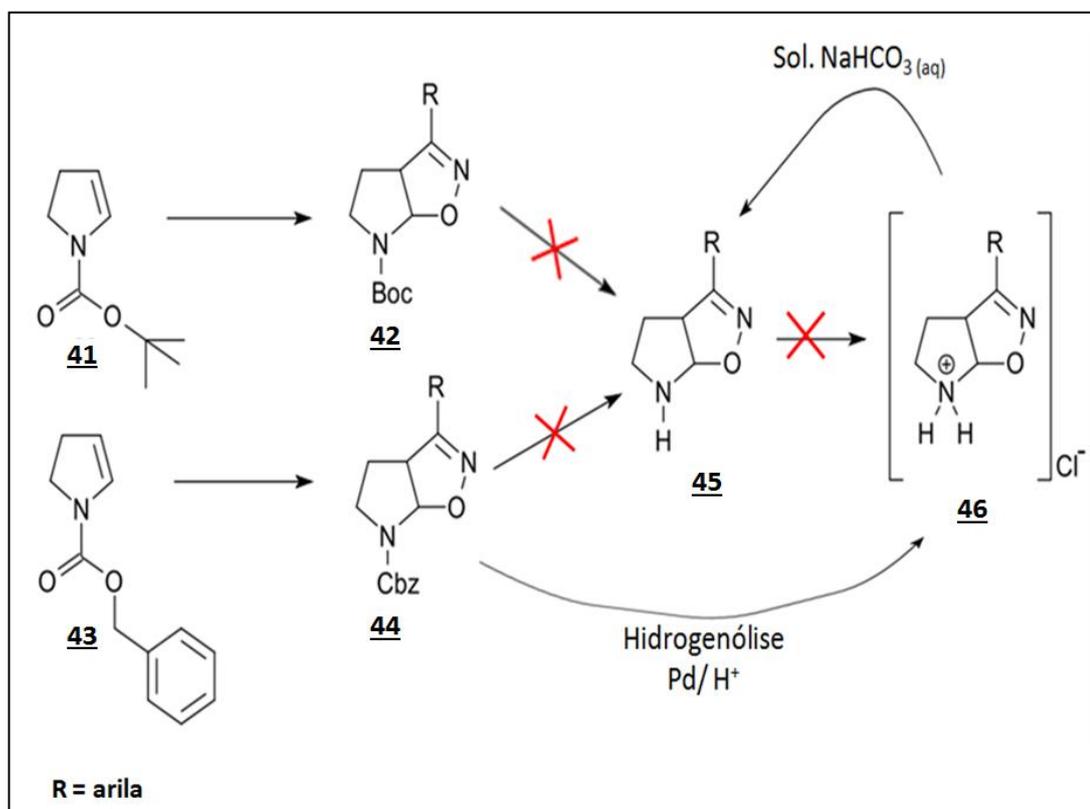
Método	Preparo da reação	Tempo	Rendimento
Aquecimento	Co-distilação do trímero	4 horas	Cbz - 67%
Sonicação	Trímero bruto	1,5 horas	Cbz - 50%

Tabela 2. Comparação dos métodos empregados para a obtenção do enecarbamato endocíclico de cinco membros **43**.

Deste modo, levando-se em consideração o fato de utilizar-se o trímero em seu estado bruto e com uma acentuada diminuição no tempo de reação, consideramos que vale a pena investir no uso do ultrassom, mesmo que ainda apresente um rendimento um pouco inferior ao do método tradicional. Além do mais, através do aperfeiçoamento da técnica empregada, poderemos, talvez, alcançar rendimentos ainda maiores do que aqueles obtidos pelo método usualmente utilizado.

5.1.4 – Obtenção das isoxazolininas bicíclicas-pirrolidínicas aril-substituídas na forma de base livre em N6 45 e dos seus respectivos sais de cloridratos 46.

Pretendeu-se utilizar uma nova rota de síntese visando obter os compostos 45 e 46, a fim de verificar os seus perfis de solubilidade nos testes biológicos. Utilizaram-se duas rotas paralelas que partem de enecarbamatos endocíclicos distintos 41 e 43. Em seguida, através da reação de cicloadição 1,3-dipolar entre os respectivos enecarbamatos endocíclicos com os *N*-óxidos de nitrila 37 foram obtidos os cicloadutos 42 e 44 (Esquema 21).



Esquema 21. Rota de obtenção dos derivados isoxazolínicos aril substituídos na forma de base livre em N6 e de suas formas de cloridratos.

observar em 1,50 ppm um sinal de singlete integrando para nove hidrogênios e, portanto, pertencentes as três metilas do grupamento boc. Em 7,40 ppm e 7,60 ppm verificamos a presença de dois dubletos referentes aos hidrogênios do anel aromático. Já em 2,11 ppm e 2,22 ppm observamos dois multipletos referentes aos hidrogênios metilênicos do carbono 4, enquanto que os hidrogênios do carbono 5 aparecem também como multipletos em 3,11 ppm e 3,76 ppm .

Tanto os hidrogênios do carbono 4 quanto os do carbono 5 aparecem com deslocamentos químicos diferentes no espectro por estarem em ambientes químicos diferentes devido as suas disposições espaciais e são portanto considerados como diastereotópicos.

Um atributo que pode ser observado neste espectro é a presença de confôrmeros rotacionais (rotâmeros). Estes que surgem devido ao ambiente químico formado pelo giro da ligação carbamídica simples N-C. Ainda no espectro do cicloaduto boc observamos em 4,21 ppm um sinal referente ao hidrogênio da junção dos anéis **3a**, enquanto que em 6,32 ppm verifica-se o sinal referente ao hidrogênio do carbono **6a** com o seu rotâmetro bem próximo, em 6,50 ppm (**Figuras 10 e 11**).

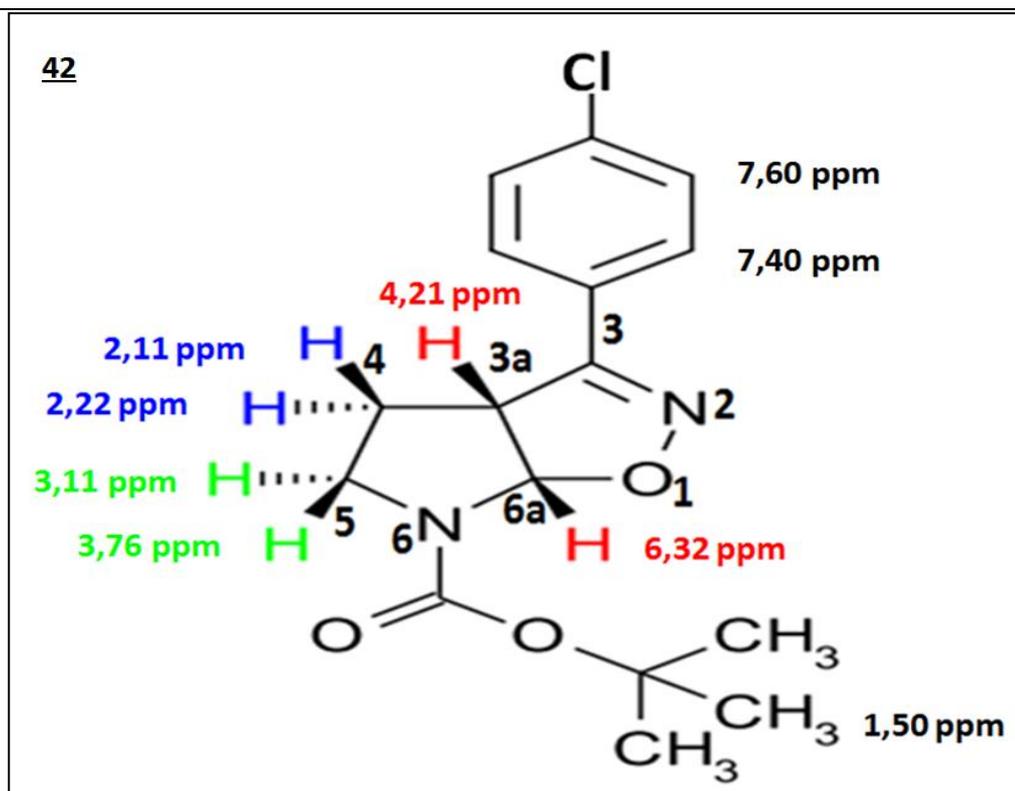


Figura 8. Deslocamento químico dos hidrogênios do cicloaduto protegido com boc.

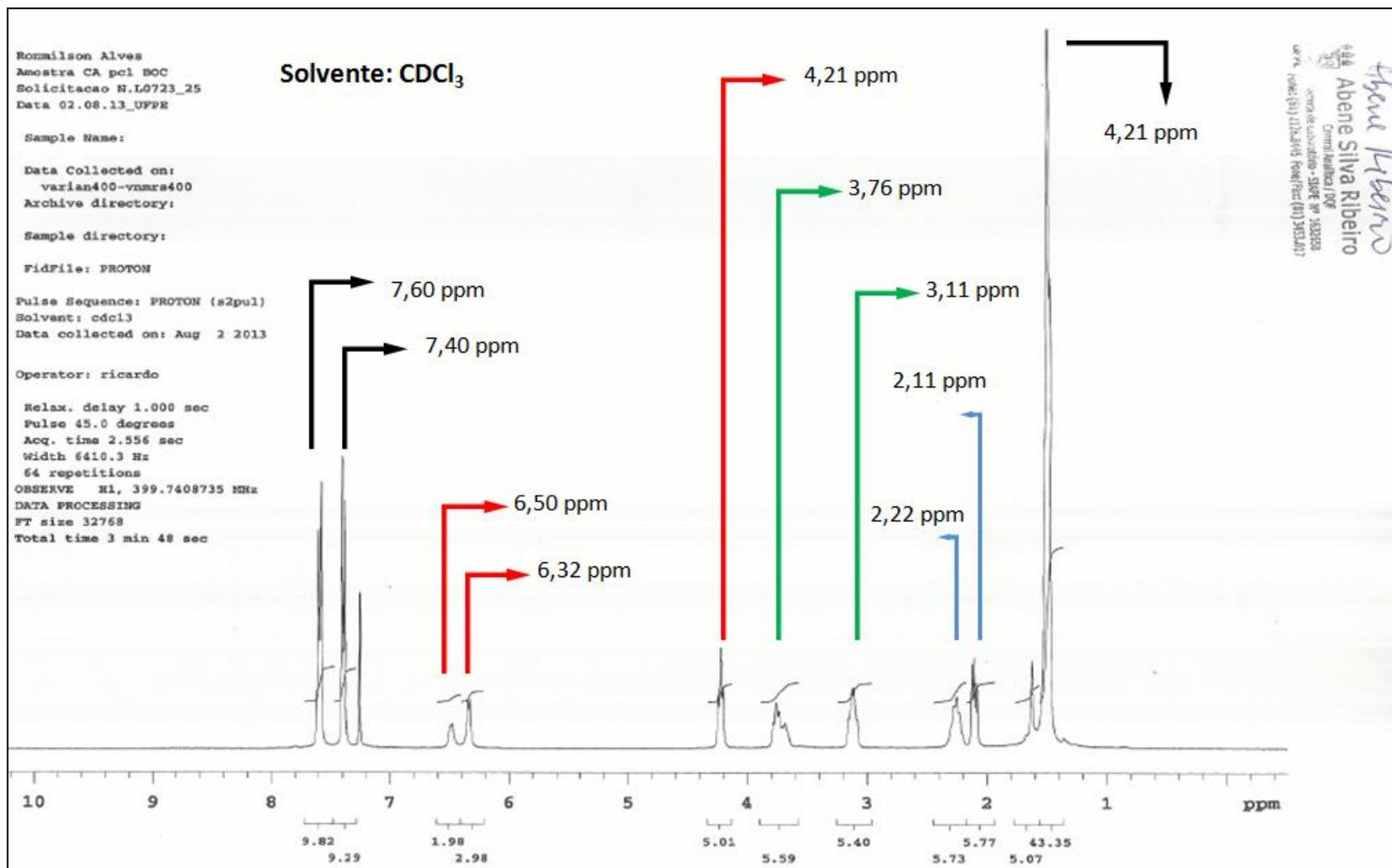


Figura 9. Espectro de RMN de ¹H do cicloaduto 42.

Pela análise do espectro de RMN de ^1H do cicloaduto protegido com o cbz **44** evidenciamos semelhanças em termos de deslocamento químico de sinais quando comparamos ao espectro do cicloaduto protegido com o boc **42**.

No espectro de RMN ^1H do cicloaduto protegido com cbz **44**, identificamos um sinal com deslocamento químico em 6,42 ppm sofrendo uma forte desblindagem, sua multiplicidade é um dubleto, indicando um acoplamento entre dois átomos de hidrogênios. Esse sinal corresponde ao hidrogênio do carbono da junção dos anéis **6a**. Ainda é possível observar o sinal de seu rotâmetro, também presentes neste espectro, que aparece muito próximo com deslocamento de 6,58 ppm.

O outro átomo de hidrogênio ligado ao carbono **3a** tem deslocamento químico em 4,25 ppm, a multiplicidade esperada é tripleto, visto que acopla com o hidrogênio da junção dos anéis **6a** e com apenas um dos dois hidrogênios do carbono 4, devido ao ângulo diedro existente entre ele e apenas um dos hidrogênios dos carbono 4 ($J \sim 0$ Hz).

Devido à distância da ligação carbamídica em relação ao hidrogênio da junção **3a**, não observamos rotâmeros para o seu sinal no espectro de RMN ^1H , o mesmo ocorre com o espectro do cicloaduto **42**. Aqui também os hidrogênios metilênicos no carbono 4 e no carbono 5 por apresentarem ambientes químicos diferentes são tidos como diastereotópicos. Logo, apresentam sinais distintos no espectro de RMN ^1H . Para os dois hidrogênios do carbono 4, os deslocamentos químicos são de 2,11 ppm e 2,25 ppm. Já os hidrogênios do carbono 5 apresentam deslocamentos químicos de 3,20 ppm e 3,80 ppm (**Figuras 8 e 9**).

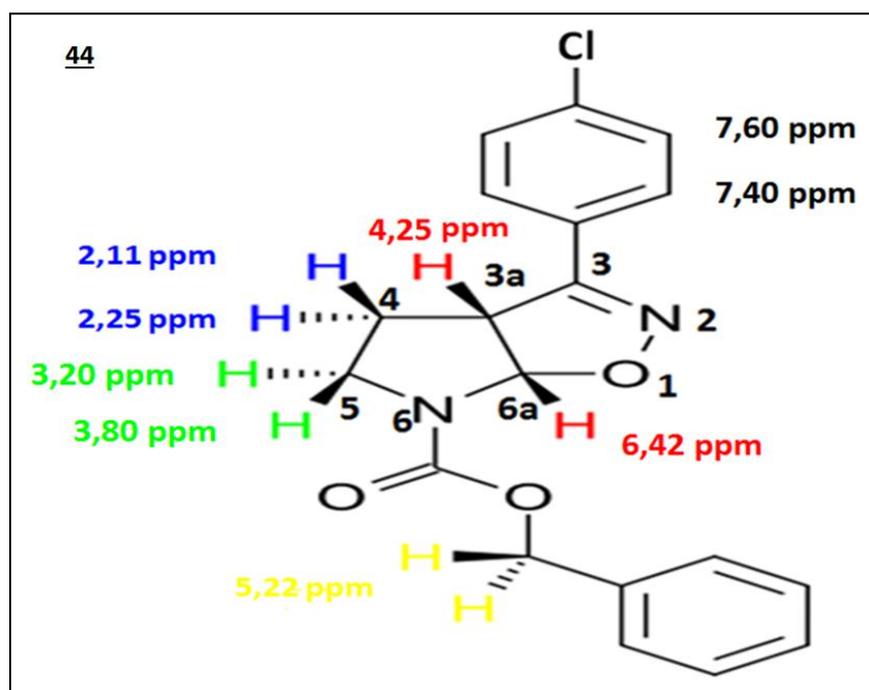


Figura 10. Deslocamento químico dos hidrogênios do cicloaduto protegido com cbz.

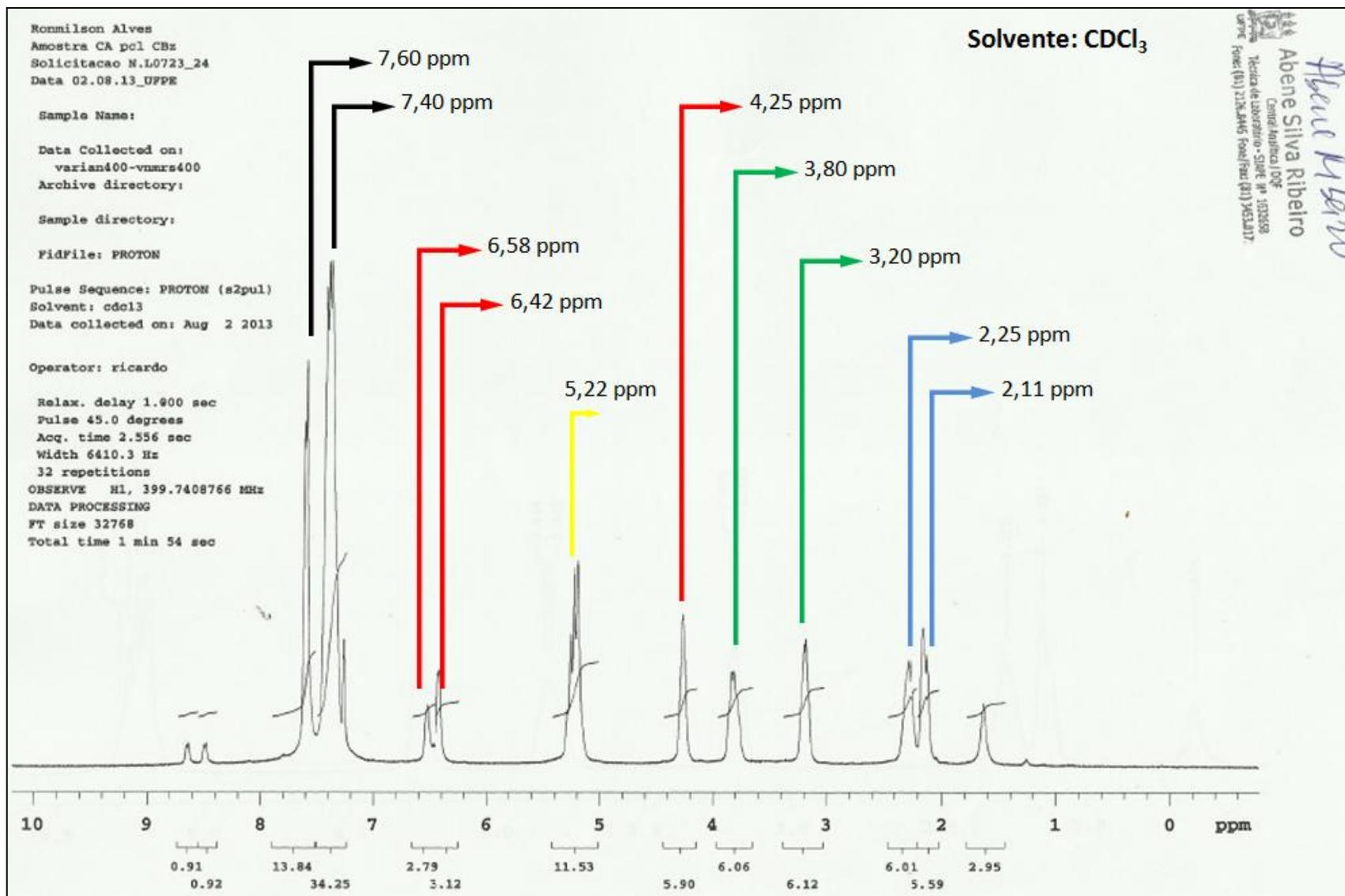
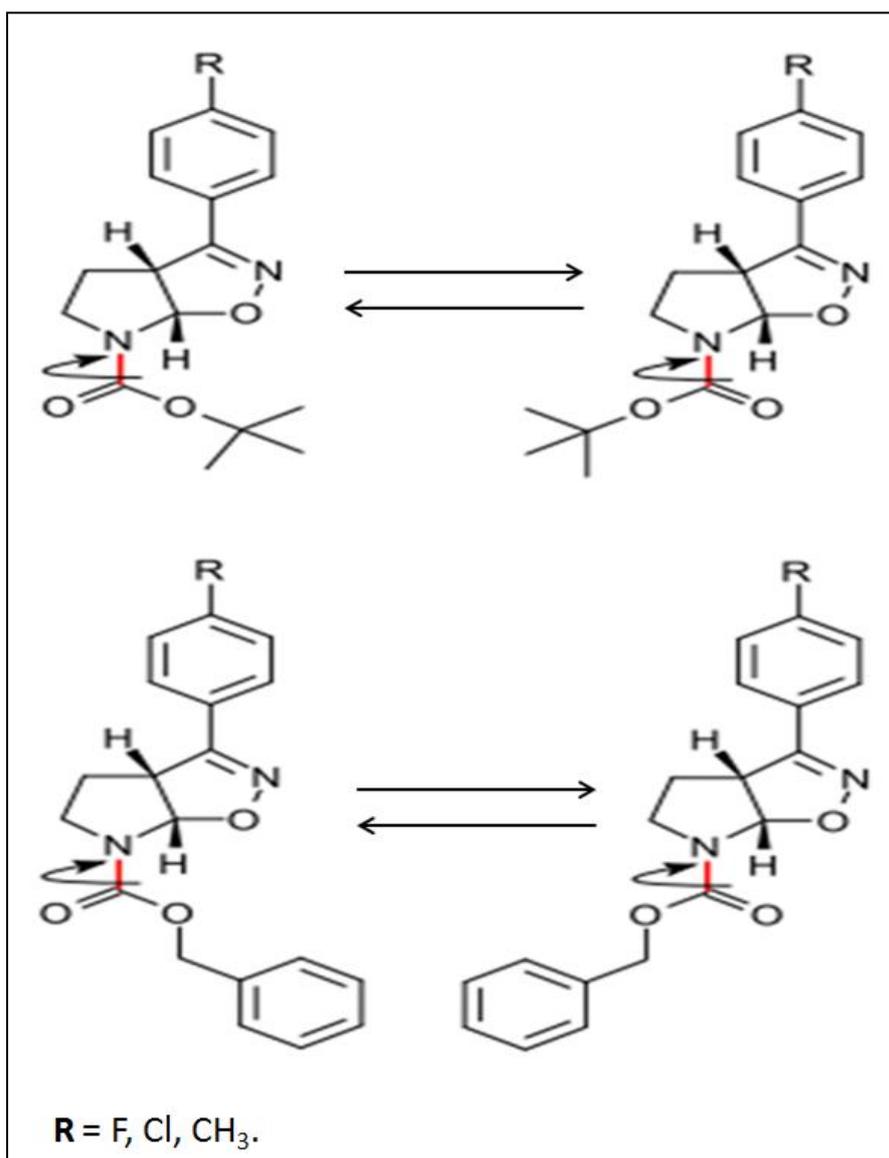


Figura 11. Espectro de RMN de ¹H do cicloaduto 44.

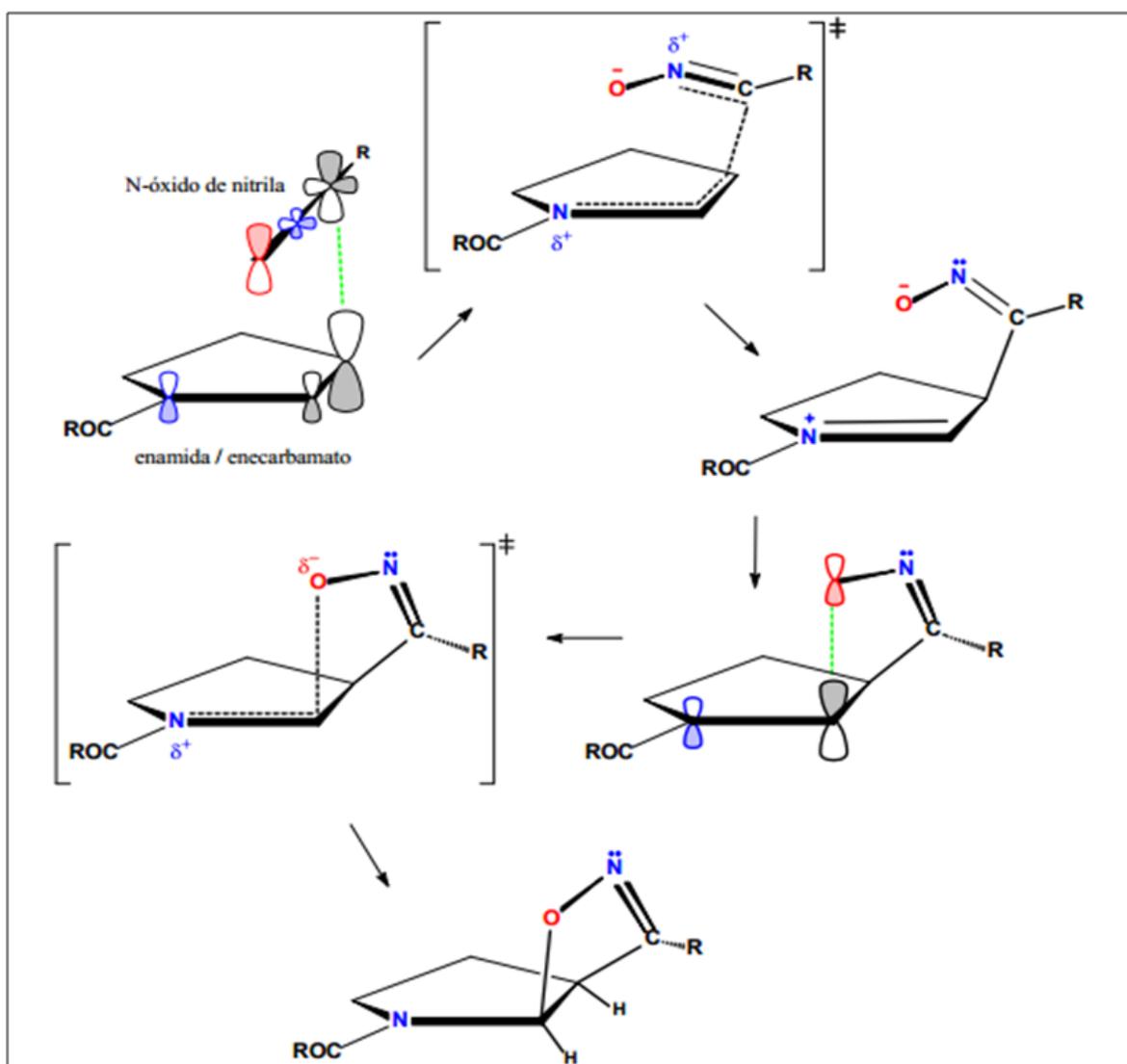
Tanto no espectro do cicloaduto **42** como no **44** constatamos a presença de rotâmeros que são formados devido à alta barreira energética rotacional da ligação carbamídica. Isto faz com que a interconversão dos rotâmeros seja lenta e que ambos os confôrmeros possam ser detectados. Em um deles o hidrogênio do carbono **6a**, por exemplo, está no campo de desproteção da carbonila e no outro rotâmero não, fazendo com que estejam em ambientes químicos e magnéticos diferentes (**Esquema 23**).



Esquema 23. Ilustração do giro da ligação sigma N-C da porção carbamídica dos cicloadutos, promovendo o desenvolvimento de diferentes ambientes químicos e magnéticos que favorecem o aparecimento de rotâmeros no espectro de RMN ¹H.

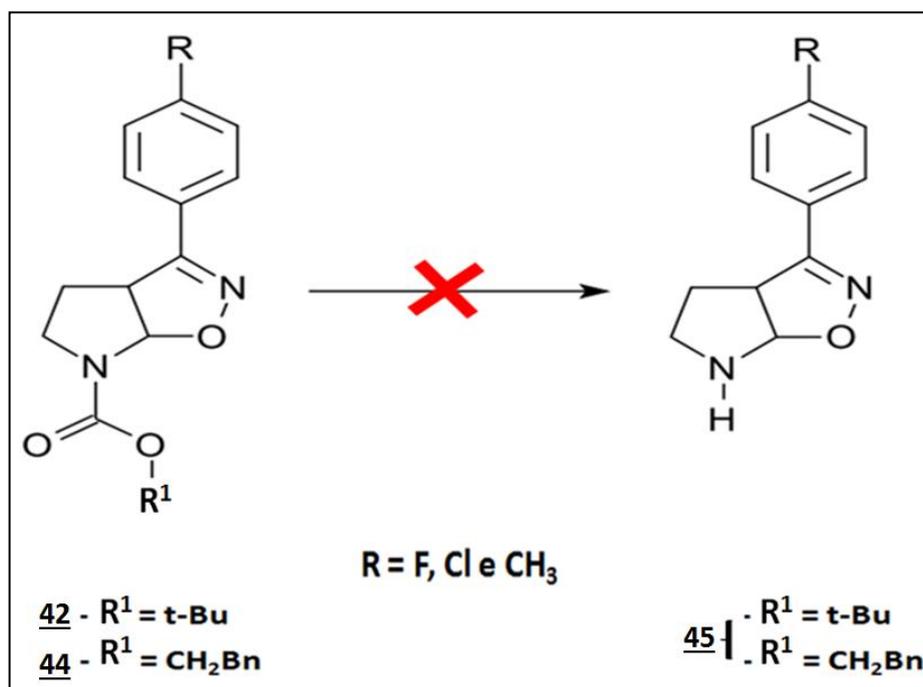
Uma proposta de mecanismo para a reação de cicloadição 1,3-dipolar foi racionalizada em nosso grupo de pesquisa por Dos Santos (**Esquema 24**)¹⁰¹. Ele relata a participação de

enamidas e enecarbamatos endocíclicos de 5 membros com *N*-óxidos de nitrila, baseando-se em um mecanismo de cicloadição não concertado. Observamos durante o desenvolvimento do esquema proposto a formação de um intermediário *N*-acil-imínio dipolar, que interage com o então formado *N*-óxido-imínio, que devido à sua disposição espacial possibilitará a adição do oxigênio ao carbono do acil-imínio e, sendo observada a aplicação desta proposta de mecanismo nas reações de cicloadição realizadas neste projeto.



Esquema 24. Proposta de mecanismo não concertada da cicloadição 1,3-dipolar.

5.1.6 – Desproteção da amina secundária em N6 para formação das isoxazolinas aril substituídas como base livre em N6.



Esquema 25. Desproteção do nitrogênio N6. Remoção dos protetores.

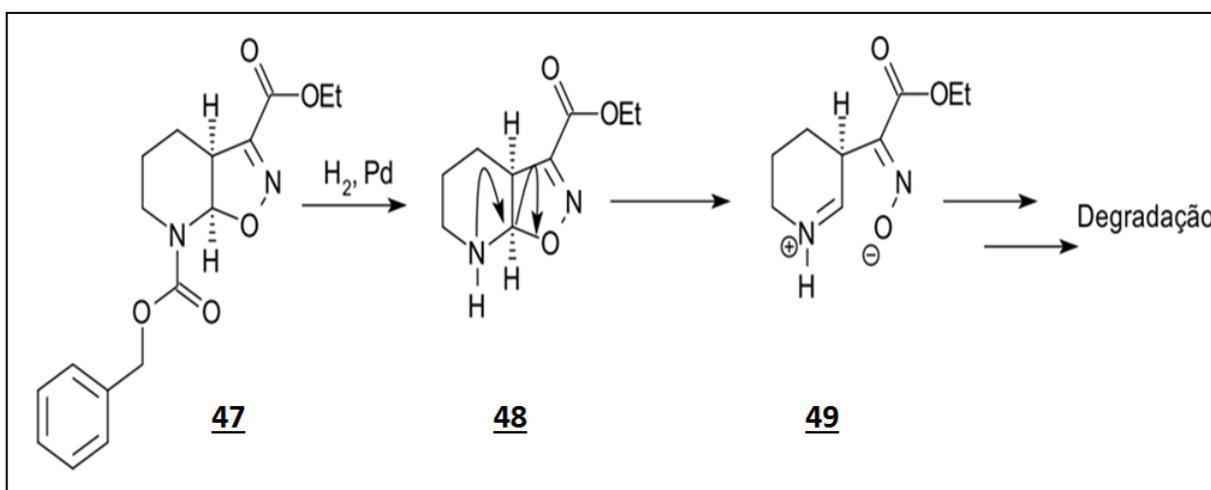
Utilizando duas metodologias distintas, mas que convergiam para o mesmo caminho não foi possível alcançar o composto pretendido, inicialmente, através da simples desproteção dos grupamentos boc e cbz (**Esquema 25**).

Projetamos a síntese do enecarbamato **41**, através da proteção do grupo amina N6 com o boc. Quando realizamos a reação de desproteção do seu respectivo cicloaduto **42** com ácido trifluoroacético (TFA), à 0°C, observamos através da CCD que houve a degradação do cicloaduto devido às várias manchas visualizadas na cromatografia. Este tipo de reação faz parte da via de síntese de alguns intermediários de nosso grupo de pesquisas. Entretanto, antes não havia sido observada esta degradação com os cicloadutos utilizados, além de apresentar bons rendimentos.

Deste modo, por acreditarmos que o meio ácido promovido pelo TFA tenha propiciado a degradação, buscamos como alternativa a síntese do enecarbamato **43**, utilizando o grupamento cbz para proteção do N6. A desproteção do seu respectivo cicloaduto **44**, através da hidrogenólise, levaria a formação do composto **45**. Este que seria obtido também através da desproteção do cicloaduto **42**. Entretanto, também não houve sucesso nesta metodologia que é bastante utilizada para a desproteção de cicloadutos obtidos com o

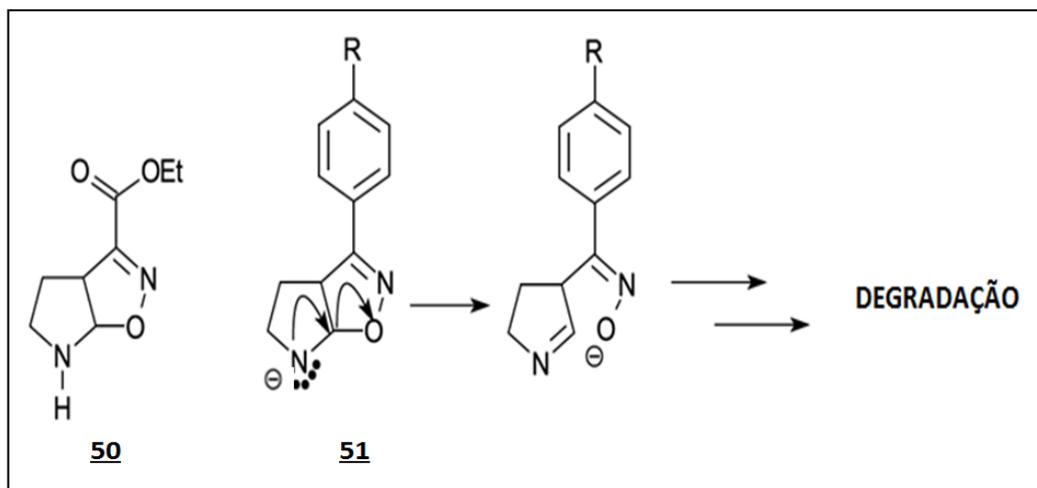
CEFNO, em nosso laboratório. Comprovou-se mais uma vez por meio de CCD a formação de vários produtos de degradação do cicloaduto **44**.

Até então, não havia sido descrita em nosso grupo a ocorrência da degradação do núcleo aza-bicíclico pirrolidínico, visto que no carbono 3 do biciclo, havia uma função éster e não arila, sendo apenas relatada abertura e degradação da série piperidínica nestas mesmas condições. Assim, presumiu-se em outros trabalhos que a estereoquímica do anel de seis membros favoreceria a abertura do biciclo 2-isoxazolina[5,4-*d*]piperidínico **47**, formando um intermediário acil-imínio **49** altamente reativo que decompõem-se em vários compostos não identificáveis¹⁰² (**Esquema 26**).



Esquema 26. Abertura do anel isoxazolinico piperidínico **47**.

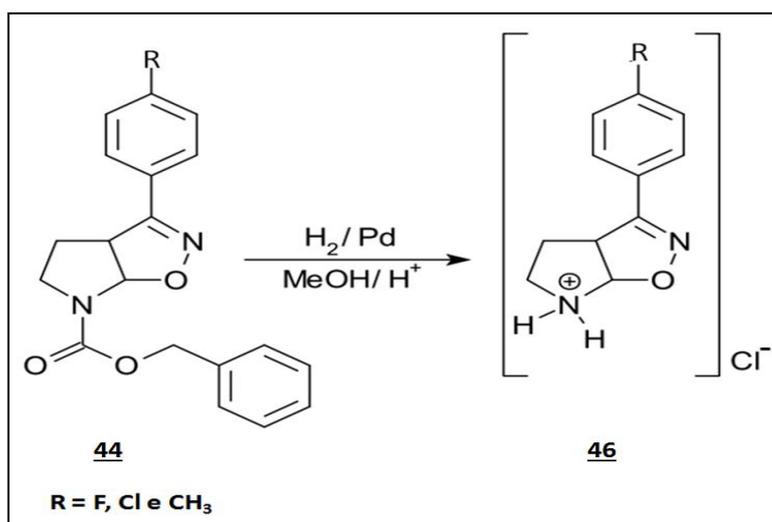
Considerando que em estudo anteriores, o composto **50** contendo o núcleo 2-isoxazolina[5,4-*d*]pirrolidina, com a porção amina livre em N6 foi obtido e levando-se em conta a maleabilidade conformacional do anel de seis membros piperidínico, que resultou em sua abertura, foi proposta a seguinte hipótese: a abertura do heterobiciclo de 2-isoxazolina[5,4-*d*]pirrolidina pode estar relacionada com a presença do grupo arila *para*-substituído ligado diretamente ao biciclo na posição C3. Sendo assim, exercendo um forte efeito eletrônico e estérico que é favorecido pela expressiva conjugação dos orbitais π na porção 2-isoxazolina do heterobiciclo. Além do mais, ocorre a formação de um anion bicíclico **51**, altamente reativo, durante a desproteção. Deste modo, acreditamos que neste trabalho o efeito eletrônico do grupo arila tenha contribuído para que antes de ocorrer a protonação de N6, um dos pares eletrônicos de N6 que está carregado negativamente, desloque-se em direção ao carbono **6a** da junção dos anéis promovendo a abertura do biciclo e iniciando-se o processo de degradação do mesmo (**Esquema 27**).



Esquema 27. Abertura do anel isoxazólico pirrolidínico.

5.1.7 - Obtenção dos cloridratos de aril isoxazolininas 46 através da hidrogenólise em meio ácido, com posterior basificação dos mesmos para formação das aril isoxazolininas na forma de base livre em N6 45.

Tendo em vista o não sucesso obtido nas duas metodologias utilizadas anteriormente - hidrólise ácida e hidrogenólise - para formação das isoxazolininas aza-bicíclicas na forma de base livre em N6, propomos uma readequação na metodologia da hidrogenólise. Passamos agora a utilizar uma solução de HCl 0,05 M em metanol (**Esquema 28**).

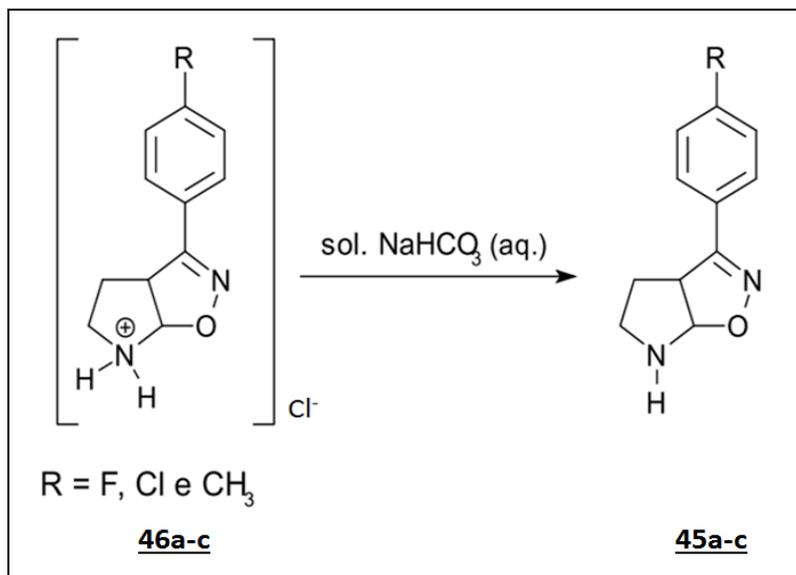


Esquema 28. Obtenção dos cloridratos de aril isoxazolinina através da hidrogenólise em meio ácido.

Desta forma, ao mesmo tempo em que fosse ocorrendo a desproteção do grupamento cbz durante a hidrogenólise, também aconteceria a protonação do nitrogênio N6 da

isoxazolina aza-bicíclica devido ao meio reacional estar ácido. Consequentemente assim obteríamos cloridratos de isoxazolinas aril substituídos.

Após o termino da hidrogenólise, em um procedimento simples de basificação com uma solução de $\text{NaHCO}_3(\text{aq.})$ promoveu-se a formação das isoxazolinas aza-bicíclicas **45a-c** na forma de base livre em N6, que não havíamos conseguido anteriormente (**Esquema 29**).



Esquema 29. Obtenção das aril isoxazolinas base livre N6 através da basificação dos respectivos cloridratos.

O fenômeno de degradação dos cicloadutos durante a remoção dos grupamentos protetores não foi observado em trabalhos anteriores com a cicloadição envolvendo o CEFNO. Deste modo reforçamos a ideia de que a degradação do núcleo pirrolidínico ocorra por influência eletrônica do grupamento arila substituído durante o processo de hidrogenólise que favorece a formação de um possível anion carregado negativamente e bastante instável que inicializa o processo degradativo do biciclo. Esta justificativa é ainda reforçada pelo fato de não observamos o fenômeno de degradação dos biciclos na forma de N-H livre, obtidos da basificação de suas formas de cloridratos. Já quando há a desproteção de N6 é realizada sem o meio estar ácido, surge em milésimos de segundo a estrutura de um anion **51** que inicia o processo de degradação antes que haja a protonação de N6 para formação da base livre estável.

5.1.8 - Análises espectrométricas de RMN de ^{13}C , ^1H , IV-FT e HRMS das isoxazolinas aril substituídas na forma de base livre em N6 e de seus respectivos sais de cloridratos.

Pela análise espectrométrica de RMN de ^{13}C , ^1H e também IV-FT e HRMS foi possível elucidar a formação dos compostos obtidos. Utilizaremos como referência nesta discussão os espectros dos compostos **45b** e **46b**, embora todos os demais espectros, no capítulo 9 (anexos), apresentem semelhanças.

Pela observação do espectro de RMN de ^{13}C da molécula **45b** verifica-se a presença dos carbonos da junção dos anéis do heterobícclo, originados desde a cicloadição 1,3-dipolar entre os enecarbamatos e os *N*-óxidos de nitrila. Com deslocamento químico em 98,5 ppm aparece o sinal referente ao carbono **6a** da junção dos anéis, fortemente desblindado por estar diretamente ligado a átomos bastante eletronegativos como o oxigênio e nitrogênio (**Figuras 12 e 13**). Enquanto que em 50,2 ppm esta exemplificado o sinal do carbono **3a** da outra junção dos anéis, estando este bem mais blindado que o carbono **6a** por não sofrer uma influência tão forte de outros heteroátomos.

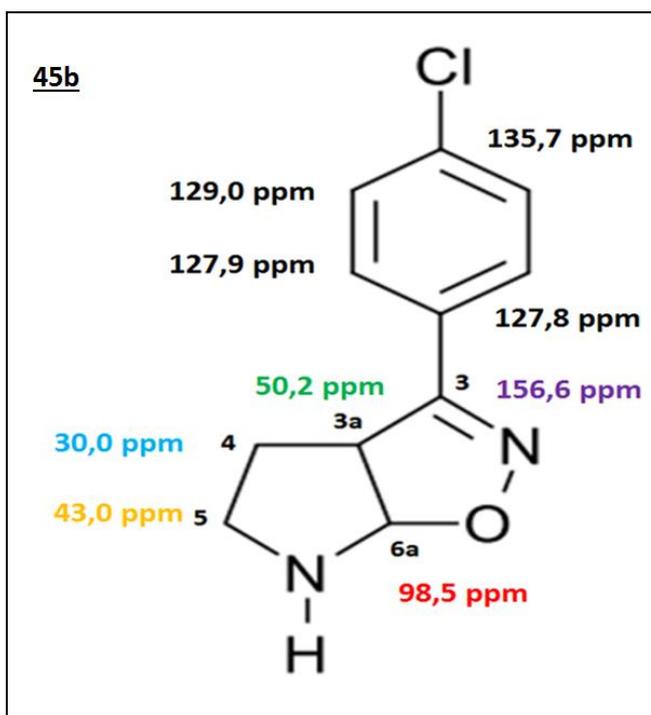


Figura 12. Deslocamentos químicos dos átomos de carbonos da aril isoxazolinona *p*-Cl na forma de base livre em N6 **45** RMN ^{13}C .

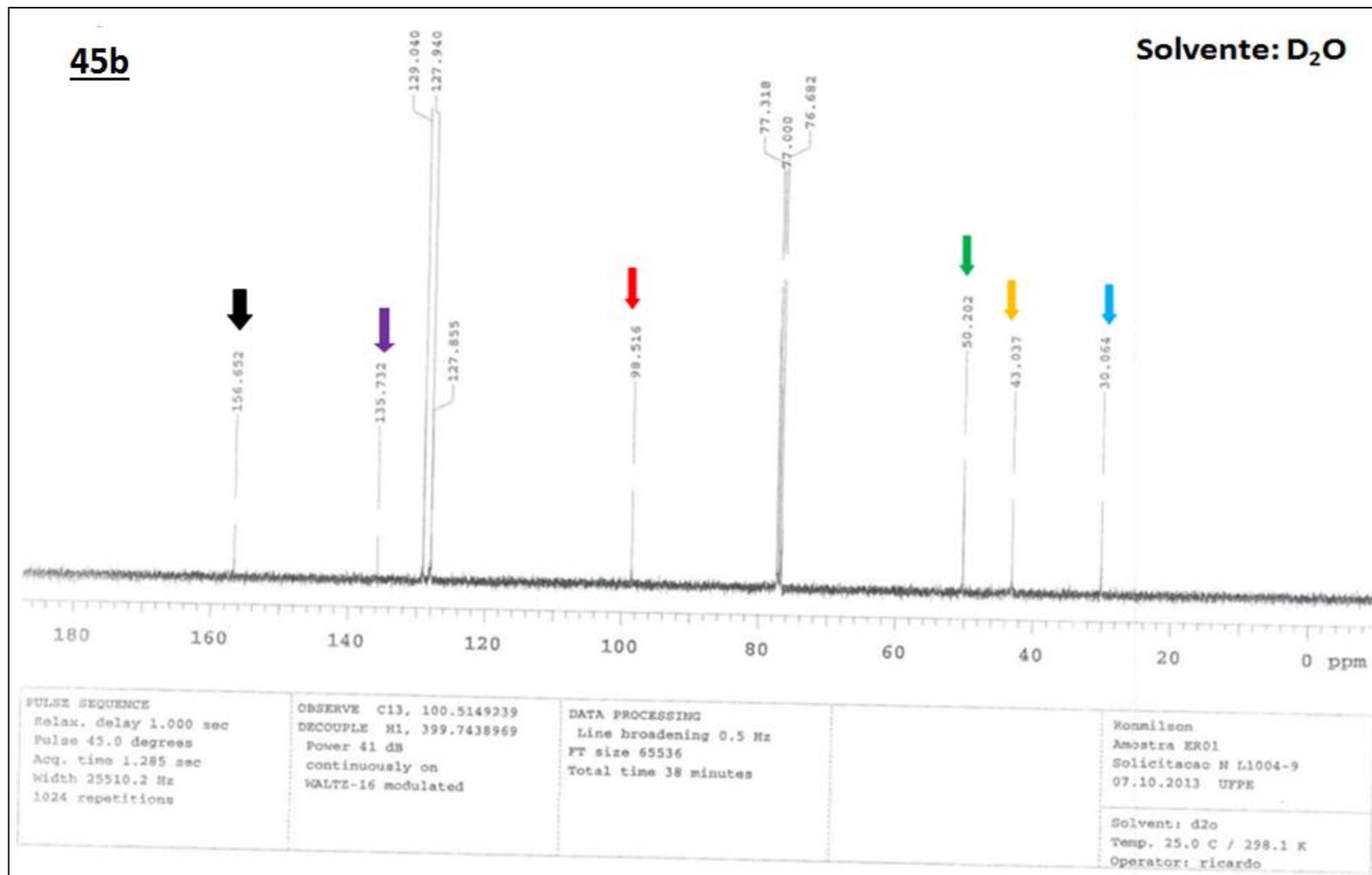


Figura 13. Espectro de RMN ¹³C da aril isoxazolinona *p*-Cl na forma de base livre em N6 **45b**.

Ainda na região abaixo de 100 ppm verifica-se a presença dos dois sinais de carbonos que faltavam para fechar o núcleo pirrolidínico. São eles o sinal com deslocamento químico em 30,0 ppm e 43,0 ppm pertencentes, respectivamente, aos carbonos 4 e 5 do anel. Estando o carbono 5 um pouco mais desblindando por estar diretamente ligado ao átomo de nitrogênio.

Encontramos em 156,6 ppm um sinal sofrendo uma forte desblindagem por influência do nitrogênio isoxazolínico sp^2 e que refere-se ao carbono 3 do núcleo, estando este diretamente ligado ao anel aromático. Unido ao carbono 3 encontra-se o carbono quaternário do anel aromático que aparece com deslocamento químico de 127,8 ppm. Já em 127,9 ppm e 129,0 ppm aparecem dois sinais que equivalem-se a outros dois sinais de mesmo deslocamento químico referentes aos carbonos CH do anel aromático. Ainda em 135,7 ppm observamos um sinal de carbono quaternário e sofrendo uma alta desblindagem por estar diretamente ligado ao átomo Cloro da posição *para* do anel aromático.

Em relação a análise do espectro de RMN de ^1H , pode-se observar um duplete em 7,38 ppm e outro duplete em 7,62 ppm referentes aos quatro hidrogênios do anel aromático (**Figuras 14 e 15**). Já em 6,05 ppm aparece um sinal de duplete do hidrogênio do carbono **6a**, da junção dos anéis, apresentando-se bastante desblindado por estar ligado ao carbono que encontra-se unido aos átomos de nitrogênio e oxigênio, ambos muito eletronegativos. Enquanto que em 4,01 ppm observa-se um tripleto referente ao hidrogênio do carbono **3a**, da outra junção dos anéis. Em 1,97 ppm e 2,08 ppm aparecem os sinais dos hidrogênios do carbono 4, enquanto que em 2,95 ppm e 3,10 ppm estão presentes os sinais dos hidrogênios do carbono 5. Em 2,48 ppm observamos o sinal do hidrogênio ligado ao nitrogênio N6.

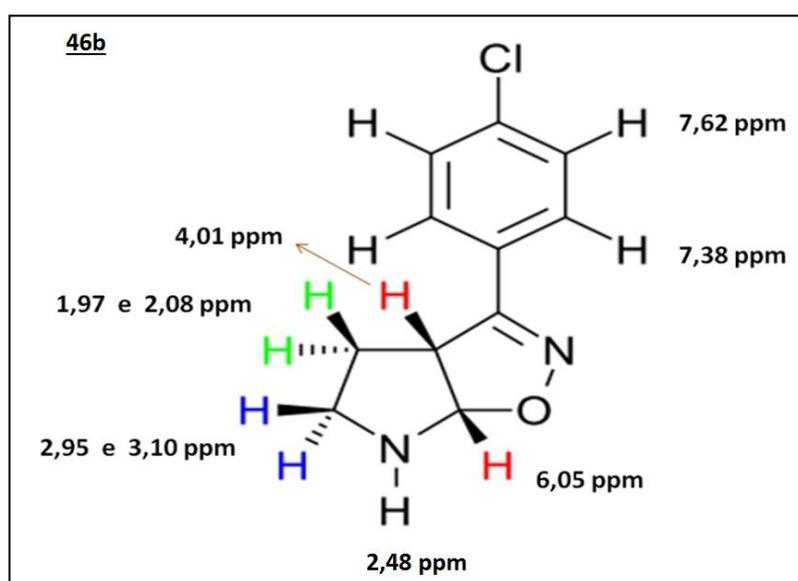


Figura 14. Deslocamento químico dos átomos de hidrogênios da aril isoxazolina *p*-Cl na forma de base livre em N6 **46b**.

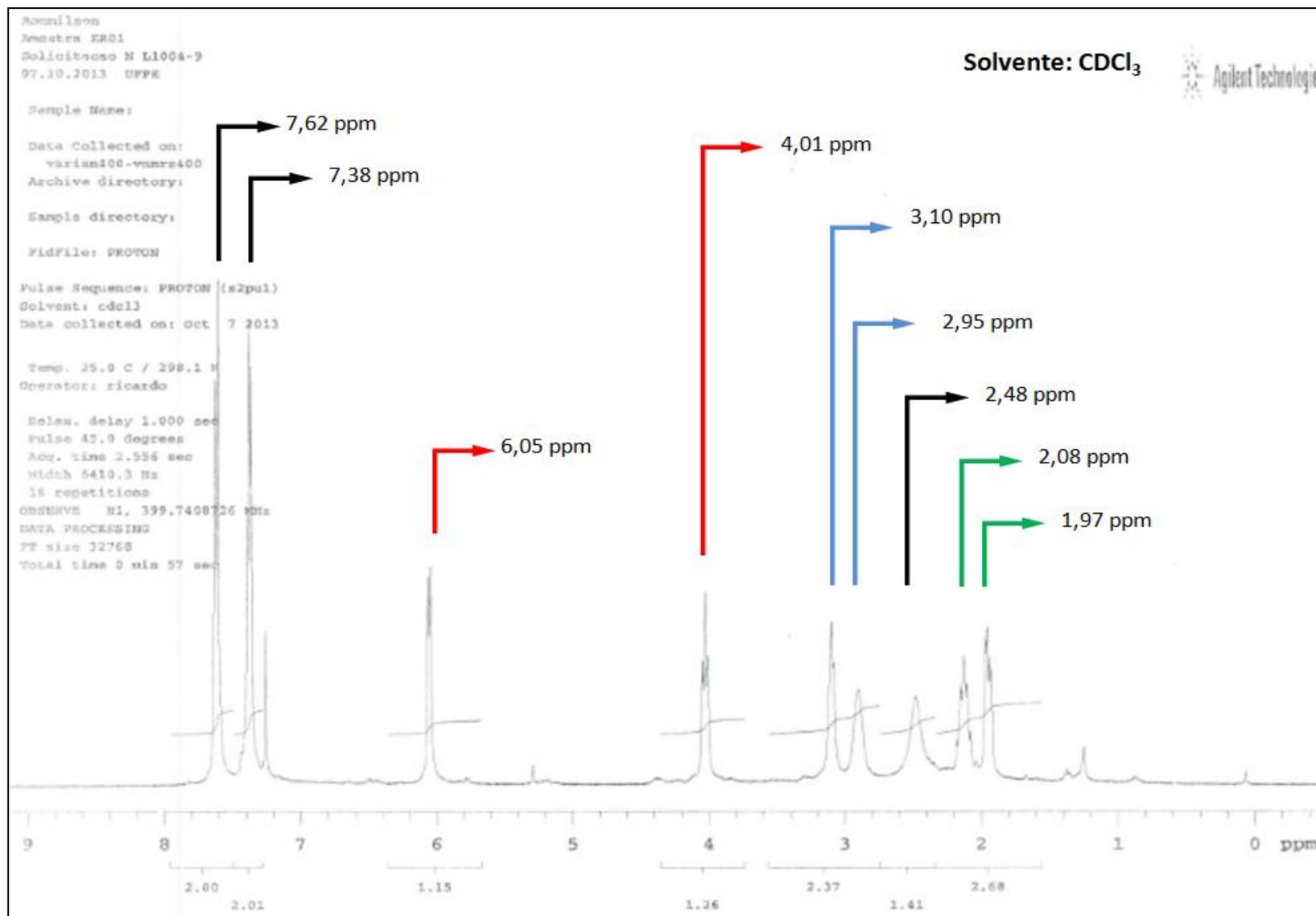


Figura 15. Espectro de RMN ¹H da aril isoxazolina na forma de base livre em N6 **42b**.

Ainda analisando espectros de RMN ^1H , agora da aril isoxazolina *p*-Cl na forma de cloridrato, vê-se em 7,40 ppm e 7,58 ppm os sinais dos dubletos referentes ao hidrogênios aromáticos (**Figuras 16 e 17**). Em 4,78 ppm surge o sinal referente ao hidrogênio do carbono da junção dos anéis **3a**. Entretanto, no espectro deste cloridrato surgiu um sinal sem integração encobrendo aquele que deveria estar exemplificando o hidrogênio pertencente ao carbono **3a**. Já em 6,22 ppm observa-se o hidrogênio do carbono **6a**, da outra junção dos anéis, bem desblindado por estar ligado a dois átomos eletronegativos. Destacando-se aqui o não aparecimento de rotâmeros em relação ao hidrogênio da junção **6a** por não mais existir os grupamentos protetores boc ou cbz que influenciavam diretamente para o surgimento do mesmo nos espectros. Deste modo, fica claro que ocorreram com êxito a desproteção dos cicloadutos obtidos anteriormente. Em 2,95 ppm e 3,41 ppm estão os sinais dos hidrogênios do carbono 5, enquanto que em 2,22 ppm e 2,39 ppm aparecem os sinais dos hidrogênios pertencentes ao carbono 4.

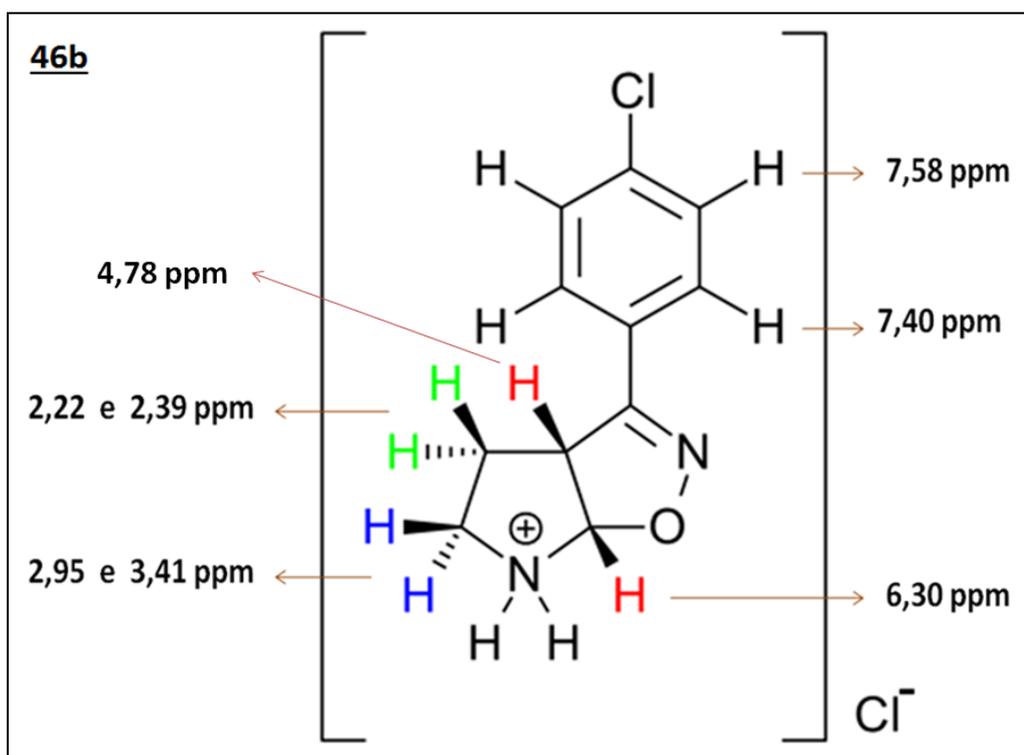


Figura 16. Deslocamento químico dos átomos de hidrogênios da aril isoxazolina *p*-Cl na forma de cloridrato.

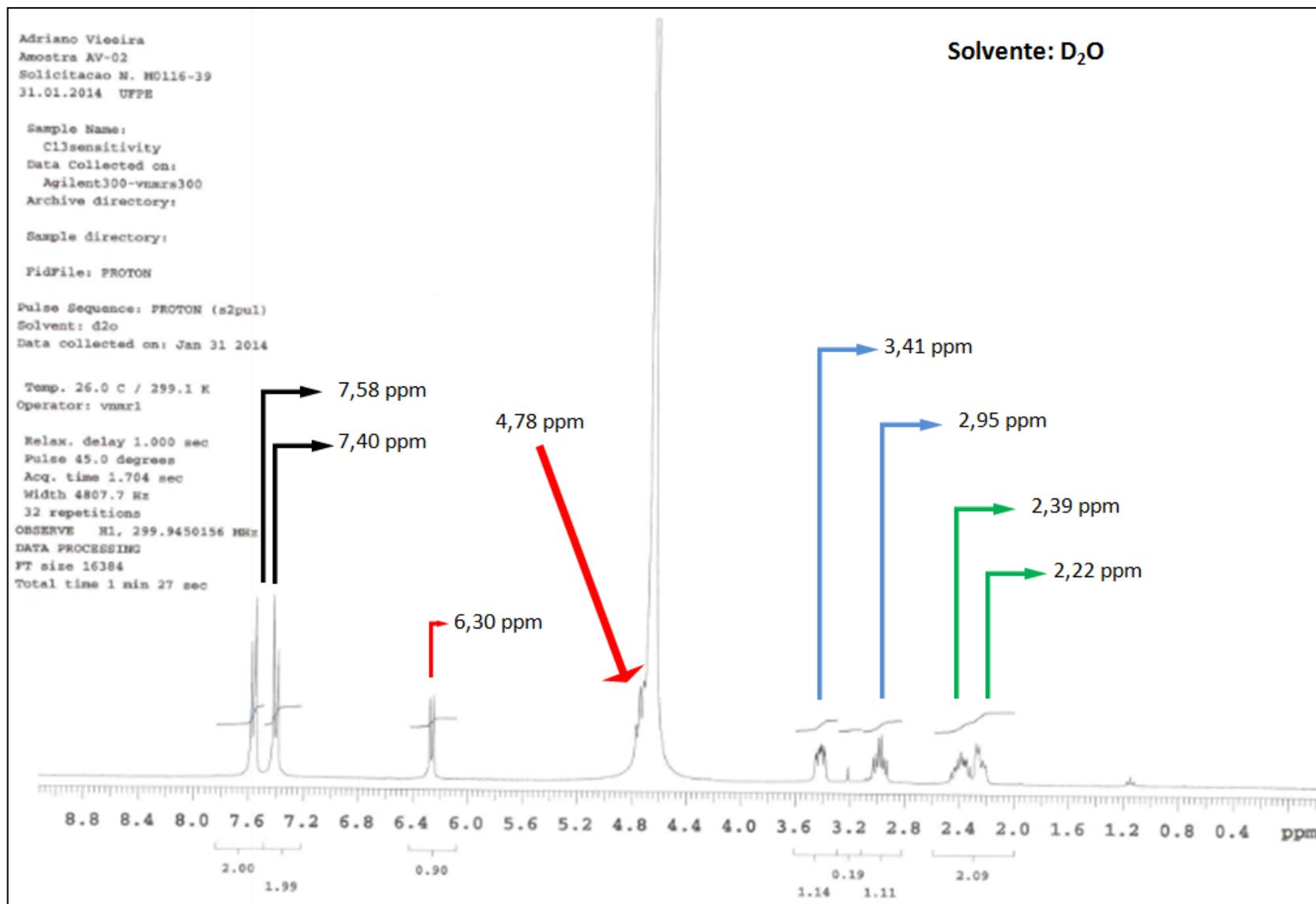


Figura 17. Espectro de RMN ¹H do cloridrato de aril isoxazolina *p*-Cl.

Pela análise do espectro de infravermelho é possível observar as bandas características das regiões de frequência que caracterizam a estrutura da molécula (**Figura 18**). Em $3335,41\text{ cm}^{-1}$ verificamos a banda característica do N-H, já em $1587,91\text{ cm}^{-1}$, vê-se a banda referente a C=N, enquanto em $1492,32$, $1434,97$ e $1404,11\text{ cm}^{-1}$ aparecem as bandas referentes a C=C do anel aromático. Já em $829,26\text{ cm}^{-1}$ observa-se o estiramento C-Cl.

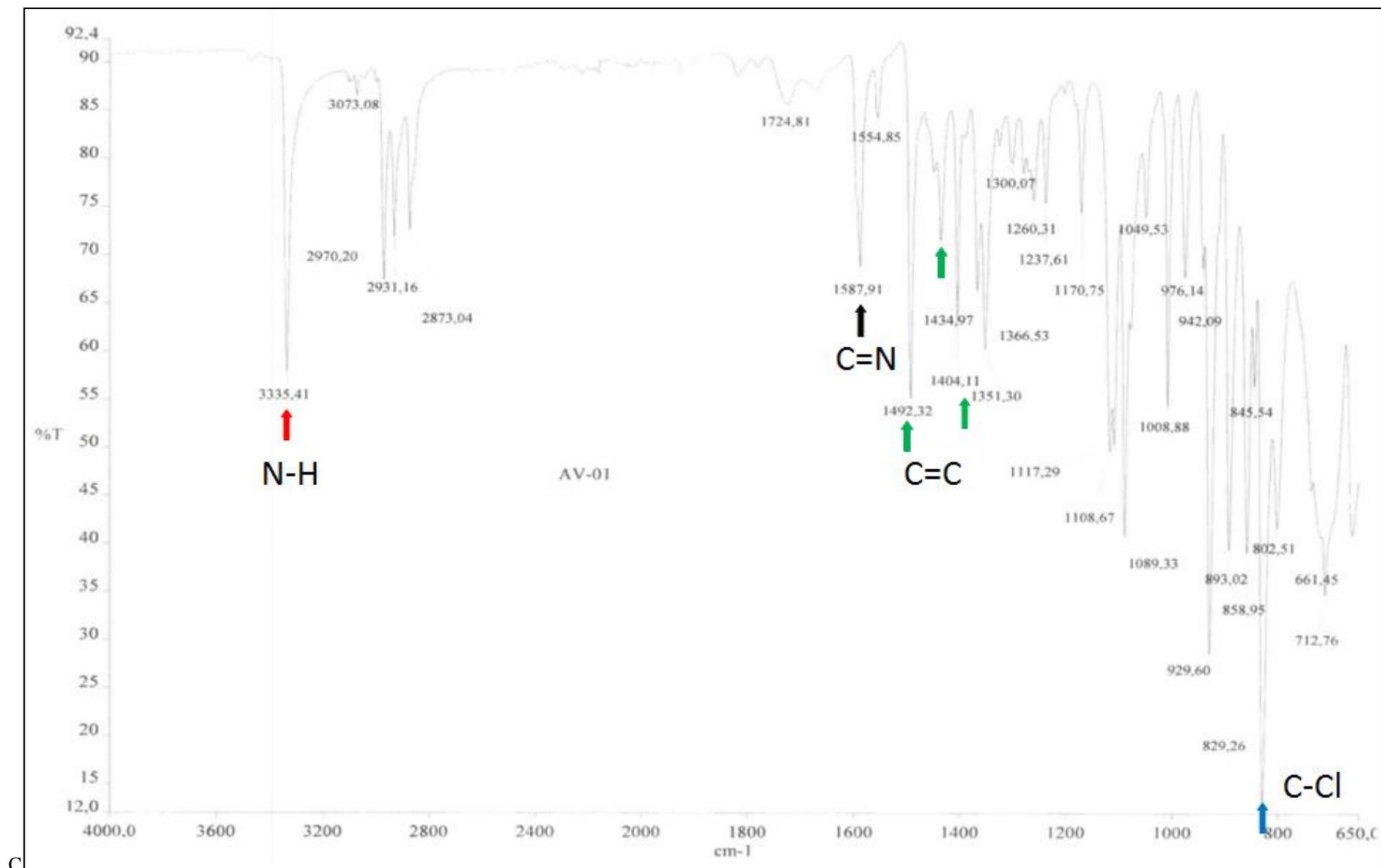


Figura 18. Espectro de infravermelho da aril isoxazolina *p*-Cl na forma de base livre.

Através da técnica de Espectrometria de Massas (HRMS-IT-TOF) com a detecção apenas do íon molecular foi possível comprovar a formação da isoxazolina *p*-Cloro **45b** na forma de base livre em N6. A molécula **45b** durante o processo de ionização tem o acréscimo de +1 na razão m/z , apresentando assim no espectro um M^+ de 223,0538 m/z . Pode-se notar uma característica importante neste espectro em relação à abundância isotópica do átomo de cloro. Sabe-se que na natureza existem dois isótopos estáveis deste átomo, um com massa 35 e outro 37, na proporção de 3:1 respectivamente. Deste modo, ao analisar o espectro pode-se observar em aproximadamente 223 m/z e em 225 m/z os dois picos referentes à proporção da molécula detectada no aparelho de massas com os seus respectivos isótopos do átomo de cloro em suas devidas proporções (**Figura 19**).

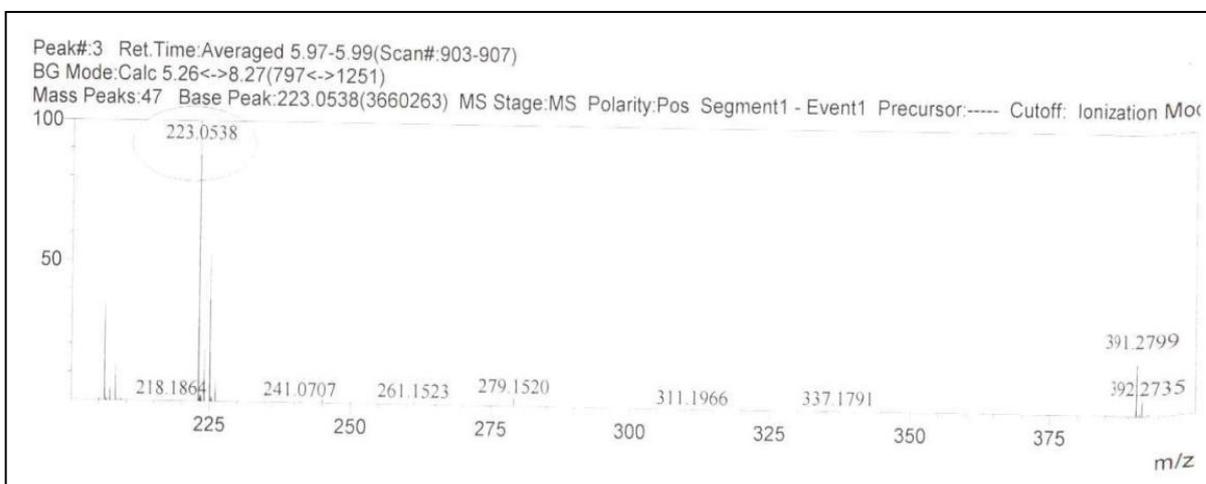


Figura 19. Espectros de Massas da aril isoxazolina *p*-Cl na forma de base livre.

5.2 Parte biológica

Neste estudo preliminar verificou-se a atividade antimicrobiana dos compostos, em suas formas de bases livre e de seus cloridratos, através do método de difusão em disco, desenvolvido por Bauer, no meio Ágar Müller Hinton. As suspensões padronizadas dos micro-organismos testes foram semeadas com o auxílio de swab na superfície do meio, em placas de Petri de 9 cm de diâmetro, contendo 18 mL do meio. Utilizaram-se discos de 6 mm de diâmetro embebidos com 0,27 mL da solução das substâncias em estudo, dissolvidas em dimetilsulfóxido (DMSO), ficando cada disco, com uma concentração de 300 µg. As placas foram incubadas a 35°C durante o período de 24 a 48 horas, dependendo do micro-organismo.

Todos os testes foram realizados em duplicatas e os resultados dos halos de inibição expressos em milímetros (mm), conforme exemplificados na tabela 3 e no gráfico 1. Utilizou-se como padrão o fármaco Ampicilina na concentração de 10 µg/disco.

Substâncias	<i>S.aureus</i>	<i>M.luteus</i>	<i>B.subtilis</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>M.smegmatis</i>	<i>E.faecalis</i>	<i>E.coli</i>	<i>S.marcesens</i>
45a	0	10,5	0	0	14	12,5	0	0
45b	0	11,5	0	0	0	0	0	0
45c	0	11	0	0	11,5	0	0	0
46a	0	13,5	0	0	0	0	0	0
46b	0	13,5	10,5	0	26	0	9,5	0
46c	0	0	0	0	11	0	0	0
AMPICILINA 10 µg	50,5	60	34	0	14	28	26,5	14

Tabela 3. Valores dos halos de inibição em mm das substâncias **45a-c** e **46a-c** frente a bactérias gram positivas e gram negativas.

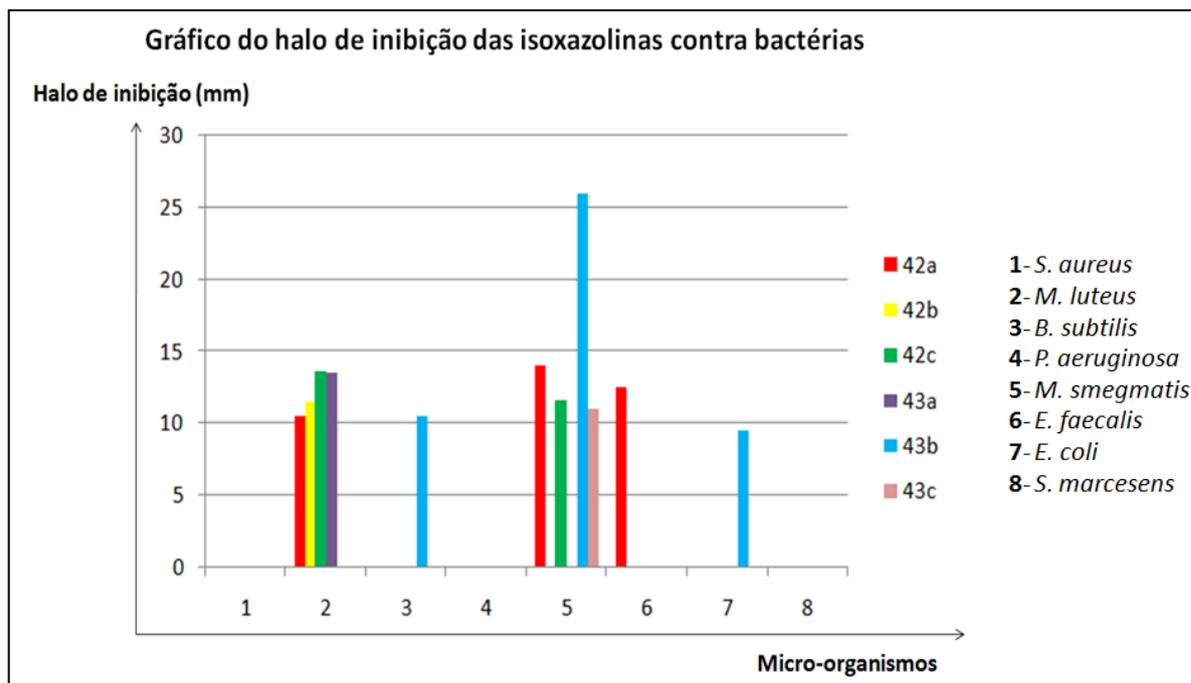


Gráfico 1. Valores dos halos de inibição, em milímetros (mm), das aril isoxazolininas nas formas de base livre e de cloridratos.

Os principais resultados das placas de difusão estão exemplificados na figura 20. As imagens de A a F exemplificam os resultados de alguns dos halos de inibição promovidos pelas moléculas sintetizadas neste trabalho contra o desenvolvimento de alguns micro-organismos. As numerações inscritas nas placas referem-se aos respectivos compostos obtidos: 1 e 2 (pertencem a outro trabalho), 3 (**45b**), 4 (**46b**), 5 (**46a**), 6 (**46c**), 7 (**45a**) e 8 (**45c**).

As imagens A e B são do meio de cultura Ágar Müller Hinton que contem o micro-organismo *Micrococcus luteus* DAUFPE 06. Nelas observam-se os halos desenvolvidos pelos compostos **45a**, **45c**, **46a** e **46b**. Na imagem C observa-se um pequeno halo desenvolvidido pelo composto **46b** contra *Serratia marcescens* DAUFPE 398, enquanto na imagem D este mesmo composto apresentou inibição frente à *Bacillus subtilis* DAUFPE 16. Já na imagem E, observa-se um grande halo de inibição (26 mm), superando até a ampicilina (halo de 14 mm), desenvolvido pelo cloridrato de aril isoxazolinina *p*-Cl **46b**, frente à *Micobacterium smegmatis* DAUFPE 71, enquanto que a sua base livre em N6, o composto **45b**, não apresentou atividade para *M. smegmatis* DAUFPE 71. Na imagem F, observa-se um pequeno halo formado contra o *Enterococcus faecalis* DAUFPE 138, promovido pelo composto **45a**.

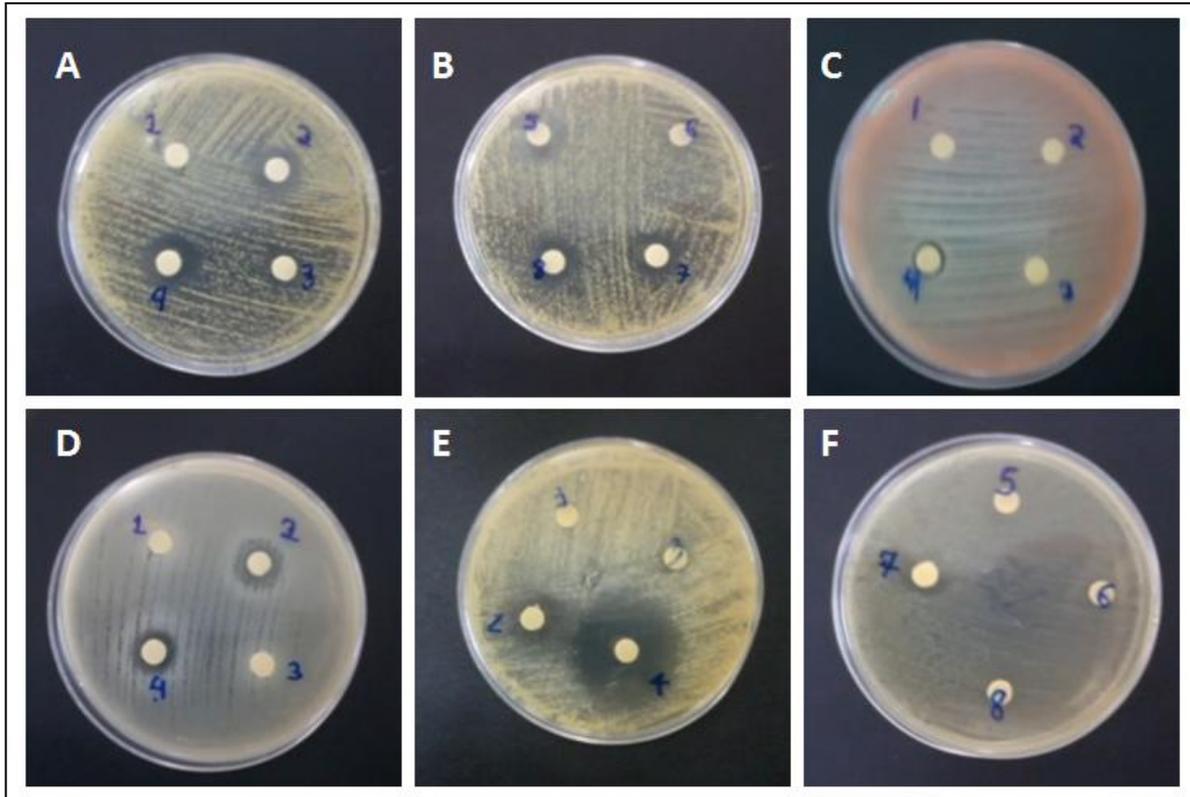


Figura 20. Placas de difusão dos principais halos de inibição das aril isoxazolinias na forma de base livre e de cloridratos frente a bactérias gram positivas e gram negativas.

CAPÍTULO 6

Procedimentos experimentais

6.0 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

6.1 Parte química:

Durante a execução do projeto, algumas etapas exigiram maiores atenções até mesmo antes de iniciar a realização dos experimentos. Algumas reações por apresentarem sensibilidade à umidade precisaram ser realizadas sob atmosfera de Argônio. São exemplos, a síntese dos enecarbamatos endocíclicos, a cicloadição 1,3-dipolar e a formação dos cloretos de hidroximinóilas. Além disto, todas as vidrarias permaneceram por cerca 4h a temperatura de 120 °C na estufa. Da mesma forma, para estas reações, os seus respectivos solventes foram devidamente secos e destilados (THF – sódio/benzofenona; Et₃N – CaH₂; CHCl₃ – CaCl₂; MeOH – I₂/ Mg⁰).

Os procedimentos de purificação das moléculas foram realizados através de colunas cromatográficas flash utilizando sílica gel 60 (230-400 mesh) como fase estacionária e acetato de etila, hexano e em algumas, isopropanol, em suas devidas proporções, como fase móvel, estando estes previamente destilados.

A reação de hidrogenólise foi realizada a temperatura ambiente borbulhando-se hidrogênio diretamente no meio reacional, deixando-o em pressão positiva.

Todas as reações foram acompanhadas durante a execução e após seu final por cromatografia em camada delgada utilizando-se lâminas cromatográficas de alumínio de 0,2 mm de espessura, contendo sílica gel 60 aderidas em uma de suas superfícies. Após aplicação da amostra na lâmina cromatográfica e eluição da mesma, estas foram analisadas através de luz ultravioleta no comprimento de onda de 254 nm. Em alguns casos, como na formação dos enecarbamatos, também foi utilizada uma câmara de Iodo (Iodo metalóide macerado em sílica gel 60) como revelador e também revelação em ácido fosmomolibdico em solução etanólica.

Nas reações com ultrassom utilizou-se o aparelho UNIQUE[®] USC 1400-A, apresentando frequência de 40 KHz.

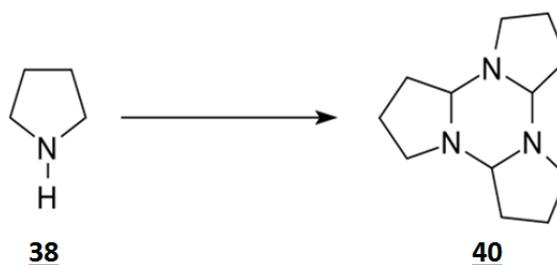
As faixas de fusão dos produtos sólidos foram mensuradas através do equipamento FISATON[®] 431D, à seco com leitura digital.

Os espectros de absorção na região do infravermelho foram obtidos utilizando-se o equipamento PerkinElmer[®] (Spectrum 400), com dispositivo de reflectância total atenuada (ATR) com cristal de Seleneto de Zinco. As frequências de absorção foram expressas em cm⁻¹.

Os espectros de Massas foram obtidos através da utilização do equipamento da marca Shimadzu LCMS IT TOF com detecção do íon molecular (m/z).

Os espectros RMN de ^1H , RMN de ^{13}C foram obtidos em equipamento Varian Unity[®] 300 e 400 MHz. Os deslocamentos químicos são expressos em ppm, tendo como padrão interno o tetrametilsilano para RMN ^1H . Os solventes empregados nas análises foram o CDCl_3 e a D_2O . Os sinais dos espectros de RMN ^1H são designados da seguinte forma: deslocamento químico (δ), multiplicidade (s = singlete, d = dubleto, dl = dubleto largo, t = tripleto, tl = tripleto largo, q = quarteto, dd = duplo dubleto, dt = duplo tripleto, ddl = duplo dubleto largo, m = multiplete, ml = multiplete largo, sl = sinal largo), constante de acoplamento (Hz) e número de hidrogênios.

6.1.1 Síntese do trímero da 1-pirrolina **40**



Uma solução aquosa de persulfato de sódio 25% (33,82 g; 144 mmols; 90 mL água) foi adicionada lentamente a uma solução de pirrolidina (11,6 mL; 144 mmols), hidróxido de sódio (11,5 g; 288 mmols) e nitrato de prata (0,118 g, 0,65 mmols) previamente adicionados a uma balão reacional em agitação e solubilizados em 90 mL de água à 0 °C. Ao final da adição lenta da solução do persulfato de sódio, a reação foi deixada em agitação por mais 1 hora a 0 °C e em seguida à temperatura ambiente por mais 3 horas.

Depois de decorrido este intervalo de tempo, procedeu-se a extração da amostra com diclorometano (3 x 40 mL). Secou-se a fase orgânica resultante com sulfato de sódio anidro e após remoção do solvente obteve-se 7,04 g de um líquido amarelado viscoso, correspondendo a um rendimento de 73%.

PROPRIEDADES FÍSICAS DO COMPOSTO **40**

Óleo amarelo viscoso

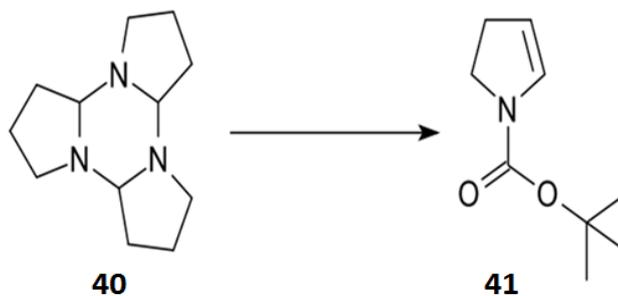
Sensível a solventes próticos

DADOS ESPECTROMÉTRICOS DO COMPOSTO **40**

^1H RMN (CDCl_3 , δ , ppm, 300MHz, t.a).

1,75 (m); 2,28 (m); 2,5 (m); 2,99 (m); 3,82 (m); 7,59 (s)

6.1.2 – Síntese do *N*-(*t*-butoxicarbonil)-2-pirrolina **41**



Em atmosfera de argônio, uma solução do trímero da 1-pirrolina (2,56 g; 12,4 mmols; 125 mL de THF) foi codestilada a temperatura de aproximadamente 60 °C. Após 30 minutos sob-refluxo, foi adicionado ao meio reacional o di-metil amino pirridina (DMAP) (0,46 g, 3,84 mmols). Em seguida, foi realizada a adição lenta do dicarbonato de di-*tert* butilla (5,7 mL, 24,8 mmols). A reação permaneceu em agitação por 12 horas a 60 °C. Após o final da reação, foi removido completamente o solvente e obteve-se um óleo marrom.

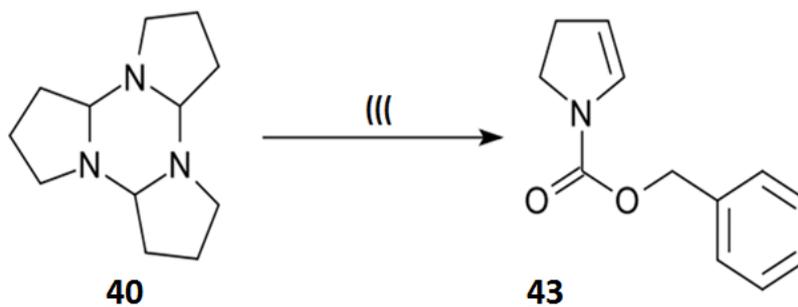
O produto resultante foi submetido à cromatografia em coluna “flash” (gel de sílica, AcOEt/hexano 1:1), e obteve-se 2 g do enecarbamato **41**, correspondendo a um rendimento de 48%.

PROPRIEDADES FÍSICAS DO COMPOSTO 41

Óleo incolor

R_f = 0,45 (AcOEt/hexano 1:9)

6.1.3 – Síntese do *N*-(benzilóxicarbonil)-2-pirrolina **43**



Uma solução do trímero da 1-pirrolina (2,56 g; 12,4 mmols; 120 mL de THF), em atmosfera de argônio, foi submetida à sonicação por 30 minutos a temperatura de 55°C. Em seguida adicionou-se a trietilamina a reação (2,1 ml; 16,12 mmols) e o sistema foi sonicado por mais 30 minutos.

Em seguida, foi iniciada a adição lenta do benzilóxicarbonila (3,35 mL, 24,8 mmols), mantendo-se durante todo processo a sonicação.

Após o término da adição do benzilóxicarbonila, a solução foi sonicada por mais 30 minutos. Durante a adição do benzilóxicarbonila verificou-se a formação de uma suspensão amarelada, que posteriormente foi filtrada em funil sinterizado, e após remoção completa do solvente obteve-se um óleo amarelo escuro. Este foi submetido à cromatografia em coluna “flash” (gel de sílica, AcOEt/hexano 3:7), obtendo 2,52 g do enecarbamato **43**, correspondendo a um rendimento de 50%.

PROPRIEDADES FÍSICAS DO COMPOSTO 43

Óleo incolor

R_f = 0,37 (AcOEt/hexano 1:9)

DADOS ESPECTROMÉTRICOS

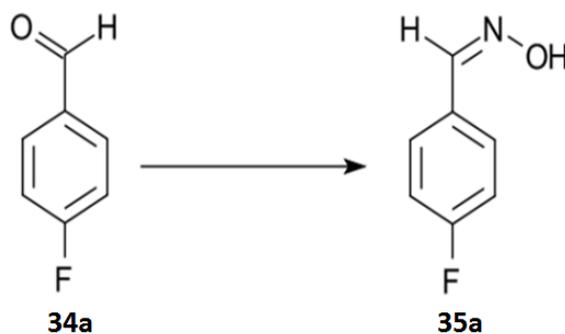
¹H RMN (CDCl₃, δ, ppm, 300MHz, t.a),

2,64 (ql; J= 9,7 Hz; 2H); 3,77 (q; J = 9,1 Hz; 2H); 5,02 e 5,07 (m, 1H, rotâmeros); 5,17 (s; 2H); 6,54 e 6,63 (m, 1H, rotâmeros); 7,35 (m; 5H).

I.V.(filme, cm⁻¹), principais sinais.

3.032, 2.956, 1.706, 1.618, 1.422, 1.342, 1.214, 1.128, 756, 698.

6.1.4 Síntese da 4-fluorobenzaldoxima **35a**



O 4-fluorobenzaldeído **34a** (2,786 g; 22 mmols, 60 mL de THF) foi dissolvido em THF e deixado em um balão à temperatura ambiente sob agitação. Após completa solubilização do mesmo, foi adicionada uma solução hidroalcoólica (30 ml de água, 30 ml de MeOH) ao meio reacional. Em seguida, introduziu-se a reação o cloridrato de hidroxilamina (3,057 g; 44 mmols) e após sua solubilização adicionou-se o acetato de sódio (5,425 g; 66 mmols). Após este procedimento, deixou-se a reação em agitação durante 24 horas.

Decorrido este intervalo de tempo adicionou-se a mistura reacional 30 ml de uma solução saturada aquosa de NaHCO_3 , e em seguida promoveu-se a extração com diclorometano (3 x 40 mL). À fase orgânica resultante foi adicionada o CaCO_3 anidro, previamente seco na estufa. A amostra foi filtrada e após completa remoção do solvente obteve-se a 4-fluorobenzaldoxima **35a**, correspondendo um rendimento de 97%.

PROPRIEDADES FÍSICAS DO COMPOSTO **35a**

Sólido branco amorfo

$R_f = 0,45$ (AcOEt/hexano 1:5)

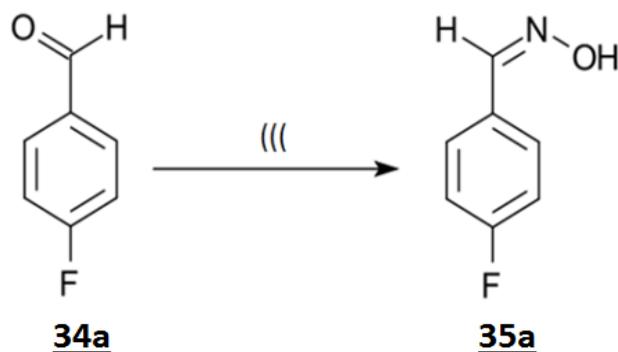
Faixa de Fusão = $81^\circ\text{C} - 83^\circ\text{C}$

DADOS ESPECTROMÉTRICOS

I.V. (cm^{-1}), principais sinais.

3.257,68; 3.018,07; 1.883,62; 1.643,87; 1606,42, 1509,38; 957,11; 879,42; 824,67.

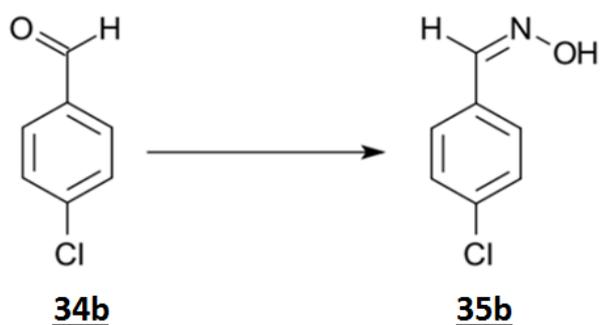
6.1.5 Síntese da 4-fluorobenzaldoxima através da sonicação



A uma solução do 4-fluorobenzaldeído **34a** (1,4 g, 11 mmols; 50 mL EtOH, foi adicionada o cloridrato de hidroxilamina (0,85 g, 12,23 mmols; 5 mL água) e a mistura reacional foi submetida a sonicação por 30 minutos, com uma potencia do aparelho de 40 KHz e a uma temperatura de 60° C.

Com o termino da reação foram realizadas três extrações com diclorometano. A fase orgânica resultante foi rota evaporada e após completa remoção do solvente obteve-se 1,42 g de 4-fluorobenzaldoxima **35a**, correspondendo a um rendimento de 91%.

6.1.6 Síntese da 4-clorobenzaldoxima **35b**



Procedimento experimental semelhante ao 6.1.4.

4-clorobenzaldeído **34b** (3.139 g; 22 mmols, 60 mL de THF), solução hidroalcoólica (30 ml de água, 30 ml de MeOH), cloridrato de hidroxilamina (3,057 g; 44 mmols), acetato de sódio (5,425 g; 66 mmols). Rendimento de 93%.

PROPRIEDADES FÍSICAS DO COMPOSTO **35b**

Sólido branco amorfo

R_f = 0,48 (AcOEt/hexano 1:5)

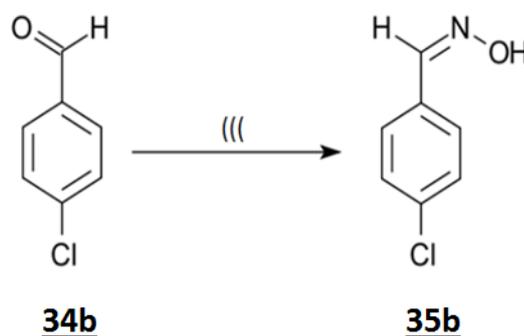
Faixa de Fusão = 107°C – 108 °C

DADOS ESPECTROMÉTRICOS

I.V. (cm⁻¹), principais sinais.

3.259, 3.056,13; 1868,98; 1.654,95; 1596,12, 1493,52; 954,55; 873,75; 821,54.

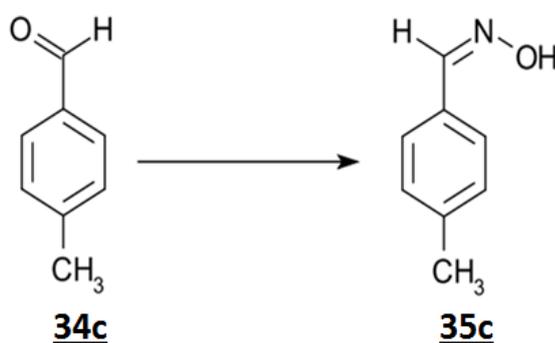
6.1.7 Síntese da 4-clorobenzaldoxima através da sonicação



Procedimento experimental semelhante ao 6.1.5.

4-clorobenzaldeído **34b** (2,8 g, 19,9 mmols; 100 mL EtOH), cloridrato de hidroxilamina (1,7 g, 24,46 mmols; 50 mL água). Obteve-se 2,94 g do produto, correspondendo a um rendimento de 88.2%.

6.1.8 Síntese da 4-toluilbenzaldoxima **35c**



Procedimento experimental semelhante ao 6.1.4.

4-toluilbenzaldoxima **34c** (2.64 g; 22 mmols, 60 mL de THF), solução hidroalcoólica (30 ml de água, 30 ml de MeOH), cloridrato de hidroxilamina (2,82 g; 44 mmols), acetato de sódio (5,425 g; 66 mmols). Rendimento de 95%.

PROPRIEDADES FÍSICAS DO COMPOSTO 35c

Sólido amarelado amorfo

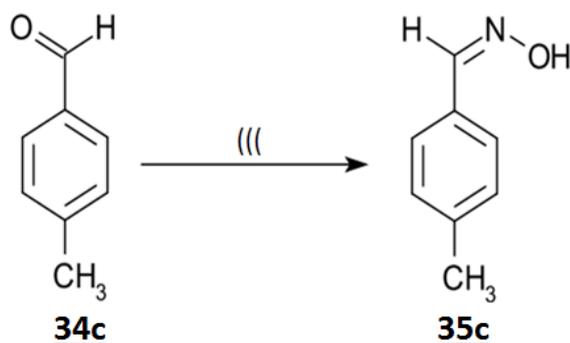
R_f = 0,53 (AcOEt/hexano 1:5)

Faixa de Fusão = 75°C – 76 °C

DADOS ESPECTROMÉTRICOS

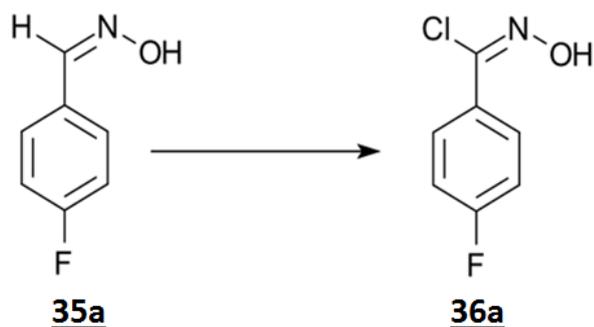
I.V. (cm⁻¹), principais sinais.

3225,75; 3110,61; 2987,19; 2916,40; 1608,29; 1513,58; 1286,99; 957,30; 812,98.

6.1.9 Síntese da 4-toluilbenzaldoxima através da sonicação

Procedimento experimental semelhante ao 6.1.5.

4-tertbutilbenzaldeído **34c** (2,38 g, 19,9 mmols; 100 mL EtOH), cloridrato de hidroxilamina (1,7 g, 24,46 mmols; 50 mL água). Obteve-se a massa de 2,44 g, correspondendo a um rendimento de 90%.

6.1.10 Síntese do cloreto de 4-fluorofenilhidroxiiminoíla 36a

Em um balão solubilizou-se o NCS, previamente pesado (0,739 g, 5,5345 mmols, 20 mL de CHCl₃). A este foi adicionado uma solução de piridina 6% em hexano (0,33 mL) e em

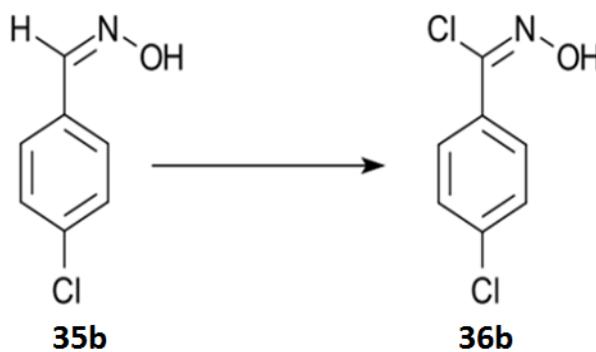
seguida, acrescentou-se a reação a 4-fluorobenzaldoxima **35a** (0,5180 g, 3,7266 mmols). Decorridos cerca de duas horas de reação, foi adicionado a mesma 10 mL de água destilada, e logo em seguida, duas gotas de HCl concentrado. A solução resultante foi extraída com clorofórmio (3x 20 mL). Após completa remoção do solvente obteve-se um sólido amarelo. Devido a grande reatividade dos cloretos de hidroxiiiminoílas formados, facilmente eles iniciam um processo de degradação com o surgimento de subprodutos o que dificulta o cálculo real do rendimento de tal reação. Por isso não foram expressos tais valores. Foi somente através da técnica descrita no capítulo 5 (seção 5.1.2.2) que conseguimos armazená-los por um período maior de tempo.

PROPRIEDADES FÍSICAS DO COMPOSTO 36a

Sólido amorfo amarelo

R_f = 0,47 (AcOEt/hexano 3:7)

6.1.11 Síntese do cloreto de 4-clorofenilhidroxiiiminoíla **36b**



Procedimento experimental semelhante ao 6.1.10.

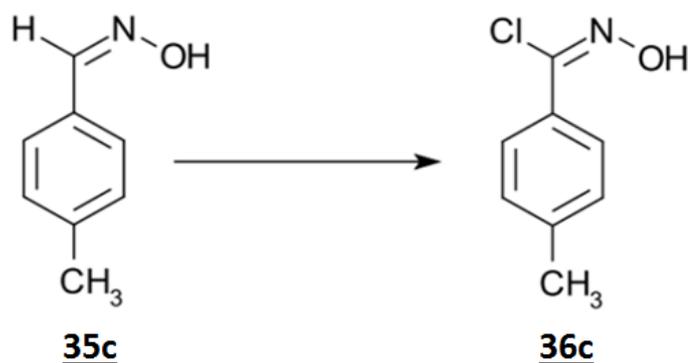
NCS (0,7390 g, 5,5345 mmols, 20 mL de CHCl₃), solução de piridina 6% em hexano (0,33 ml), 4-clorobenzaldoxima **35b** (0,5740 g, 3,6897 mmols).

PROPRIEDADES FÍSICAS DO COMPOSTO 36b

Sólido amorfo amarelo

R_f = 0,53 (AcOEt/hexano 3:7)

6.1.12 Síntese do cloreto de 4-toluilfenilhidroxiiminoíla **36c**



Procedimento experimental semelhante ao 6.1.10.

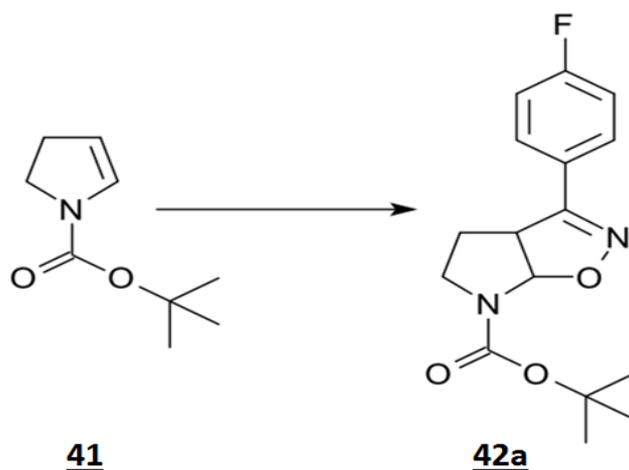
NCS (0,7390 g, 5,5345 mmols, 20 mL de CHCl_3), solução de piridina 6% em hexano (0,33 ml), 4-clorobenzaldoxima **35c** (0,5740 g, 3,6897 mmols).

PROPRIEDADES FÍSICAS DO COMPOSTO 36c

Sólido amorfo amarelo

$R_f = 0,6$ (AcOEt/hexano 3:7)

6.1.13 Síntese do 6-tert-butoxicarbonil-3-(4-fluorofenil)-3a,4,5,6a-tetrahidro-pirrol[3,2-d]isoxazol **42a**



Em atmosfera de argônio, dissolve-se o enecarbamato **41** no solvente adequado (1 g; 6,36 mmols; 50 mL de CHCl_3). Ao sistema reacional foi adicionada a trietilamina (2,5 mL; 17,9 mmols). Lentamente, foi introduzido o cloreto de hidroxiiminoíla *p*-F na reação e observou-se a formação de uma turvação na reação. O surgimento do cicloaduto **42a**, bem como o consumo do enecarbamato **41** foram acompanhadas através da cromatografia de

camada delgada (CCD). A suspensão resultante foi filtrada, e após completa remoção do solvente, obteve-se um óleo viscoso amarelado.

O produto resultante foi submetido à cromatografia em coluna “flash” (gel de sílica, AcOEt/hexano 1:5), obtendo 1,49 g do cicloaduto **42a**, correspondendo a um rendimento de 77%.

PROPRIEDADES FÍSICAS DO COMPOSTO 42a

Sólido amorfo branco

R_f = 0,29 (AcOEt/hexano 1:4)

DADOS ESPECTROMÉTRICOS

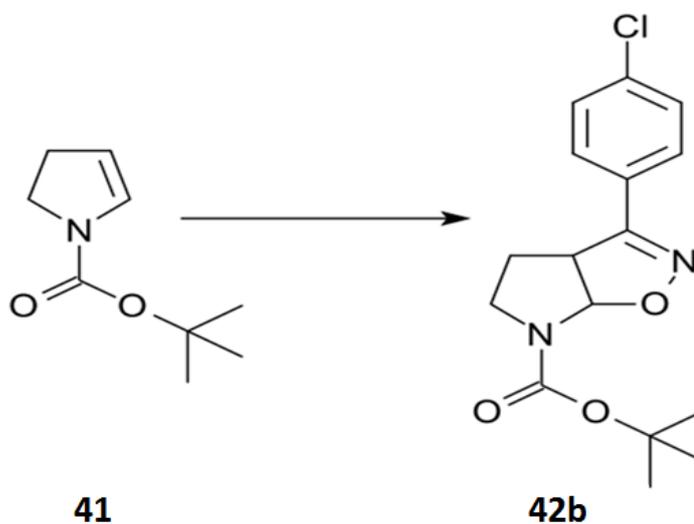
¹H RMN (CDCl₃, δ, ppm, 400MHz, t.a), presença de rotâmeros.

1,518 e 1,489 (s: 9H, rotâmeros); 2,133 (m; 1H); 2,270 (m, 1H); 3,130 (m: 1H); 3,758 e 3,680(m, 1H, rotâmeros); 4,233 (t; 1H); 6,336 e 6,468 (d: 1H, rotâmeros).

¹³C RMN (CDCl₃, δ, ppm, 400MHz, t.a)

28,314 (CH₃); 28,670(CH₂) 43,533 (CH₂), 51,619(CH), 80,989 (C), 92,823 (CH), 116,199 (CH), 124,641 (C), 128,924 (CH); 164,970 e 162,468 (d = 100 Hz; C-F); 156,234 (C=O).

6.1.14 – Síntese do 6-tert-butoxicarbonil-3-(4-clorofenil)-3a,4,5,6a-tetrahidro-pirrol[3,2-d]isoxazol **42b**



Procedimento experimental semelhante ao 6.1.13.

Enecarbamato **41** (1 g; 6,36 mmols; 50 mL de CHCl_3), trietilamina (2,5 mL, 17,9 mmols), cloreto de hidroxiiinoíla *p*-Cl **36b**. Massa obtida foi 1,53 g correspondendo ao rendimento de 75%.

PROPRIEDADES FÍSICAS DO COMPOSTO 42b

Sólido amorfo branco

R_f = 0,32 (AcOEt/hexano 1:4)

Faixa de fusão = 151 – 152 °C

DADOS ESPECTROMÉTRICOS

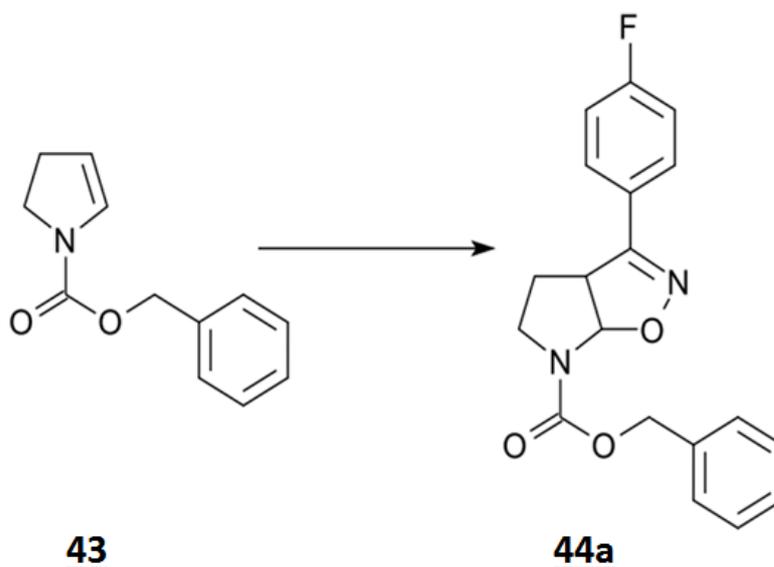
¹H RMN (CDCl_3 , δ , ppm, 400MHz, t.a), presença de rotâmeros.

1,519 e 1,490 (s: 9H, rotâmeros); 2,125 (m; 1H); 2,271 (m, 1H); 3,129 (m: 1H); 3,758 e 3,686(m, 1H, rotâmeros); 4,225 (t; 1H); 6,330 e 6,479 (d: 1H, rotâmeros).

¹³C RMN (CDCl_3 , δ , ppm, 400MHz, t.a)

27,880 (CH_2); 28,314 (CH_3) 43,533 (CH_2), 51,418(CH), 92,978 (CH), 128,142 (CH); 129,195 (CH); 156,234 (C=O).

6.1.15 – Síntese do (6-benziloxicarbonil)-(3-fluorofenil-3a,4,5,6a-tetrahidro-pirrol[3,2-*d*]isoxazol) **44a**



Procedimento experimental semelhante ao 6.1.13.

Enecarbamato **43** (1 g; 4,9 mmols; 50 mL de CHCl_3), trietilamina (2 mL, 14,7 mmols), cloreto de hidroxiiinoíla *p*-F **36a**. Rendimento de 42 %, correspondendo à massa de 0,66 g.

PROPRIEDADES FÍSICAS DO COMPOSTO 44a

Sólido amorfo branco

R_f = 0,30 (AcOEt/hexano 3:7)

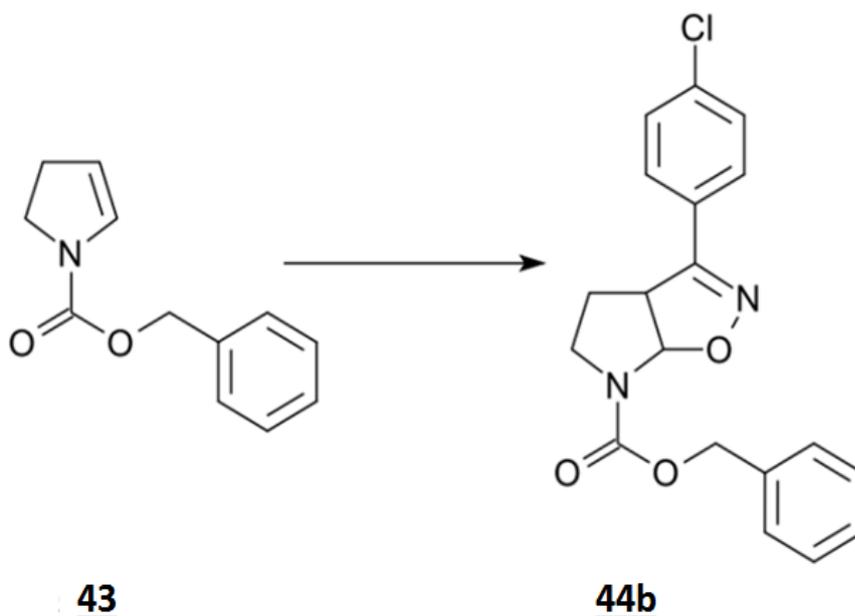
Faixa de fusão = 121 – 122 °C

DADOS ESPECTROMÉTRICOS

¹H RMN (CDCl₃, δ, ppm, 400MHz, t.a), presença de rotâmeros.

2,179 (m; 1H); 2,280 (m, 1H); 3,209 (m: 1H); 3,839 (m: 1H); 4,282 (t, 1H); 5,226 (m; 2H); 6,430 e 6,531 (d: 1H, rotâmeros).

6.1.16 Síntese do (6-benziloxicarbonil)-(3-clorofenil-3a,4,5,6a-tetrahidro-pirrol[3,2-d]isoxazol) 44b



Procedimento experimental semelhante ao 6.1.13.

Enecarbamato **43** (1 g; 4,9 mmols; 50 mL de CHCl₃), trietilamina (2 mL, 14,7 mmols), cloreto de hidroxiiiminoila *p*-Cl **36b**. Rendimento de 48 %, correspondendo à massa de 0,8 g.

PROPRIEDADES FÍSICAS DO COMPOSTO 44b

Sólido amorfo branco

R_f = 0,35 (AcOEt/hexano 3:7)

Faixa de fusão = 155 – 156 °C

DADOS ESPECTROMÉTRICOS

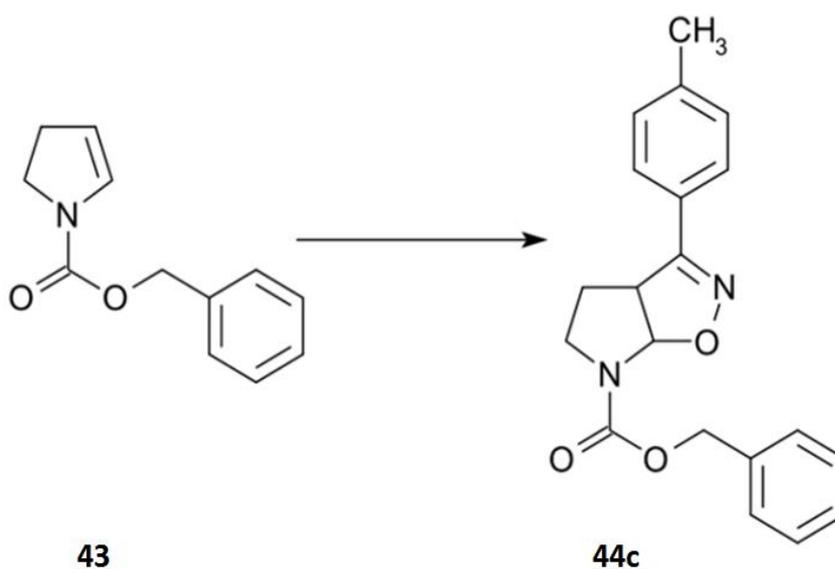
¹H RMN (CDCl₃, δ, ppm, 400MHz, t.a), presença de rotâmeros.

2,149 (m; 1H); 2,273 (m, 1H); 3,199 (m: 1H); 3,834 (m: 1H); 4,270 (t, 1H); 5,223 (m; 1H); 6,434 e 6,535 (d: 1H, rotâmeros).

¹³C RMN (CDCl₃, δ, ppm, 400MHz, t.a), presença de rotâmeros.

27,841 e 28,662 (CH₂, rotâmeros); 43,959 e 44,129 (CH₂, rotâmeros), 50,604 e 51,673 (CH, rotâmeros), 67,458 (CH₂), 92,575 e 93,288 (CH), 136,359 (C); 156,350 (C=O).

6.1.17 Síntese do (6-benziloxicarbonil)-(3-toluilfenil-3a,4,5,6a-tetrahidro-pirrol[3,2-d]isoxazol) 44c



Procedimento experimental semelhante ao 6.1.13.

Enecarbamato 43 (1 g; 4,9 mmols; 50 mL de CHCl₃), trietilamina (2 mL, 14,7 mmols), cloreto de hidroxiiiminoila *p*-toluil 36c. Rendimento de 57 %, correspondendo à massa de 0,89 g.

PROPRIEDADES FÍSICAS DO COMPOSTO 44c

Sólido amorfo branco

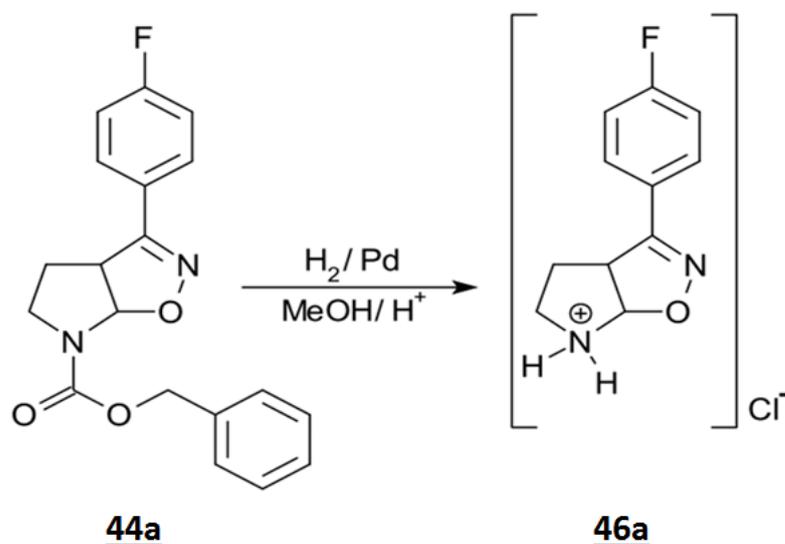
R_f = 0,38

Faixa de fusão = 132 – 134 °C

Através da comparação do valor do R_f deste composto 44c com os valores de R_f daqueles estruturalmente semelhantes 44a e 44b, pudemos observar que seguia a proporção esperada. A reação de cicloadição para formação de 44c também se procedeu dentro do

esperado com a formação apenas de um produto. Entretanto, este foi posteriormente utilizado na reação subsequente onde se pode então confirmar a estrutura do produto final esperado através das técnicas de RMN ^1H e ^{13}C . Por isso não disponibilizamos os dados espectrométricos deste intermediário.

6.1.18 Síntese do 3-(4-fluorofenil)-4,5,6,6a-tetrahidro-3aH-pirrol[3,2-d]isoxazol-6-íon cloreto 46a através da hidrogenólise em meio ácido.



Dissolveu-se o cicloadulto 44a (47,6 mg; 0,14025 mmols) em 10 mL de uma solução de HCl 0,05M em MeOH seco. Em seguida, adicionou-se 1,3 mg de Pd(OH) e, posteriormente iniciou-se o borbulhamento contínuo de hidrogênio na reação. Esta permaneceu em agitação a temperatura ambiente por cerca de 50 minutos. Ao término da reação, realizou-se a filtração da mesma em funil sinterizado e levou-a ao evaporador rotatório para eliminação do solvente. Obteve-se ao final um produto sólido com rendimento de 53%.

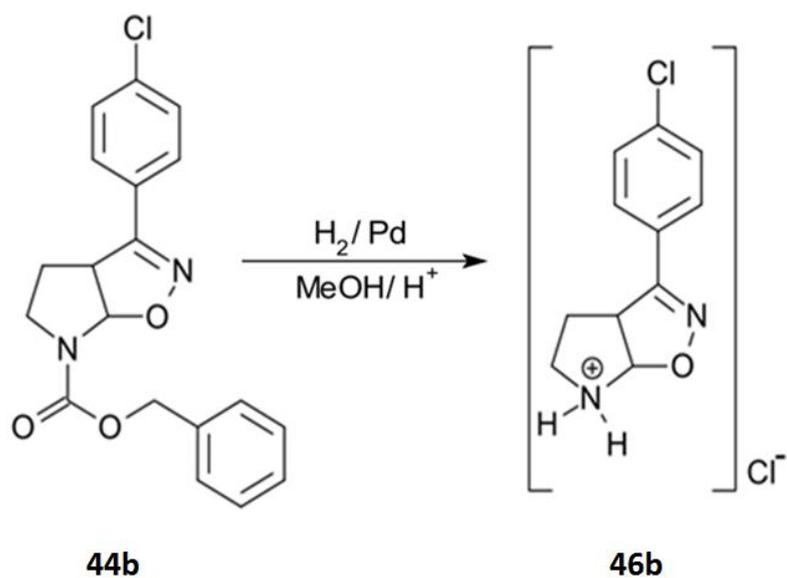
PROPRIEDADES FÍSICAS DO COMPOSTO 44a

Sólido amorfo branco

Rf = 0 (AcOEt/hexano 3:2)

Faixa de fusão = 187 – 189 °C

6.1.19 Síntese do 3-(4-clorofenil)-4,5,6,6a-tetrahidro-3aH-pirrol[3,2-d]isoxazol-6-íon cloreto 46b através da hidrogenólise em meio ácido.



Procedimento semelhante ao 6.1.22

Cicloadulto **44b** (50 mg; 0,14025 mmols); 10 mL de MeOH seco; 1,3 mg de Pd(OH).
Rendimento de 64%.

PROPRIEDADES FÍSICAS DO COMPOSTO 46b

Sólido amorfo amarelado

R_f = 0 (AcOEt/hexano 3:2)

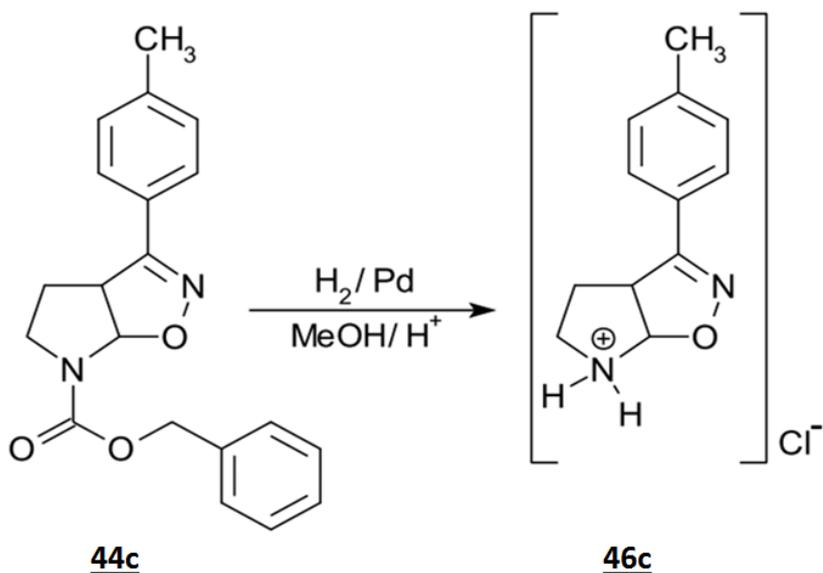
Faixa de fusão = 194 – 196 °C

DADOS ESPECTROMÉTRICOS

¹H RMN (CDCl₃, δ, ppm, 400MHz, t.a), presença de rotâmeros.

2,22 (ml: 1H); 2,4 (ml: 1H); 3 (m, 1H); 3,4 (m: 1H); 6,22 (d: 1H); 7,4 (d, 1H) e 7,6 (d; 1H).

6.1.20 Síntese do 3-(4-toluilfenil)-4,5,6,6a-tetrahidro-3aH-pirrol[3,2-d]isoxazol-6-íon cloreto 46c através da hidrogenólise em meio ácido.



Procedimento semelhante ao 6.1.20

Cicloadulto **44c** (47,05 mg; 0,1 mmol); 10 mL de MeOH seco; 1,3 mg de Pd(OH). Rendimento de 58%.

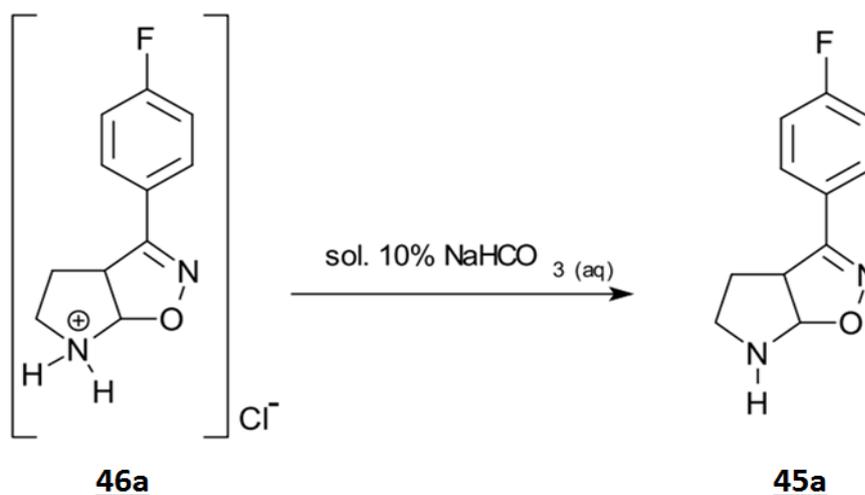
PROPRIEDADES FÍSICAS DO COMPOSTO 46c

Sólido amorfo branco

R_f = 0 (AcOEt/hexano 3:2)

Faixa de fusão = 181 – 183 °C

6.1.21 Síntese do 3-(4-fluorofenil)-4,5,6,6a-tetrahidro-3aH-pirrol[3,2-d]isoxazol através da basificação do composto **46a**.



Adicionou-se uma solução aquosa 10% de NaHCO_3 (10 mL) ao cloridrato de p-F **46a** (40 mg; 0,164 mmols). Após isto, mediu-se o pH com uma fita pHmétrica e observou-se uma faixa de pH em torno de 8-9. Em seguida promoveu-se uma extração do produto obtido com CH_2Cl_2 (4 x 10 mL), secou-se a fase orgânica com Na_2SO_4 , filtrou-se e em seguida promoveu-se a rota evaporação. Rendimento quantitativo.

PROPRIEDADES FÍSICAS DO COMPOSTO **45a**

Sólido amorfo amarelo

$R_f = 0,21$ (AcOEt/hexano 1:4)

Faixa de fusão = 149 – 151 °C

DADOS ESPECTROMÉTRICOS

^1H RMN (CDCl_3 , δ , ppm, 400MHz, t.a.)

1,9 (m; 1H); 2,1 (m; 1H); 2,6 (s, 1H); 2,8 (m; 1H); 3 (m, 1H); 4 (t: 1H); 5,58 (d: 1H); 7 (d: 1H) e 7,6 (d: 1H).

^{13}C RMN (CDCl_3 , δ , ppm, 400MHz, t.a)

30,048 (CH_2); 43,037 (CH_2); 50,58 (CH), 98,29 (CH), 126,415 (C), 126,68 (CH); 129,43 (CH); 140 (C); 162,26 e 164,75 (d: C-F).

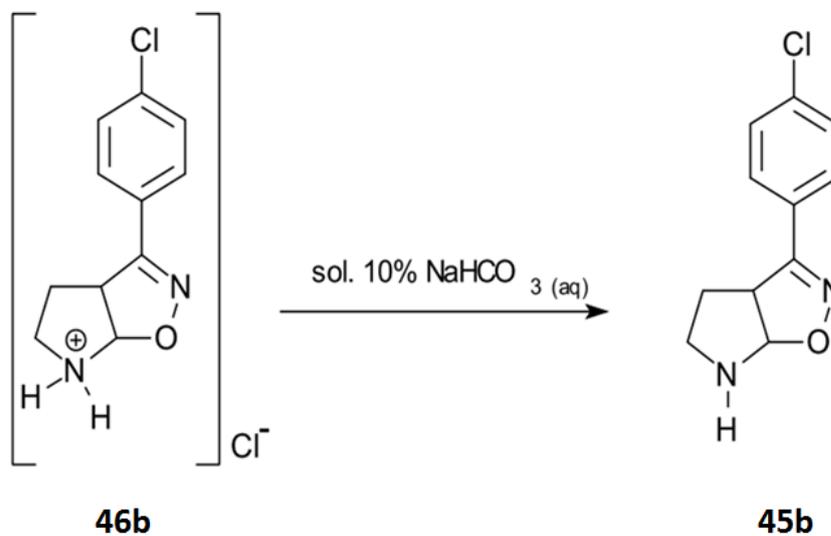
I.V. (cm^{-1}), principais sinais.

3377,36; 2963,03; 2840,91; 1603,84; 1510,60; 1414,94; 1353,86; 1221,46; 918,22; 815,94.

HRMS-IT-TOF, íon molecular (m/z)

207.

6.1.22 Síntese do 3-(4-clorofenil)-4,5,6,6a-tetrahidro-3aH-pirrol[3,2-d]isoxazol através da basificação do composto 46b.



Procedimento experimental semelhante ao 6.1.25.

Sol. NaHCO₃ 10% (10 mL); cloridrato de *p*-Cl (42 mg; 0,164 mmols).

PROPRIEDADES FÍSICAS DO COMPOSTO 45b

Sólido amorfo amarelado

R_f = 0,24 (AcOEt/hexano 1:4)

Faixa de fusão = 156 – 158 °C

DADOS ESPECTROMÉTRICOS

¹H RMN (CDCl₃, δ, ppm, 400MHz, t.a).

1,9 (m; H); 2,1 (m; 1H); 2,9 (sl, 1H); 3,1 (m; 1H); 4 (t; 1H); 6,05 (d; 1H); 7,4 (d; 1H) e 7,6 (d; 1H).

¹³C RMN (CDCl₃, δ, ppm, 400MHz, t.a)

30,064 (CH₂); 43,037 (CH₂) 50,20 (CH); 98,526 (CH); 127,85 (C); 127,94 (CH); 129,04 (CH); 135,73 (C) e 156,65 (C-Cl).

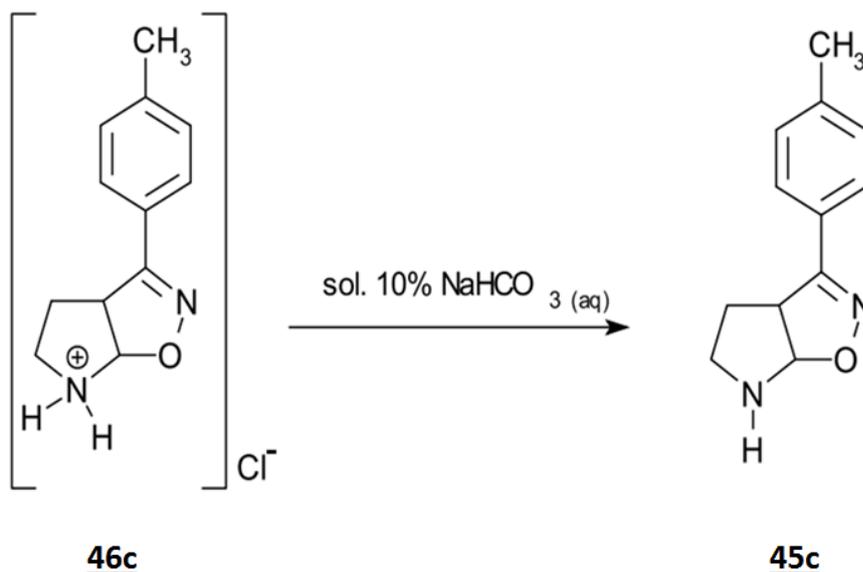
I.V. (cm⁻¹), principais sinais.

3335,41; 2970,20; 2931,16; 2873,04; 1587,91; 1492,32; 1089,33; 929,60; 829,26.

HRMS-IT-TOF, íon molecular (m/z)

223,05.

6.1.23 Síntese do 3-(4-toluilfenil)-4,5,6,6a-tetrahidro-3aH-pirrol[3,2-d]isoxazol através da basificação do composto 46c.



Procedimento experimental semelhante ao 6.1.25.

Sol. NaHCO₃ (aq.) 10% (10 mL); cloridrato *p*-toluil (39,11 mg; 0,164 mmols).

PROPRIEDADES FÍSICAS DO COMPOSTO 45c

Sólido amorfo amarelado

R_f = 0,27 (AcOEt/hexano 1:4)

Faixa de fusão = 142 – 144 °C

DADOS ESPECTROMÉTRICOS

¹H RMN (CDCl₃, δ, ppm, 400MHz, t.a), presença de rotâmeros.

1,85 (m; 1H); 2,08 (m; 1H); 2,81 (ml, 1H); 2,3 (t; 3H); 3,01 (m; 1H); 4 (t; 1H); 5,59 (d; 1H); 7,1 (d; 1H) e 7,5 (d; 1H).

¹³C RMN (CDCl₃, δ, ppm, 400MHz, t.a)

21,37 (CH₃); 30,17 (CH₂) 43,037 (CH₂), 51,418(CH), 50,61 (CH), 97,85 (CH); 126,41 (C); 126,70 (CH); 129,45 (CH); 140,031 (C) e 157,51 (C).

I.V. (cm⁻¹), principais sinais.

3366,66; 2976,887; 2954,93; 2940,61; 1929,03; 1410,98; 1355,78; 1271,97; 918,26; 822,48.

HRMS-IT-TOF, íon molecular (m/z)

203.

CAPÍTULO 7

Conclusões e perspectivas

7.0 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Neste trabalho pudemos explorar a aplicação química e biológica das novas 3-aryl-2-isoxazolina[5,4-*d*]pirrolidinas em suas formas de base livre e de cloridratos. Observamos características destes heterobisciclos, até então desconhecidas, como por exemplo, o fenômeno da degradação dos cicloadutos durante a desproteção de N6. Este acontecimento, só havia sido verificado, anteriormente, durante a desproteção de N6 em cicloadutos piperilidínicos desenvolvidos em outros estudos de nosso grupo.

Este fenômeno serviu de base para que pudéssemos reavaliar a metodologia empregada durante a hidrogenólise dos cicloadutos **44b**, passando a desenvolvê-la em meio ácido e obtendo as nossas isoxazolinas aril substituídas sem observar a degradação do biciclo.

Neste mesmo trabalho, continuamos a explorar as reações de cicloadição 1,3-dipolar, úteis na inserção de heteroátomos em estruturas orgânicas, realizando-a entre enecarbamatos endocíclicos de cinco membros **41** e **43** com *N*-óxidos de nitrila **37**, apresentando rendimentos moderados. Ainda pudemos explorar, nesta pesquisa, a utilização da sonicação que de modo bastante simples diminuiu expressivamente o tempo das reações de obtenção das aril-oximas **35** e do enecarbamato **43**, com rendimentos razoáveis.

No estudo biológico fez-se um *screening* dos compostos obtidos testando-os contra diferentes espécies de micro-organismos, entre bactérias gram positivas e gram negativas. Através do método de difusão em disco foi avaliado o perfil de inibição dos compostos obtidos frente aos micro-organismos, tendo a ampicilina com fármaco padrão neste estudo. Observamos o maior halo de inibição (26 mm) com o cloridrato de aril isoxazolina *p*-Cloro **46b** quando utilizado contra a bactéria álcool ácido resistente *Mycobacterium smegmatis* DAUFPE 71.

Os demais compostos que apresentaram maiores valores de halos de inibição foram os **45a** (halo de 14 mm frente à *Mycobacterium smegmatis* DAUFPE 71 e 12,5 mm frente à *Enterococcus faecalis* DAUFPE 138), **45b**, **46a** e **46b** (halos de 11,5, 13,5 e 13,5 mm, respectivamente, frente à *Micrococcus luteus* DAUFPE 06).

Verificamos, portanto, que os objetivos pretendidos no projeto inicial, quanto à parte química e biológica, foram executados, em sua maioria, apresentando resultados satisfatórios, quanto à via de síntese e aos resultados obtidos em relação à ação antimicrobiana dos compostos obtidos. Além disso, também pudemos neste estudo utilizar novas metodologias que se mostraram bastantes satisfatórias quando comparadas com os métodos tradicionais, também utilizados.

Sendo assim, temos como futuras pretensões à continuidade destes trabalhos a fim de podermos explorar ainda mais os estudos químicos e biológicos sobre o biciclo isoxazolínico com a possibilidade de:

Expandir a serie de isoxazolinas bicíclicas-pirrolidínicas aril substituídas na forma de base livre em N6 e de suas formas de cloridratos;

Comparar os seus potenciais antimicrobianos, anti-inflamatórios e antitumorais através dos estudos biológicos;

Avaliar a citotóxica dos cicloadutos obtidos e também dos derivados complementares da serie;

Introduzir grupamentos na porção N-H livre das isoxazolinas e também verificar suas potenciais atividades biológicas.

REFERÊNCIAS

- 1- BARREIRO, E. J.. **A Química Medicinal e o paradigma do composto-protótipo**. Rev. Virtual Quim., v. 1 (1), p. 26-34, 2009.
- 2- BARREIRO, E. J., FRAGA, C. A. M., MIRANDA, A. L. P., RODRIGUES, C. R.. **A Química medicinal de N-acilidrazonas: novos compostos-protótipos de fármacos analgésicos, antiinflamatórios e anti-trombóticos**. Quim. Nova, v. 25, n. 1, p. 129-148, 2002.
- 3- BARREIRO, E. J., MENEGATTI, R., FRAGA, C. A. M.. **A importância da síntese orgânica de fármacos**. Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola. N. 3, 2001.
- 4- ROCHA, D. R., FERREIRA, V. F. e SANTOS W. C.. **Aspectos da Síntese Orgânica no Desenvolvimento de Métodos e de Moléculas Biologicamente Ativas**. Revista Processos Químicos. Goiânia, v.2, n.3, ano 2, pág 9-22, jan/jun 2008.
- 5- DONNICI, C. L., MELO, J. O. F., AUGUSTI, R., FERREIRA, V. F., SOUZA, M. C. B. V., FERREIRA, M. L. G. e CUNHA, A. C.. **Heterociclos 1,2,3-triazólicos: histórico, métodos de preparação, aplicações e atividades farmacológicas**. Quim. Nova, v. 29, n. 3, p. 569-579, 2006
- 6- DALANOCE, C. FRIGERIO, F., GRAZIOSO, G., MATERA, C., VISCONTI, G. L., AMICIA, M., PUCCI, L., PISTILLO, F., FUCILE, S., GOTTI, C., CLEMENTI, F., MICHELI, C.. **New spirocyclic Δ^2 -isoxazoline derivatives related to selective agonists of $\alpha 7$ neuronal nicotinic acetylcholine receptors**. European Journal of Medicinal Chemistry., v. 46, p. 5790 – 5799, 2011.
- 7- KE, S. SHI, L., HU, R., WEI, Y., LIANG, Y., YANG, Z.. **Anthranilic acid-based diamides derivatives incorporating aryl-isoxazoline pharmacophore as potential anticancer agents: Design, synthesis and biological evaluation**. European Journal of Medicinal Chemistry., v. 54, p. 549 - 556, 2012.

- 8- ROSA, R. R., VILELA, G. D., MERLO, A. A.. Síntese de precursores avançados para materiais orgânicos eletrônicos (MOE) derivados de isoxazóis a partir de Δ^2 -isoxazolidinas.** 34^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2011.
- 9- NONN, M. M.. Selective functionalization of alicyclic β -amino acids by 1,3-dipolar cycloaddition of nitrile oxides.** Institute of Pharmaceutical Chemistry, University of Szeged Szeged, Hungary, 2012.
- 10- JUNIOR, V. L., OLIVEIRA, K. T., SILVA, R. C., CONSTANTINO, M. G. e SILVA, G. V. J.. Reatividade em reações de Diels-Alder: uma prática computacional.** Quim. Nova, v. 30, n. 3, p. 727-730, 2007.
- 11- BHIMWAL, R., SHARMA, A. K., JAIN, A.. Synthesis, Characterization and In-Vitro Antimicrobial Evaluation of Some Novel Isoxazoline Derivatives.** Journal of Advanced Pharmacy Education & Research., v. 1(5), p. 251-258, 2011.
- 12- MONDAL P., JANA S., BALAJI A., RAMAKRISHNA R., KANTHAL LK.. Synthesis of some new isoxazoline derivatives of chalconised indoline 2 one as a potential analgesic, antibacterial and anthelmimtic agents.** Journal of Young Pharmacists., v. 4, p. 38-41, 2012.
- 13- GOLL, A. S., FARIA, M. G. I. Bacterial resistance as a result of use unsuitable of antibiotics.** Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research – BJSCR., v.5, n.1, p.69-72, dez. 2013/ fev. 2014.
- 14- HEINEN, J. E., FREDDO, R. J., COSTA, T. D.. Penetração tecidual de antibióticos.** Caderno de Farmácia, UFRGS, v. 17, n.1, p. 9-18, 2001.
- 15- QUADRELLI, P., PICANELLO, A., MELLA, M., CORSARO, A., PISTANA, V.. From cyclopentadiene to isoxazoline-carbocyclic nucleosides: a rapid access to biological molecules through aza Diels-Alder reactions.** Tetrahedron., v. 64, p. 3541-3547, 2008.

- 16- HAMME, A. T., DADIBOYENA, S., e VALENTE, E. J.. **Synthesis of Novel Pyrazoles via [2+3]-Dipolar Cycloaddition Using Alkyne Surrogates.** *Tetrahedron Lett.*, v. 51(9), p. 1341, 2010.
- 17- PERUMAL, S., MAHESWARI, S. U.. **A facile sequential three-component regio- and stereoselective synthesis of novel spiro-isoxazoline/acridinone hybrids.** *Tetrahedron Letters.*, v. 53, p. 6885–6888, 2012.
- 18- CORRAL, J. M. M., GORDALIZA, M., CASTRO, M. A., LÓPEZ-VÁZQUEZ, M. L., GARCÍA-GRÁVALOS. M. D., BROUGHTON, H. B., FELICIANO, A. S.. **Bioactive Isoxazoline and Oxime Derivatives from 7-Ketolignans.** *Tetrahedron.*, v. 53, n. 18, p. 6555-6564, 1997.
- 19- SHI, X., ZHONG, C., GAUTAM, L. N. S., WANG, D., AKHMEDOV, N. G., PETERSEN, J. L.. **Amine nucleophilic addition to nitroalkene as a new practical approach for the synthesis of fully substituted isoxazoline-N-oxide.** *Tetrahedron.*, v. 67, p. 4402-4411, 2011.
- 20- MERLO, A. A., PASSO, J. A, ECCHER, J., BECHTOLD, I. H. e KELLY, S. M.. **Síntese e caracterização de copolímeros de cadeia lateral derivados de acrilatos de 4,5-dihidroisoxazol e do (-)-mentol.** *Quim. Nova.*,v. 35, n. 8, p. 1527-1533, 2012.
- 21- TAVARES, A.. **Isoxazolina. Uma classe de materiais avançados revisitada.** Tese de Doutorado. UFRGS, nov., 2010.
- 22- MERLO, A.A., TAVARES, A., LIVOTTO, P. R., GONÇALVES, P. F. B.. **3-Arylisoxazolyl-5-Carboxylic Acid and 5-(Hydroxymethyl)-3-Aryl-2-Isoxazoline as Molecular Platforms for Liquid-Crystalline Materials.** *J. Braz. Chem. Soc.*, v. 20, n. 9, p. 742-1752, 2009.
- 23- FORMARIZ, T.P., URBAN, M. C. C., SILVA, A. A. J., Gremiao, M. P. D., Oliveira, A. G.. *Rer. Bras. Cienc. Farm.*, v. 41, p. 301, 2005.

- 24- CROUSSE, B., BONNET-DELPON, D., GONÇALVES, R. S. B., SANTOS, M., BERNADAT, G.. **A one-pot synthesis of 3-trifluoromethyl-2-isoxazolines from trifluoromethylaldoxime.** *Beilstein J. Org. Chem.*, v. 9, p. 2387–2394, 2013.
- 25- MONDAL, P., BANERJEE, M., JANA, S., BOSE, A.. **Synthesis and evaluation of 1,3 di-Substituted Schiff, mannich bases and spiro isatin derivatives.** *J Young Pharm.*, v. 2, p. 169-72, 2010.
- 26- NISHIYAMA, S., OGAMINO, T., OBATA, R.. **Asymmetric synthesis of aerothionin, a marine dimeric spiroisoxazoline natural product, employing optically active spiroisoxazoline derivative.** *Tetrahedron Letters* 47, 727–731, 2006.
- 27- NISHIYAMA, S., OGAMINO, T.. **Synthesis and structural revision of calafianin, a member of the spiroisoxazole family isolated from the marine sponge, *Aplysina gerardogreeni*.** *Tetrahedron Letters.*, v. 46, p. 1083–1086, 2005.
- 28- REDDY, K. R. V., SRIDHARA, A. M., KESHAVAYYA, J., AMBIKA, D. M. S., GOPINATH, V. S., BOSE, P., GOUD, S. K. e PEETHAMBAR, S. K.. **Synthesis, Antimicrobial and Cytotoxicity Studies of Some Novel Modified Strobilurin Derivatives.** *J. Braz. Chem. Soc.*, v. 22, n. 5, p. 849-856, 2011.
- 29- KNAUS, E. E., HABEEB, A. G., RAO, P. N. P.. **Design and Synthesis of 4,5-Diphenyl-4-isoxazolines: Novel Inhibitors of Cyclooxygenase-2 with Analgesic and Antiinflammatory Activity.** *J. Med. Chem.*, v. 44, p. 2921-2927, 2001.
- 30- CONTI, A. P., GRAZIOSO, G., TAMBORINI, L., MADSEN, U., NIELSEN, B., MICHELI, C.. **Synthesis of new isoxazoline-based acidic amino acids and investigation of their affinity and selectivity profile at ionotropic glutamate receptors.** *European Journal of Medicinal Chemistry.*, v. 46, p. 787-793, 2011.
- 31- AMICI, M., KLOTZ, K. N., DALLANOCE, C., MERONI, G., HOFFMANN, C., e MICHELI, C.. **Synthesis of enantiopure Δ^2 -isoxazoline derivatives and evaluation of their affinity and efficacy profiles at human β -adrenergic receptor subtypes.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry.*, v. 14, p. 4393–4401, 2006.

- 32- WONG, P. C., CRAIN, E. J., KNABB, R. M., MEADE, R. P., QUAN, M. L., WATSON, C. A., WEXLER, R. R., WRIGHT, M. R., E SLEE, A. M.. **Nonpeptide Factor Xa Inhibitors II. Antithrombotic Evaluation in a Rabbit Model of Electrically Induced Carotid Artery Thrombosis.** The Journal Ofpharmacology and Experimental Therapeutics., v. 295, p. 212–218, 2000.
- 33- LEE, R. E., HEVENER, K. E., BALL, D. M e BUOLAMWINI, J. K.. **Quantitative structure-activity relationship studies on nitrofuranyl antitubercular agents.** Bioorg Med Chem., v. 1; 16 (17), p. 8042–8053, 2008.
- 34- LEE, R. E., TANGALLAPALLY, R. P., SUN, D., budha, N., LEE, R. E. B., LENAERTS, A. J. M e MEIBOHM, B.. **Discovery of novel isoxazolines as anti-tuberculosis agents.** Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters., v. 17, p. 6638-6642, 2007.
- 35- RANGAPPA, K. S.. et al. **Anti-cancer activity of novel dibenzo[b,f]azepine tethered isoxazoline derivatives.** Sadashivaet al. BMC Chemical Biology, v. 12, p. 5, 2012.
- 36- FREITAS, M. R., et al. **The role of apoptosis in cisplatin-induced ototoxicity in rats.** Braz J Otorhinolaryngol., 2009.
- 37- GILBERT, M. R., LATERRA, J. J., GROSSMAN, S. A., CARSON, K. A., LASER, G. J. e HOCHBERG, F. H.. **Suramin and radiotherapy in newly diagnosed glioblastoma: Phase 2 NABTT CNS Consortium study.** Neuro-Oncology, jan., 2014.
- 38- KAI, H., MATSUMOTO, H., HATTORI, N., TAKASE, A., FUJIWARA, T. e SUGIMOTO, H.. **Anti-influenza Virus Activities of 2-AlkoxyiminoN-(2-isoxazolin-3-ylmethyl)acetamides.** Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters., v.11, p. 1997–2000, 2001.
- 39- KUMAR, A., KAUR, H. e KUMAR, S.. **Synthesis, Antipsychotic and Anticonvulsant Activity of some new pyrazolinyl/isoxazolinylindol-2-ones.** International Journal of Chem Tech Research., v.2, n.2, p. 1010-1019, 2010.

- 40- RANGAPPA, K. S., KUMAR, B. A. M. S., SWAMY, S. N., MAHENDRA, M., PRASAD, J. S. e VISWANATHB, B. S.. **Novel Δ^2 -isoxazolines as group II phospholipase A2 inhibitors.** Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters., v.14. p. 3679–3681, 2004.
- 41- RANGAPPA, K. S., BASAPPA, M. P., SADASHIVA, K., MANTELINGU, S. e SWAMY, N.. **Solution-Phase Synthesis of Novel D2-Isoxazoline Libraries via 1,3-Dipolar Cycloaddition and Their Antifungal Properties.** Bioorganic & Medicinal Chemistry., v. 11, p. 4539–4544, 2003.
- 42- LÓRAND, T. e GARAI, J.. **Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) Tautomerase Inhibitors as Potential Novel Anti-Inflammatory Agents: Current Developments.** Current Medicinal Chemistry, v. 16, p. 1091-1114, 2009.
- 43- ILG, T., GASSEL, M., WOLF, C., NOACK, S., WILLIAMS, H.. **The novel isoxazoline ectoparasiticide fluralaner: Selective inhibition of arthropod γ -aminobutyric acid- and L-glutamate-gated chloride channels and insecticidal/acaricidal activity.** Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2013.
- 44- OZOE, Y., ASAH, M., OZOE, F., NIKAHIRA, K. e MITA, T.. **The antiparasitic isoxazoline A1443 is a potent blocker of insect ligand-gated chloride channels.** Biochemical and Biophysical Research Communications., v. 391, p. 744–749, 2010.
- 45- PIRRUNG, M. C., TUMEY, L. N., RAETZ, C. R. H., JACKMAN, J. E., SNEHALATHA, K., MCCLERREN, A. L., FIERKE, C. A., GANT, L. e RUSCHE, K. M.. **Inhibition of the Antibacterial Target UDP-(3-O-acyl)-N acetylglucosamine Deacetylase (LpxC): Isoxazoline Zinc Amidase Inhibitors Bearing Diverse Metal Binding Groups.** J. Med. Chem., v. 45, p. 4359-4370, 2002.
- 46- JADHAV, S. B., SHASTRI, R. A., GAIKWAD, K. V. e GAIKWAD, S. V.. **Synthesis and Antimicrobial Studies of Some Novel Pyrazoline and Isoxazoline Derivatives.** E-Journal of Chemistry, 2009.

- 47- JANNET, H. B., ZGHAB, I., TRIMECHE, B., MANSOUR, M. B., HASSINE, M. e TOUBOUL, D.. **Regiospecific synthesis, antibacterial and anticoagulant activities of novel isoxazoline chromene derivatives.** *Arabian Journal of Chemistry*, 2013.
- 48- DE ALMEIDA, V. M.. **Síntese assimétrica de 3-carboxamidas enantiomericamente puras e de hidrazonas e aril-hidrazonas, derivados do novo heterociclo 7-(benzoi)-2-isoxazolina[5,4-b]pirrolidina. Avaliação das atividades biológicas.** Tese de Doutorado. UFPE. Recife, 2008.
- 49- FARIA, A. R., REIS, S. L. G. B., DE ALMEIDA, V. M., ALMEIDA, G. C., BOAVIAGEM, K. M. e MENDES, C. C. D. B.. **Síntese e avaliação preliminar da atividade antinociceptiva de novas isoxazolil-aril-hidrazonas.** *Quim. Nova.*, v. 34, n. 1, p. 76-81, 2011.
- 50- ALMEIDA, G. C.. **Síntese e avaliação preliminar da atividade antimicrobiana e antichagásica de novas isoxazolil-aril-semicarbazonas e tiossemicarbazonas e isoxazolil-nitrofurfuril-hidrazonas.** Dissertação de Messtrado. UFPE, 2010.
- 51- KUMMER, C. L., COELHO, T. C. R. B.. **Cyclooxygenase-2 Inhibitors Nonsteroid Anti-Inflammatory Drugs: Current Issues.** *Rev Bras Anestesiol.*, p. 498- 512, 2002.
- 52- STARK, H., LILL, A. e SCHOLICH, K.. **Synthesis of novel dansyl-labeled Celecoxib derivatives.** *Tetrahedron Letters.*, v. 54, p. 6682–6686, 2013.
- 53- COREY, E. J. e REDDY, L. R.. **Facile air oxidation of the conjugate base of rofecoxib (Vioxx™), a possible contributor to chronic human toxicity.** *Tetrahedron Letters.*, v. 46, p. 927–929, 2005.
- 54- BHUSARI, K. P., DRAVYAKAR, B. R., KAWADEL, D. P. e KHEDEKAR, P. B.. **Design and syntheses of some new diphenylaminoisoxazolines as potent anti-inflammatory agent.** *Indian Journal of Chemistry.* v. 47B, p. 1559-1567, Oct., 2008.
- 55- MARTINS, D. L.. **Reações aldólicas.** *Rev. Virtual Quim.*, v. 1 (3), p. 186-211, 2009.

- 56- NONN, M. M.. Selective functionalization of alicyclic β -amino acids by 1,3-dipolar cycloaddition of nitrile oxides.** Institute of Pharmaceutical Chemistry, University of Szeged Szeged, Hungary, 2012.
- 57- SANTOS, M. M., RIBEIRO, C. J. A., AMARAL, J. D., RODRIGUES, C. M. P. E MOREIRA, R.. Synthesis and evaluation of spiroisoxazoline oxindoles as anticancer Agents.** Bioorganic & Medicinal Chemistry., v. 22, p.577–584, 2014.
- 58- CHANG, H., SAHA, M. N. e QIU, L.. Targeting p53 by small molecules in hematological Malignancies.** Journal of Hematology & Oncology., v. 6, p. 23, 2013.
- 59- ARGYROPOULOU, E. C. e PILANIDOU, P.. An entry to new isoxazoline analogues of dideoxynucleosides by bromonitrile oxide 1,3-dipolar cycloaddition.** Tetrahedron Letters, v. 44, p. 3755–3758, 2003.
- 60- KIM, K. e CHANG, R.. A facile and novel method for the synthesis of 2-isoxazolines.** Tetrahedron Letters., v. 40, p. 6773-6776, 1999.
- 61- PIHKO, P. M. e POHJAKALLIO, A.. A Versatile Entry to 3-Unsubstituted 2-Isoxazolines.** Synlett, p. 827-830, 2008.
- 62- MOSHER, M. D., NORMAN, A. L., SHURRUSH, K. A. e CALLEROZ, A. T.. A tandem oximation–cyclization route to Δ^2 -isoxazolines.** Tetrahedron Letters., v.48, p.6849-6851, 2007.
- 63- MERLO, A. A., VILELA, G. D., DA ROSA, R. R., SCHNEIDER, P. H., BECHTOLD, I. H. e ECCHER, J.. Expeditious preparation of isoxazoles from Δ^2 -isoxazolines as advanced intermediates for functional materials.** Tetrahedron Letters., v. 52, p. 6569–6572, 2011.
- 64- HOUK, K. N., JAVIER, G. e LI, Y.. Pericyclic Reaction Transition States: Passions and Punctilios, 1935-1995.** *Acc. Chem. Res.*, v. 28, p. 81-90, 1995.

- 65- OH, L. M.. **Synthesis of celecoxib via 1,3-dipolar cycloaddition.** *Tetrahedron Letters.*, v. 47, p. 7943–7946, 2006.
- 66- PELLISSIER, H.. **Asymmetric 1,3-dipolar cycloadditions.** *Tetrahedron.*, v. 63, p. 3235-3285, 2007.
- 67- BROCKSOM, T. J., DANATONI, M. C., ULIANA, M. P. e VIEIRA, Y. W.. **A reação de Diels-Alder no início do século vinte um.** *Quim. Nova*, v. 33, n. 10, p. 2211-2218, 2010.
- 68- SOARES, I. L. S.. **A Química de Dipolos Conjugados na Síntese de Pirróis e Pirazóis.** Tese de Doutorado. Coimbra, 2007.
- 69- HUISGEN, R.. **The Concerted Nature of 1,3-Dipolar Cycloadditions and the Question of Diradical Intermediates.** *The Journal of Organic Chemistry.*, v 41, n. 3, February, 1976.
- 70- MANCERA, M., RAFFÉ, I. e GALBIS, J. A.. **Stereoselective 1,3-Dipolar Cycloadditions of Nitrile Oxides to Sugar Olefins. Synthesis of Acyclic-Sugar Isoxazoline C-Nucleoside Analogs.** *Tetrahedron.*, v. 51, n. 22, p. 6349-6362, 1995
- 71- CONTE, G.. **Síntese regioseletiva de cristais líquidos quirais contendo o heterociclo [1,2,3]-triazol.** Florianópolis, 2005.
- 72- GOTHEL, K. V. e JORGENSEN, K. A.. **Asymmetric 1,3-Dipolar Cycloaddition Reactions.** *Chem. Rev.*, v. 98, p. 863-909, 1998.
- 73- TOLDO, J. M.. **Estudo teórico da reação de cicloadição [3+2] 1,3-dipolar para formação do anel isoxazolina utilizando teoria do funcional da densidade e modelos implícitos de solvente.** Dissertação de Mestrado. Porto Alegre, 2013.
- 74- IAN. F.. **Molecular orbitals and organic chemical reactions:** Reference edition; Wiley, 2010.

75- ROSA, R. R.. Núcleo isoxazol na síntese e caracterização de cristais líquidos curvos. Dissertação de Mestrado. Porto Alegre, 2013.

76- HOUK, K. N., SIMS, J., WATTS, C. R. e LUSKUS L. J.. The Origin of Reactivity, Regioselectivity, and Periselectivity in 1,3-Dipolar Cycloadditions. *Journal of the American Chemical Society*, October, 1973.

77- DINIZ, A.. avaliação farmacocinética da piperacilina em musculo de ratos infectados com *E. coli*. Dissertação de Mestrado. Porto Alegre: Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, UFRGS, 2000.

78- CHAMBERS, H. F., SANDE, M. A.. Quimioterapia das doenças microbianas: considerações gerais. In: Hardman, L. e col. (Ed.) Goodman e Gilman. As bases farmacológicas da terapêutica 9. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. Cap. 43, p. 757-776, 1996.

79- LIMBERG, J., LEBEL, M., DERENDORF, H.. Evaluation of free tissue concentrations of fleroxacin after oral administration. *Pharmaceutical Research*, v. 7, n. 4, p. 423-424, 1990.

80- MEULEMANS, A., PAYCHA, F., HANNOUN, P., VULPILLAT, M.. Measurement and clinical and Pharmacokinetic implications fo diffusion coeficientes of antibiotics in tissues. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 33, n. 8, p. 1286-1290, 1989.

81- BENET, L. Z., KROETZ, D. L., SHEINER, L. B.. Farmacocinética: a dinâmica da absorção, distribuição e eliminação de fármacos. In: Hardman, L. e col. (Ed.) Goodman e Gilman. As bases farmacológicas da terapêutica. 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. Cap. 1, p. 3-20, 1996.

82- BERGAN, T.. Pharmacokinetics of tissue penetration of antibiotics. Reviews of infectious diseases. v. 3, n.1, p. 45-66, 1981.

- 83- WISE, R., LISTER, D., MCNULTY, C. A. M., GRIGGS, D., ANDREWS, J. M.. **The comparative pharmacokinetics and tissue penetration of four quinolones including intravenously administered enoxacin.** *Infectious diseases*, v, 14, p. 196-202, 1986.
- 84- GODDARD, A. F., ERAH, P. O., BARRET, D. A., SHAW, P. N., SPILLER, R. C.. **The effect of protein binding and lipophilicity of piperacilin on their in vitro across gastric mucosa.** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 41, p. 231-236, 1998.
- 85- NIX, D. E., GOODWIN, S. D., PELOQUIN, C. A., ROTELLA, D. L., SCHENTAG, J. J.. **Antibiotic Tissue Penetration and their Meaning.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. v. 35, n. 10, p. 1947-1952, 1991.
- 86- BERGERON, M. G.. **Tissue Penetration of Antibiotics.** *Clinical Biochemistry*, v. 19, p. 90-100, 1986.
- 87- BAUER, D. J., DUMBELL, K. R., FOX-HULME, P., SADLER, P. W.. *Bull. Wid. Hlth. Org.*, v. 26, p. 727-732, 1962.
- 88- KRAUS, G. A., NEUENSCHWANDER, K.. *J. Org. Chem* , v. 46, p. 4791-4792, 1981.
- 89- DE ALMEIDA, V. M., DOS SANTOS, R. J., GÓES, A. J. S., DE LIMA, J. G., CORREIA C. R., DE FARIA, A. R.. *Tetrahedron Lett*, v. 50, p. 842, 2009.
- 90- PARK, K., MARSHALL, W. J.. *Tetrahedron Letts*, v.45, p.4931, 2004.
- 91- MARQUES, R. A., SILVA, J. C., MENDES, C. C D. B., JUNIOR, N. S. B., FARIA, A. R.. **Síntese de novas Δ^2 -1,2,4-oxadiazolinas bicíclicas com potenciais atividades anti-inflamatória e antinociceptiva.** 35ª RASBQ, Águas de Lindóia, 2012.
- 92- LI, J. T.; LI, X. L.; LI, T. S.. *Ultrasonics Sonochemistry*., v. 13, p. 200-202, 2006.
- 93- ZANG, H., WANG, M., CHENG, B., SONG, J.. **Ultrasound-promoted synthesis of oximes catalyzed by a basic ionic liquid [bmIm]OH.** *Ultrasonics Sonochemistry*.,v. 16, p. 301–303, 2009.

- 94- KORN, M., DE ANDRADE, M. V. A.. **Procedimentos analíticos assistidos por ultrassom**. Instituto de Química. UFBA. Revista Analytica, fev., 2003.
- 95- LI, J., LI, X., LIU, X., MA, J.. **Synthesis of O-benzyl oximes by combination of phase transfer catalysis and ultrasound irradiation**. Chinese Journal of Organic Chemistry, v. 4 (1), p. 58–62, 2009.
- 96- LI, J., LI, X., LI, T.. **Synthesis of oximes under ultrasound irradiation**. Ultrasonics Sonochemistry., v. 13, p. 200–202, 2006.
- 97- HANSEN, E. C., LEVENT, M. e CONNOLLY T. J.. **Safe and Scaleable Oxidation of Benzaldoximes to Benzohydroximinoyl Chlorides**. Organic Process Research & Development, v. 14, p. 574–578, 2010.
- 98- MARQUES, R. A.. **Síntese e Avaliação das Atividades Antiinflamatória e citotóxica de 3-aril-2-isoxazolinazabícclicas**. Dissertação de Mestrado. UFPE, agosto de 2013.
- 99- RAI, K. M. L., LINGANNA, N., HASSNER, H. e ANJANAMURTHY, C.. **A convenient method for the generation of nitrile oxide and its application to the synthesis of 2-isoxazolines.**, v.. 24, p. 91-93, 2009.
- 100- DE ALMEIDA, V. M., DOS SANTOS, R. J., GÓES, A. J. S., DE SOUZA, I. A., DE FARIA, A. R.. **Rev. Bras. Cienc. Saúde**, v. 9, p. 275, 2005.
- 101 – DOS SANTOS, R. J.. **Reações de cicloadição 1,3-dipolar de enecarbamatos e enamidas endocíclicas de 5 membros com N-óxido de nitrila. Síntese e avaliação da atividade antiinflamatória de derivados isoxazolínicos bicíclicos pirrolidínicos e antimicrobiana de enamidas endocíclicas de 5 membros**. Dissertação de Mestrado. UFPE, junho de 2013.

ANEXOS

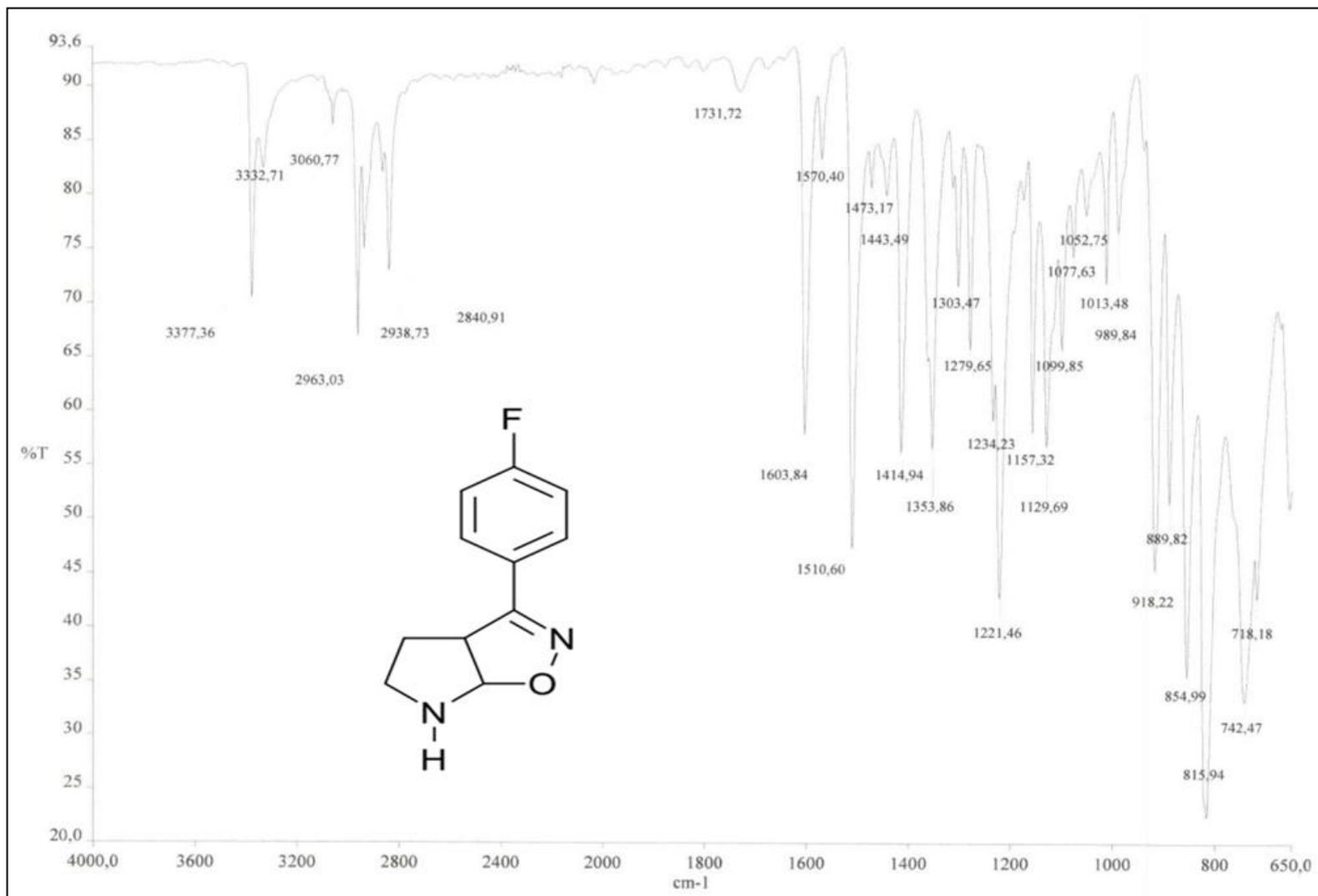


Figura 21. Espectro de infravermelho da aril isoxazolina *p*-F na forma de base livre.

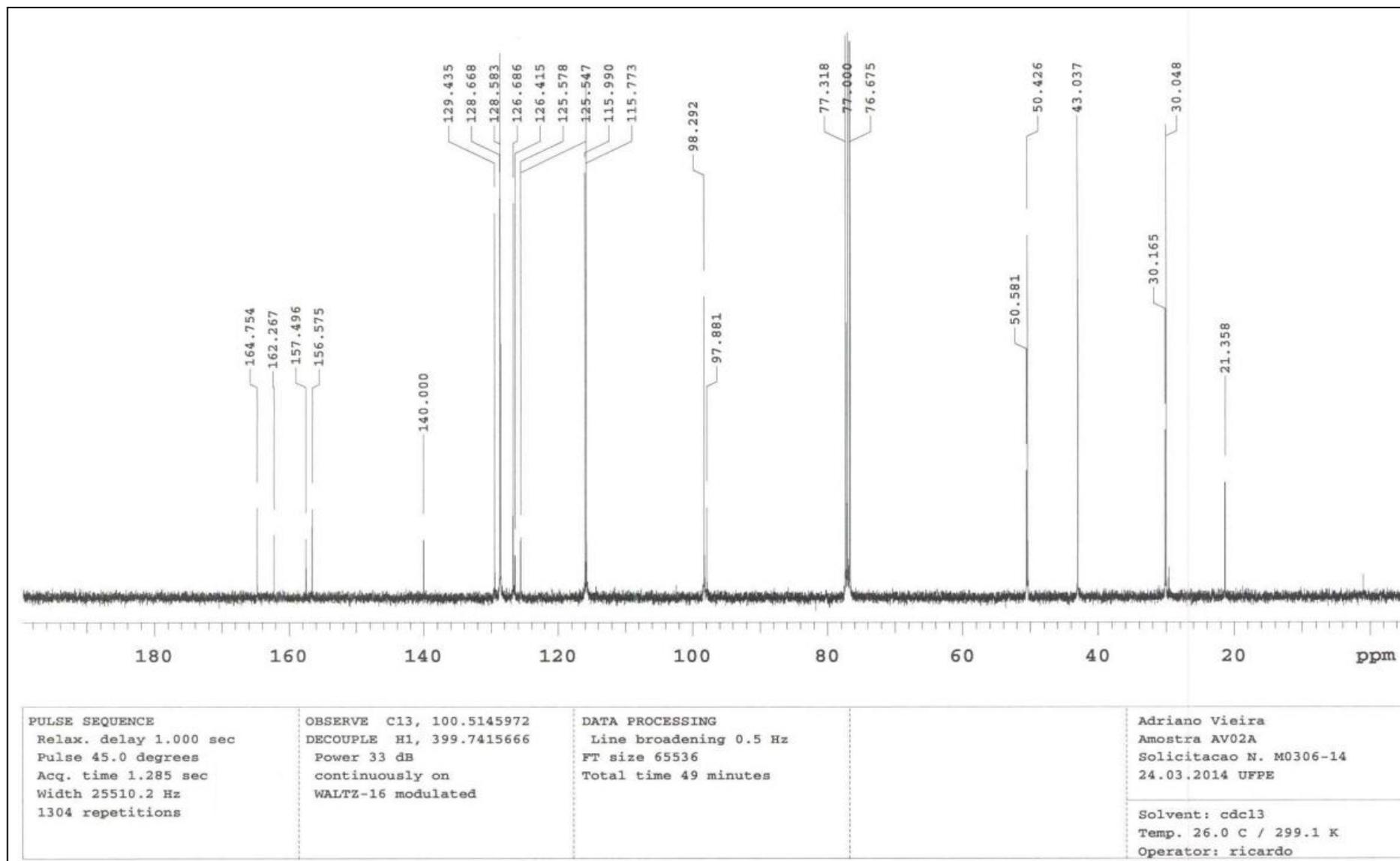


Figura 22. Espectro de RMN ^{13}C da aril isoxazolina *p*-F base livre em N6.

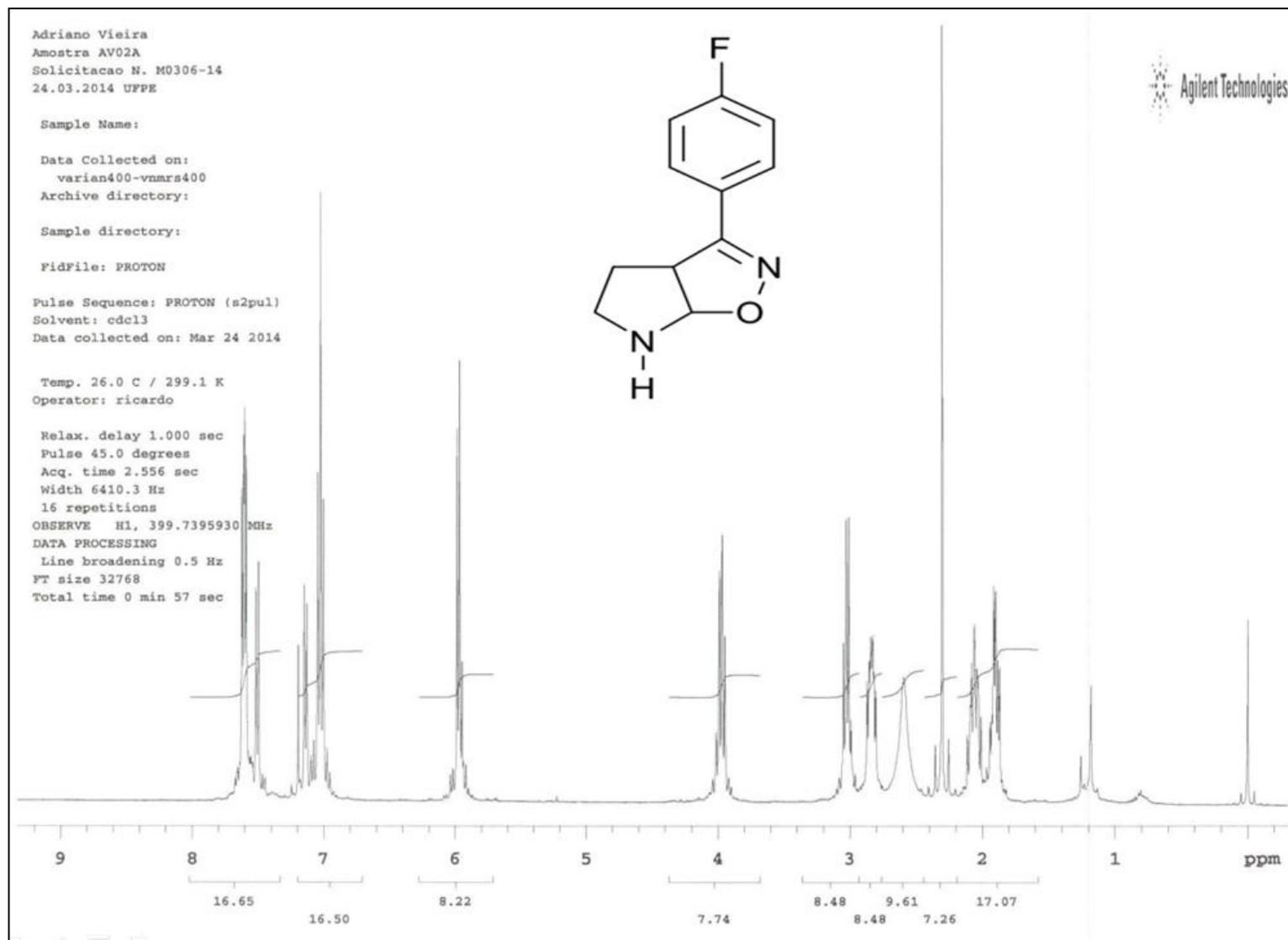


Figura 23. Espectro de RMN ^1H da aril isoxazolina *p*-F base livre em N6.

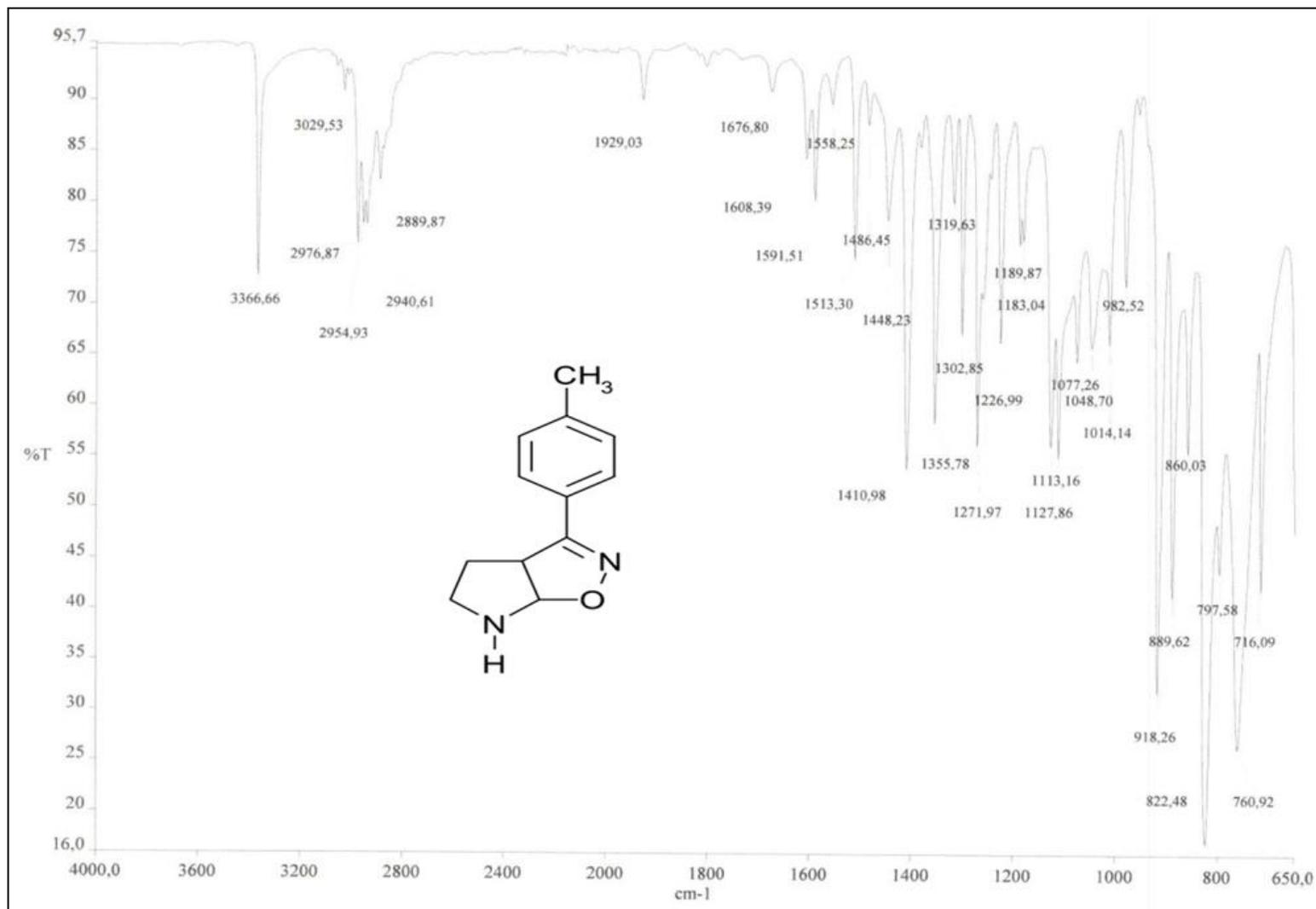


Figura 24. Espectro de infravermelho da aril isoxazolina *p*-CH₃ na forma de base livre.

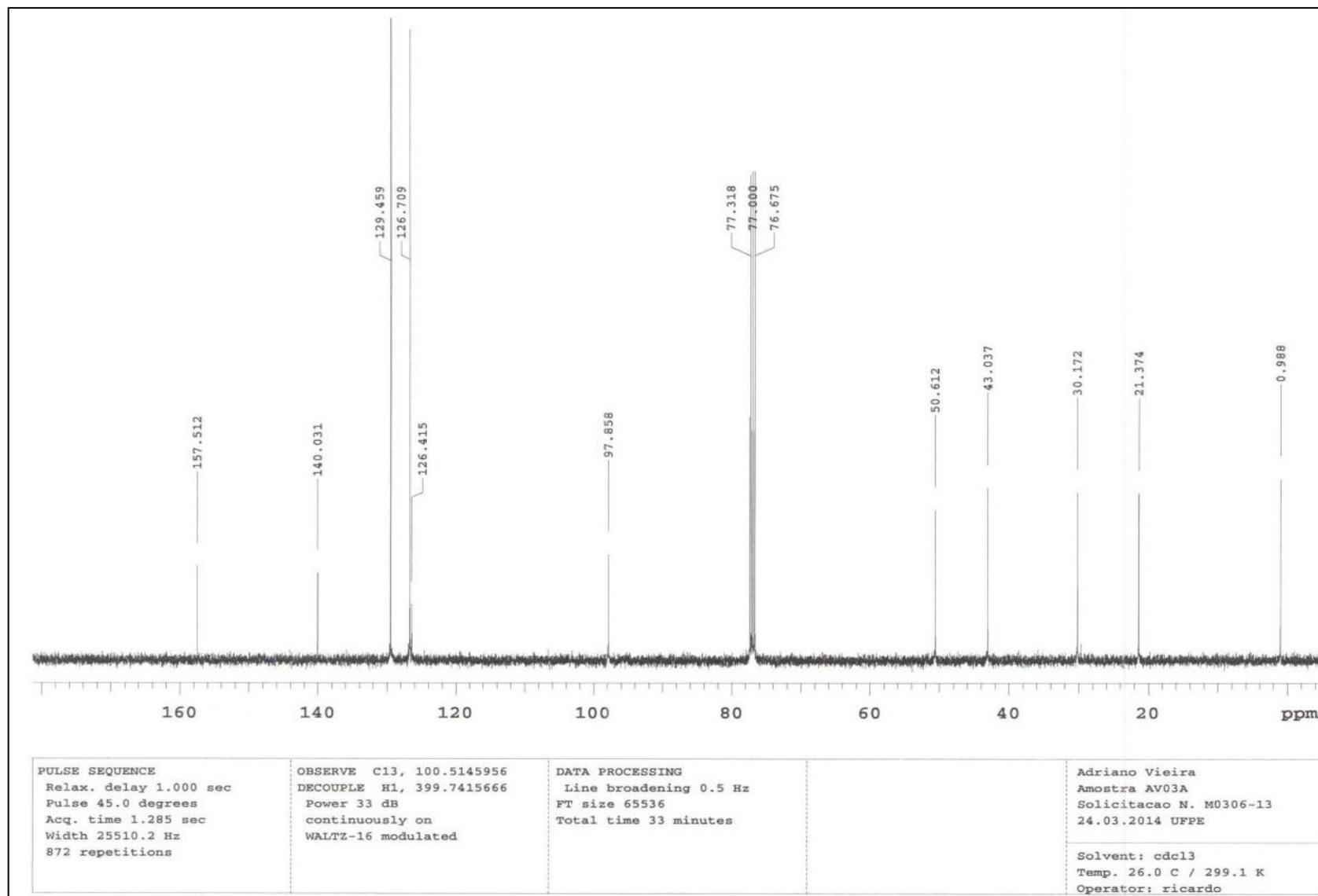


Figura 25. Espectro de RMN ^{13}C da aril isoxazolína *p*- CH_3 base livre em N6.

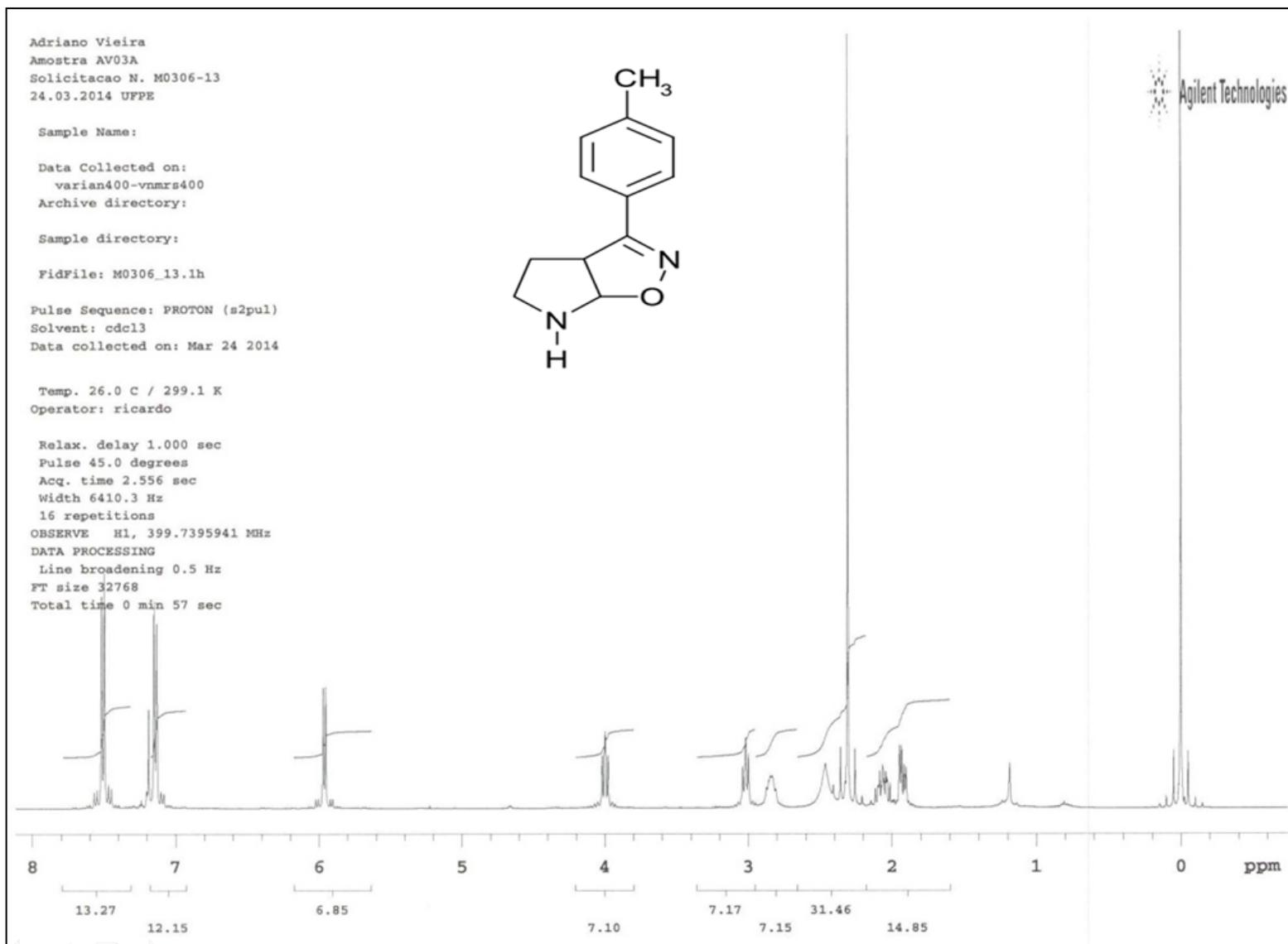


Figura 26. Espectro de RMN ^1H da aril isoxazolina *p*- CH_3 base livre em N6.

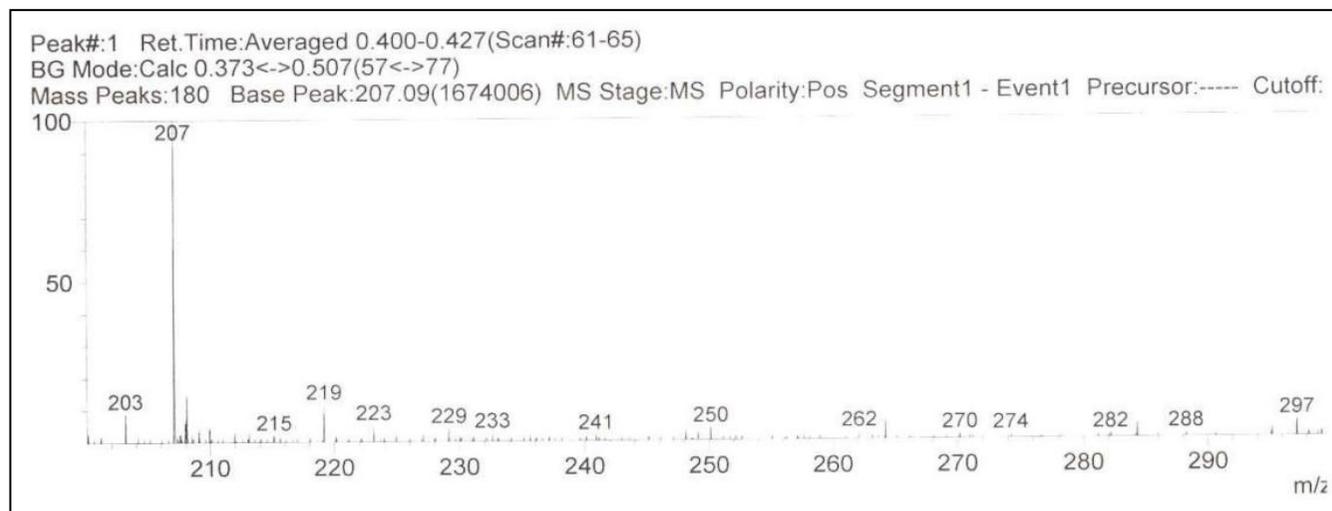


Figura 27. Espectros de Massas da aril isoxazolina *p*-F na forma de base livre.

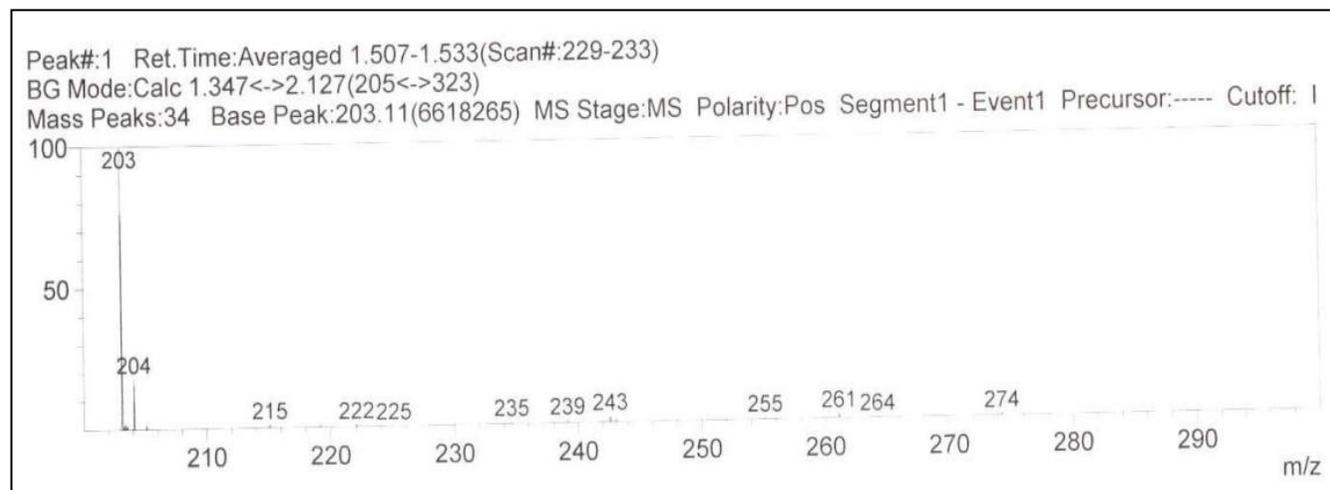


Figura 28. Espectros de Massas da aril isoxazolina *p*-CH₃ na forma de base livre