

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

NATANAEL DA SILVA BEZERRA JÚNIOR

Síntese e avaliação da atividade citotóxica de novos derivados
tiossemicarbazônicos isoxazolínicos aza-bicíclicos

Recife
2016

NATANAEL DA SILVA BEZERRA JÚNIOR

Síntese e avaliação da atividade citotóxica de novos derivados
tiossemicarbazônicos isoxazolínicos aza-bicíclicos

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

Área de Concentração:
Síntese Orgânica

Orientadora:
Profa. Dra. Maria do Carmo Alves de Lima

Co-orientador:
Prof. Dr. Antônio Rodolfo de Faria

Recife
2016

Catálogo na Fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

- B574s Bezerra Júnior, Natanael da Silva.
Síntese e avaliação da atividade citotóxica de novos derivados
tiossemicarbazônicos isoxazolínicos aza-bicíclicos / Natanael da Silva
Bezerra Júnior. – 2016.
110 f.: il.; 30 cm.
- Orientadora: Maria do Carmo Alves de Lima.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Recife, 2016.
Inclui referências e apêndices.
1. Câncer. 2. Química medicinal. 3. Reação de cicloadição. 4. 2-
Isoxazolina. 5. Tiossemicarbazona. I. Lima, Maria do Carmo Alves de
(Orientadora). II. Título.
- 615.3 CDD (23. ed.) UFPE (CCS 2017-039)

Nome: BEZERRA JÚNIOR, Natanael da Silva

Título: Síntese e avaliação da atividade citotóxica de novos derivados tiossemicarbazônicos isoxazolinicos aza-bicíclicos.

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

Aprovado em: 24/02/2016

Banca Examinadora

Prof. Dr. Antônio Rodolfo de Faria

Julgamento: _____

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco

Assinatura: _____

Prof. Dr. Dalci José Brondani

Julgamento: _____

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco

Assinatura: _____

Prof. Dr. Ricardo Oliveira da Silva

Julgamento: _____

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco

Assinatura: _____

Profa. Dra. Maria do Carmo Alves de Lima

Julgamento: _____

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco

Assinatura: _____

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

Profa. Florisbela de Arruda Camara e Siqueira Campos

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Ernani Rodrigues de Carvalho Neto

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. Nicodemos Teles de Pontes Filho

VICE-DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Profa. Vânia Pinheiro Ramos

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Prof. Antônio Rodolfo de Faria

VICE-CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Profa. Elba Lúcia Cavalcanti de Amorim

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

Prof. Almir Gonçalves Wanderley

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

Prof. Rafael Matos Ximenes

À Santíssima Virgem Maria

AGRADECIMENTOS

Ao Bom Deus pelo dom da vida e pelos incomensuráveis amor e graças derramados ao longo de minha existência.

Aos meus pais Natanael e Rosivania e ao meu irmão Lucas pelo amor, apoio e esforços demonstrados ao longo de minha vida, particularmente no tempo de execução das atividades concernentes a esta pesquisa.

À Profa. Dra. Maria do Carmo (Nena), pela atenção, instruções, conhecimentos e sorrisos gentilmente distribuídos.

Ao Prof. Dr. Antônio Rodolfo, com quem tive o privilégio de trabalhar há cinco anos, desde a monitoria da disciplina de Química Geral Aplicada, na graduação, passando pela iniciação científica e mestrado. Pelos incontáveis ensinamentos, orientações e demais contribuições dispensados, meu muito obrigado.

Aos amigos do LASOF, Charles Mendes, Marlene, Eduarda, Jéssica, Felipe, Karolynne e Odimar pela amizade e colaboração. Àqueles que já passaram pelo laboratório ou que comigo conviveram, mas que permanecem no coração: Ronmilson, Lucas, Adriano, Otoni, César, Charles Simões, Danilo e Daniel. Muito obrigado pelo companheirismo.

Aos colegas do LPSE, especialmente representados nas pessoas de Jamerson e Íris, que muito contribuíram com esse trabalho.

À Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Pernambuco, pela possibilidade de realização do curso de mestrado.

Aos professores Alexandre Góes, Eulália Camelo, Ana Cristina, Marcelo Zaldini e José Gildo que contribuíram com esse projeto mediante a ministração de suas respectivas disciplinas.

Ao LTM/UFPE, nas pessoas do Prof. Dr. Pedro Rolim e do técnico Lourenço, pela realização das espectroscopias de infravermelho dos produtos.

À Profa. Teresinha e ao doutorando Temístocles, pela execução das análises quanto à citotoxicidade dos compostos inéditos.

À Central Analítica do Departamento de Química Fundamental/UFPE, na pessoa da técnica Abene Ribeiro, pelas análises espectroscópicas realizadas das moléculas finais.

Ao Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (Cetene), pelas análises espectrométricas de Massas.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), por, financeiramente, garantir a viabilização do projeto de pesquisa e concessão da bolsa de mestrado.

Há pessoas que desejam saber só por saber, e isso é curiosidade; outras, para alcançarem fama, e isso é vaidade; outras, para enriquecerem com a sua ciência, e isso é um negócio torpe; outras, para serem edificadas, e isso é prudência; outras, para edificarem o outro, e isso é caridade.

Santo Agostinho de Hipona

RESUMO

BEZERRA JÚNIOR, N. S. **Síntese e avaliação da atividade citotóxica de novos derivados tiossemicarbazônicos isoxazolínicos aza-bicíclicos**. 2016. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2016.

As neoplasias malignas (cânceres), caracterizadas prioritariamente por anormalidade na taxa de crescimento celular são responsáveis por elevada morbidade e destacada mortalidade em várias partes do Globo. O desenvolvimento de resistência às drogas atualmente disponíveis, além do perfil da grande toxicidade por parte desses agentes quimioterápicos, fazem com que as pesquisas por novos fármacos que possuam maior segurança e efetividade terapêuticas sejam imprescindíveis. Com base na literatura, diversos compostos contendo em sua estrutura as classes orgânicas 2-isoxazolina ou tiossemicarbazona demonstraram possuir diversas propriedades: antiviral, antibacteriana, antinociceptiva, antitumoral, antichagásica, entre outras. Isso posto, o presente trabalho teve por finalidade, a partir da estratégia de hibridação molecular, realizar a síntese de novos híbridos tiossemicarbazônicos isoxazolínicos aza-bicíclicos, avaliando sua potencial ação citotóxica, em continuidade com estudos prévios do grupo de pesquisa. Os aldeídos contendo o núcleo 2-isoxazolina, obtido a partir da reação de cicloadição 1,3-dipolar entre enamidas/enecarbamatos endocíclicos e óxido de nitrila (CEFNO), foram condensados com tiossemicarbazidas substituídas em N-4 para gerar sete inéditas tiossemicarbazonas isoxazolínicas, em bons rendimentos (52,53 a 84,08%). Auxiliados pelas análises de infravermelho e espectrometria de massas, sinais diagnósticos nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C possibilitaram a elucidação estrutural das moléculas finais. A avaliação *in vitro* de citotoxicidade, executada contra as linhagens de células tumorais NCI-H292, HT-29, HEP-2, MCF-7, HL-60, por ensaio de MTT, demonstrou a incapacidade das moléculas testadas em inibir o crescimento celular neoplásico (0,0 a 53% de inibição do crescimento). Adicionalmente, a fim de verificar a potencial atividade antichagásica dos novos compostos sintetizados, estudos complementares de toxicidade sobre as formas evolutivas de *T. cruzi* estão atualmente em curso.

Palavras-chave: Câncer. Química Medicinal. Reação de Cicloadição. 2-Isoxazolina. Tiossemicarbazona.

ABSTRACT

The malignant tumors, primarily characterized by abnormal growth of cells, are responsible for high morbidity and highlighted mortality rates in several regions of the globe. The development of resistance to the drugs currently available, beyond the important toxicity profile presented by these chemotherapeutic agents, are reasons why new researches for safer drugs and with higher therapeutic effectiveness are primordial. Based on literature, several chemical compounds containing 2-isoxazoline or thiosemicarbazone in their structures have shown antiviral, antibacterial, antinociceptive, anticancer, anti-Chagas disease, among other properties. The aim of this work was realize the synthesis of new hybrids aza-bicyclic isoxazolines thiosemicarbazones using molecular hybridization approach, analyzing their cytotoxic potential. The 2-isoxazoline aldehydes obtained from the reaction of 1,3-dipolar cycloaddition among enamide/enecarbamate endocyclic and nitrile oxide (CEFNO), were condensed with N-4 substituted thiosemicarbazide to generate seven new isoxazolinic thiosemicarbazone in good yields (52,53 to 84,08%). With infrared and mass spectrometry analyzis, diagnostic signs on ^1H and ^{13}C NMR spectra allowed the elucidation of the final molecules structure. *In vitro* evaluation of cytotoxicity executed against tumor cell lines NCI-H292, HT-29, HEP-2, MCF-7, HL-60 by MTT assay, showed the molecules incapacity in inhibiting neoplastic cells growth (0.0 to 53% of growth control). Additionally, in order to verify the possible anti-Chagas disease activity from the new synthesized compounds, some complementary toxicity studies about forms in differentiation of *T. cruzi* have being performed.

Keywords: Cancer. Medicinal Chemistry. Cycloaddition Reaction. 2-Isoxazoline. Thiosemicarbazone.

LISTA DE SIGLAS

786-0	Adenocarcinoma renal humano
A2780	Células de câncer epitelial ovariano
A2780cisR	Células de câncer epitelial ovariano resistentes à cisplatina
A431	Carcinoma epidermóide de pele
DABCO	1,4-diazobiciclo[2.2.2]octano
DMEM	Meio de água modificado por Dulbecco
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DMSO-D6	Dimetilsulfóxido Deuterado
CBZ	Cloroformato de benzila
CCD	Cromatografia em camada delgada
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
CEFNO	Óxido de carbetóxi-formonitrila
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
CHCl ₃	Clorofórmio
EC ₅₀	Concentração para 50% da resposta máxima
HeLa	Adenocarcinoma de cérvix
HEp-2	Carcinoma epidermoide de laringe
HFF-1	Células fibroblásticas de prepúcio normais
HL-60	Leucemia promielocítica aguda
HT-29	Células de tumor de cólon humano
HOMO	Orbital molecular ocupado de maior energia
IC ₅₀	Concentração para inibição de 50%
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry

J774A1	Cepa de macrófagos
LLCMK ₂	Células epiteliais de rim de macaco
LUMO	Orbital Molecular não ocupado de menor energia
MCF-7	Células de câncer de mama (humana caucasiana)
MIC	Concentração mínima inibitória
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
NCI-H292	Carcinoma mucoepidermoide de pulmão humano
PLA ₂	Fosfolipase A ₂
Rf	Fator de Retenção
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
T47D	Células de câncer de mama humano
TEA	Trietilamina
THF	Tetrahidrofurano
TMS	Tetrametilsilano
TsOH	Ácido sulfônico <i>p</i> -tolueno

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1 2-ISOXAZOLINAS	17
2.1.1 Síntese	18
2.1.2 Atividades Biológicas	27
2.2 TIOSSEMICARBAZONAS	34
2.2.1 Síntese	35
2.2.2 Atividades Biológicas	40
3. OBJETIVOS	44
3.1 OBJETIVOS GERAIS	44
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	44
4. METODOLOGIA	45
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
5.1 ÂMBITO QUÍMICO	48
5.1.1 Síntese racêmica do heterobíclo 2-isoxazolina[5,4-b]pirrolidínico	48
5.1.1.1 Síntese do trímero da 1-pirrolina 82	48
5.1.1.2 Síntese do N-(benziloxycarbonil)-2-pirrolina 83 (enecarbamato endocíclico)	49
5.1.1.3 Síntese do N-(4-fluorobenzoil)-2-pirrolina (enamidas endocíclicas 84)	49
5.1.1.4 Síntese do clorooximinoacetato de etila 10 (precursor do 1,3-dipolo CEFNO)	50
5.1.1.5 Síntese do éster 6-benzil-3-etil do ácido 3a,4,5,6a-tetrahidropirrolpirrolo[3,2-d]isoxazol-3,6-dicarboxílico 85 (éster do enecarbamato – cicloadição 1,3-dipolar)	51
5.1.1.6 Síntese dos cicloadutos ésteres das enamidas endocíclicas 87 (cicloadição 1,3-dipolar)	54
5.1.2 Síntese dos aldeídos derivados do heterobíclo 2-isoxazolina[5,4-b]pirrolidínico	54
5.1.2.1 Síntese do éster do ácido 3a,4,5,6a-tetrahidropirrolo[3,2-d]isoxazol-3-carboxílico 86 (desproteção do nitrogênio do cicloaduto)	55
5.1.2.2 Síntese do éster etílico do ácido 6-(4-clorobenzoil)-4,5,6,6a-tetrahidro-3aH-pirrolo[3,2-d]isoxazol-3-carboxílico 87 (acilação de N-7)	55
5.1.2.3 Redução da porção éster em C3 (síntese dos álcoois isoxazolínicos 88)	56
5.1.2.4 Oxidação branda de Swern da porção álcool em C-3 (síntese dos aldeídos isoxazolínicos 89)	57
5.1.3 Síntese das tiossemicarbazonas derivadas do heterobíclo 2-isoxazolina[5,4-b]pirrolidínico	59
5.1.3.1 Síntese das tiossemicarbazidas substituídas 92	59
5.1.3.2 Condensação entre os aldeídos isoxazolínicos e tiossemicarbazidas substituídas (Síntese das tiossemicarbazonas 90)	60
5.2 ÂMBITO BIOLÓGICO	67
5.2.1 Teste citotóxico	67
6. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	69

6.1 ÂMBITO QUÍMICO.....	69
6.1.1 Síntese racêmica do heterobícclo 2-isoxazolina[5,4-b]pirrolidínico.....	70
6.1.1.1 Síntese do trímero da 1-pirrolina 82	70
6.1.1.2 Síntese do N-(benziloxicarbonil)-2-pirrolina 83 (enecarbamato endocíclico)	71
6.1.1.3 Síntese do N-(4-clorobenzoil)-2-pirrolina (enamida endocíclica p-cloro 84a)	72
6.1.1.4 Síntese do N-(4-fluorobenzoil)-2-pirrolina (enamida endocíclica p-flúor 84b)	73
6.1.1.5 Síntese do clorooximinoacetato de etila 10 (precursor do 1,3-dipolo CEFNO)	74
6.1.1.6 Síntese do éster 6-benzil-3-etil do ácido 3a,4,5,6a-tetrahidropirrolpirrolo[3,2-d]isoxazol-3,6-dicarboxílico 85 (cicloaduto do enecarbamato – cicloadição 1,3-dipolar).....	75
6.1.1.7 Síntese do éster etílico do ácido 6-(4-clorobenzoil)-4,5,6,6a-tetrahidro-3aH-pirrolo[3,2-d]isoxazol-3-carboxílico 87a (cicloaduto da enamida p-cloro)	76
6.1.1.8 Síntese do éster etílico do ácido 6-(4-fluorobenzoil)-4,5,6,6a-tetrahidro-3aH-pirrolo[3,2-d]isoxazol-3-carboxílico 87b (cicloaduto da enamida p-flúor).....	77
6.1.2 Síntese dos aldeídos derivados do heterobícclo 2-isoxazolina[5,4-b]pirrolidínico	78
6.1.2.1 Síntese do éster do ácido 3a,4,5,6a-tetrahidropirrolo[3,2-d]isoxazol-3-carboxílico 86 (desproteção do nitrogênio do enecarbamato)	78
6.1.2.2 Síntese do éster etílico do ácido 6-(4-clorobenzoil)-4,5,6,6a-tetrahidro-3aH-pirrolo[3,2-d]isoxazol-3-carboxílico 87a (acilação do nitrogênio N-7)	79
6.1.2.3 Síntese do álcool (4-clorofenil)-(3-hidroximetil-3a,4,5,6a-tetrahidro-pirrolo[3,2-d]isoxazol-6-il-metanona 88a (síntese do álcool isoxazolínico p-cloro)	80
6.1.2.4 Síntese do álcool (4-fluorofenil)-(3-hidroximetil-3a,4,5,6a-tetrahidro-pirrolo[3,2-d]isoxazol-6-il-metanona 88b (síntese do álcool isoxazolínico p-flúor).....	82
6.1.2.5 Síntese do 6-(4-clorobenzoil)-4,5,6,6a-tetrahidro-3aH-pirrolo[3,2-d]isoxazol-3-carbaldeído 89a (síntese do aldeído isoxazolínico p-cloro)	83
6.1.2.6 Síntese do 6-(4-fluorobenzoil)-4,5,6,6a-tetrahidro-3aH-pirrolo[3,2-d]isoxazol-3-carbaldeído 89b (síntese do aldeído isoxazolínico p-flúor)	84
6.1.3 Síntese das tiossemicarbazonas derivadas do heterobícclo isoxazolina[5,4-b]pirrolidínico	85
6.1.3.1 Síntese das tiossemicarbazidas substituídas 92	85
6.1.3.2 Síntese da N-(4-metóxi-fenil)-N-(4-cloro-fenil)-3a,4,5,6a-tetrahidro-pirrolo[3,2-d]isoxazolo-6-il-metanona-hidrazina-carbotiamida 90a	86
6.1.3.3 Síntese da N-(4-etil-fenil)-N-(4-cloro-fenil)-3a,4,5,6a-tetrahidro-pirrolo[3,2-d]isoxazolo-6-il-metanona-hidrazina-carbotiamida 90b	87
6.1.3.4 Síntese da N-(4-metil-fenil)-N-(4-cloro-fenil)-3a,4,5,6a-tetrahidro-pirrolo[3,2-d]isoxazolo-6-il-metanona-hidrazina-carbotiamida 90c	89
6.1.3.5 Síntese da N-(3-piridil)-N-(4-cloro-fenil)-3a,4,5,6a-tetrahidro-pirrolo[3,2-d]isoxazolo-6-il-metanona-hidrazina-carbotiamida 90d	90
6.1.3.6 Síntese da N-(□-naftil)-N-(4-cloro-fenil)-3a,4,5,6a-tetrahidro-pirrolo[3,2-d]isoxazolo-6-il-metanona-hidrazina-carbotiamida 90e	91
6.1.3.7 Síntese da N-(3-piridil)-N-(4-flúor-fenil)-3a,4,5,6a-tetrahidro-pirrolo[3,2-d]isoxazolo-6-il-metanona-hidrazina-carbotiamida 90f	92
6.1.3.8 Síntese da N-(□-naftil)-N-(4-flúor-fenil)-3a,4,5,6a-tetrahidro-pirrolo[3,2-d]isoxazolo-6-il-metanona-hidrazina-carbotiamida 90g	94

6.2 ÂMBITO BIOLÓGICO	95
6.2.1 Teste citotóxico	95
7. CONCLUSÕES	97
8. PERSPECTIVAS	98
REFERÊNCIAS	99
APÊNDICE A – Espectroscopia de RMN ^1H de 90a	105
APÊNDICE B – Espectroscopia de RMN ^{13}C de 90a	106
APÊNDICE C – Espectroscopia de RMN ^1H de 90c	107
APÊNDICE D – Espectroscopia de RMN ^{13}C de 90c	108
APÊNDICE E – Espectroscopia de RMN ^1H de 90e.....	109
APÊNDICE F – Espectroscopia de RMN ^{13}C de 90e.....	110

1. INTRODUÇÃO

As neoplasias malignas, mais comumente denominadas por cânceres, constituem um importante grupo de patologias responsável pela geração de significativas morbidade e mortalidade em todo o mundo. Tal grupo de doenças é caracterizado por elevada taxa de proliferação celular, graças a modificações sofridas no material genético (DNA) de uma ou mais células, apresentando autonomia no crescimento, atenuado grau de diferenciação, capacidade de infiltração dos tecidos adjacentes e, uma vez ocorrida a disseminação por vasos sanguíneos e/ou linfáticos, o desenvolvimento de focos neoplásicos distantes do local de origem, as metástases.

Sua etiologia está atrelada ao desequilíbrio dos mecanismos reguladores de divisão celular, que podem envolver a ativação acentuada de genes estimuladores do crescimento (oncogenes), a redução na expressão de genes supressores de tumor e escape das vias normais de apoptose (morte celular). Vários dos agentes iniciadores e promotores das neoplasias malignas estão ordinariamente presentes na vida da sociedade contemporânea, tais como as radiações, certos solventes orgânicos (benzeno), anticoncepcionais, bebidas alcóolicas e tabaco.

Várias são as frentes de combate ao câncer: intervenção cirúrgica, radioterapia, quimioterapia, imunoterapia, hormonioterapia etc. Nesse contexto, a utilização de fármacos antineoplásicos pode ser necessária nos casos em que seja preciso complemento à extirpação do tumor por cirurgia, tratamento inicial de leucemia, método paliativo para alívio de sintomas etc. Entretanto, devido à notável toxicidade desses agentes e ao desenvolvimento de resistência tumoral à sua ação, torna-se premente a intensificação de pesquisas que visem prover novos candidatos a fármacos com um perfil terapêutico mais aceitável.

No afã de suprir a carência ainda existente na terapia de doenças como o câncer, diversos grupos de pesquisa não poupam esforços a fim de encontrar saídas para esses empecilhos. Dentre as ferramentas utilizadas na tentativa de desenvolver/otimizar um protótipo para obtenção de um composto mais promissor destacam-se estratégias inerentes à química medicinal, a saber: bioisosterismo, latenciação, hibridação e simplificação molecular.

Nesse âmbito, devido aos reconhecidos efeitos exercidos sobre sistemas biológicos, os compostos heterocíclicos constituem uma rica fonte de possibilidades de trabalho para os químicos medicinais. O leque terapêutico hodierno atesta facilmente a vasta presença desse grupo como parte integrante nas estruturas moleculares de diversos princípios ativos

comercializados: omeprazol, cimetidina, anlodipino, celecoxibe, metotrexato, antibióticos betalactâmicos etc.

Utilizando-se da técnica de hibridação molecular entre duas classes orgânicas extensamente descritas na literatura quanto aos seus efeitos biológicos, as 2-isoxazolininas e tiossemicarbazonas, o presente trabalho buscou realizar a síntese, caracterização estrutural e avaliação da atividade citotóxica (sobre linhagens de células tumorais), *in vitro*, de novos derivados tiossemicarbazônicos aza-bicíclicos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 2-ISOXAZOLINAS

As isoxazolininas fazem parte de um grupo de compostos heterocíclicos de cinco membros, constituídos por heteroátomos de oxigênio e nitrogênio ligados entre si e por uma instauração ao longo do anel. Diferem de outras classes análogas, como isoxazolidinas e isoxazóis, devido ao padrão de instauração envolvido: quando o anel for totalmente saturado ou aromático, respectivamente. Por sua vez, a posição em que se encontra a insaturação determina o tipo de isoxazolina em questão: 2- ou 3- ou 4-isoxazolina (figura 01) (DE ALMEIDA, 2008).

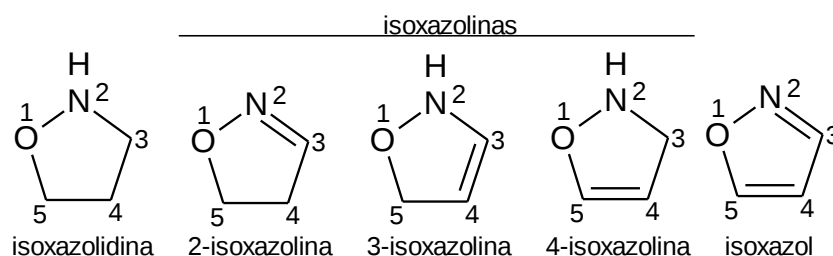


Figura 01

Originalmente, essa classe de moléculas orgânicas era sinteticamente obtida quer por meio da reação entre cetonas β -halogenadas e hidroxilamina, como constante do trabalho de Rupe e Schneider¹ (1895 apud PEROLD; STEYN; REICHE, 1957, p. 462), quer pelo emprego de cetonas α,β -insaturadas em meio alcalino (BLATT; STONE JR, 1931). Todavia, particularmente a partir da década de 1950, Perold, Steyn e Reiche (1957) ressaltaram o surgimento de pesquisas recentes que utilizavam a cicloadição 1,3-dipolar entre óxidos de benzonitrila e olefinas para obter o núcleo 2-isoxazolina, que, com o passar dos anos, consolidou-se como a principal via de obtenção desta estrutura molecular.

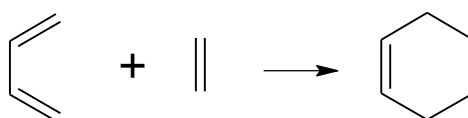
Por seu turno, tem sido apresentados na literatura diversos efeitos biológicos atrelados aos compostos orgânicos contendo a classe 2-isoxazolina, dentre tais registros: atividades

¹ RUPE, H.; SCHNEIDER, F. Zur Kenntniss der β -Halogenketone. **Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft**, Berlin, v. 28, p. 957-966, 1895.

antitrombótica (PRUITTI *et al*, 2000), anti-inflamatória (BASAPPA *et al*, 2004; GUIDINI *et al*, 2015), antinociceptiva (Reis *et al*, 2011), antimicrobiana (AGGARWAL; BANSAL; MITTAL, 2013; MANDAWAD *et al*, 2014; BANO *et al*, 2015), antiviral (QUADRELLI *et al*, 2013), antimalárica (BRUNO, 2014 *et al*), antitripanossômica (ETTARI *et al*, 2015) e anticâncer (PRAJAPTI *et al*, 2015; FRANK *et al*, 2014; ABOLHASANI *et al*, 2014), evidenciando a relevância de sua participação na descoberta de novos compostos bioativos.

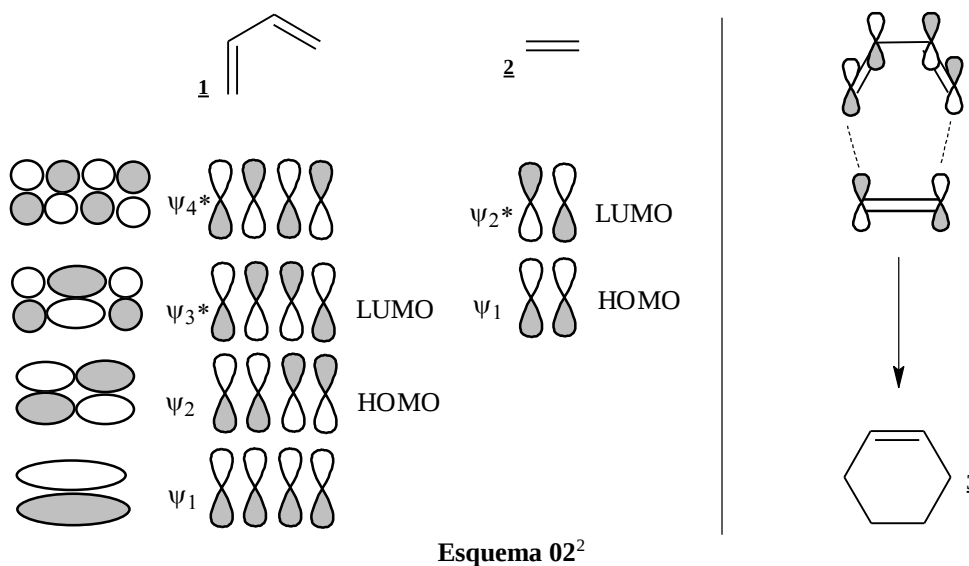
2.1.1 Síntese

Conforme a IUPAC (1997), as reações de cicloadição são aquelas em que duas ou mais moléculas insaturadas (ou parte de uma mesma molécula) interagem para formar um cicloaduto. Para caracterização do tipo de cicloadição em estudo, a notificação mais recente designa o sistema entre colchetes [i + j + ...], onde a sentença expressa o número de elétrons π diretamente envolvidos no desenrolar da reação (anteriormente a expressão constava entre parênteses e representava o número dos átomos, não a quantidade de elétrons π , envolvidos). De acordo com essa definição, a clássica reação de Diels-Alder (esquema 01), que ocorre entre um dieno conjugado e um alqueno, é uma cicloadição do tipo [4+2]:

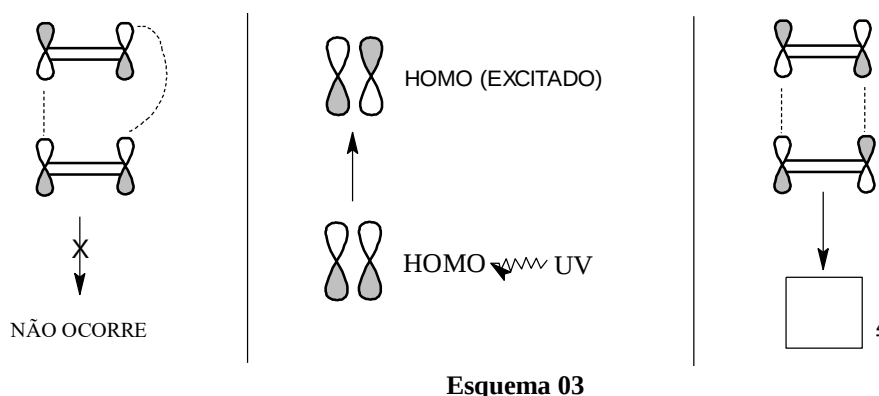


Esquema 01

A fim de compreender de modo mais fidedigno o modo pelo qual se processam as reações de cicloadição, é necessário recorrer à abordagem dos orbitais moleculares de fronteira (FMO). Nesse contexto, segundo Woodward e Hoffman (1965), reafirmado por McMurry (2012), considera-se que os elétrons π presentes no orbital molecular ligante de mais alta energia (HOMO) de um reagente interagem com o orbital molecular anti-ligante de menor energia (LUMO) do outro reagente, estabelecendo a formação de uma ligação σ resultante. A simetria correta dos lóbulos destes orbitais, no entanto, é imprescindível para viabilizar a reação. Dessa forma, para a referida reação de Diels-Alder, um adequado mecanismo de reação seria aquele apresentado no esquema 02.



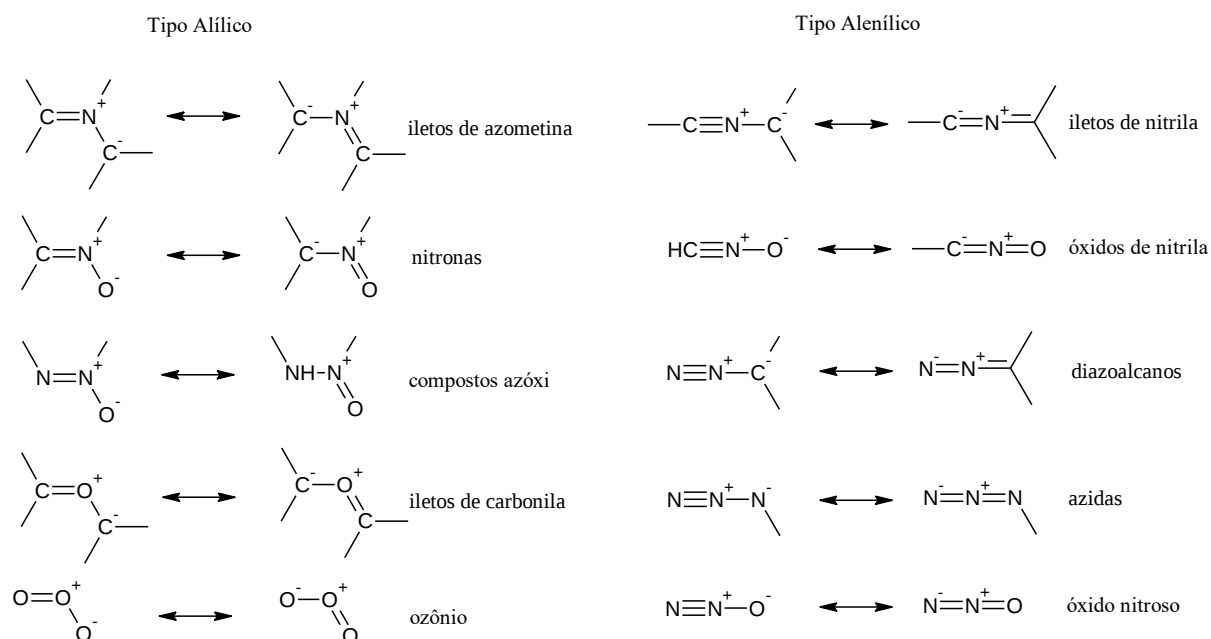
Diferentemente da reação anterior, que ocorre com geometria suprafacial em controle térmico, a cicloadição entre dois alquenos não acontece nas mesmas condições. Esse empecilho é resolvido mediante a ação de radiação ultravioleta no sistema reacional (reação fotoquímica), que promove (excita) um elétron do orbital molecular HOMO, propiciando uma correta simetria dos orbitais terminais (esquema 03).



As cicloadições 1,3-dipolares, principal via para obtenção de 2-isoxazolininas (KANEMASA; NISHIUCHI; WADA, 1992), são reações onde estruturas zwitteriônicas (1,3-dipolos) adicionam-se a moléculas insaturadas (dipolarófilos), levando à produção de um cicloaduto de 5 membros (HUISGEN, 1963). Há duas categorias de 1,3-dipolos, conforme

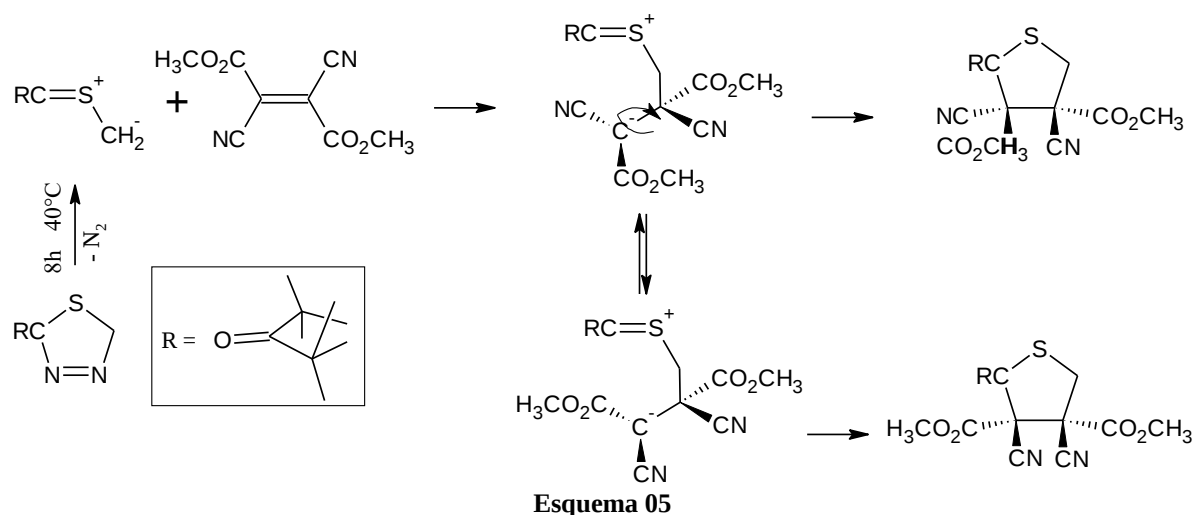
² À esquerda, orbitais moleculares do dieno **1** e do alqueno **2** em ordem crescente de energia (ψ_1 a ψ_4^* e ψ_1 a ψ_2^* , respectivamente). Os orbitais ligantes, nos quais os elétrons encontram-se no estado fundamental, estão com asterisco (*) ausente. À direita, interação dos elétrons do orbital HOMO do dieno com o orbital LUMO do alqueno, formando o ciclohexeno **3**. Uma vez que os lóbulos dos orbitais terminais possuem simetria adequada à interação, a geometria da cicloadição é dita suprafacial.

Huisgen (1976): aqueles com átomo central hibridizado sp^2 , de geometria angular (tipo alílico); e o grupo onde o átomo medial possui hibridização sp , apresentando forma linear (tipo alenílico) (esquema 04).



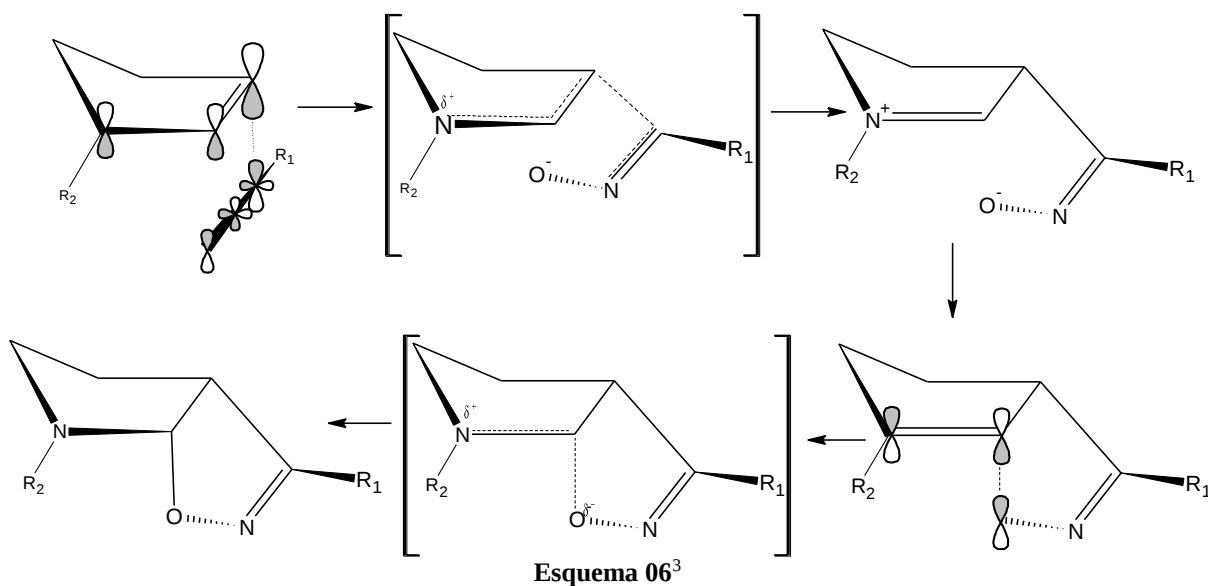
Esquema 04

O mecanismo da cicloadição 1,3-dipolar, na maioria dos casos, ocorre de modo concertado, isto é, algumas ligações são desfeitas e outras estabelecidas em uma única etapa, sem formação de intermediários (reações pericíclicas). Todavia, expondo formas peculiares desse tipo de reação, Huisgen, Mloston e Langhals (1986) relataram pela primeira vez uma cicloadição do tipo (3+2), onde duas etapas estavam envolvidas na produção do aduto. O primeiro passo correspondia ao estabelecimento de uma ligação σ C-C entre o 1,3-dipolo (2,2,4,4-tetrametilciclobutan-1-ona-3-tiona *S*-metilídio), gerado *in situ* a partir de seu precursor (espiro-1,3,4-tiadiazolina), e o dipolarófilo (dimetil-2,3-dicianofumarato), em THF. A estrutura zwitteriônica resultante, devido à possibilidade de rotação da antiga ligação dupla do dipolarófilo, possibilitou que a adição seguinte pudesse levar à geração de um par de isômeros *cis-trans*, na proporção de 48:52, sendo o rendimento de 94% (esquema 05). A falta de estereoespecificidade foi prova de que a reação se processou de modo não-concertado.



Recentemente, Siadati (2015), a partir de métodos computacionais para o cálculo das energias livres de Gibbs envolvidas na geração dos estados de transição da reação entre um óxido de nitrila (metil óxido de nitrila) e dois dipolarófilos (etileno, não substituído, e tetraaminoetileno), verificou que a utilização de um alqueno rico em elétrons como dipolarófilo e de solventes de crescente polaridade tendem a favorecer a ocorrência de um mecanismo em etapas, em detrimento de um concertado.

Partindo desse princípio, um mecanismo provável para a cicloadição entre óxidos de nitrila e enamidas/enecarbamatos, utilizados no presente trabalho, poderia ser descrito da seguinte forma:



³ O esquema foi elaborado a partir dos dados de De Almeida (2008)

A interação inicial ocorre entre o orbital HOMO da enamida/enecarbamato (dipolarófilo) e o orbital LUMO do óxido de nitrila (CEFNO) gerado *in situ* a partir de seu precursor clorooximinoacetato de etila. O estado de transição leva ao estabelecimento de uma ligação σ C-C (carbono β do dipolarófilo e carbono central do 1,3-dipolo), sendo o carbocátion resultante da adição estabilizado pelo par de elétrons livres presente no nitrogênio do enecarbamato/enamida, constituindo uma espécie zwitteriônica. Sequencialmente, o orbital preenchido do oxigênio sobrepõe o orbital LUMO do carbono α do dipolarófilo, estabelecendo um estado de transição que, pela formação de uma ligação σ C-O, produzirá o cicloaduto 2-isoxazolinico.

Um dos trabalhos pioneiros envolvendo a cicloadição 1,3-dipolar de óxido de benzonitrila a compostos etilênicos, portanto possuidores de ligação dupla, foi executado por Quilico, D'Alcontres e Grünanger (1950). A reação que levou à produção das 2-isoxazolininas se processou em solvente etéreo e à temperatura ambiente (ou levemente aumentada). Nessa linha, Perold, Steyn e Reiche (1957) realizaram a síntese de uma série de 2-isoxazolininas (**5**, **6**, **7**, **8** e **9**) a partir de reações entre o mesmo 1,3-dipolo (óxido de benzonitrila) e várias moléculas insaturadas, dentre as quais: *p*-metilestireno, α -metilestireno, indeno e diclopentadieno (figura 02).

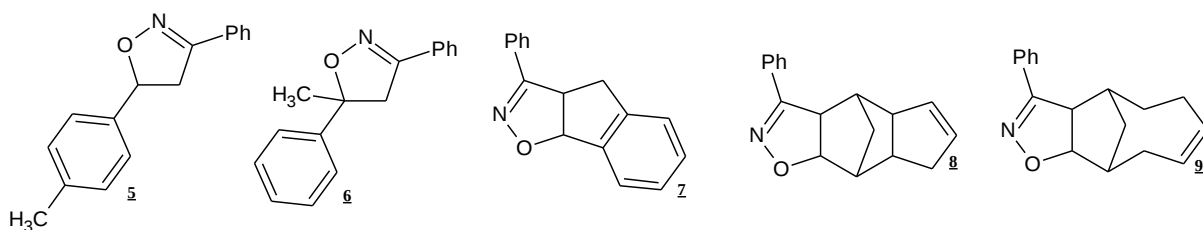
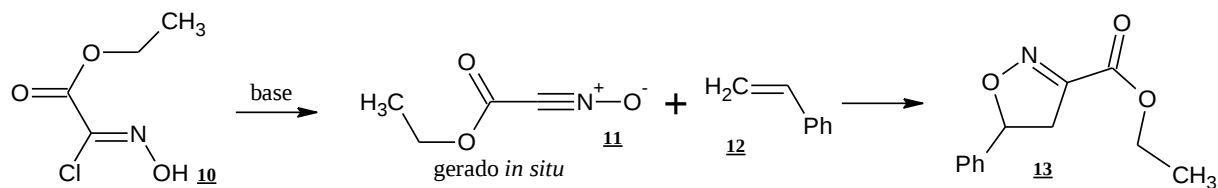


Figura 02

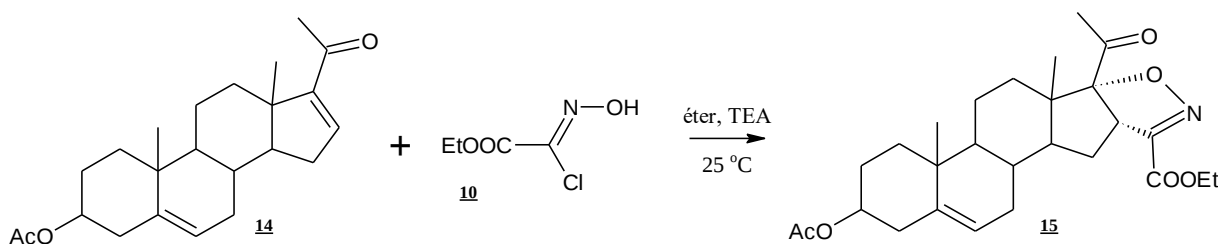
A partir dos achados publicados por pesquisadores à época, Vaughan e Spencer (1960) decidiram empregar o uso do 1,3-dipolo alenílico não-aromático CEFNO **11**, gerado *in situ* a partir de seu precursor (cloroximinoacetato de etila **10**), ao estireno **12** a fim de obter o ácido 5-fenil-2-isoxazolina-3-carboxílico **13**. Seu interesse era de que, ao obter um derivado 2-isoxazolinico substituído na posição 3, reações sequenciais, como a produção de hidrazida, pudessem abrir possibilidade para uma ampla gama de funcionalizações. O procedimento de então envolveu a agitação vigorosa de uma solução etérea contendo o estireno e o cloroximinoacetato de etila, à qual foi introduzida, lentamente, solução aquosa alcalina de carbonato de sódio (para geração do CEFNO a partir de sua molécula precursora), à temperatura

ambiente, levando à formação do éster do aduto cíclico 2-isoxazolínico em um rendimento de 50 % (esquema 07).



Esquema 07

Em continuidade com essa abordagem, Moersch, Wittle e Neuklis (1965) descreveram a síntese de um novo derivado 2-isoxazolínico do colesterol a partir da reação entre acetato de preña-5,16-dien-3 β -ol-20-ona **14** e cloroximinoacetato de etila **10**, para produzir o éster **15** correspondente. O procedimento deu-se sob agitação, à temperatura de 25°C, em éter seco, sendo utilizada solução etérea de TEA anidra (adicionada lentamente) como uma base, durante seis horas sob agitação e ao longo da noite (em repouso). O rendimento foi de 80 % do éster 16 α ,17 α [3-carboxi-3,1-(2-isoxazolino)]-pregn-5-em-3 β -ol-20-ona 3 β -acetato **13** (esquema 08).

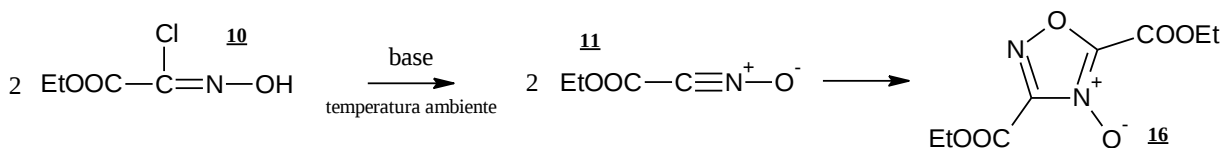


Esquema 08

Ordinariamente, os óxidos de nitrila alifáticos devem ser gerados gradativamente no meio reacional (*in situ*), a partir de seus precursores sob a ação de bases como aminas terciárias (ex. TEA). A instabilidade química, característica marcante destas estruturas altamente reativas, é mensurada pela capacidade que apresentam em formar dímeros (óxidos de dialquilfurazana **16**), subprodutos provenientes da interação de dois 1,3-dipolos entre si (GRUDMANN⁴, 1966 apud GRUDMANN; DATTA, 1969) (esquema 09). No entanto, como apontou o estudo de Grundmann e Datta (1969), vale salientar que a presença de grupos volumosos presentes na

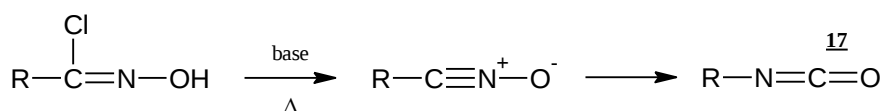
⁴ GRUDMANN, C. The chemistry of nitrile oxides. **Fortschritte der Chemischen Forschung**, Berlin, v. 7, p. 62, 1966.

estrutura de tais 1,3-dipolos faz com que o impedimento estérico gerado seja capaz de conferir-lhes estranha estabilidade, inclusive em temperatura equivalente a 25°C.



Esquema 09⁵

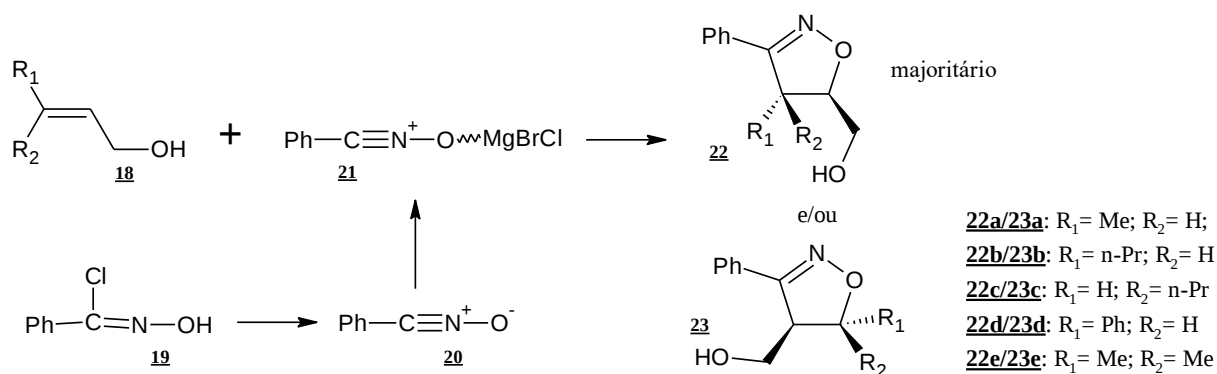
Por outro lado, o aquecimento do meio reacional propicia o rearranjo dos dipolos recém-formados para gerar isocianatos **17** (esquema 10) (FRANK *et al*, 2014). Isso posto, tanto em um como no outro caso (adição rápida do precursor do 1,3-dipolo ou elevação da temperatura do meio reacional), o rendimento da reação será negativamente afetado, uma vez que haverá menor extensão de óxido de nitrila para interagir com o dipolarófilo.



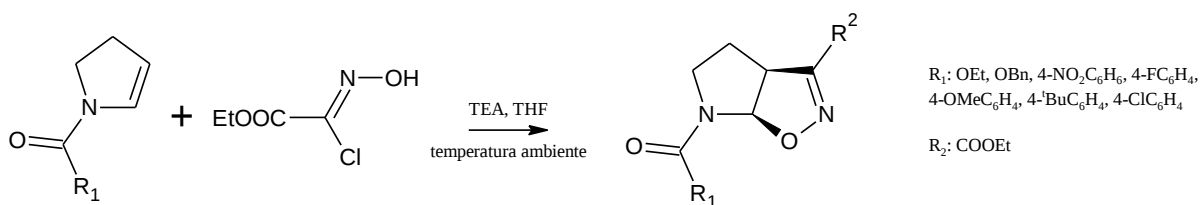
Esquema 10

Kanemasa, Nishiuchi e Wada (1992) relataram a produção altamente regioseletiva de derivados 2-isoxazolin-5-metanol a partir da reação entre álcoois alílicos substituídos **18** e óxido de benzonitrila **20** (oriundo de seu precursor cloreto de hidroximinoíla **19**) (esquema 11). Os rendimentos mais elevados (47-100%) e as melhores proporções de regioseletividade foram atingidos quando TEA foi empregada juntamente com mais de uma quantidade equimolar de alcóxido de magnésio, em CH₂Cl₂ por solvente. Tal regioseletividade fundamenta-se na formação de um complexo óxido de benzonitrila-MgBrCl **21**, menos reativo que a espécie 1,3-dipolo livre, interagindo com o dipolarófilo, portanto, de modo mais específico.

⁵ Dimerização de CEFNO a partir de seu precursor cloroximinoacetato de etila. Esquema adaptado a partir do artigo de Mattos e Kover (1994).

Esquema 11⁶

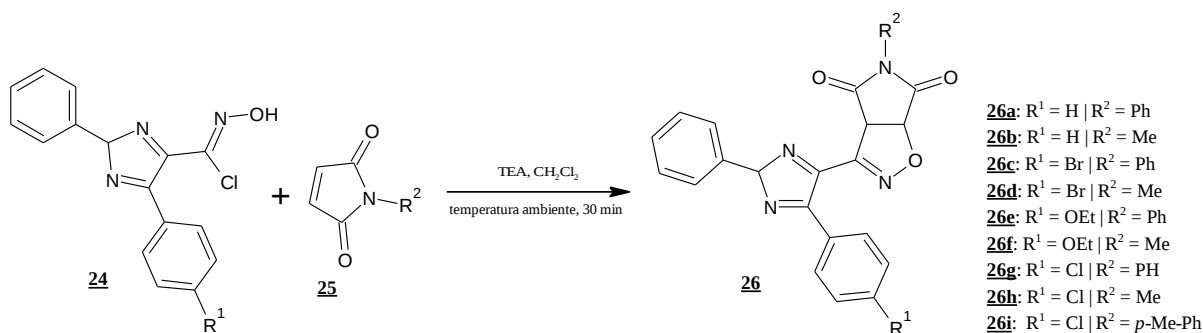
Em um dos trabalhos anteriores realizados pelo grupo de pesquisa, De Almeida *et al* (2009) destacaram a síntese inédita, tanto racêmica quanto diastereoisomérica, de 2-isoxazolininas aza-bicíclicas a partir de cicloadição 1,3-dipolar entre óxidos de nitrila (tanto CEFNO quanto aromáticos) e diversos enamidas/enecarbamatos endocíclicos de seis e cinco membros (esquema 12). Os melhores resultados foram alcançados quando clorooximinoacetato de etila (em solução, sendo gotejada lentamente), dipolarófilos de cinco membros, TEA seca (base) em CHCl₃ ou THF secos (solventes), à temperatura ambiente, foram utilizados. Nessas condições, os rendimentos variaram de 65% a 80%.



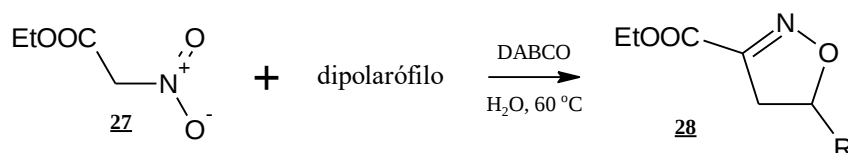
Esquema 12

Karthikeyan *et al* (2009), a partir da reação entre óxidos de nitrila pirazólicos **24** e três diferentes compostos insaturados **25** (maleimida N-substituída, fenilacetileno ou dicarboxilato de dietilacetileno), obtiveram novas isoxazolininas pirazolônicas **26**. A reação que transcorreu no período de 30 minutos, à temperatura ambiente, tendo CH₂Cl₂ como solvente e TEA por base orgânica, levou a rendimentos de 77-85% (esquema 13).

⁶ Os rendimentos e a razão dos produtos majoritário/minoritário foram os seguintes: **22a** – 90% (um único produto); **22b** – 90% (um único produto); **22c** – 100% (98:2); **22d** – 92% (um único produto); **22e** – 47% (99:1).

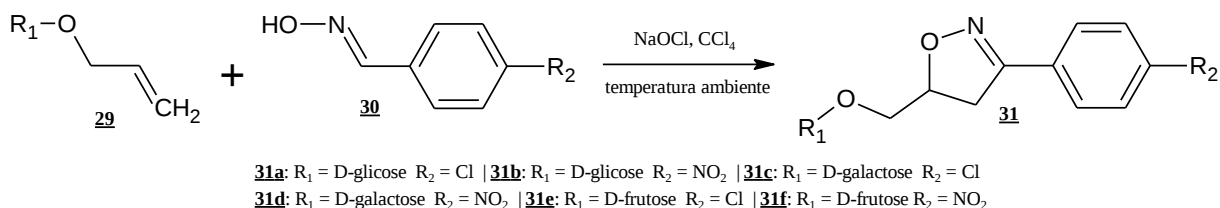
Esquema 13⁷

Trogu *et al* (2012) destacaram a síntese de 2-isoxalinas **28** a partir da reação de condensação entre ésteres nitroacéticos **27** a vários dipolarófilos (alquenos). A utilização de bases orgânicas (como TEA ou DABCO), à temperatura de 60°C, em fase aquosa e agitação do meio reacional, proporcionou os melhores rendimentos observados (52-83%), mesmo quando CHCl₃ foi empregado como solvente, em um período transcorrido de 18 horas (esquema 14).



Esquema 14

Gaamoussi *et al* (2013) narraram a produção regioseletiva de glicosil-1,2-isoxazolininas **31** por meio de cicloadição 1,3-dipolar entre aril óxidos de nitrila, gerados *in situ* a partir da reação de NaOCl com as respectivas oximas **30**, e glicosídeos alílicos **29** previamente preparados. As condições reacionais envolveram ainda a utilização de CCl₄ (solvente), à temperatura ambiente (esquema 15). Os rendimentos variaram de 86 a 91%.

Esquema 15⁸

⁷ A seguir são dados os rendimentos dos compostos: **26a** = 85%, **26b** = 82%, **26c** = 78%, **26d** = 79%, **26e** = 82%, **26f** = 81%, **26g** = 76%, **26h** = 80%, **26i** = 77%.

⁸ Os rendimentos obtidos foram os seguintes: **31a:** 88%, **31b:** 87%, **31c:** 91%, **31d:** 89%, **31e:** 87%, **31f:** 86%.

2.1.2 Atividades Biológicas

Em um estudo realizado por Pruitt *et al* (2000), para avaliar a atividade antitrombótica por parte de alguns heterociclos, constatou que 2-isoxazolininas 3,4,5-substituídas **32** apresentaram significativa inibição do fator Xa da cascata de coagulação, com concentrações inibitórias variando de 0,55 a 2,3 nM (figura 03).

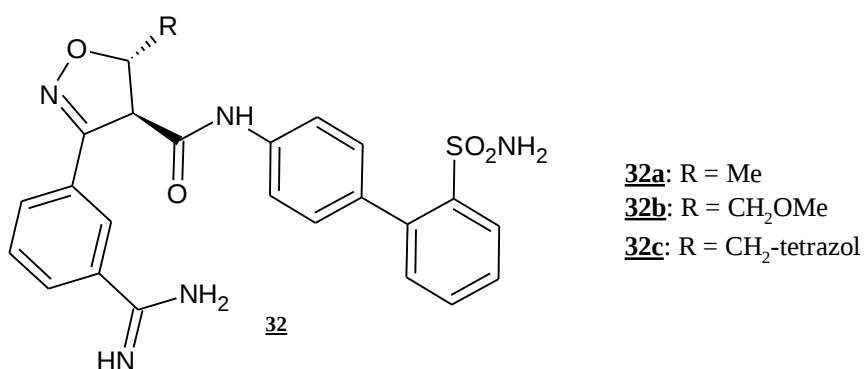


Figura 03⁹

Basappa e colaboradores (2004) avaliaram a atividade de novos derivados de 2-isoxazolininas frente à enzima PLA₂ (PLA₂, proveniente da espécie ofídica *Vipera russelli russelli*), diretamente relacionada à via do ácido ariquidônico e, consequentemente, constituindo etapa fundamental na síntese de mediadores pró-inflamatórios. Nesse aspecto, os autores destacaram os resultados obtidos por dois dos compostos pré-sintetizados, dos quais o mais ativo **33** apresentou IC₅₀ à PLA₂ de 86,2 μM, *in vitro* (figura 04).

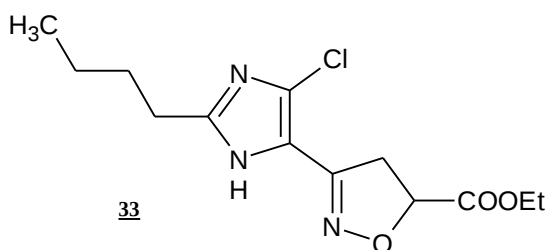


Figura 04¹⁰

⁹ As concentrações de inibição do fator Xa com relação aos compostos são: **32a** = 1,8 nM; **32b** = 0,55 nM; **32c** = 2,3 nM.

¹⁰ O padrão positivo utilizado no experimento foi o ácido ursólico, que apresentou IC₅₀ de 2,5 nM.

Também movidos pela descoberta de novos agentes anti-inflamatórios, Ghidini *et al* (2015) executaram a síntese de vários compostos esteróides contendo o núcleo 2-isoxazolinico (figura 05). Dentre os resultados obtidos com relação à molécula mais promissora da série **34**, destacam-se sua maior afinidade pelo receptor glicocorticóide em relação à dexametasona (0,5 nM x 2,3 nM, para seus respectivos valores de k_i), sua preferência pelo receptor glicocorticóide em detrimento do mineralocorticóide, bem como seus perfis farmacocinéticos e farmacodinâmicos, que propiciariam sua utilização como alternativa tópica para o tratamento de quadros inflamatórios respiratórios (via inalatória).

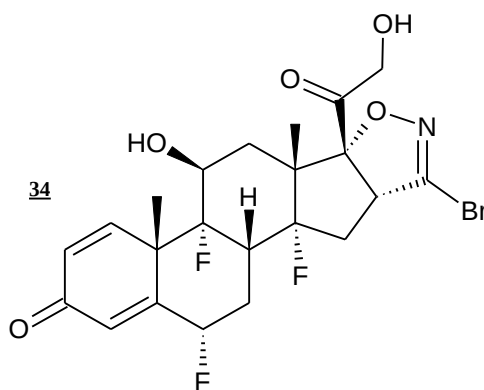
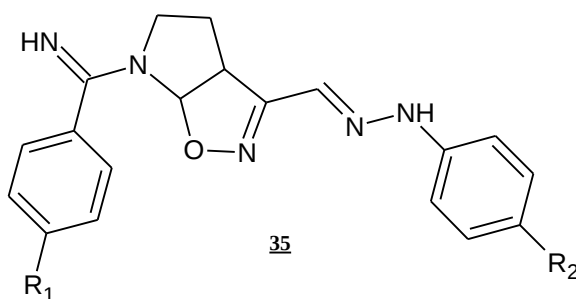


Figura 05

Reis *et al* (2011) elaboraram a síntese e a verificação dos efeitos antinociceptivos de seis híbridos de hidrazonas 2-isoxazolininas aza-bicíclicas **35**, por prova de inibição das contrações abdominais em camundongos, desencadeadas por administração intraperitoneal de ácido acético (figura 06). Os resultados apontaram elevada analgesia (dose de 150 μ mol/kg), em analogia ao padrão dipirona, assim como baixos níveis de toxicidade (1500 μ mol/kg).



- 35a:** $R_1 = \text{Cl}$ $R_2 = \text{Cl}$
35b: $R_1 = \text{Cl}$ $R_2 = \text{F}$
35c: $R_1 = \text{Cl}$ $R_2 = \text{OMe}$
35d: $R_1 = \text{F}$ $R_2 = \text{Cl}$
35e: $R_1 = \text{F}$ $R_2 = \text{F}$
35f: $R_1 = \text{F}$ $R_2 = \text{OMe}$

Figura 06¹¹

¹¹ Os percentuais de inibição das contrações abdominais foram: **35a** = 85,8%; **35b** = 69,6%; **35c** = 72,0%; **35d** = 69,3%; **35e** = 72,1%; **35f** = 76,0%; dipirona = 59,3%.

Aggarwal, Bansal e Mittal (2013), a fim de expandir o espectro de atividades relacionado ao núcleo 2-isoxazolina, expuseram a síntese e avaliação de seis novos derivados desta classe orgânica (figura 07). Três das moléculas mais ativas exibiram resultados satisfatórios contra duas cepas de bactérias Gram-positivas (*Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus*) e ação fungicida sobre uma cepa de *Saccharomyces cerevisiae*, em relação aos padrões positivos ciprofloxacino e fluconazol, para as respectivas provas.

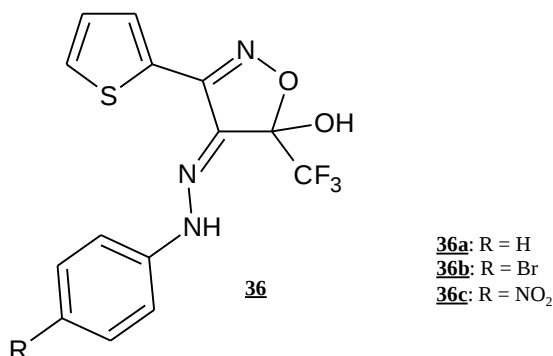
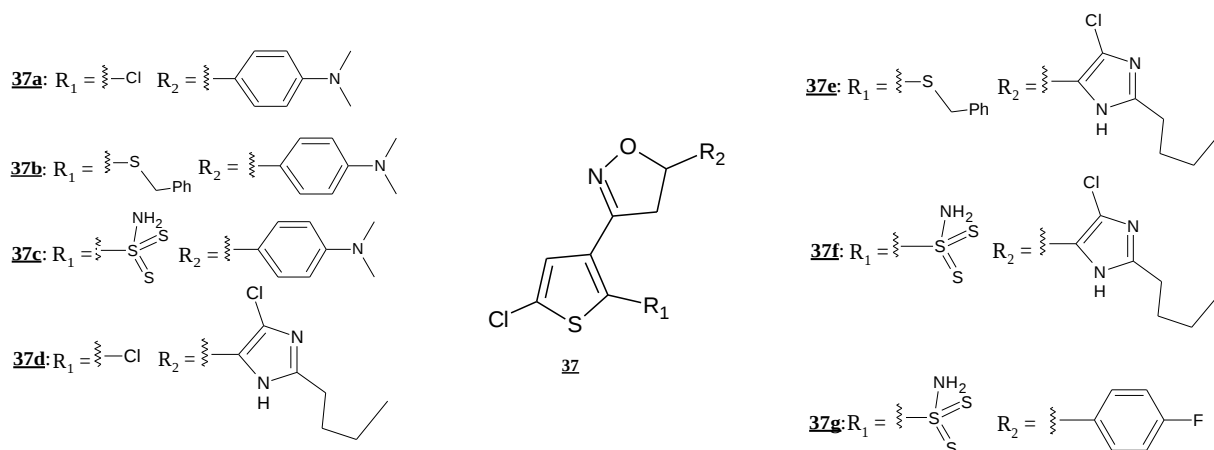


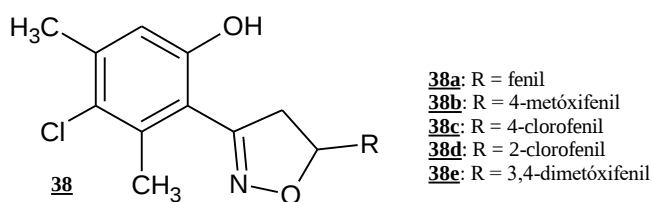
Figura 07¹²

Em pesquisa realizada por Mandawad *et al* (2014), uma nova série de moléculas contendo os núcleos tiofeno e 2-isoxazolina tiveram avaliada sua atividade antimicrobiana (figura 08). Vários dos compostos testados apresentaram de bons a excelentes resultados, comparáveis aos fármacos utilizados como padrões (rifampicina, estreptomicina e nistatina), quanto à inibição no crescimento de algumas cepas de microrganismos patogênicos, dentre os quais: *Micobacterium smegmatis*, *M. tuberculosis*, *Staphylococcus aureus* (Gram-positiva), *Pseudomonas aeruginosa* (Gram-negativa) e *Aspergillus niger*.

¹² Quanto à atividade antibacteriana, seguem os dados para a MIC (em µg/mL): **36a** = 10 e 25, **36b** = 25 e 10, **36c** = 5 e 5, ciprofloxacino = 2 e 4, frente à *B. subtilis* e *S. aureus*, respectivamente. Em relação à avaliação do perfil antifúngico, as seguintes informações são fornecidas para a MIC (µg/mL): **36a** = 100, **36b** = 10, **36c** = 5, fluconazol = 2, contra a cepa de *S. cerevisiae*.

Figura 08¹³

Em trabalho análogo ao supracitado, Bano *et al* (2015) conduziram análises biológicas a fim de averiguar os perfis antifúngico e antibacteriano de cinco novas espécies químicas contendo o núcleo 2-isoxazolina. Os resultados apontaram uma pronunciada ação contra cepas dos fungos *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *A. versicolor* e *A. flavus*, semelhante à do fármaco fluconazol, mas ação moderada em relação às bactérias *S. aureus* e *Escherichia coli*, considerando a droga padronizada ciprofloxacino (figura 04).

Figura 09¹⁴

Avaliando os efeitos de certos nucleosídeos isoxazolinico-carbocíclicos, Quadrelli *et al* (2013) evidenciaram uma significativa ação de dois desses compostos regioisoméricos contra

¹³ Na averiguação da atividade antimicrobiana, os valores da MIC ($\mu\text{g/ml}$) frente a *M. smegmatis*, *M. phlei* e *M. tuberculosis* para os três compostos mais ativos foram, sequencialmente: **37a** (0,05; 0,07; 0,1), **37b** (0,06; 0,05; 0,05), **37c** (0,05; 0,06; 0,06), rifampicina (0,48; 0,0004; 0,28). Quanto à prova da atividade antimicrobiana, os valores da MIC dos quatro compostos mais promissores contra cepas de *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *A. niger*, *C. albicans* foram: 6,25; 6,25; 6,25; 6,25; 25; 25 para as moléculas **37d**, **37e**, **37f** e **37g**, em comparação com os padrões estreptomicina (6,25; 6,25; 6,25; 6,25; não determinado; não determinado) e nistatina (não determinado; não determinado; não determinado; não determinado; 6,25; 6,25).

¹⁴ Os valores das MICs ($\mu\text{g/mL}$) das referidas referidas moléculas frente aos fungos *C. albicans*, *A. fumigatus*, *A. versicolor* e *A. flavus* foi, nessa ordem: **38a** (25; 12,5; 25; 6,25), **38b** (12,5; 25; 25; 6,25) e equivalentes para os produtos **38c**, **38d** e **38e** (12,5; 6,25; 12,5; 12,5), em comparação ao fluconazol (12,5; 12,5; 3,125; 12,5). Em respeito à avaliação antibacterianas das amostras, suas respectivas zonas de inibição de crescimento (mm) às bactérias *S. aureus* e *E. coli* foram: 1 (11 $\pm$ 0,1; 8 $\pm$ 0,1), 2 (11 $\pm$ 0,1; 8 $\pm$ 0,2), 3 (12 $\pm$ 0,1; 7 $\pm$ 0,2), 4 (11 $\pm$ 0,1; 8 $\pm$ 0,1), 5 (10 $\pm$ 0,2; 9 $\pm$ 0,2), ciprofloxacino (24 $\pm$ 0,1; 24 $\pm$ 0,1).

o vírus Influenza do tipo A (H1N1). Dentre os parâmetros utilizados no experimento, os autores destacaram as EC_{50} destas moléculas, menores que aquela da droga de referência ribavirina (figura 10).

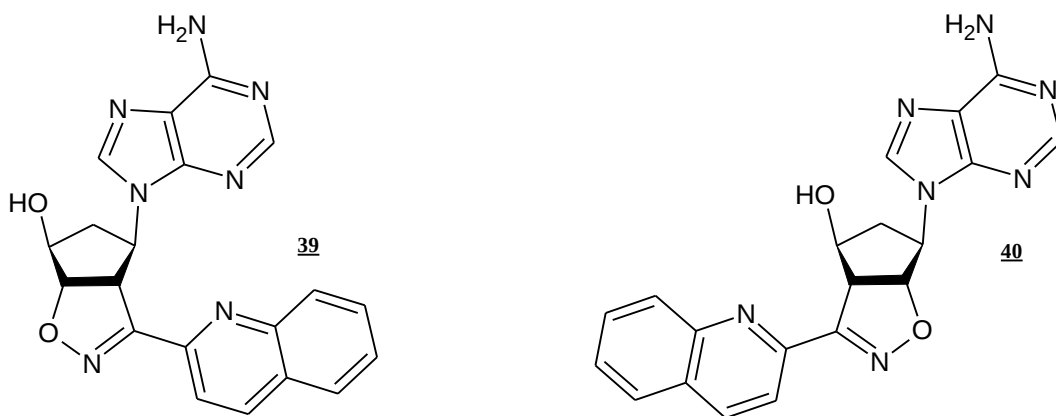


Figura 10¹⁵

Bruno *et al* (2014) narraram a obtenção sintética e a aferição do efeito inibitório de derivados 3-bromo-isoxazolínicos sobre a enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *Plasmodium falciparum*, macromolécula da via glicolítica que é fundamental na fase amastigota do protozoário para a geração de energia. As moléculas **40** e **41**, mais proeminentes para a atividade antimalárica, exibiram razões k_{inact}/K_i (que expressa a extensão da inibição de um dado composto) de $10,7 \pm 2,8 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ e $10,3 \pm 2,6 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$, sequencialmente (figura 11).

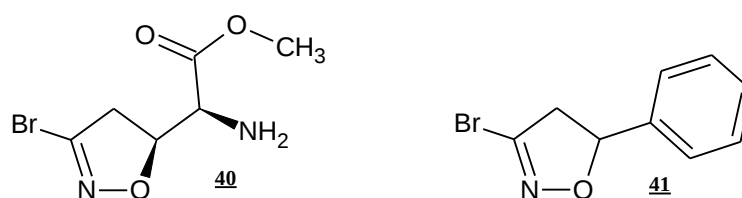


Figura 11¹⁶

A fim de contribuir no desenvolvimento de novas alternativas quimioterápicas ao tratamento da tripanossomíase africana humana (mais conhecida como doença do sono), Ettari *et al* (2015) procederam à síntese de compostos contendo o esqueleto 2-isoxazolina e

¹⁵ As concentrações que foram necessárias para reduzir a replicação viral pela metade (EC_{50}) foram (em μM): **39** (1,33), **40** (0,80), ribavirina (5,85). Por outro lado, suas correspondentes concentrações precisas para depletar por 90% a replicação do vírus (EC_{90}) foram: **39** (>100), **40** (>100), ribavirina (13,28).

¹⁶ As razões k_{inact}/K_i foram ($\text{s}^{-1} \text{ M}^{-1}$): **40** = $10,7 \pm 2,8$; e **41** = $10,3 \pm 2,6$.

mensuraram sua ação inibitória contra a enzima rodesaína, protease fundamental à vida do parasito *Trypanosoma brucei rhodesiense*, agente etiológico da patologia. A mistura diastereoisomérica mais ativa **42** apresentou K_i igual a $2,62 \pm 0,21 \mu\text{M}$, exibindo elevada seletividade sobre a enzima parasitária em comparação com as catepsinas B e L humanas (figura 12).

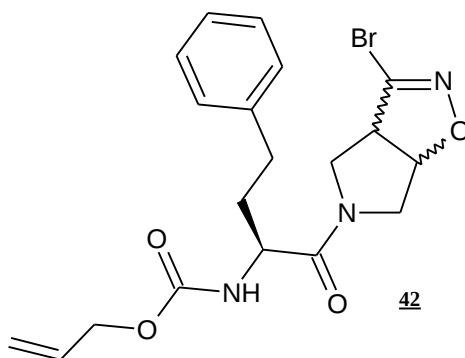


Figura 12

Prajapati *et al* (2015) executaram a produção de isoxazolinas bicíclicas (fundidas com ciclopentano), relatando os resultados quanto à constatação de suas características antimicrobianas e anticâncer, *in vitro* (figura 13). Em relação à citotoxicidade, um dos análogos dióis **43**, destacou-se com pronunciada ação sobre uma linhagem de células de câncer de mama (MCF-7), semelhante àquela do fármaco de referência etoposídeo (valores de IC_{50} sendo $11,5 \pm 1,45$ e $11,95 \pm 2,63 \mu\text{g/mL}$, respectivamente).

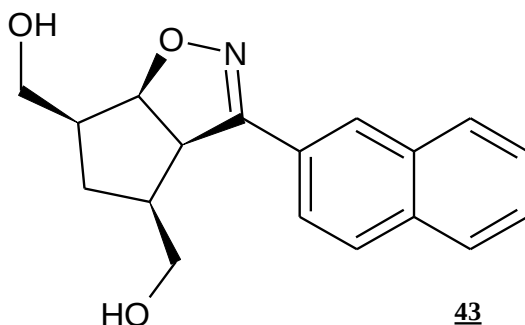


Figura 13

Em uma síntese estereo e regioseletiva de espiroisoxazolinas, obtidas por cicloadição 1,3-dipolar, Frank *et al* (2014) avaliaram os efeitos farmacológicos dos novos compostos contra três linhas de células cancerígenas: A431, HeLa e MCF7. Os resultados apontaram para uma

satisfatória atividade de duas das novas estruturas **44a** e **44b**, com valores de IC₅₀ menores ou ao menos comparáveis àqueles do fármaco de referência cisplatina (figura 14).

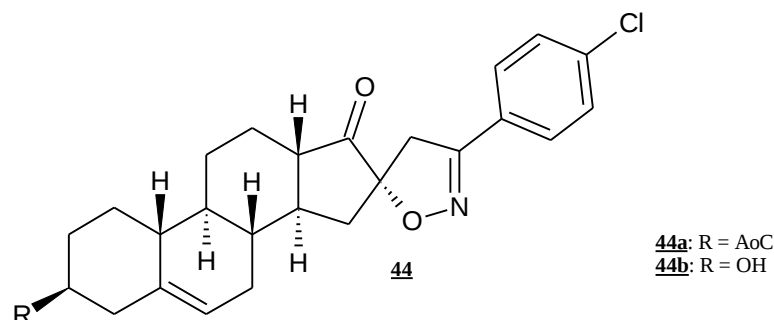


Figura 14¹⁷

Em relação ao papel das espiroisoxazolininas na pesquisa por novos agentes citotóxicos, Abolhasani *et al* (2014) expuseram a síntese e avaliação de seus derivados frente a três linhas de células neoplásicas malignas: T47D, MCF-7, HT29. Dois dos compostos estudados exibiram elevada atividade contra a linhagem T47D, com valores de IC₅₀ similares às referências empregadas no teste (colchicina, vimblastina, vincristina, cisplatina e doxorubicina), apesar de sua não ignorável toxicidade sobre células normais de HFF-1 (figura 15).

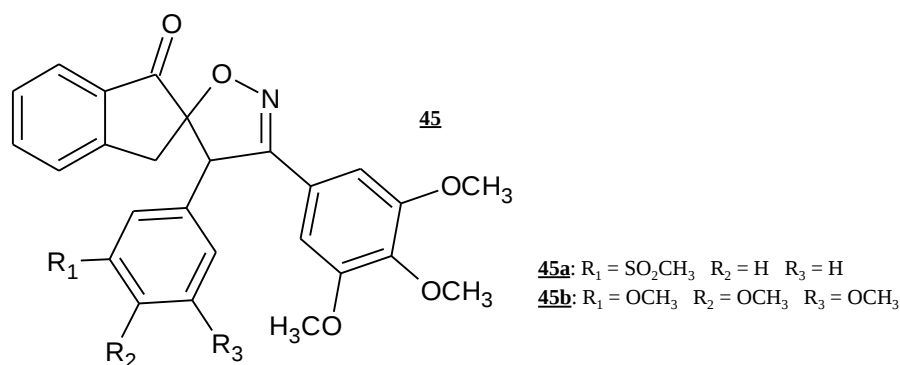


Figura 15¹⁸

¹⁷ Os valores de IC₅₀ das moléculas contra as linhas de células neoplásicas HeLa, MCF7 e A431 foram, respectivamente (em µM): **44a** (7,46; 8,07; 3,42), **44b** (7,39; 7,13; 4,20) e cisplatina (12,43; 9,63; 2,84).

¹⁸ Os valores de IC₅₀ dos compostos testados para as três linhas células tumorais (MCF-7, HT29, T47), bem como aquela de células normais (HFF-1) foram, depois de 72 horas de incubação com as substâncias avaliadas, respectivamente (em µM): **45a** (24,17±2,57; 69,26±1,61; 0,07±0,01; 2,31±0,04), **45b** (17,48±2,74; 28,53±7,42; 0,12±0,07; 2,60±0,01), colchicina (0,03±0,005; 0,01±0,007; 0,05±0,016; não determinado), cisplatina (0,204±0,04; 0,018±0,006; 21,43±2,25; não determinado), vincristina (0,0026±0,001; 0,011±0,003; 0,046±0,017; não determinado), vimblastina (0,0041±0,003; 0,03±0,01; 0,074±0,013; não determinado), doxorubicina (0,062±0,012; 0,28±0,09; 0,084±0,036; não determinado).

2.2 TIOSSEMICARBAZONAS

Classe orgânica constituída por heteroátomos de nitrogênio e enxofre, dos quais destacam-se as porções azometina (C=N) e tioamida (S=CN), as tiossemicarbazonas são estruturas que atraem grande interesse tanto na síntese orgânica quanto na química medicinal, graças à facilidade de sua obtenção e ao seu uso como intermediário na elaboração de outros compostos orgânicos, assim como ao seu notório emprego na busca por novas moléculas bioativas. Sua estrutura básica, conforme a IUPAC (1993), pode ser compreendida como exposto na figura 16.

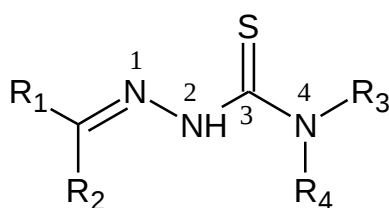
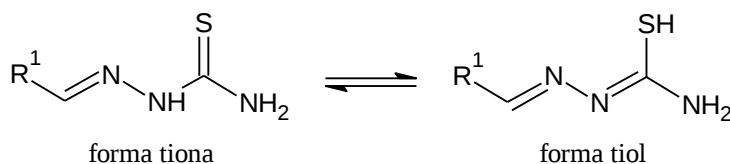


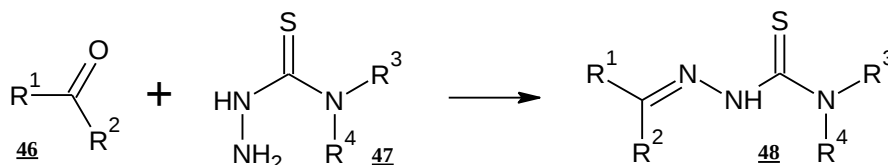
Figura 16

Uma peculiaridade das tiossemicarbazonas é que, uma vez que possuem marcante deslocalização eletrônica, podem apresentar-se em equilíbrio quer na forma “tiona” (C=S), quer na sua forma tautomérica “tiol” (C-SH), podendo haver predominância (ou mesmo ocorrência única) de uma das duas (LI, M.-X. *et al*, 2010) (esquema 16).



Esquema 16

Sua síntese envolve a reação de condensação entre compostos carbonilados (aldeídos ou cetonas) **46**, e tiossemicarbazidas **47**, catalisadas por ácidos, sendo estas comercialmente adquiridas ou previamente preparadas (esquema 17). No último caso, os principais meios pelos quais se pode conseguir as tiossemicarbazidas são através das reações entre hidratos de hidrazina e diversos reagentes orgânicos sulfetados como isotiocianatos, ditiocarbamatos e ácido tioglicólico (TENÓRIO *et al*, 2005).

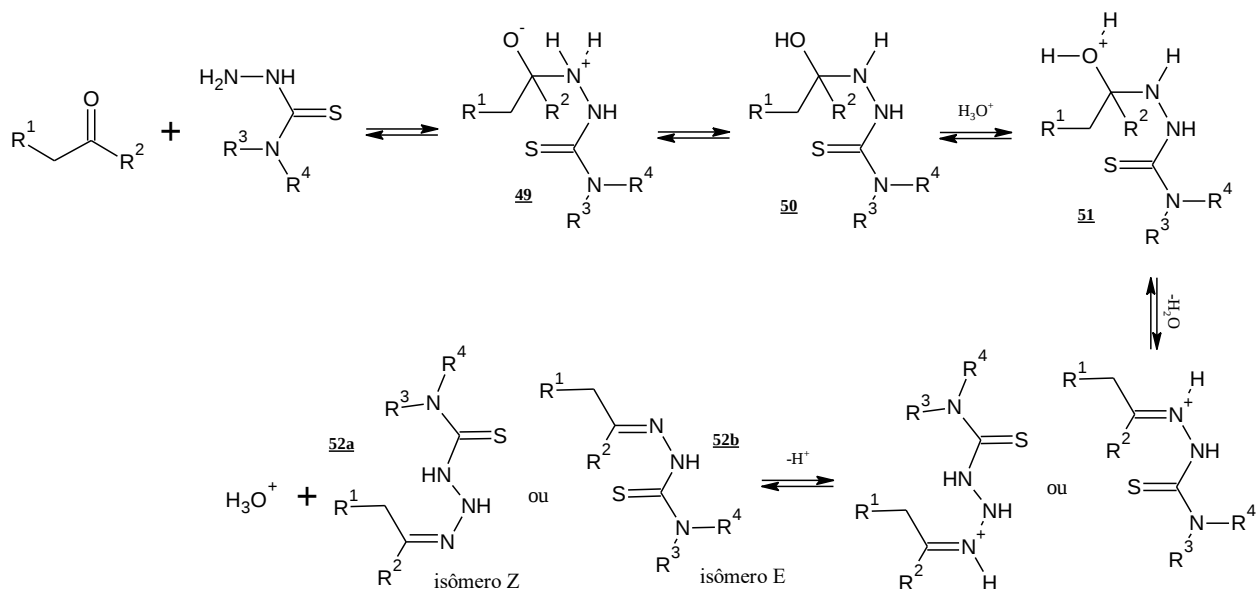


Esquema 17

Quanto ao seu uso na química medicinal, a literatura atesta que diversos agentes contendo em sua estrutura a classe tiossemicarbazona exibiram resultados promissores em relação aos efeitos antibacteriano (HAMEED *et al*, 2015), antiviral (KANG *et al*, 2011), antileishmania (BRITTA *et al*, 2014), antichagásico (BRITTA *et al*, 2015; BLAU *et al*, 2013; MOREIRA *et al*, 2014), antitumoral (DE OLIVEIRA *et al*, 2015) e citotóxico (MATESANZ; HERNÁNDEZ; SOUZA, 2014). Outra característica desses compostos é sua capacidade em quelar cátions metálicos, conduzindo à formação de complexos que, não raras vezes, também demonstraram satisfatórias ações biológicas (ESWARAN *et al*, 2016).

2.2.1 Síntese

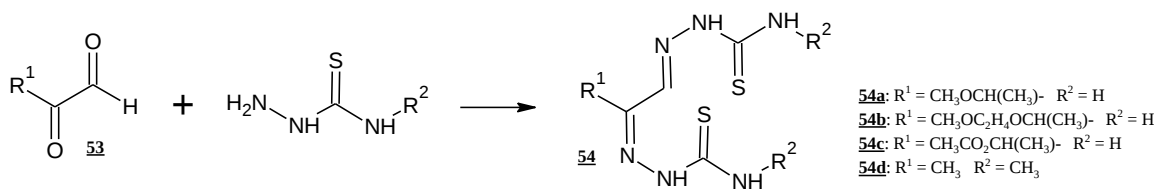
As tiossemicarbazonas são ordinariamente obtidas pela reação entre tiossemicarbazidas e aldeídos ou cetonas. O mecanismo desse tipo de reação é similar àquele proposto para a formação de iminas (TENÓRIO *et al*, 2005). Conforme Solomons e Fryhle (2012), esse processo reversível é iniciado pelo ataque nucleofílico do átomo de nitrogênio da tiossemicarbazida à carbonila, seguido por formação de um intermediário dipolar **49** que gera um aminoálcool **50**, com sua posterior desidratação **51**, através de catálise ácida, para produzir as iminas (no nosso caso, tiossemicarbazonas **52a** e **52b**), geralmente numa mistura isomérica E/Z (esquema 18).



Esquema 18

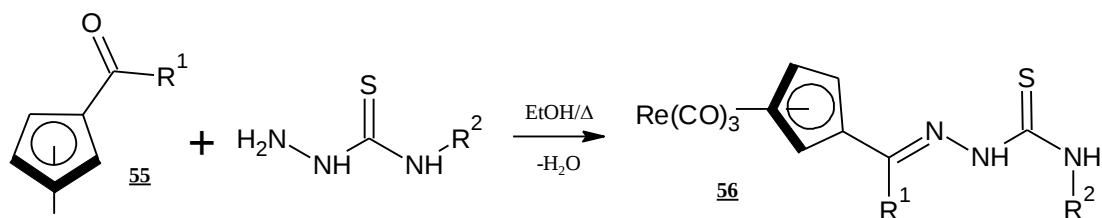
No entanto, os autores advertiram que para uma maior velocidade da reação o valor do pH deveria estar situado entre 4 e 5. Isso porque uma baixa concentração de H^+ (pH elevado) dificultaria a protonação da OH do aminoálcool, inviabilizando a catálise, enquanto uma grande taxa de H^+ (pH baixo) faria com que a amina, na etapa inicial, estivesse protonada, o que inviabilizaria o ataque nucleofílico à carbonila.

Petering *et al* (1965) relataram a produção de uma série de bis-tiossemicarbazonas a partir da reação entre α -ceto aldeídos e tiossemicarbazidas, catalisada por ácido acético de 2-5% (esquema 19).



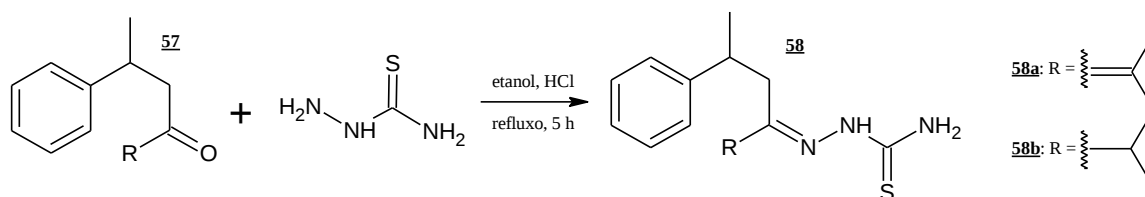
Esquema 19

Aracinbia *et al* (2014) executaram a reação entre diversas tiossemicarbazidas e os compostos carbonilados organometálicos ciretrenoalaldeído ou acetilciretreno 55, formando as tiossemicarbazonas desejadas 56 (contendo rênio em suas estruturas), exclusivamente com isomeria E (esquema 20). O meio reacional, contendo etanol seco como solvente, foi deixado sob refluxo por 24 horas. Os rendimentos foram de 50 a 90%.

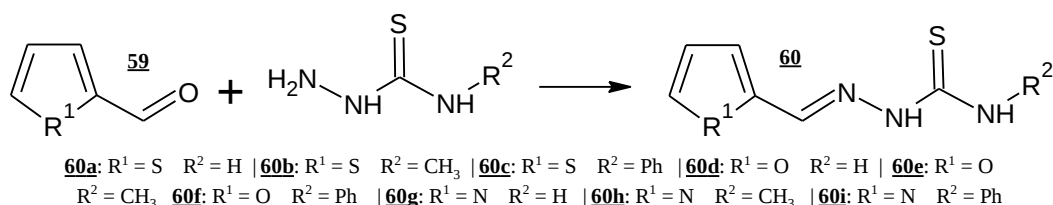


Esquema 20

Mazoir *et al* (2016) publicaram a síntese das tiossemicarbazonas **58a** e **58b** a partir da condensação entre derivados terpênicos **57** isolados do óleo essencial de *Cedrus atlantica* e tiossemicarbazidas. A reação foi realizada em etanol, em cinco horas, sob refluxo, tendo HCl como catalisador, dando os excelentes rendimentos de 94 e 98% (esquema 21).

Esquema 21¹⁹

Xie *et al* (2016) relataram a síntese de diferentes moléculas contendo o esqueleto tiossemicarbazona, provenientes da reação entre diversos aldeídos (2-tiofenocarboxaldeído, 2-furaldeído e 2-pirrolcarboxaldeído) e distintas tiossemicarbazidas. À solução da tiossemicarbazida em etanol, contendo quantidade catalítica de ácido acético, foi gotejado gradativamente o respectivo aldeído. A mistura reacional foi deixada em refluxo durante duas horas. Os produtos cristalinos exibiram rendimentos entre 63,9-96,3% (esquema 22).

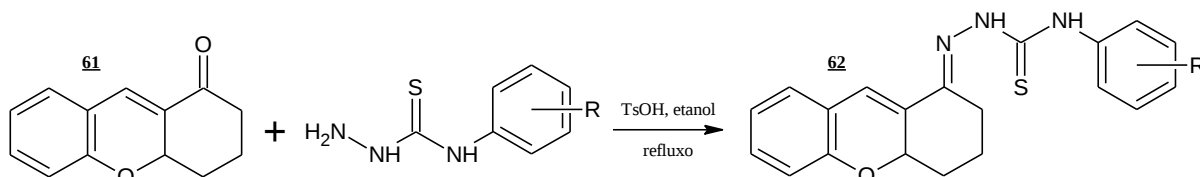
Esquema 22²⁰

Realizando a condensação entre 2,3,4,4a-tetrahidro-1H-xanten-1-ona **61**, um análogo de xanteno, e tiossemicarbazidas substituídas, Hameed *et al* (2015) obtiveram as respectivas

¹⁹ Os compostos **a** e **b** foram obtidos em rendimentos de 94 e 98 %, respectivamente.

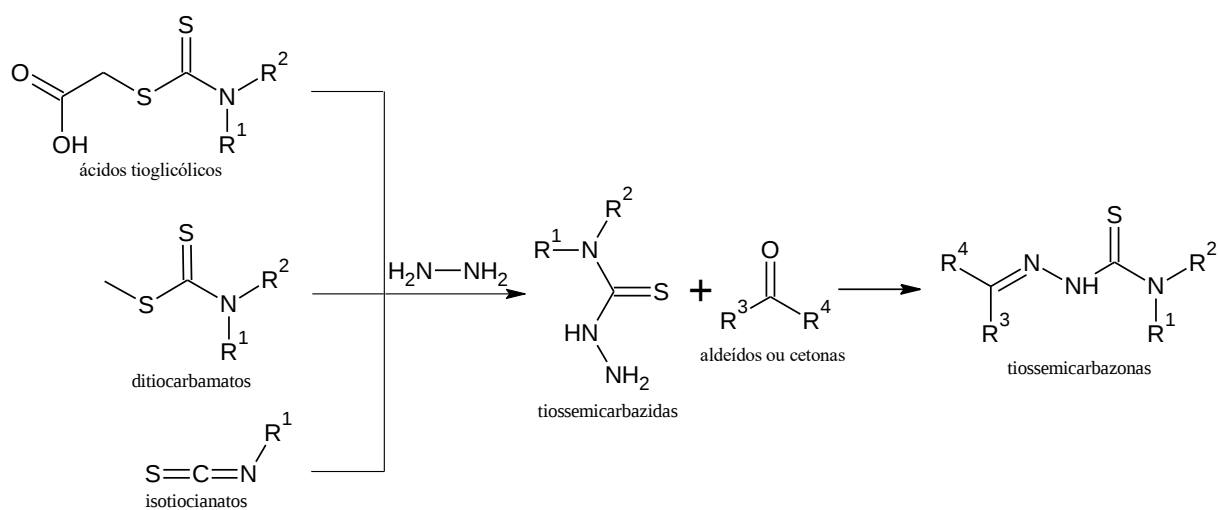
²⁰ |A descrição dos rendimentos é dada a seguir: **60a** = 72,0%; **60b** = 89,3%; **60c** = 89,2%; **60d** = 96,3%; **60e** = 71,5%; **60f** = 87,0%; **60g** = 71,2%; **60h** = 67,8%; **60i** = 63,9%.

tiossemicarbazonas **62** em bons a excelentes rendimentos (70-93%). A reação foi processada em etanol como solvente, sob refluxo e tendo TsOH como catalisador (esquema 23).



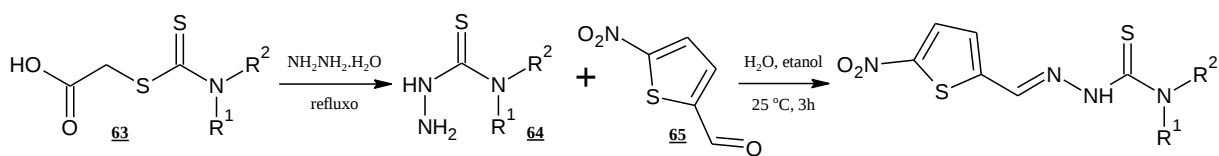
Esquema 23

Entretanto, com o objetivo de ampliar as possibilidades de obtenção de tiossemicarbazonas substituídas, alguns métodos para preparação do reagente de partida tiossemicarbazida podem ser utilizados (esquema 24).



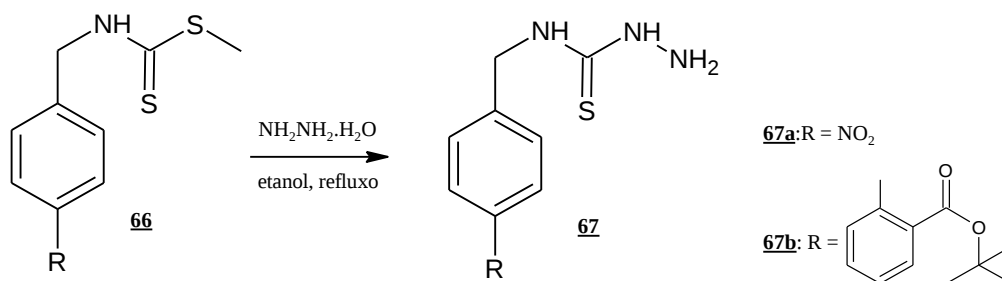
Esquema 24

No trabalho de Barthi *et al* (2002), tiossemicarbazidas substituídas **64** foram obtidas pela reação entre ácidos tioglicólicos **63** e hidrato de hidrazina. A etapa seguinte envolveu a condensação das tiossemicarbazidas recém preparadas e 5-nitrotiofeno-2-carboxaldeído **65**, levando à produção das tiossemicarbazonas correspondentes, em rendimentos que variaram de 53-74% (esquema 25).



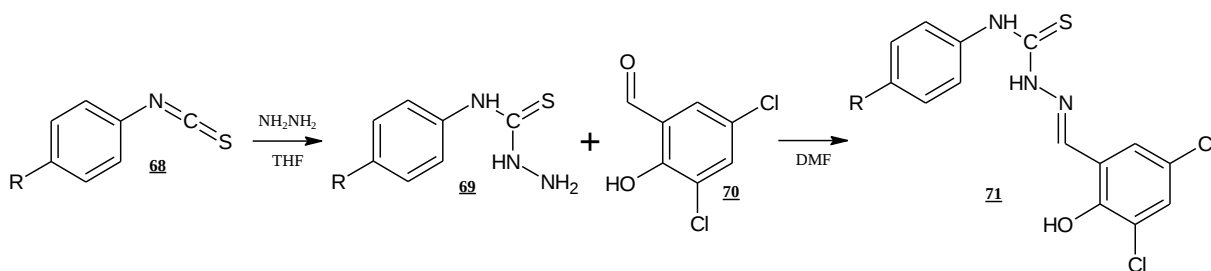
Esquema 25

Dois derivados tiossemicarbazidas, 4-(4-nitrobenzil)-3- **67a** e 4-[[2'-(tert-butoxicarbonil)-bifenil-4-il]metil]-3-tiossemicarbazida **67b**, foram sintetizados por Ashton *et al* (1993) através da reação entre hidrato de hidrazina e apropriados ditiocarbamatos **66**, em etanol e sob refluxo por duas horas (esquema 26). Os rendimentos foram de 60% e 79%, respectivamente.



Esquema 26

Duffy *et al* (2002) executaram a preparação de 3-carbóxi e 3-sulfônictiossemicarbazidas, a partir da reação entre hidrazina e isotiociantos **68** com o padrão de substituição desejado. As tiossemicarbazidas *p*-substituídas **69** foram utilizadas, subsequentemente, na condensação com 3,5-diclorosalicilaldeído **70**, gerando as tiossemicarbazonas **71** de interesse (esquema 27).



Esquema 27

Uma vez que as reações para obter as tiossemicarbazonas são feitas em sequência (com necessidade de purificação de intermediários), Cunha e Da Silva (2009), desejando minimizar o dispêndio costumeiro de solventes e energia, realizaram a produção das tiossemicarbazonas através de uma única mistura contendo hidrazina, isotiocianatos e compostos oxo diversos, tendo metanol por solvente, sem uso de catalisador e submetida a refluxo. Os rendimentos foram de razoáveis a excelentes, variando entre 25-98%.

2.2.2 Atividades Biológicas

Kang *et al* (2011) planejaram a produção de novas isatinas- β -tiosemicarbazonas, bem como sua avaliação contra os vírus da herpes humana, tipos 1 e 2 (HSV-1 E HSV-2, respectivamente). A inserção do substituinte morfolina na posição N-4 da tiossemicarbazona resultou no composto **72** com melhor atividade anti-herpética sobre ambas as formas virais, analogamente àquela registrada para a droga padrão aciclovir (figura 17).

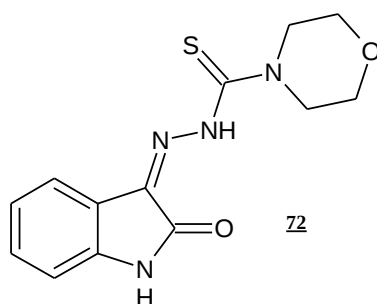


Figura 17²¹

Matesanz, Hernández e Souza (2014), após procederem à síntese de derivados 2,6-diacetilpiridina bis(*p*-clorofeniltiossemicarbazona) nas formas livre e seus complexos com platina e paládio, avaliaram sua atividade citotóxica contra as linhas de células tumorais A2780, A2780cisR e T-47D (figura 18). Os resultados demonstraram que a forma livre **73** apresentou ação mais pronunciada sobre T-47D quando comparada àquela da cisplatina (referência positiva no teste).

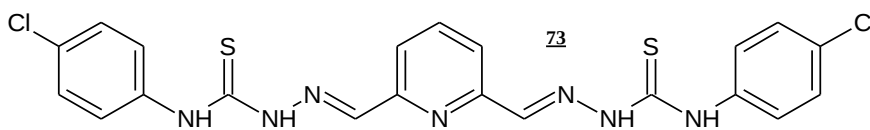


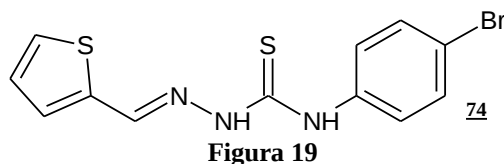
Figura 18²²

Na senda do desenvolvimento de novos agentes ativos contra células tumorais, De Oliveira *et al* (2015) sintetizaram quatorze compostos contendo o esqueleto tiofeno-2-

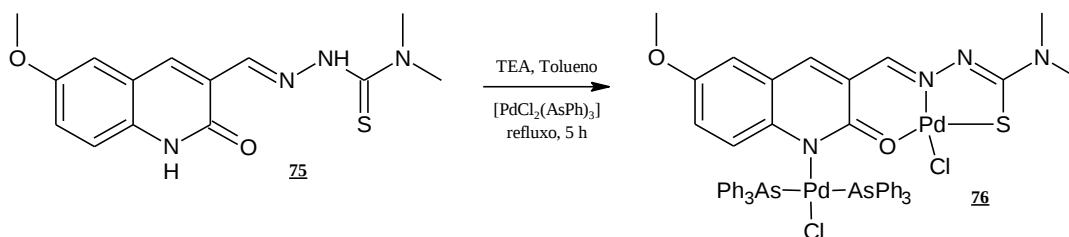
²¹ Os valores de IC₅₀ (μM) contra HSV-1 e HSV-2 foram, respectivamente: 1,30±0,16 e 2,74±0,23, para o derivado isatina- β -tiosemicarbazona; 0,30±0,04 e 1,27±0,14, para aciclovir.

²² Os valores de IC₅₀ (μM) dos compostos para as linhas de células tumorais A2780, A2780cisR e T-47D foram, respectivamente: forma livre **73** (7,16±0,14; 13±1; 7,42±0,14), complexos com platina (7,12±0,21; 9,13±0,07; 9,17±0,07) e paládio (24±1; >100; >100), cisplatina (0,88±0,01; 7,77±0,10; 12±1).

tiossemicarbazona, avaliando seu perfil contra linhas de células neoplásicas (*in vitro*) e sua atividade relacionada à inibição no desenvolvimento do tumor sólido de Erlinch (*in vivo*). Dentre as moléculas testadas, aquela possuindo o substituinte *p*-bromofenil em N-4 da porção tiossemicarbazona **74** demonstrou ser a mais ativa frente à linha de células tumorais 786-0 (figura 19).



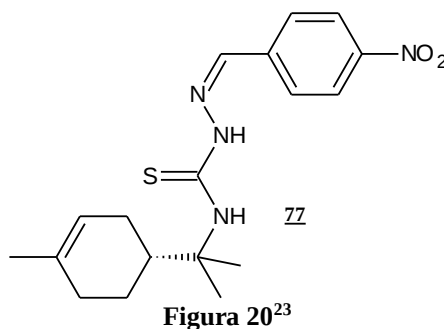
Eswaran *et al* (2016) levaram a cabo a produção do ligante 6-metóxi-2-oxo-1,2-diidroquinolina-3-carbaldeído-4(N,N)-dimetiltiossemicarbazona binuclear **75** bem como seu complexo de Pd(II) **76** correspondente (esquema 28). Os compostos apresentaram a capacidade de intercalação entre os pares de bases nitrogenadas da molécula de DNA (sobretudo a forma coordenada com o metal de transição), que consiste num dos mecanismos de ação dos quimioterápicos antineoplásicos.



Esquema 28

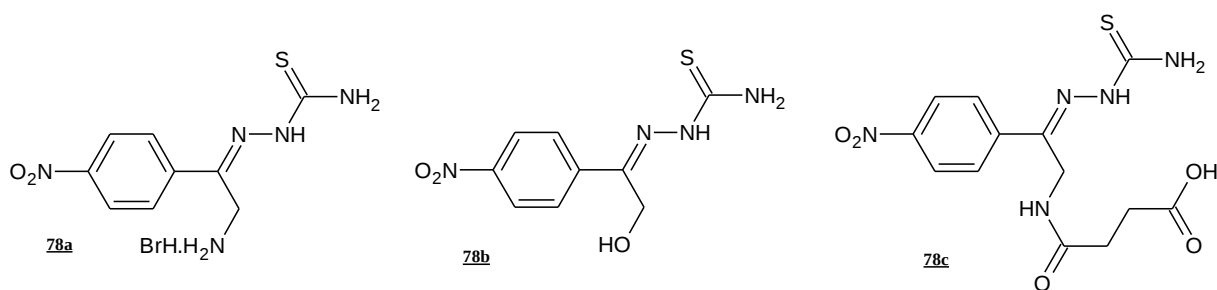
Um grupo de pesquisadores realizou a síntese de 4-nitrobenzaldeído tiossemicarbazona proveniente de *S*-(-)-limoneno **77**, avaliando seus perfis contra *Leishmania amazonensis* (BRITTA *et al*, 2014) e *Trypanosoma cruzi* (BRITTA *et al*, 2015), a fim de oferecer outras alternativas para o tratamento da leishmaniose e doença de Chagas, respectivamente (figura 20). O composto tiossemicarbazônico foi responsável por causar extensas alterações morfológicas e diminuição da proliferação de promastigotas e amastigotas intracelulares (*L. amazonensis*), assim como de epimastigotas e redução da viabilidade de tripomastigotas (*T. cruzi*), como consequência de alterações mitocondriais causadas por sua ação (embora sem alterar a permeabilidade da membrana plasmática). Além disso, 4-nitrobenzaldeído

tiossemicarbazona foi mais tóxica contra os protozoários em comparação às células J774A1 e LLCMK₂ de mamíferos.



Um dos modos mais eficazes de desenvolver novos agentes para o enfrentamento de patologias é identificar um possível alvo envolvido na gênese da doença. Nesse aspecto, a descoberta da cruzaina, uma protease cisteína derivada do *T. cruzi*, envolvida em vários processos vitais de todas as formas evolutivas deste protozoário, impulsionou diversos grupos de pesquisa a buscar potentes inibidores contra esta enzima (CHIYANZU, *et al*, 2003; GREENBAUM, D. C. *et al*, 2004; FUJII *et al*, 2005).

Blau *et al* (2013) desenvolveram aril tiossemicarbazonas (**78**, **79** e **80**) com boa atividade antichagásica (figura 21). Na ocasião, os autores destacaram que fatores como a presença do grupo nitro na posição *para* do anel aromático e a ausência do substituinte amino foram aspectos preponderantes à atividade observada.



²³ Referente à ação sobre as formas epimastigota e tripomastigota de *T. cruzi*, a tiossemicarbazona apresentou os valores de $9,2 \pm 1,7 \mu\text{M}$ (IC₅₀, concentração de inibição do crescimento em 50%) e $1,43 \pm 0,9 \mu\text{M}$ (EC₅₀, concentração que lisou 50% do protozoário), respectivamente. Por sua vez, os valores de IC₅₀ para promastigotas e amastigotas intracelulares foram de $3,8 \mu\text{M}$ e $7,7 \mu\text{M}$.

²⁴ Frente à forma epimastigota, são referidos os seguintes valores de IC₅₀ para os citados compostos: **78a** = $6,3 \mu\text{M}$; **78b** = $37,7 \mu\text{M}$; **78c** = $12,0 \mu\text{M}$; **benznidazol** (droga de referência) = $34,6 \mu\text{M}$.

Entretanto, a fim de verificar a influência de um grupo espaçador entre o anel aromático e a porção tiossemicarbazona sobre a ação tripanossomicida, Moreira *et al* (2014) procederam a síntese e avaliação biológica de vinte e quatro destes novos derivados. Os dois compostos de maior destaque (**79a** e **79b**) apresentaram marcante atividade sobre as formas tripomastigota e epimastigota do parasito (figura 22). Em consideração à influência da estrutura sobre o perfil biológico apresentado pelos agentes, os pesquisadores confirmam que a natureza (elétrondoadora ou retiradora) do substituinte é importante, mas sua posição no anel aromático tem pequena relevância.

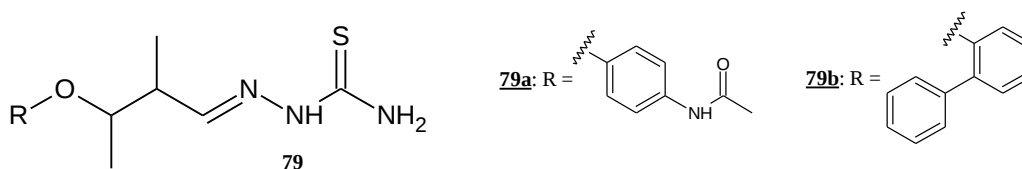


Figura 22²⁵

Todavia, tem sido recorrente nos trabalhos supracitados, em relação à ação antichagásica das tiossemicarbazonas, que não raras vezes vários compostos desta classe são ativos contra *T. cruzi* mas sem afinidade apreciável sobre a cruzaina. Tal constatação tem servido de evidência para sugerir que outros mecanismos estão envolvidos para ocorrência dos efeitos observados.

²⁵ Os valores de CC₅₀ (μM) que expressa a concentração citotóxica para 50% da forma tripomastigota de *T. cruzi*, bem como a concentração não citotóxica mais elevada (μM) frente às células esplênicas de ratos BALB/c são dados: **79a** = 1,4 e >339; **79b** = 1,1 e 31,9; **benznidazol** = 6,2 e 96,0; **nifurtimox** = 2,7 e 3,4. Do mesmo modo, para a forma epimastigota, os valores que reduziram em 50% sua proliferação IC₅₀ (μM) foram: **79a** = 71,5; **79b** = 2,2; **benznidazol** = 48,8; **nifurtimox** = 5,7.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

- Executar a síntese regioseletiva de inéditos híbridos tiossemicarbazônicos isoxazolínicos aza-bicíclicos racêmicos, caracterizando-os mediante análises espectroscópicas de RMN ^1H e ^{13}C , infravermelho e espectrometria de massas.
- Avaliar o perfil dos neoderivados quanto à sua possível atividade citotóxica.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Proceder à síntese do núcleo 2-isoxazolina, mediante emprego de metodologia concernente à reação de cicloadição 1,3-dipolar entre enamidas/enecarbamatos endocíclicos e óxido de nitrila (CEFNO).
- Realizar a conversão do grupo éster dos cicloadutos isoxazolínicos aza-bicíclicos à função aldeído.
- Submeter os aldeídos obtidos à reação de condensação com tiossemicarbazidas funcionalizadas, gerando os respectivos híbridos tiossemicarbazônicos isoxazolínicos aza-bicíclicos.
- Elucidar estruturalmente os novos compostos a partir das técnicas de espectroscopia de RMN ^1H e RMN ^{13}C (1D e 2D), infravermelho e espectrometria de massas.
- Testar as moléculas adquiridas quanto ao seu efeito citotóxico sobre linhagens de células neoplásicas malignas.

4. METODOLOGIA

4.1 ÂMBITO QUÍMICO

Há muito, a síntese de produtos contendo o anel 2-isoxazolina aza-bicíclico, bem como a avaliação dos efeitos biológicos concernentes a essas estruturas, é prática consolidada no grupo de pesquisa. Nesse sentido, e aproveitando da abordagem de hibridação molecular, De Almeida (2010) desenvolveu a junção do referido esqueleto heterocíclico (2-isoxazolinico, em destaque vermelho) pirrolidínico (anel de cinco membros) e piperidínico (ciclo de seis membros) à classe orgânica tiossemicarbazona (em destaque azul), a fim de verificar se os novos compostos exibiriam atividades antimicrobiana e antichagásica (figura 23).

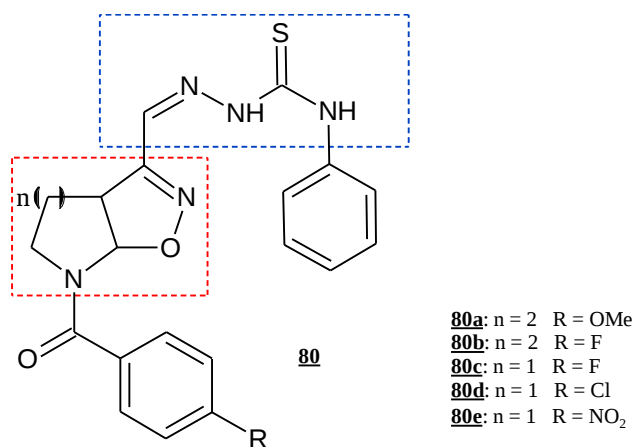
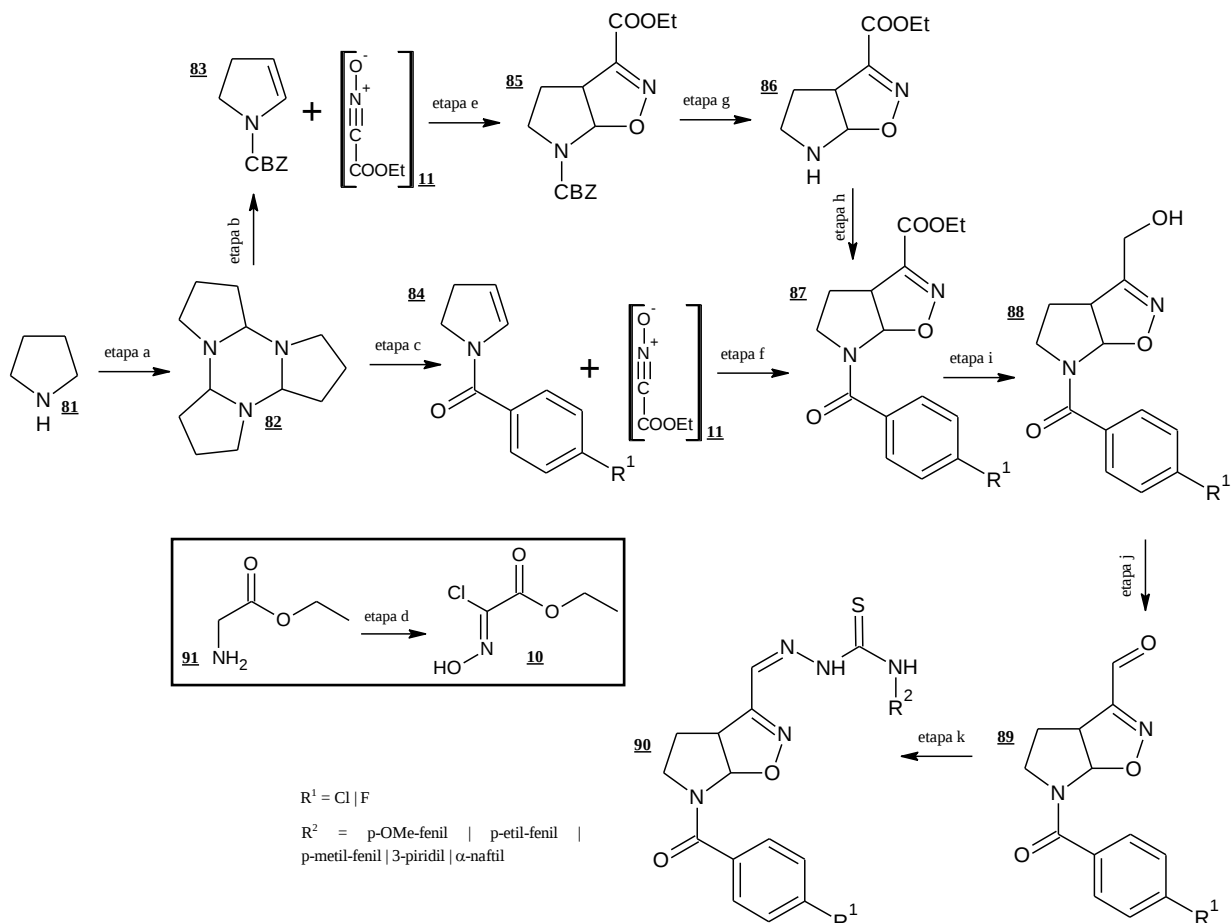


Figura 23²⁶

O procedimento-padrão utilizado para obtenção das moléculas de interesse foi aquele consagrado no nosso laboratório, sendo sumarizado no esquema 29.

²⁶ Os valores de citotoxicidade (µg/mL) e de IC₅₀ (µg/mL) das citadas moléculas frente ao *T. cruzi* (forma epimastigota) são dados, sequencialmente: **80a** (>100; 11,82), **80b** (5; 14,36), **80c** (>100; 10,88), **80d** (>100; 5,80), **80e** (5; 49,84).



Esquema 29

O esqueleto 2-isoxazolina aza-bicíclico foi obtido por meio da reação de cicloadição 1,3-dipolar entre CEFNO **11** (1,3-dipolo), gerado *in situ* a partir de seu precursor cloroximinoacetato de etila **10**, e enecarbamato/enamida endocíclicos (**83** ou **84**) (dipolarófilos). Para a preparação destes últimos, foi utilizada inicialmente pirrolidina **81** comercial que foi oxidada (etapa “a”), levando à produção da espécie reativa 1-pirrolina que trimeriza-se espontaneamente. No passo seguinte, a geração do monômero 1-pirrolina a partir do seu trímero **82** bruto (destrimerização) propiciou a acetilação do seu átomo de nitrogênio quer pelo cloroformato de benzila (etapa “b”) ou por cloretos de benzoíla substituídos (etapa “c”), formando o enecarbamato endocíclico **83** ou enamidas **84** endocíclicos, respectivamente. Após purificação, procedeu-se a cicloadição entre cada um desses dipolarófilos (etapas “e” e “f”) e CEFNO, sendo este derivado do cloroximinoacetato de etila o qual foi preparado através da cloração de glicina esterificada comercial **91** (etapa “d”), produzindo os ésteres do cicloaduto isoxazolina aza-bicíclicos.

Em relação ao cicloaduto do enecarbamato **85**, este sofreu reação de hidrogenólise (etapa “g”) para desproteção de seu átomo de nitrogênio carbamídico, produto (**86**) que em seguida foi N-acilado (etapa “h”) através do emprego de cloreto de benzoíla.

Uma vez purificados, os adutos cíclicos amídicos **87** tiveram sua função éster em C-3 reduzida a álcool **88** (etapa “i”), porção esta que foi depois convertida em aldeído **89** (etapa “j”) por meio de oxidação branda de Swern. Os aldeídos conseguidos foram então submetidos à reação de condensação com diferentes tiossemicarbazidas substituídas **92** (etapa “k”), obtidas previamente pela reação entre isotiocianatos e hidrato de hidrazina, possibilitando a produção das tiossemicarbazonas.

4.2 ÂMBITO BIOLÓGICO

Tendo em consideração os promissores resultados do trabalho de De Almeida (2010) e, mais ainda, a gama de atividades referentes a essas duas classes orgânicas (2-isoxazolina e tiossemicarbazona) vastamente atestada na literatura, a presente pesquisa propôs expandir a série racêmica anteriormente produzida em nosso laboratório, variando os substituintes na porção tiossemicarbazona, com o objetivo de verificar sua ação tóxica sobre células tumorais e, num futuro próximo, seu efeito anti-tripanossômico (figura 24).

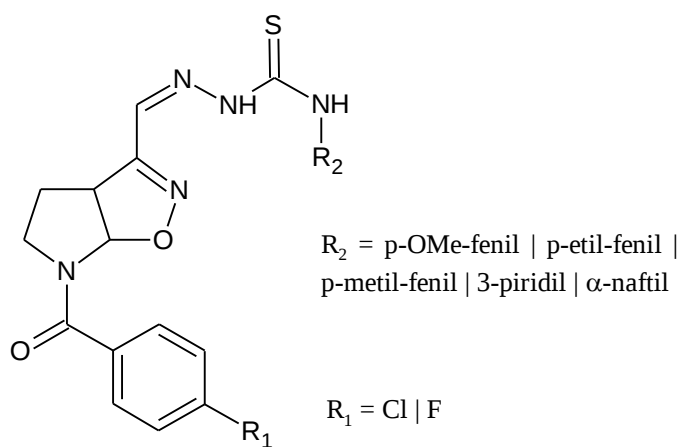


Figura 24

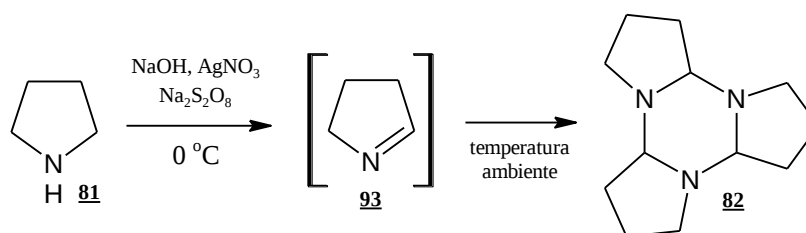
A análise *in vitro* da citotoxicidade sobre as linhas de células tumorais NCI-H292, HT-29, HEP-2, MCF-7 e HL-60 foi realizada através do método do MTT, baseado na detecção de células viáveis.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ÂMBITO QUÍMICO

5.1.1 Síntese racêmica do heterobiclo 2-isoxazolina[5,4-b]pirrolidínico

5.1.1.1 Síntese do trímero da 1-pirrolina **82**



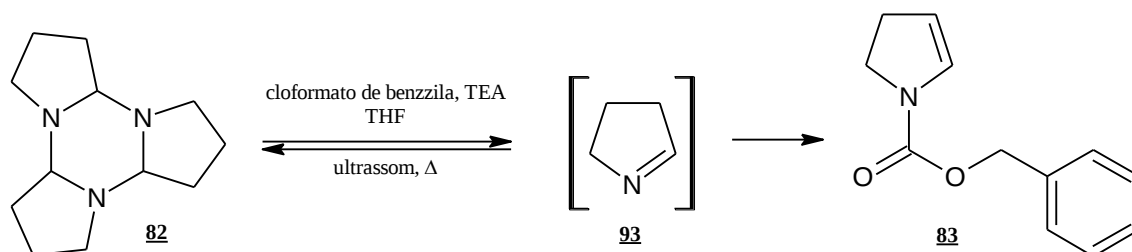
Esquema 30

O trímero da 1-pirrolina **82**, intermediário fundamental para a constituição posterior da estrutura do biciclo, foi gerado convenientemente conforme modelo estabelecido por Nomura *et al* (1977) e extensamente empregado no laboratório.

A reação foi executada partindo da pirrolidina **81**, comercialmente disponível, que foi submetida à contínua oxidação através do uso de solução aquosa de Na₂S₂O₈ (introduzida por gotejamento), em um pH alcalino, catalisada por AgNO₃ e arrefecida por banho de gelo em uma temperatura próxima de 0 °C.

Num segundo momento, a reação foi extraída em CH₂Cl₂ e seca em NaSO₄ anidro. Contudo, uma vez que não foi possível realizar o isolamento do trímero (mediante destilação) da solução bruta, esta teve de ser diretamente empregada na reação seguinte. O trímero impuro apresentou coloração levemente alaranjada, razoável viscosidade e forte odor característico. Processada por via radicalar, a reação apresentou o rendimento de 50% na geração do produto, sendo semelhante àquele descrito no artigo original.

5.1.1.2 Síntese do N-(benziloxicarbonil)-2-pirrolina **83** (enecarbamato endocíclico)



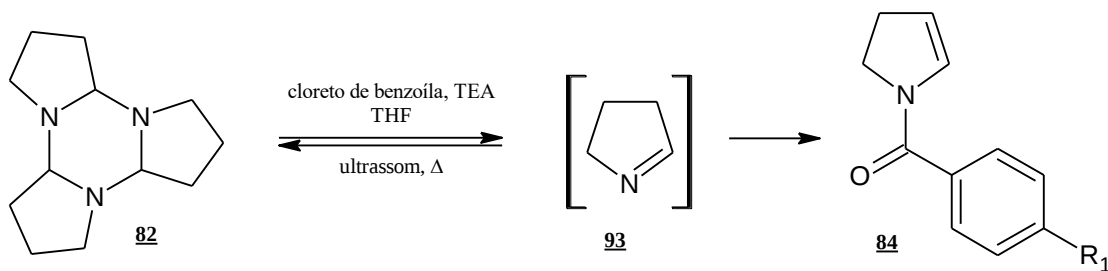
Esquema 31

A síntese do dipolarófilo enecarbamato endocíclico **83** foi realizada através da reação entre 1-pirrolina **93** e o agente acilante CBZ. A metodologia empregada foi adaptada a partir daquela estabelecida por Kraus e Neuenschwander (1981) e recentemente realizada por Marques (2013), onde o ultrassom fora empregado.

Nessa etapa, o intermediário instável 1-pirrolina foi gerado a partir de seu trímero **82**, como consequência da vibração de elevada frequência gerada pelo processo de sonicação, bem como pelo aumento da temperatura ($\sim 60^\circ\text{C}$). Uma vez formado no meio, o intermediário é N-acilado por CBZ, resultando no enecarbamato endocíclico. Após evaporação do solvente e purificação do produto em coluna cromatográfica de sílica gel, este apresentou-se como um líquido viscoso de cor levemente amarelada.

Tendo em vista que o reagente de partida (trímero da 1-pirrolina **82**) estava impuro, o rendimento de 11,8% na obtenção do enecarbamato endocíclico foi calculado a partir da quantidade de mol de CBZ empregado na reação. Uma vez que a utilização de ultrassom para obtenção deste produto é um método recente, não foi possível comparar o rendimento aqui atingido com dados da literatura. Contudo, vale destacar que a presente metodologia teve a vantagem da facilidade na organização do aparato necessário para a realização desta síntese, como a não-utilização de gelo seco, como empregado no trabalho de Kraus e Neuenschwander (1981), o que torna o procedimento mais prático e financeiramente mais viável.

5.1.1.3 Síntese do N-(4-fluorobenzoil)-2-pirrolina (enamidas endocíclicas **84**)

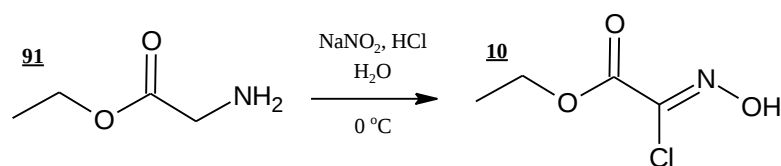


Esquema 32

As reações para obtenção das enamidas endocíclicas **84** foram análogas àquela da síntese do enecarbamato endocíclico. Desta vez, os agentes acilantes foram cloretos de cloro- ou flúor-benzoíla substituídos na posição *para*.

Quando $R^1 = \text{cloro}$, a síntese rendeu 17,6 %, ao passo que, quando $R^1 = \text{flúor}$, o rendimento de 20,1%. Os valores ficaram abaixo daqueles apresentados por Marques (2013), onde os rendimentos das enamidas *p*-cloro e *p*-flúor foram de 42% e 32%, respectivamente.

5.1.1.4 Síntese do clorooximinoacetato de etila **10** (precursor do 1,3-dipolo CEFNO)

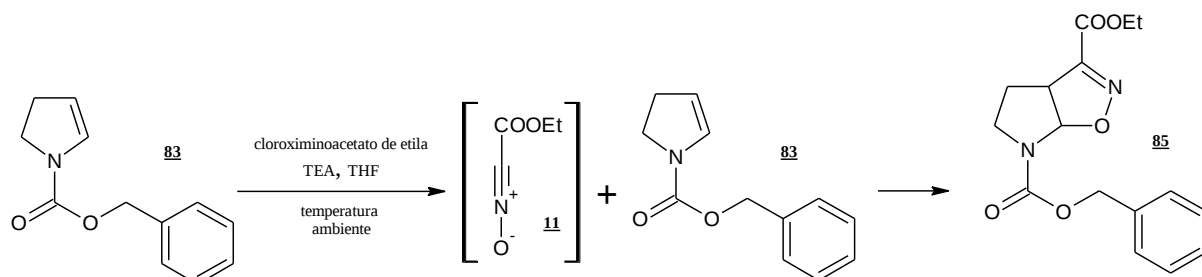


Esquema 33

A fim de obter o núcleo 2-isoxazolina, foi preciso executar a preparação prévia do precursor do 1,3-dipolo CEFNO **11**, clorooximinoacetato de etila **10**, uma oxima halogenada. Na reação, foi utilizado o éster etílico da glicina **91** comercial, o qual foi convertido na oxima de interesse mediante adição de HCl concentrado e solução aquosa de NaNO_2 , à baixa temperatura.

Os processos de extração e recristalização proporcionaram a formação de cristais brancos de clorooximinoacetato de etila num rendimento de 64,5%, que foram devidamente armazenados sob refrigeração para a reação posterior de cicloadição 1,3-dipolar.

5.1.1.5 Síntese do éster 6-benzil-3-etil do ácido 3a,4,5,6a-tetrahidropirrolpirrolo[3,2-d]isoxazol-3,6-dicarboxílico **85** (éster do enecarbamato – cicloadição 1,3-dipolar)



Esquema 34

A presente reação de cicloadição consistiu na etapa chave da via sintética. Foi realizada entre a espécie portadora de insaturação (o dipolarófilo, neste caso, enecarbamato endocíclico **83**) e óxido de nitrila **11** (1,3-dipolo), em excesso, gerado no meio reacional a partir da ação da base orgânica TEA sobre seu precursor clorooximinoacetato de etila **10**.

Ao balão contendo enecarbamato endocíclico e TEA dissolvidos em THF, foi adicionada lentamente a solução de cloroximinoacetato de etila no mesmo solvente etéreo, previamente seco em sódio metálico. A temperatura empregada para o procedimento foi ambiente e o produto formado teve o solvente evaporado em pressão negativa, sendo purificado por coluna cromatográfica de sílica gel. A metodologia possibilitou a obtenção de um par enantiomérico do cicloaduto 2-isoxazolina aza-bicíclico **85**, de modo regioseletivo mas sem seletividade estereoisomérica (DE ALMEIDA *et al*, 2009) (figura 25).

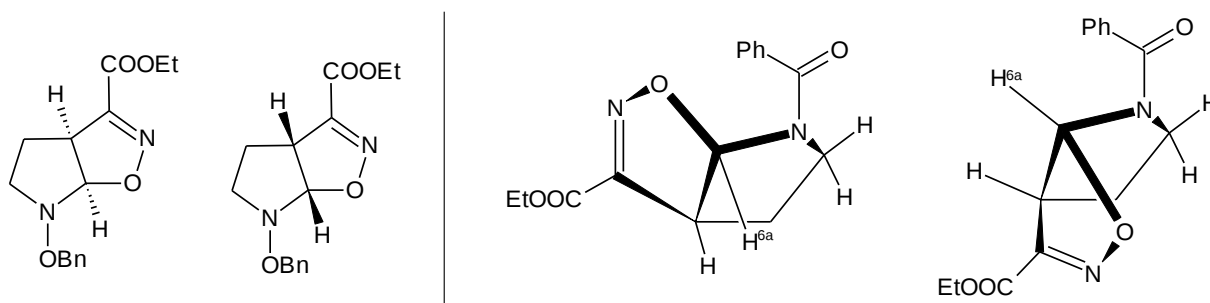


Figura 25²⁷

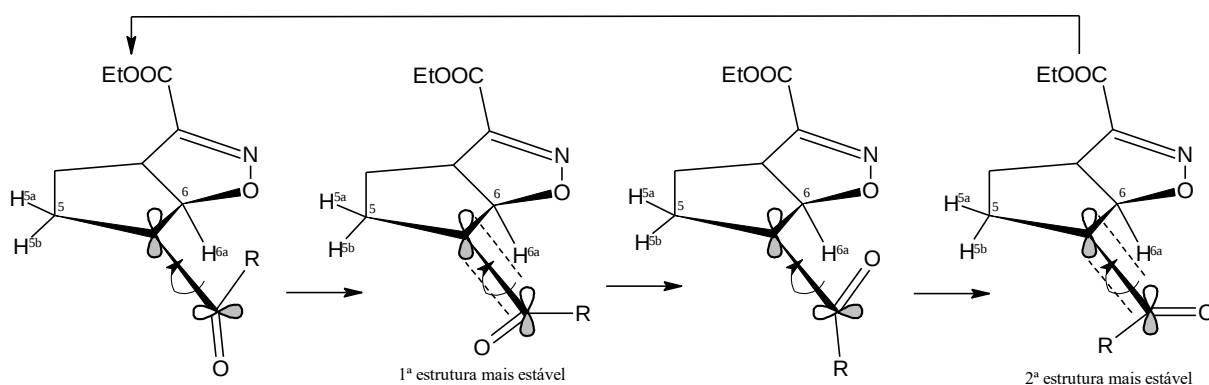
A adição lenta da solução de cloroximinoacetato de etila à mistura reacional é justificada pelo princípio de que, uma vez formados *in situ*, devido à sua notável instabilidade química, os

²⁷ Estruturas da série racêmica de cicloadutos isoxazolínicos aza-bicíclicos. À esquerda, estrutura dos adutos cíclicos no plano do papel e, à direita, projeção das mesmas moléculas em perspectiva.

1,3-dipolos (neste caso, CEFNO) podem interagir entre si, levando à formação dos dímeros, o que compromete o rendimento da reação (GRUDMANN²⁸, 1966 apud GRUDMANN; DATTA, 1969).

Por outro lado, temperatura ambiente foi requerida pois o aquecimento do meio reacional promove a conversão do 1,3-dipolo a isocianato, o que também afeta negativamente o rendimento esperado para essa etapa (FRANK *et al*, 2014).

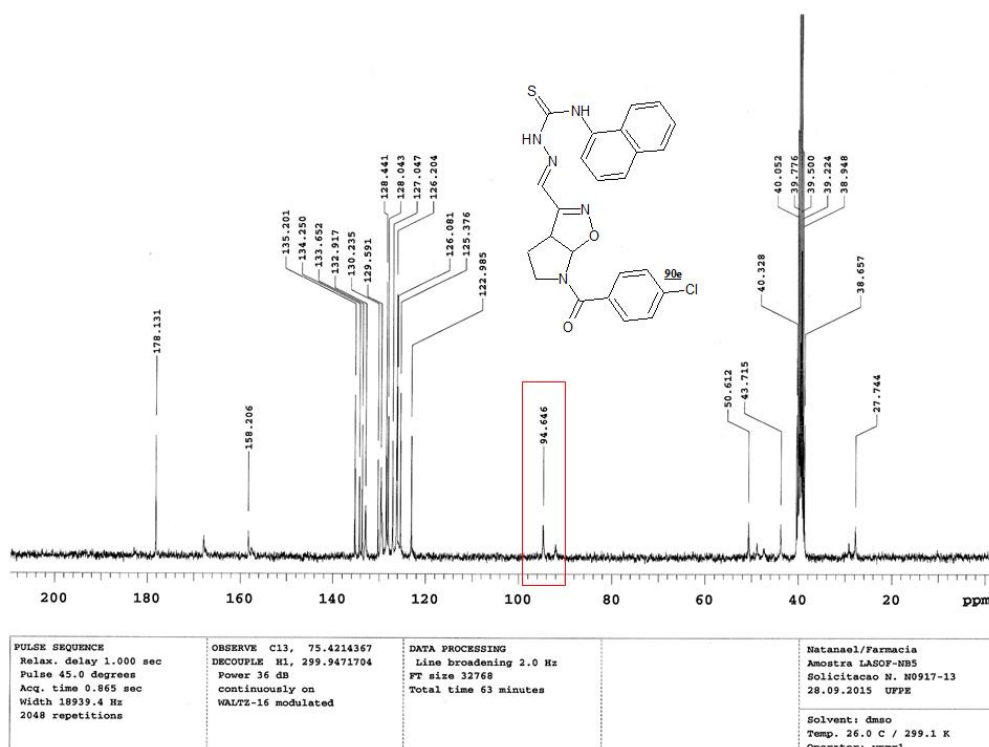
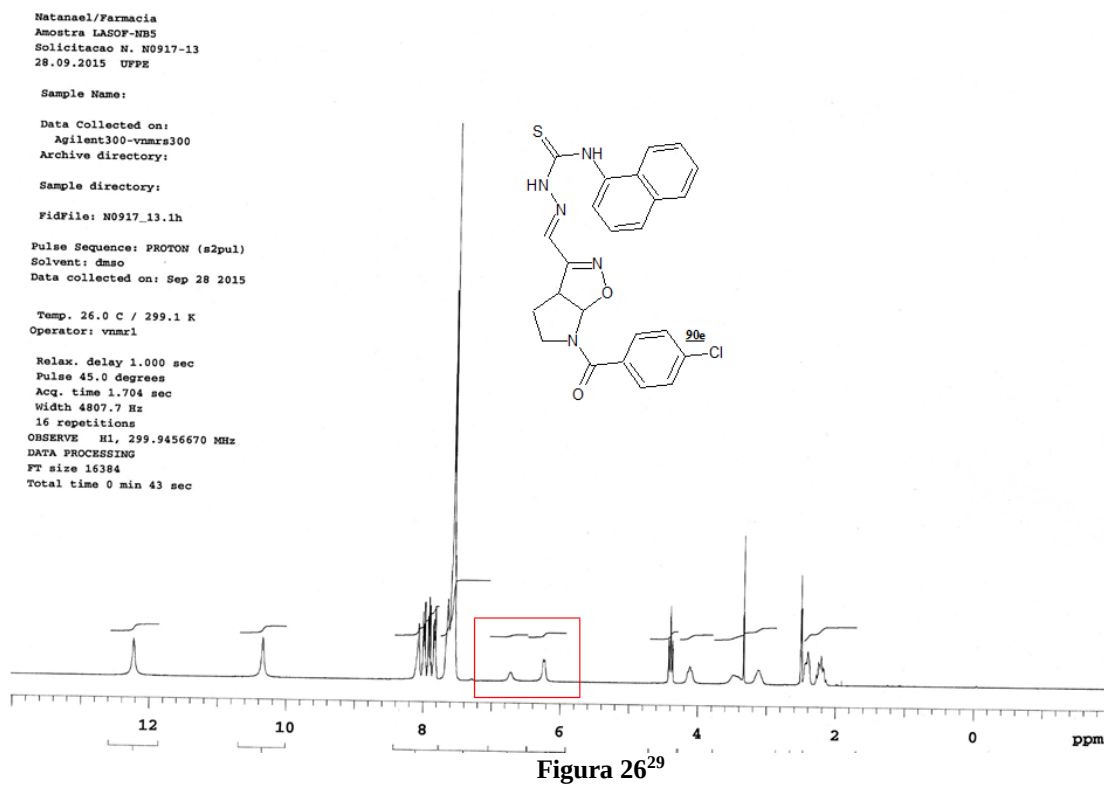
Uma peculiaridade dessa estrutura bicíclica, como aponta De Almeida (2010) foi o surgimento de sinais de rotâmeros nos espectros de RMN H^1 e C^{13} . Rotâmeros são espécies de isômeros conformacionais que existem graças à elevada barreira rotacional, neste caso particular, da ligação dos grupos amidídicos (enamida) ou carbamídicos (enecarbamato). Isso ocorre porque, à medida que estes grupos giram no eixo da ligação simples C-N, o orbital “p” do carbono “ sp^2 ” pode sobrepor ao orbital “p” do nitrogênio pirrolidínico, fazendo com que os elétrons entrem em ressonância, o que ocasiona um estado momentaneamente mais estável. Uma vez que esse tipo de interação pode ocorrer duas vezes a cada giro completo, duas conformações são prioritárias (esquema 35).



Esquema 35

Como consequência, o ambiente químico dos hidrogênios mais próximos da ligação amídica/carbamídica, H^{6a} e os diastereotópicos H^{5a} e H^{5b} , foi diferente, distinção essa que reverberou em sinais de baixa resolução nos espectros de RMN 1H (destaque vermelho, figura 26). O núcleo do hidrogênio H^{6a} em **90e**, por exemplo, apareceu como um sinal de baixa resolução na faixa de 6,23 ppm e 6,72 ppm, ao passo que o do carbono C6 teve deslocamento químico próximo a 94 ppm (destaque vermelho, figura 27), sendo estes dois sinais diagnósticos da formação do biciclo (ARAÚJO NETA, 2014).

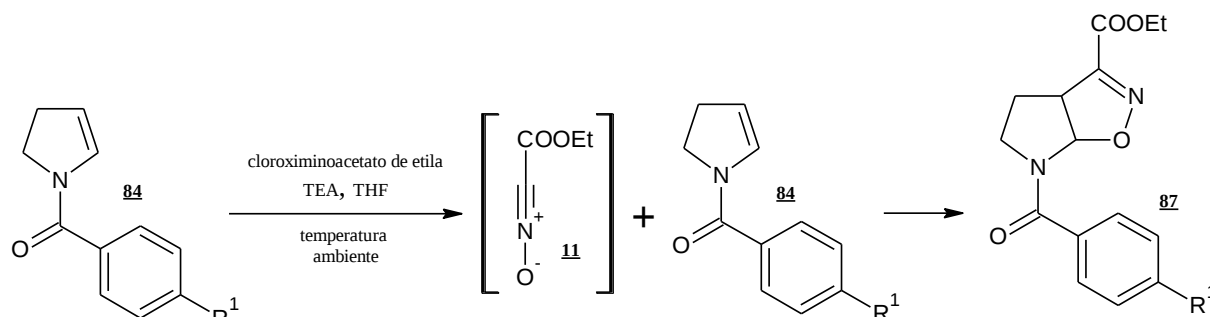
²⁸ GRUDMANN, C. The chemistry of nitrile oxides. **Fortschritte der Chemischen Forschung**, Berlin, v. 7, p. 62, 1966.



²⁹ O referido espectro de RMN ¹H corresponde à molécula final **9e**. Entretanto, o exemplo é válido para essa etapa pois os sinais destacados em vermelho referem-se unicamente à porção isoxazolina aza-bicíclica, evidenciando sua formação. O mesmo pode ser dito sobre o espectro de RMN ¹³C, na figura 27.

Os rendimentos variaram de 50,5% (quando as quantidades estavam de acordo com as proporções originais de reagentes, ou seja, um leve excesso do precursor do 1,3-dipolo) a 82,1% (com um excesso adicional do clorooximinoacetato de etila e TEA³⁰), estando o segundo dos percentuais em conformidade com relatos anteriores. Tal constatação sugere que o baixo rendimento observado no primeiro caso pode ter sido causado por degradação do clorooximinoacetato de etila utilizado.

5.1.1.6 Síntese dos cicloadutos ésteres das enamidas endocíclicas **87** (cicloadição 1,3-dipolar)



Esquema 36

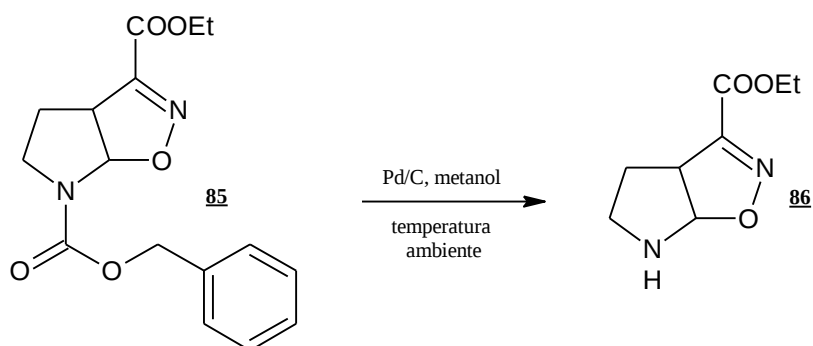
A cicloadição entre enamidas **84** e óxido de nitrila **11** segue o mesmo curso daquele exposto na geração do cicloaduto do enecarbamato. Neste caso particular, quando $R^1 = \text{Cl}$, o rendimento foi de 69,6%, abaixo do resultado aguardado; ao passo que, quando $R^1 = \text{F}$, o procedimento teve rendimento quantitativo na produção dos adutos enantioméricos. Na reação de cicloadição da enamida *p*-flúor, excesso de reagentes foi utilizado³¹. Esta informação corrobora a tese de que a quantidade de clorooximinoacetato de etila realmente disponível para liberação do 1,3-dipolo era menor que aquela calculada.

5.1.2 Síntese dos aldeídos derivados do heterobiciclo 2-isoxazolina[5,4-*b*]pirrolidínico

³⁰ O excesso de clorooximinoacetato de etila e TEA foram de, respectivamente, 56,25% e 96,07%.

³¹ Em termos percentuais, clorooximino acetato de etila, TEA e THF estiveram em 50%, 2,9% e 13,54%, respectivamente, de excesso.

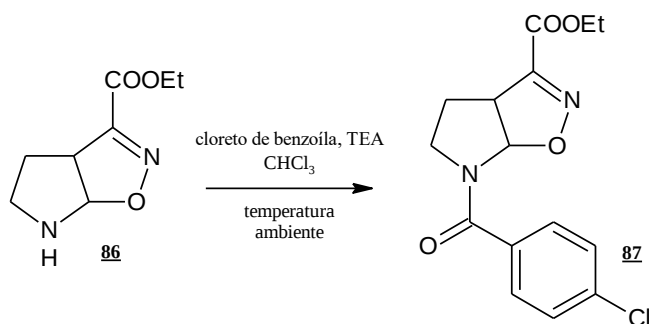
5.1.2.1 Síntese do éster do ácido 3a,4,5,6a-tetrahidropirrolo[3,2-d]isoxazol-3-carboxílico **86** (desproteção do nitrogênio do cicloaduto)



Esquema 37

Levando em consideração que a formação do biciclo isoxazoliníco ocorreu na etapa precedente, e ciente da necessidade em estabelecer a formação de uma porção amídica no nitrogênio da posição 7 do anel (obtenção da estrutura **87**), foi realizada a desproteção de **85** através da reação de hidrogenólise, utilizando hidrogênio molecular, catalisada por Pd/C. A filtração e evaporação do solvente empregado na reação possibilitaram a formação de um óleo incolor em um rendimento de 88,2%, pouco abaixo do valor alcançado por Dos Santos *et al* (2003). Devido à ausência de impurezas, não foi necessário procedimento complementar para purificação do produto, o que permitiu redução de tempo e custos para a etapa subsequente.

5.1.2.2 Síntese do éster etílico do ácido 6-(4-clorobenzoil)-4,5,6,6a-tetrahidro-3aH-pirrolo[3,2-d]isoxazol-3-carboxílico **87** (acilação de N-7)



Esquema 38

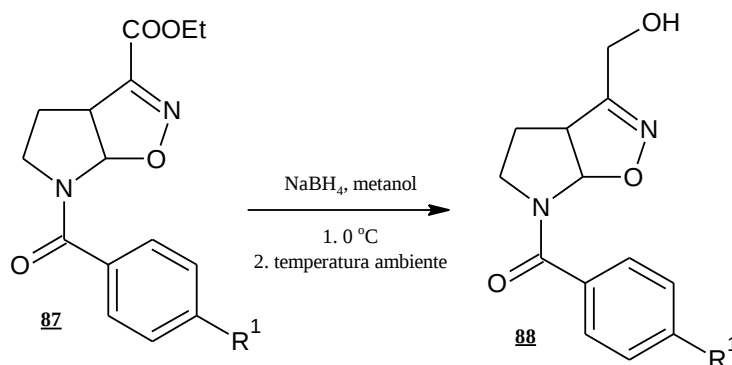
A acilação do nitrogênio pirrolidínico desprotegido **86** guardou certa analogia com a síntese das enamidas. A distinção entre ambas é que, naquela situação, a reação foi processada em THF e sob ação do ultrassom e aquecimento adicional, uma vez que tais condições eram necessárias à liberação do monômero 1-pirrolina a partir de seu trímero. Desta feita, CHCl_3 foi utilizado como solvente e a temperatura ambiente foi adequada para gerar os produtos.

O agente acilante cloreto de 4-clorobenzoíla propiciou a obtenção do cicloaduto substituído **87** na posição *para* ($\text{R}^1 = \text{Cl}$) em 48,14% de rendimento. Levando em conta que tal aproveitamento é aquém daquele habitualmente obtido, para uma segunda reação, excesso de cloreto de 4-clorobenzoíla e TEA³² foi acrescentado, possibilitando uma melhoria significativa na geração do produto (rendimento de 81,9%), próximo do que indica De Almeida *et al* (2009).

Esse resultado leva a crer que o reagente responsável pela acilação não estava íntegro, mas que o procedimento, por outro lado, é capaz de proporcionar a aquisição do produto em boa quantidade.

Nesse aspecto, vale esclarecer um ponto: uma vez que a formação de **87** pode ser conseguida pela reação entre enamidas *para* substituídas **84** e CEFNO **11**, a utilização do enercarbamato endocíclico **83** justificativa-se no fato de que, diferentemente dos resultados obtidos no presente trabalho, tanto a síntese de **83** quanto sua cicloadição resultaram em melhores rendimentos em comparação às reações nas quais enamidas *para* substituídas foram usadas (DE ALMEIDA *et al*, 2009).

5.1.2.3 Redução da porção éster em C3 (síntese dos álcoois isoxazolínicos **88**)



Esquema 39

³² Os percentuais de excesso utilizados foram de 100%, para cloreto de 4-clorobenzoíla, e 107,5%, para TEA.

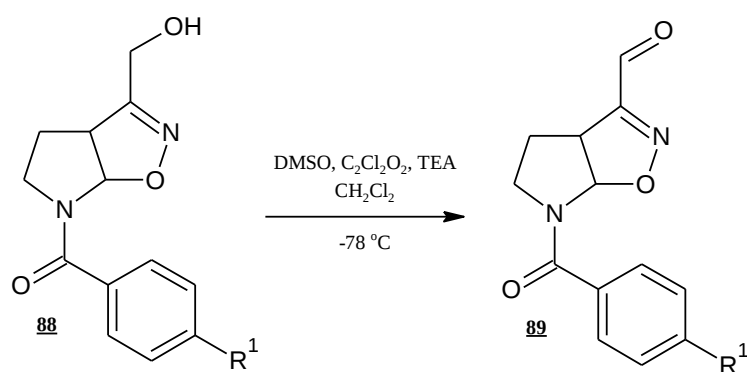
Haja vista que a função aldeído é necessária à reação de condensação com tiossemicarbazidas, a fim de gerar as tiossemicarbazonas desejadas, a porção éster de **87** foi inicialmente reduzida a álcool **88** com o objetivo de convertê-la depois em aldeído. Isto ocorreu pois, a partir de resultados anteriores (REIS *et al*, 2011), constatou-se que os métodos convencionais para a conversão da função éster a aldeído não apresentavam os resultados esperados para este caso.

Nesse sentido, vale salientar um aspecto importante dessa reação: a produção do álcool isoxazolinico costuma ser inicialmente acompanhada da geração de seu éster metílico, como subproduto momentâneo da conversão da porção éster etílico a metílico, haja vista que metanol é empregado como solvente da reação.

Enquanto o procedimento com as proporções calculadas de NaBH_4 forneceu o rendimento de 79,8% do produto desejado, a introdução de uma quantidade adicional³³ do agente redutor conduziu à conversão plena ao álcool isoxazolinico de interesse, ocasionando rendimentos de 84,1% e 87,5%, quando $\text{R}^1 = \text{cloro}$ ou flúor , nesta ordem. A purificação dos produtos foi realizada por coluna cromatográfica de sílica gel.

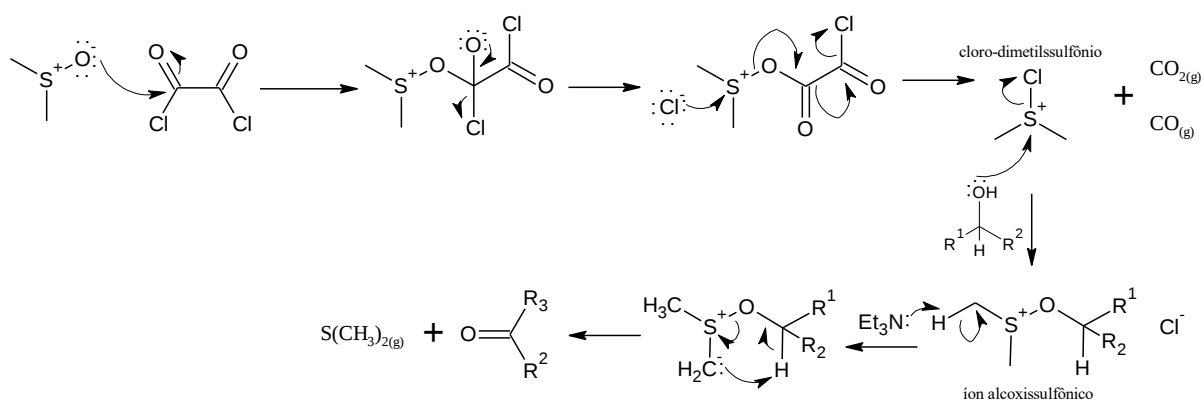
Uma suposta deterioração do sal NaBH_4 é possível, sobretudo, tendo em conta seu marcante grau higroscópico, que certamente pode ter acarretado o consumo da base hidreto (H^-), tornando-a menos disponível à redução.

5.1.2.4 Oxidação branda de Swern da porção álcool em C-3 (síntese dos aldeídos isoxazolinicos **89**)



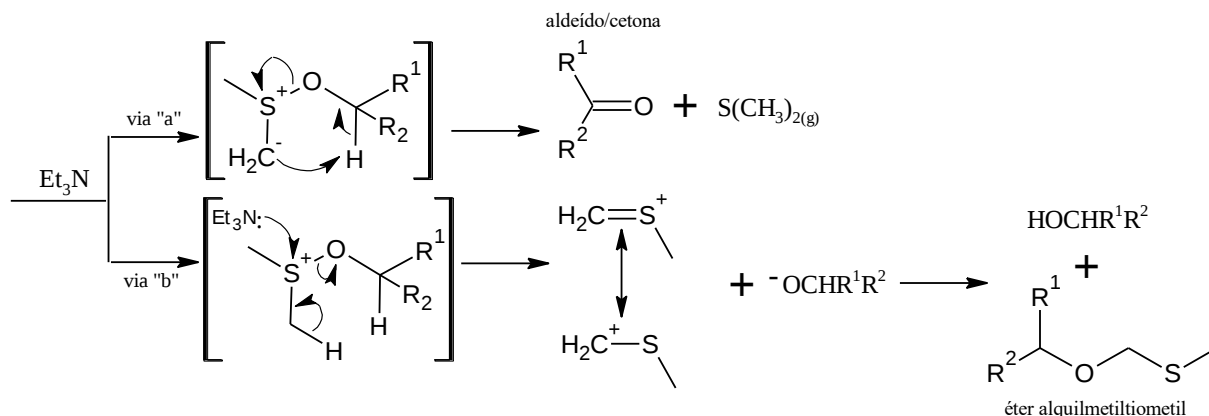
³³ O excesso de NaBH_4 empregado foi de 200%, para a síntese do álcool *p*-cloro, e 100%, para o álcool *p*-flúor.

A obtenção do aldeído isoxazolíneo **89** a partir de seu álcool **88** foi baseada na metodologia de oxidação branda, desenvolvida por Omura e Swern (1978). Os aspectos mecanísticos da reação envolvem a ativação do DMSO por um eletrófilo (neste caso, $\text{C}_2\text{Cl}_2\text{O}_2$), o ataque do DMSO ativado pelo álcool e a subsequente liberação de $\text{S}(\text{CH}_3)_2(\text{g})$ e o composto carbonílico de interesse (esquema 41). A reação foi arrefecida a aproximadamente -78°C , por uso de banho de gelo seco/etanol, e, após introdução da TEA, água destilada foi introduzida no meio reacional para interromper a reação, bem como eliminar o sal cloreto de trietilamônio por extração com CH_2Cl_2 .



Esquema 41

É importante destacar que a utilização de álcoois e bases (geralmente aminas) relativamente volumosos contribui para alcançar rendimentos mais elevados das estruturas carboniladas. Isso ocorre uma vez que o impedimento estérico gerado faz com que a ação da amina se dê basicamente pela desprotonação do grupo metila do íon alcoxissulfônico, levando à geração do aldeído/cetona (via “a”), em detrimento de um ataque nucleofílico por parte do nitrogênio amínico ao átomo de enxofre do íon alcoxissulfônico (via “b”), que determinaria a formação do éter alquilmetiltiometil juntamente com a reconstituição do álcool original (OMURA; SWERN, 1978) (esquema 42). Outra explicação para a ação básica da amina em comparação a um possível comportamento nucleofílico reside no fato de que tanto o nitrogênio da TEA quanto o próton da metila são base e ácido duros, respectivamente, o que favorece sua interação, diferentemente da menos provável ação do nucleófilo duro nitrogênio sobre o eletrófilo mole enxofre.

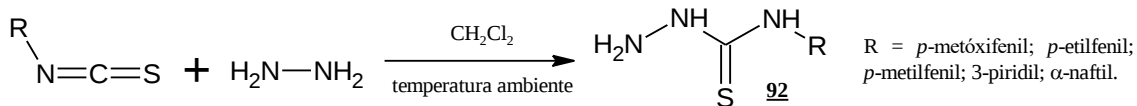


Esquema 42

Como esperado, já que tanto o álcool isoxazolinico quanto a base empregada (TEA) possuem suficiente grau de impedimento estérico, após purificação por cromatografia em coluna de sílica gel, os aldeídos foram obtidos em rendimentos próximos ao que indica a literatura, de 92,3% e 78,1% quando $\text{R}^1 = \text{cloro}$ ou flúor , respectivamente.

5.1.3 Síntese das tiossemicarbazonas derivadas do heterobiciclo 2-isoxazolina[5,4-b]pirrolidínico

5.1.3.1 Síntese das tiossemicarbazidas substituídas 92

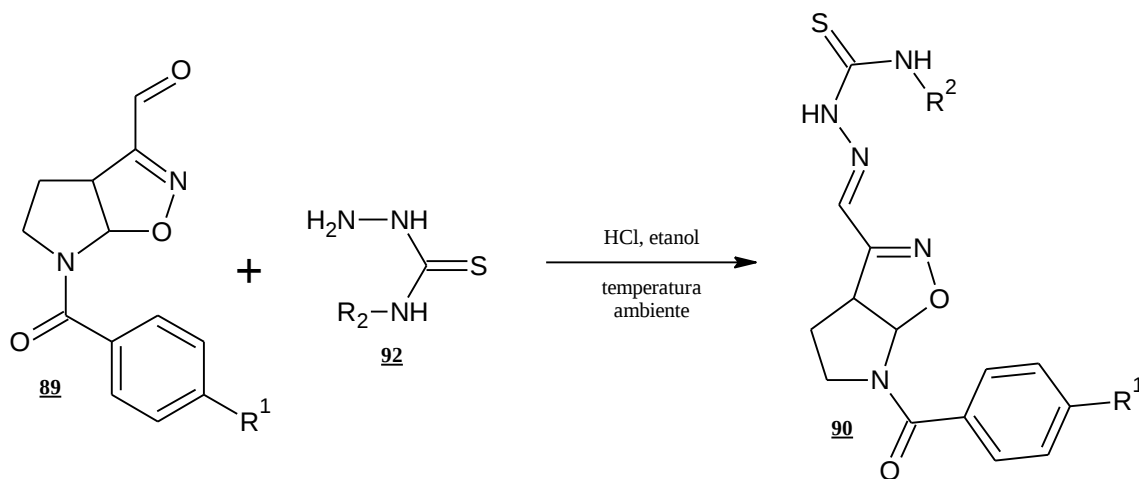


Esquema 43

A obtenção das tiossemicarbazidas foi alcançada conforme metodologia apresentada no trabalho de De Oliveira *et al* (2015). Vários isotiocianatos substituídos reagiram com hidrato de hidrazina, em diclorometano como solvente, à temperatura ambiente, sob agitação.

As tiossemicarbazidas substituídas 92, devido à sua nucleofilia, foram empregadas na condensação com os aldeídos isoxazolinicos aza-bicíclicos para formar suas respectivas tiossemicarbazonas.

5.1.3.2 Condensação entre os aldeídos isoxazolínicos e tiossemicarbazidas substituídas (Síntese das tiossemicarbazonas **90**)



Esquema 44

Tendo em mãos os aldeídos isoxazolínicos **89**, estes foram submetidos à pretendida condensação com tiossemicarbazidas substituídas **92**, previamente preparadas, para gerar as respectivas tiossemicarbazonas substituídas em N-4 **90**. A reação deu-se em etanol, à temperatura ambiente e utilizando quantidade catalítica (duas gotas) de ácido clorídrico concentrado.

Para execução desta etapa, foram utilizadas tiossemicarbazidas onde $R^2 = p$ -metilfenil, p -etilfenil, p -metóxfenil, 3-piridil e α -naftil, levando à produção das inéditas tiossemicarbazonas de interesse, conforme evidenciado por análise em cromatografia de camada delgada, que foram purificadas por sucessivas lavagens em etanol (intercaladas por centrifugações). Como esperado, bons a excelentes rendimentos foram alcançados (Tabela 01) (ARACINBIA *et al*, 2014; XIE *et al*, 2016).

Tabela 01 – Rendimentos das tiossemicarbazonas isoxazolínicas aza-bicíclicas

Código da molécula	Padrão de substituição	Rendimento
90^a	$R^1 = \text{Cl} \mid R^2 = \text{OCH}_3$	71,88%
90b	$R^1 = \text{Cl} \mid R^2 = \text{CH}_2\text{CH}_3$	52,53%
90c	$R^1 = \text{Cl} \mid R^2 = \text{CH}_3$	70,86%
90d	$R^1 = \text{Cl} \mid R^2 = 3\text{-piridil}$	68,54%

<u>90e</u>	$R^1 = \text{Cl} \mid R^2 = \alpha\text{-naftil}$	74,02%
<u>90f</u>	$R^1 = \text{F} \mid R^2 = 3\text{-piridil}$	79,45%
<u>90g</u>	$R^1 = \text{F} \mid R^2 = \alpha\text{-naftil}$	84,08%

Embora outras tiossemicarbazidas substituídas (onde $R^2 = p\text{-flúorfenil}$, $p\text{-clorofenil}$, $p\text{-bromofenil}$, alil e feniletil) tenham sido igualmente empregadas, ocasionando a formação dos respectivos produtos tiossemicarbazônicos, estes não puderam ser purificados pelos métodos convencionais (cristalização, cromatografia em coluna de sílica gel, placa preparativa), razão pela qual não foi possível tratá-los aqui.

Como consequência, sete novas moléculas foram devidamente caracterizadas por análises espectroscópicas de RMN ^1H e ^{13}C , infravermelho e espectrometria de massas.

Na espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ^1H , o surgimento de três singletos nos deslocamentos químicos em 12,62 ppm (1H, N-NH), 10,62 ppm (1H, C-NH-Ar)³⁴ e 8,1 ppm (1H, H-C=N) foram diagnósticos para a comprovação da formação da porção tiossemicarbazona. Além disso, a constatação de sinais amplos e duplicados em 6,3 e 6,78 ppm (1H, H^{6a}) e em 3,08 e 3,44 ppm (1H, H^{5b}) são indícios da presença de rotâmeros, conforme discutido anteriormente (seção 5.1.1.5), atestando a presença do núcleo isoxazolínico aza-bicíclico (espectro de RMN ^1H , “figura 28”; atribuição dos sinais, “figura 29”, ambos para a molécula **90d**).

³⁴ Neste caso particular, os deslocamentos químicos dos referidos hidrogênios foram encontrados acima da média para as outras tiossemicarbazonas. Certamente isso ocorreu devido à influência do nitrogênio eletronegativo no anel piridínico.

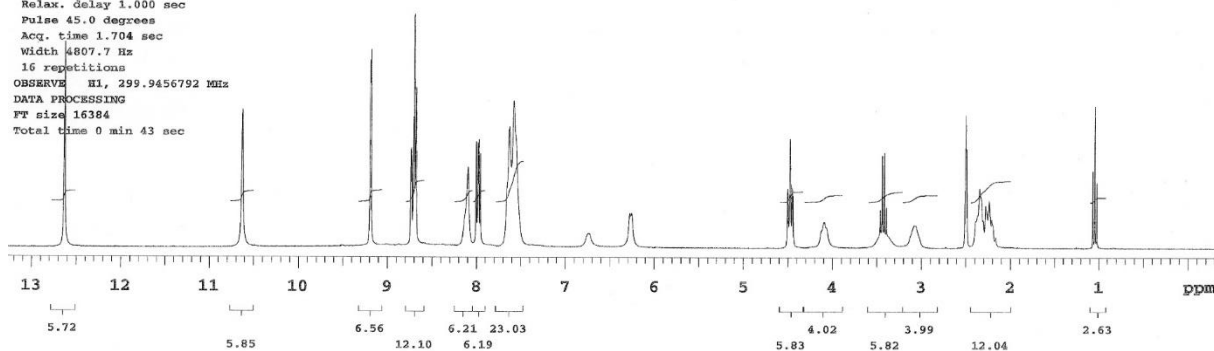
Matansel/Antônio Rodolfo
 Amostra IASOP - MB 4 3 piridil +
 Solicitação N. N0729_7
 Data 05.08.15_UFFH

Sample Name:
 N0729_7
 Data Collected on:
 Agilent300-vmr3300
 Archive directory:
 /home/vmr1/vmr3300/data/RMN_2013/agosto
 Sample directory:
 p5mm3300_calib_20131010_01
 Fidfile: PROTON

Pulse Sequence: PROTON (s2pul)
 Solvent: dmsc
 Data collected on: Aug 5 2015

Temp. 25.0 C / 298.1 K
 Operator: vmr1

Relax. delay 1.000 sec
 Pulse 45.0 degrees
 Acq. time 1.704 sec
 Width 4807.7 Hz
 16 repetitions
 OBSERVE H1, 299.9456792 MHz
 DATA PROCESSING
 FT size 16384
 Total time 0 min 43 sec



Abene Ribeiro
 Abene Silva Ribeiro
 Central Analítica / DQF
 Técnica de Laboratório - SHAPE Nº 1630458

Figura 28

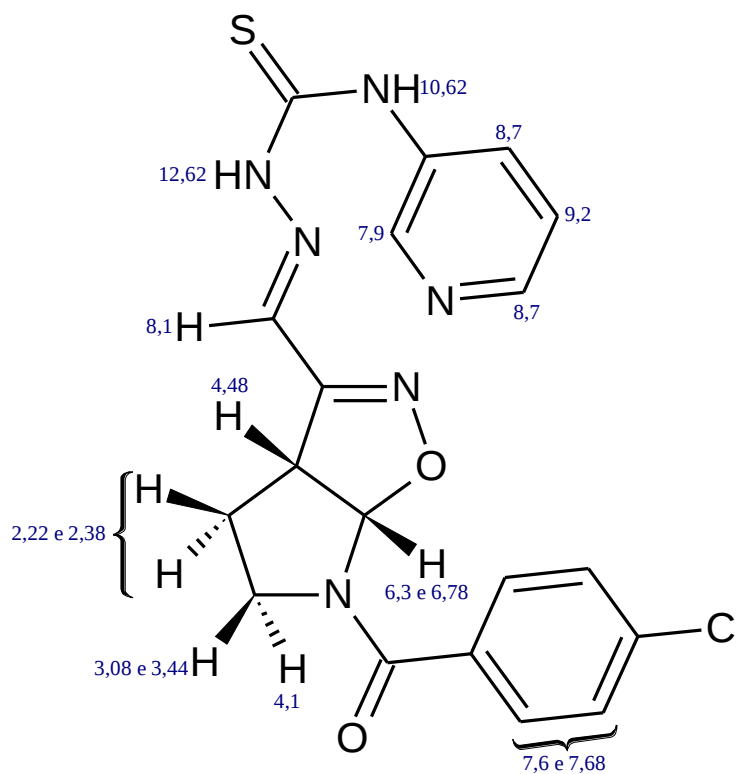


Figura 29

Na reação de condensação entre aldeídos/cetonas e tiossemicarbazidas, a geração de produtos de orientação *E/Z* em torno da dupla ligação da imina ($C=N$) é possível. Entretanto, tendo por base os dados oriundos da espectroscopia de RMN de 1H para os compostos testados, estes sugerem a ocorrência de um único isômero formado. Isto pode ser deduzido a partir da constatação de que os sinais referentes ao hidrogênio ligado ao grupo imínico ($HC=N$) aparece em único singlete, ao invés de sinais duplicados como quando uma mistura de isômeros *E/Z* está presente (ESPÍNDOLA *et al*, 2015). Além disso, os deslocamentos químicos em torno de 8,1 ppm para este mesmo hidrogênio são indício de isomeria *E*, o qual costuma estar mais blindado do que em seu isômero *Z* (CARDOSO *et al*, 2014; CANEVA *et al*, 2015).

Da mesma forma, os espectros de RMN ^{13}C revelaram a existência de sinais em 43,8 ppm, 50,1 ppm, 95 ppm e 158 ppm, que constatarem a presença do heterobícclo isoxazolinico; ao passo que os picos em 135 ppm e 176,5 ppm evidenciaram a formação da porção tiossemicarbazona (espectro de RMN ^{13}C , “figura 30”; atribuição dos sinais, “figura 31”, ambos para a molécula **90d**).

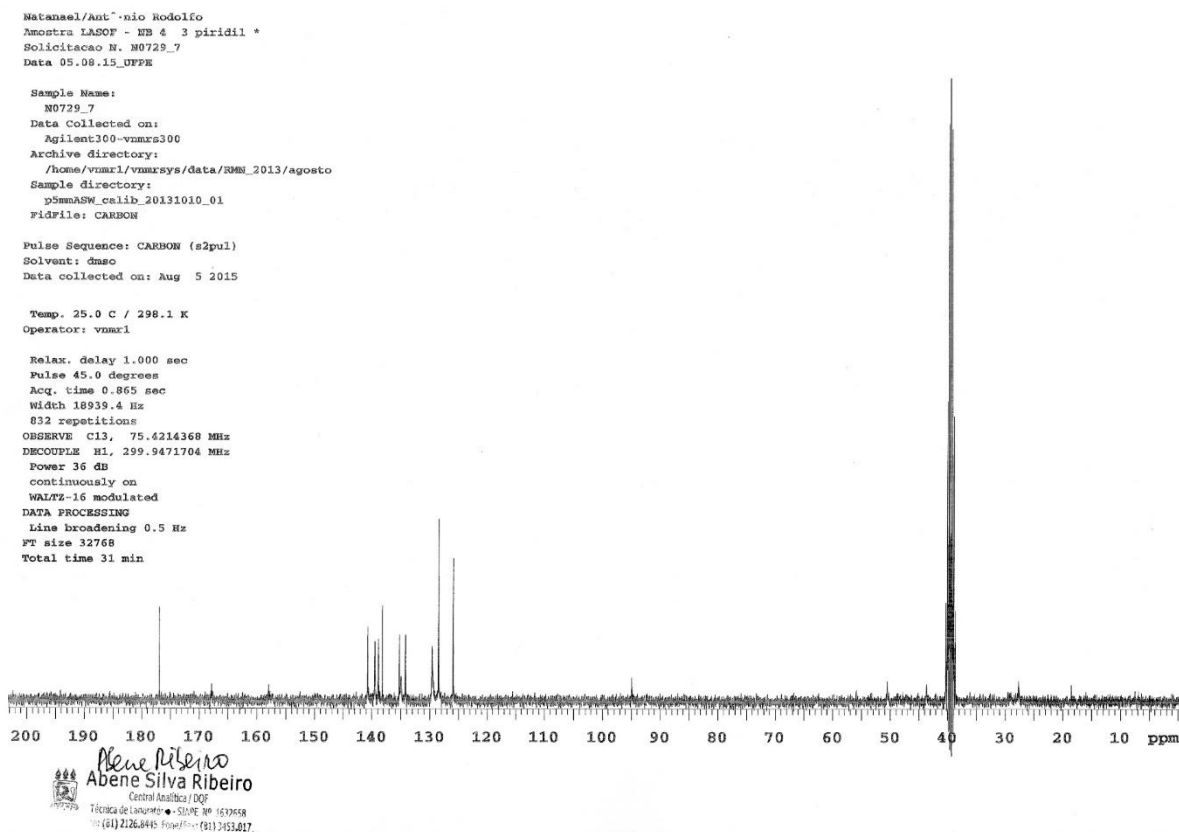


Figura 30

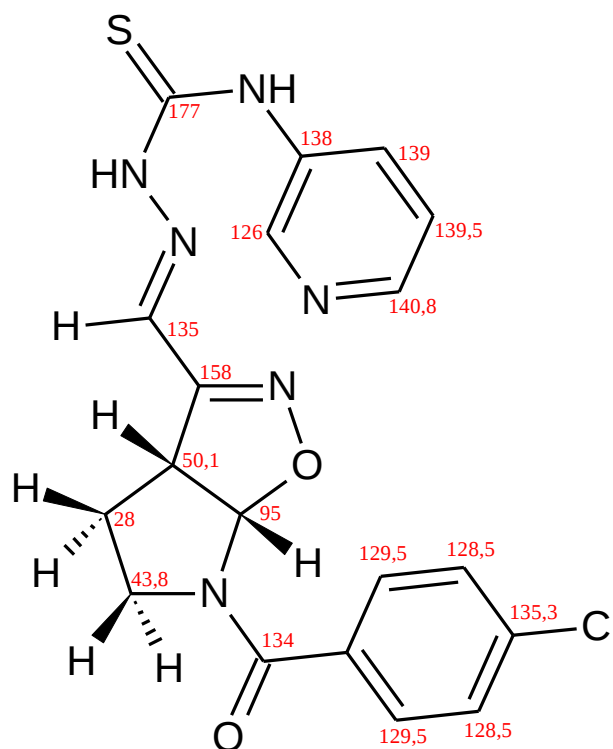


Figura 31

A espectroscopia de infravermelho revelou dados que contribuíram na determinação das funções orgânicas presentes nas moléculas. A faixa de absorção para as aminas (N–H) das tiossemicarbazonas, bem como para a porção aromática (H–C), variaram de 3190 a 3459 cm^{-1} (deformação axial), enquanto as bandas em 1612 a 1655 foram referentes à azometina (ligação C=N) (LI *et al* 2010). A absorção na região de 1178 cm^{-1} sinalizou a ocorrência de tiocarbonila (estiramento C=S) na estrutura (HAMEED *et al*, 2015), que foi confirmada pelo surgimento de uma banda média a forte em 1500-1540 cm^{-1} (como consequência da associação das deformações axiais de S=C e C–N) (figura 32).

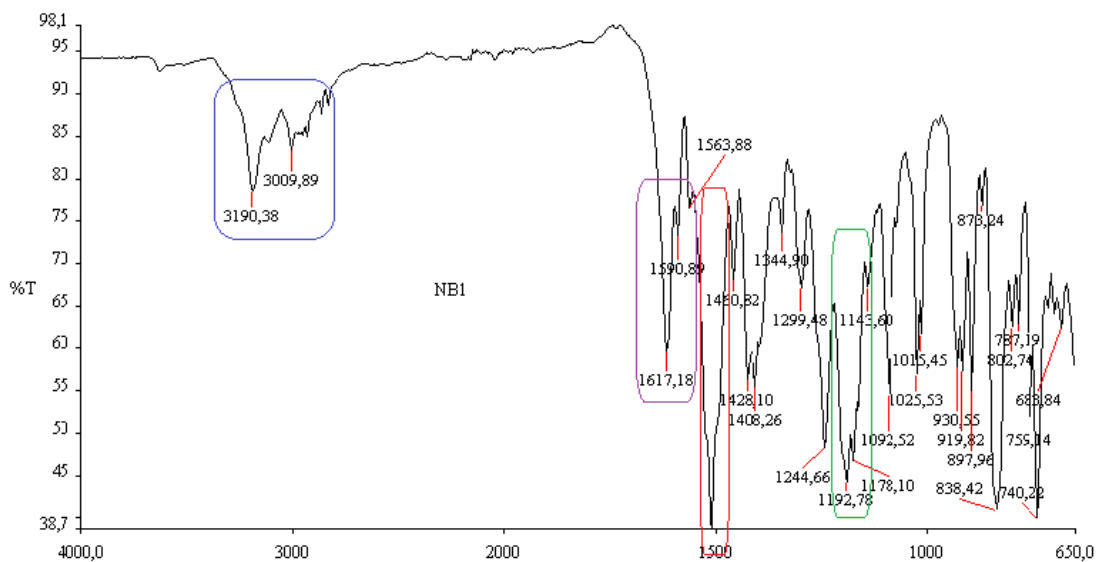


Figura 32³⁵

Todavia, é necessário registrar que o estiramento C=S no espectro de infravermelho costuma ser apresentado de modo demasiadamente heterogêneo pelos autores. Graças às interações entre os alongamentos das ligações C=S e C–N, a atribuição da tiocarbonila pode dar-se em uma ampla região que vai desde 1563 cm⁻¹ (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2006), passando por valores intermediários como 1080 cm⁻¹ (THANH *et al*, 2015), até ser manifesto em números mais baixos na faixa de 833-875 cm⁻¹ (RIGOLINO *et al*, 2015; PRABHU; PAL, 2015), o que torna sua determinação notoriamente difícil.

De todo modo, a ocorrência simultânea de bandas médias a fortes em 831-844 cm⁻¹ para todos os espectros reforça a evidência quanto à presença desta função orgânica nas moléculas analisadas.

Nesse sentido, contudo, vale destacar uma peculiaridade apresentada nos espectros de infravermelho para **90d** e **90f**: ambos os compostos passaram a exibir uma banda larga de absorção por volta de 2587 cm⁻¹, o que caracteriza a presença de “tiol” (S-H) (DE OLIVEIRA *et al*, 2015). Tal constatação sugere a existência de tautomerismo tiona-tiol, exclusivamente para estas tiosemicarbazonas contendo um anel piridínico em N-4 (figura 33).

³⁵ Os destaques em azul, roxo, verde e vermelho correspondem, respectivamente, às deformações axiais e angulares das aminas e hidrogênios ligados a carbonos aromáticos, ao estiramento de C=S e às interações de deformações axiais de S=C e C–N, para a molécula **90a**.

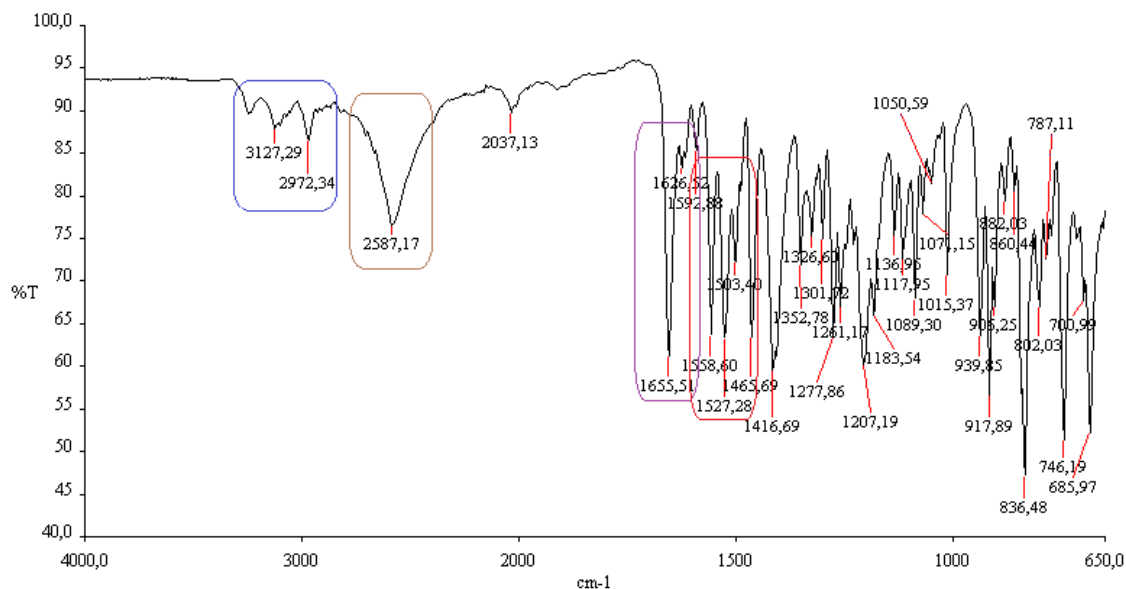


Figura 33³⁶

Ademais, a fim de complementar a elucidação estrutural das moléculas, através da espectrometria de massas foi possível verificar o surgimento dos picos referentes aos respectivos íons moleculares numa razão massa/carga (m/z) próxima aos valores das massas moleculares exatas dos compostos estudados. Em relação a **90d**, a razão “ m/z ” atribuída ao íon molecular foi 428,912, enquanto sua massa exata calculada é de 428,8952. Tal resultado demonstrou, sem margem para dúvidas, que o composto efetivamente obtido foi aquele premeditado (figura 34).

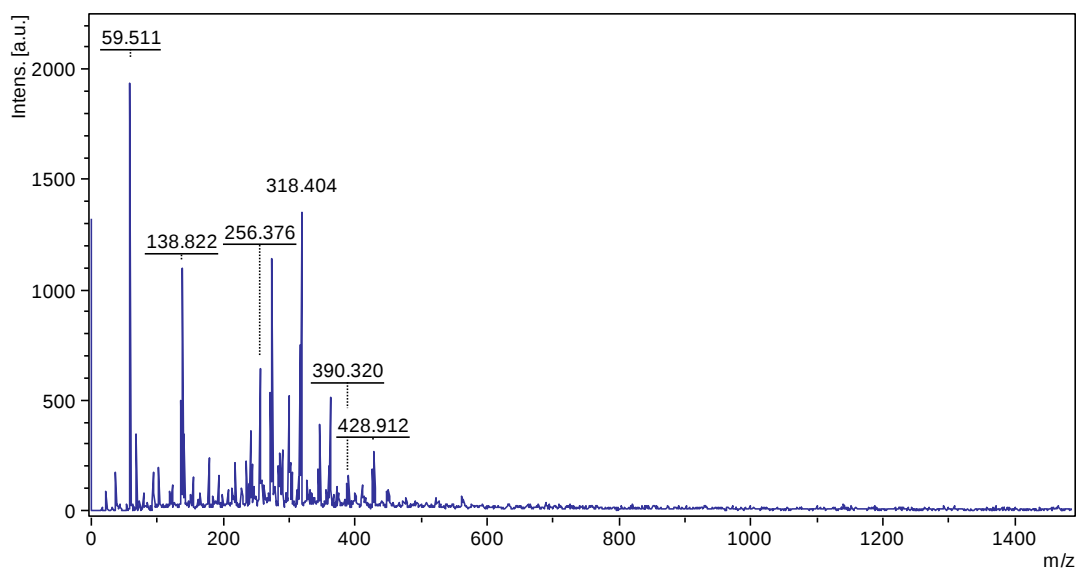


Figura 34

³⁶ As bandas de absorção com os destaques nas cores azul, roxo, marrom e vermelho correspondem, respectivamente, às deformações axial e angular das aminas, e aos estiramentos S–H e S=C–N, para o composto **90d**.

5.2 ÂMBITO BIOLÓGICO

5.2.1 Teste citotóxico

O perfil citotóxico de seis das sete moléculas obtidas (com exceção de **90c**) foi determinado a partir de metodologia para estudo de viabilidade celular, conforme emprego de ensaio colorimétrico utilizando MTT (MOSMANN, 1983; ALLEN *et al*, 1988). O MTT é empregado como indicador de viabilidade celular, uma vez que é convertido na mitocôndria de células vivas e/ou ativas à formazana, produto cuja absorbância pode ser mensurada por meio de espectrômetro, utilizando um comprimento de onda de 560 nm.

Sobre a linha de células tumorais NCI-H292, **90b** exibiu maior atividade (40,7% de inibição do crescimento celular) em comparação com as demais moléculas sintetizadas. Nesse sentido, **90f** e **90e**, segunda e terceira com os melhores resultados, apresentaram inibições de crescimento neoplásico de apenas 25,2% e 21,6%, respectivamente.

Em relação à toxicidade sobre a linhagem HT-29, todos os compostos estudados apresentaram resultados irrelevantes quanto à capacidade de limitar a proliferação deste tipo de células neoplásicas malignas. De modo análogo, a ação sobre HEP-2 também mostrou ser infrutífera, onde os melhores resultados de inibição do crescimento celular foram de 26,9 % e 25,8% para **90d** e **90b**, sequencialmente.

Outrossim, os melhores desempenhos frente à linha MCF-7 igualmente mostraram estar demasiadamente aquém do desejado, em que as melhores performances obtidas foram os percentuais de inibição de crescimento de 26,5% e 25,4% para os compostos **90d** e **90g**, nesta ordem.

Por fim, a partir da avaliação da citotoxicidade das moléculas sobre HL-60, os melhores resultados da triagem foram alcançados, destacando as inibições de 53,0%, 46,2% e 45,8% para **90g**, **90b** e **90d**, respectivamente (gráfico 01).

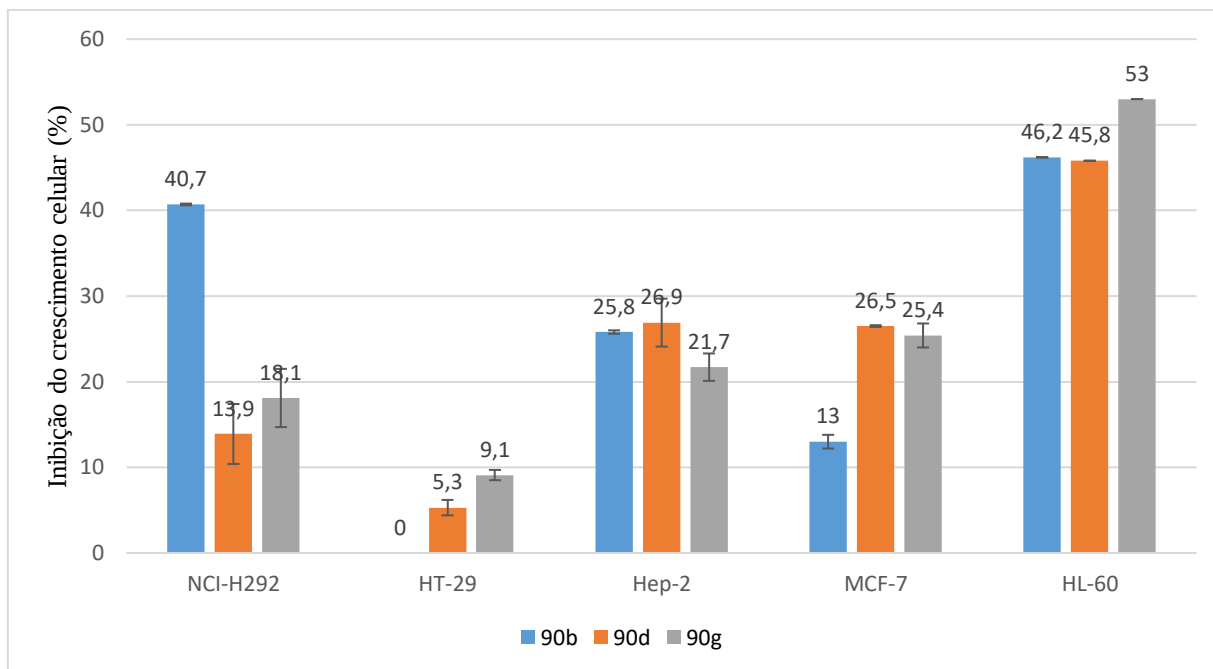


Gráfico 01

Contudo, uma vez que mesmo os compostos mais ativos **90b**, **90d** e **90g** não apresentaram resultados satisfatórios no geral, a partir do critério de classificação quanto ao perfil citotóxico proposto por Rodrigues *et al* (2014), os produtos avaliados puderam ser ditos não possuírem ação citotóxica contra as linhas de células tumorais aqui empregadas.

Nesse contexto, a despeito da constatação de ineficiência das tiossemicarbazonas isoxazolínicas aza-bicíclicas aqui testadas, no que diz respeito a células neoplásicas malignas, um estudo complementar de sua toxicidade sobre células normais pode consistir num importante indicativo. Isso porque, no próximo estudo para avaliação de seu perfil antichagásico, casos as moléculas sejam ativas contra o parasito *Trypanosoma cruzi* mas apresentem baixa toxicidade contra as células do hospedeiro, elas poderão servir de protótipo para o desenvolvimento de candidatos a fármacos a serem utilizados no tratamento da doença de Chagas, além de possibilitar o desenvolvimento do estudo da relação estrutura-atividade.

6. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

6.1 ÂMBITO QUÍMICO

Várias das reações aqui executadas foram anidras, necessitando de condições especiais em relação à secagem de solventes e vidrarias. Estas foram: as sínteses das enamidas/enecarbamato endocíclicos, cicloadição 1,3-dipolar, N-benzoilação, redução da porção éster a álcool e a oxidação branda de Swern. Os demais procedimentos foram implementados ou em fase aquosa ou em solvente orgânico que não precisasse estar isento de umidade.

Quanto à secagem dos solventes, tal deu-se da seguinte maneira: THF foi seco através de sódio metálico, tendo benzofenona como indicador; CHCl_3 foi deixado em repouso na presença de CaCl_2 ; CH_2Cl_2 foi tratado com CaH_2 ; e metanol foi deixado sob ação de magnésio/iodo metálicos. Por sua vez, TEA foi tratada com CaH_2 . Tanto os solventes quanto a referida base orgânica foram destilados imediatamente antes de seu uso.

Condição particular foi a do DMSO, deixado na presença de peneira molecular de 4 Å de diâmetro, sendo esta previamente seca em estufa para eliminação de água. Do mesmo modo, as vidrarias empregadas nas reações anidras foram também submetidas a tratamento com calor seco (estufa).

As reações para produção das enamidas/enecarbamato endocíclicos foram executadas em aparelhos de ultrassom UNIQUE® USC 1400-A, numa frequência de 40 KHz, com seletor de temperatura ativo ($\sim 60^\circ\text{C}$).

Para execução das colunas cromatográficas foram utilizados sílica gel 60 (230-400 mesh) e sistemas de solventes destilados (hexano, acetato), como fases estacionária e móvel, respectivamente. Em alguns casos, isopropanol PA foi utilizado em concomitância ao hexano.

As cromatografias em camada delgada foram efetuadas em lâminas de alumínio contendo sílica com revelador fluorescente para comprimento de onda de 254 nm (ultravioleta), sendo a espessura da camada sílica/revelador de 2 mm. Dependendo da necessidade, revelações com vapores de iodo também foram implementadas.

Os pontos de fusão foram determinados usando o aparato FISATON® 431 D, a partir das amostras previamente secas em alto vácuo (o mesmo procedimento de secagem das amostras para a execução das espectroscopias).

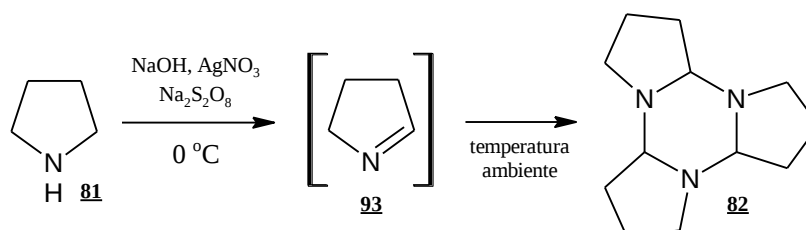
Em relação às análises espectroscópicas, os espectros de infravermelho foram obtidos a por meio de aparelho Perkin Elmer® (Spectrum 400), portando dispositivo de reflectância total atenuada, com cristal de seleneto de zinco. Os resultados foram expressos como “cm⁻¹”.

As ressonâncias magnéticas nucleares foram realizadas em um equipamento Varian Unity Plus®, de 300 MHz, tendo TMS como padrão interno. Os solventes usados para as análises foram CDCl₃ ou DMSO-D₆. Os deslocamentos químicos evidenciados foram dados em ppm (parte por milhão). Para expor o modo como se apresentaram os sinais, aplicaram-se as seguintes letras: “s” (singleto), “d” (dubleto), “dl” (dubleto largo), “t” (triplete), “tl” (triplete largo), “q” (quarteto), “dd” (duplo dubleto), “dt” (duplo triplete), “ddl” (duplo dubleto largo), “m” (multiplete), “ml” (multiplete largo), “sl” (sinal largo), dependendo da existência e tipo de acoplamento (onde “J” é a constante de acoplamento) entre os núcleos em questão, o qual é dado na unidade Hz (Hertz).

As espectrometrias de massas foram obtidas através de um equipamento MALDI-TOF Autoflex III, empregando o critério M+1. Os resultados foram dados em um gráfico da intensidade (eixo das ordenadas) *versus* a relação massa/carga (eixo das abcissas) dos fragmentos iônicos detectados.

6.1.1 Síntese racêmica do heterobiciclo 2-isoxazolina[5,4-b]pirrolidínico

6.1.1.1 Síntese do trímico da 1-pirrolina **82**



Um balão contendo pirrolidina comercial **81** (5,8 mL; 72 mmol) foi submetido ao banho de gelo ao qual, após estabilização da temperatura próximo a 0 °C, foram adicionadas as soluções aquosas de NaOH (5,74 g; 143 mmol) e AgNO₃ (0,059 g; 0,325 mmol), nesta sequência, sob intensa agitação. Em seguida, uma solução aquosa de Na₂S₂O₈ (16,9066 g; 72

mmol) foi gradualmente gotejada no meio reacional. Após adição da solução de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$, a reação permaneceu sob agitação durante uma hora em banho de gelo e, depois, duas horas à temperatura ambiente.

Concluída a reação, o trímero bruto **82** foi extraído da fase aquosa por CH_2Cl_2 (funil de separação), sendo seco em NaSO_4 anidro e filtrado a vácuo (funil de vidro sinterizado). O solvente orgânico foi removido por evaporação, a partir de pressão negativa (evaporador rotatório).

O produto foi pesado, levando à obtenção de massa bruta igual a 3,7702 g, que foi usada na reação seguinte.

Propriedade física:

- Óleo amarelado

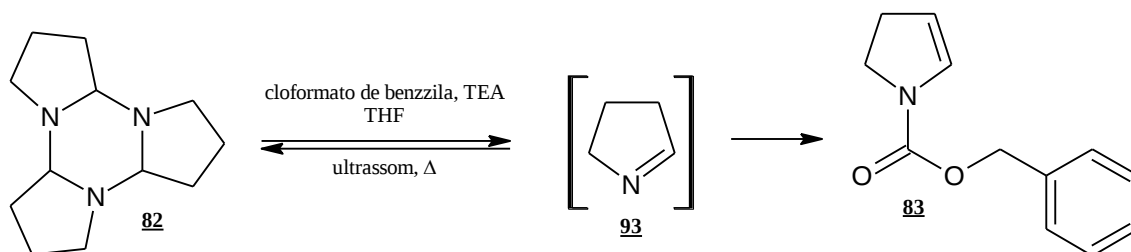
Dados espectroscópicos³⁷:

RMN de ^1H (CDCl_3 , δ , ppm, 300 MHz, temperatura ambiente).

(parte do monômero estava no meio, graças ao equilíbrio)

1,27 (m); 2,28 (m); 2,50 (m); 2,99 (m); 3,82 (m); 7,59 (s).

6.1.1.2 Síntese do N-(benziloxicarbonil)-2-pirrolina **83** (enecarbamato endocíclico)



Uma porção de trímico bruto **82** (1,5 g) foi pesada em um balão, ao qual foi adicionado o solvente THF (47 mL), sendo submetido à sonicação, sob aquecimento ($\sim 60^\circ\text{C}$), para iniciação da detrimimerização do monômero 1-pirrolina **93**. Após 30 minutos, TEA (3,0 mL, 25,25

³⁷ Os dados espectroscópicos aqui apresentados, com exceção daqueles relacionados às tiossemicarbazonas isoxazolinicas aza-bicíclicas, são provenientes de trabalhos anteriores do grupo de pesquisa.

mmol) foi adicionada via seringa ao balão. Transcorrido mais 30 minutos, foi iniciado o gotejamento da solução etérea do CBZ (3,1 mL; 22,94 mmol dissolvidos em 6 mL de THF), por cerca de 40 minutos. Após 1 hora e 40 minutos, uma CCD (acetato de etila/hexano – 2:8) determinou o encerramento da reação.

O produto bruto foi filtrado a vácuo (funil de vidro sinterizado) e o solvente evaporado à pressão negativa (evaporador rotatório). A execução de coluna cromatográfica de sílica gel, tendo como sistema de eluição acetato de etila/hexano (1:9), possibilitou a obtenção do enecarbamato endocíclico **83** puro, em um rendimento de 11,95 %.

Propriedades físicas:

- Óleo incolor
- R_f = 0,26 (acetato de etila/hexano, 1:9)

Dados espectroscópicos:

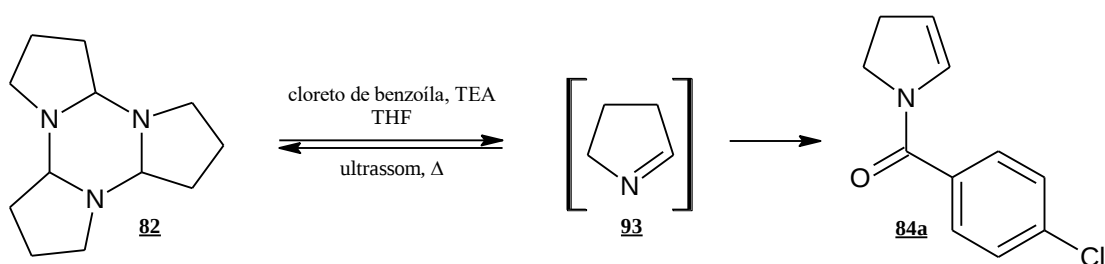
RMN de ¹H (CDCl₃, δ, ppm, 300 MHz, temperatura ambiente), presença de rotâmeros.

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, 1.422, 1.342, 1.214, 1.128, 756, 698.

6.1.1.3 Síntese do N-(4-clorobenzoil)-2-pirrolina (enamida endocíclica p-cloro **84a**)



Ao balão contendo o trímero bruto **82** (2,8970 g), foram adicionados o solvente THF (144,85 mL) e TEA (2,89 mL; 20,74 mmol), iniciando a sonicação e aquecimento (~ 60°C). Após 30 minutos, passou a ser gotejado cloreto de 4-clorobenzoíla (3,18 mL; 24,79 mmol)

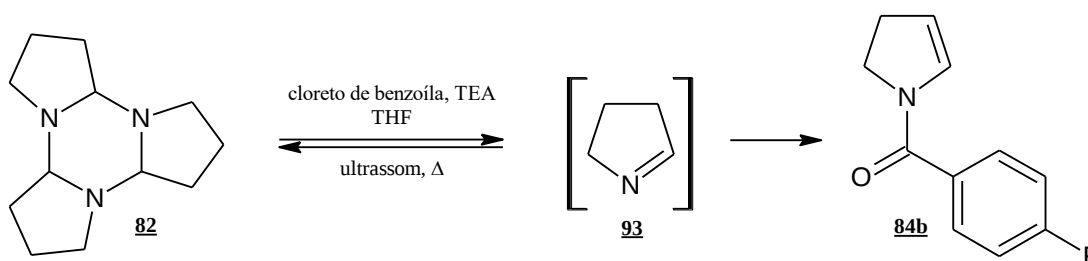
durante 25 minutos. Duas horas depois da adição do cloreto de 4-clorobenzoíla, uma CCD (acetato de etila/hexano – 3:7) revelou o fim da síntese da enamida *p*-cloro **84a**.

O meio reacional foi filtrado a vácuo (funil de vidro sinterizado), sendo o solvente removido por pressão negativa (evaporador rotatório). A realização de coluna cromatográfica de sílica gel (tendo por sistema de eluição acetato de etila/hexano – 2:8) forneceu um precipitado levemente amarelado, em rendimento de 17,63%³⁸.

Propriedade física:

- Sólido levemente amarelado.

6.1.1.4 Síntese do N-(4-fluorobenzoil)-2-pirrolina (enamida endocíclica *p*-flúor **84b**)



A reação foi executada analogamente ao procedimento exposto na seção anterior 6.1.3.

Trímero bruto **82** (4,2262 g), cloreto de 4-fluorobenzoíla (4,58 mL; 38,76 mmol), TEA (4,22; 30,28 mmol) e THF (140 mL)³⁹.

A purificação por coluna cromatográfica de sílica gel proporcionou um sólido branco **84b** em 21,54% de rendimento.

Propriedades físicas:

- Cristais brancos que fundem por volta de 27 °C
- R_f = 0,42 (acetato de etila/hexano – 1:1)

³⁸ As proporções expostas dos reagentes foram aquelas calculadas. Foi feita uma leve aproximação das quantidades de cada um deles, sendo, no final: 3,2 mL de cloreto de 4-clorobenzoíla; 3,0 mL de TEA e 145 mL de THF.

³⁹ A quantidade de cloreto de 4-fluorobenzoíla disponível era insuficiente, razão pela qual apenas 2,9 mL foram utilizados.

Dados espectroscópicos:

RMN de ^1H (CDCl_3 , δ , ppm, 300 MHz, temperatura ambiente), presença de rotâmeros.

2,68 (m; 2H); 3,98 (tl; $J = 8,7$ Hz; 2H; rotâmero em 3,79); 5,19 (m; 1H; rotâmero em 5,36); 6,40 (m; 1H); 7,07 (m; 2H); 7,50 (m; 2H).

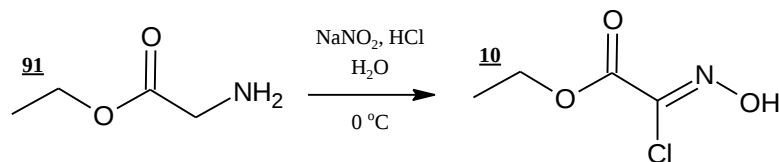
RMN de ^{13}C (CDCl_3 , δ , ppm, 75 MHz, temperatura ambiente).

28,2 (CH_2); 45,67 (CH_2); 112,0 (CH); 115,4 (d; $J = 21,7$ Hz; CH); 129,9 (d; $J = 8,7$ Hz; CH); 130,3 (CH); 131,8 (C); 163,6 (d; $J = 248$ Hz; C); 165,7 ($\text{C}=\text{O}$).

I.V. – FT (janela de KBr, cm^{-1}), principais sinais.

3.124, 3.078, 3.055, 2.966, 2.926, 2.898, 2.865, 1.606, 1.508, 1.469; 1.428, 1.368, 1.289, 1.220, 1.153, 1.095, 847, 733, 567.

6.1.1.5 Síntese do clorooximinoacetato de etila **10** (precursor do 1,3-dipolo CEFNO)



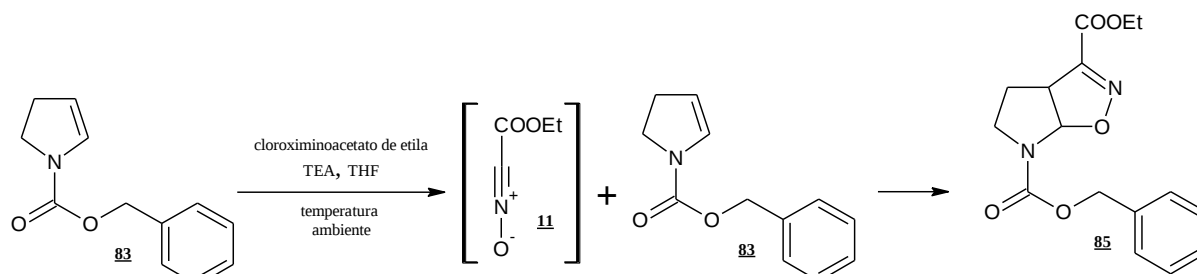
Uma solução aquosa de glicina esterificada **91** (20 g; 224,48 mmol) foi preparada em um balão, sendo arrefecida por banho de gelo próximo a 0 °C, altura em que foi inserido HCl concentrado (12,39 mL; 143,56 mmol). Em seguida, foi gotejada uma solução aquosa de NaNO_2 (10 g; 143,13 mmol em 30 mL de água) no meio reacional. Após isso, outra metade de HCl (12,39 mL; 143,56 mmol) foi introduzida no balão, ao qual foi adicionada a segunda parte da solução de NaNO_2 (10 g; 143,13 mmol em 30 mL de água), por gotejamento.

Concluída esta etapa, o clorooximinoacetato de etila **10** foi separado da fase aquosa através de extração com CH_2Cl_2 , fase orgânica posteriormente seca com Na_2SO_4 anidro, filtrada a vácuo (funil de vidro sinterizado) e evaporada em pressão negativa (evaporador rotatório). Os cristais do produto formados foram recristalizados em hexano gelado, levando a um rendimento de 64,51%.

Propriedade física:

- Ponto de fusão em 80 °C, segundo literatura.

6.1.1.6 Síntese do éster 6-benzil-3-etil do ácido 3a,4,5,6a-tetrahidropirrololpirrolo[3,2-d]isoxazol-3,6-dicarboxílico **85** (cicloadduto do enecarbamato – cicloadição 1,3-dipolar)



Ao balão contendo enecarbamato endocíclico **83** (0,8171 g; 4,02 mmol) solubilizado em THF (10,3 mL), foi agregada TEA (1,53 mL; 10,97 mmol), sob agitação. 15 minutos depois, foi lentamente gotejada solução etérea do precursor clorooximinoacetato de etila **10** (0,76 g; 5,01 mmol em 20,5 mL de THF), em excesso. A reação foi processada à temperatura ambiente.

Após confirmação da formação do produto **85**, através de CCD (acetato de etila/hexano – 3:7), o produto bruto foi filtrado a vácuo (funil de vidro sinterizado), tendo sido o solvente removido sob pressão negativa (evaporador rotatório).

A purificação por coluna cromatográfica em sílica gel forneceu um óleo levemente amarelado, em um rendimento de 61,57%⁴⁰.

Propriedade física:

- Óleo levemente amarelado
- R_f = 0,47 (acetato de etila/hexano – 1:1)

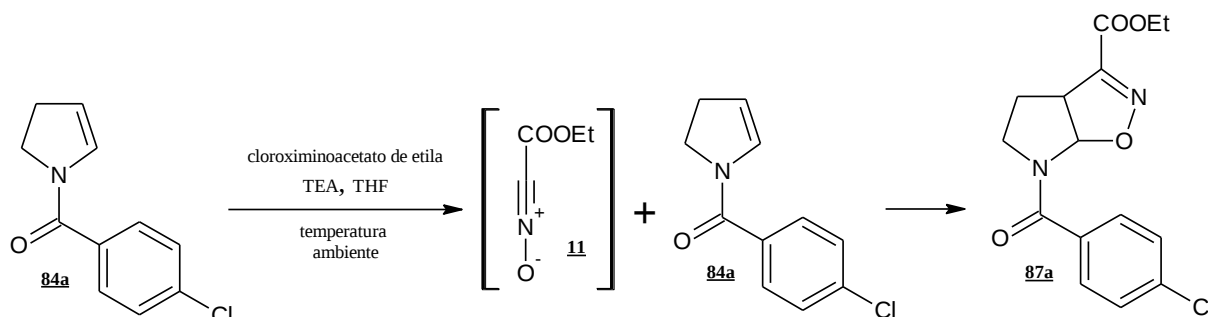
Dados espectroscópicos:

RMN de ¹H (CDCl₃, δ, ppm, 300 MHz, temperatura ambiente), presença de rotâmeros.

1,37 (t; J = 7,2 Hz; 3H); 2,23 (m; 2H); 3,18 (dt; J = 11,1 Hz; J = 6,3; 1H); 3,84 (m; 1H); 4,08 (m; 1H); 4,36 (m; 2H); 5,2 (m; 2H); 6,42 e 6,53 (d; J = 7,5 Hz; 1H; rotâmeros); 7,36 (m; 5H).

⁴⁰ Um excesso do precursor cloroxominaacetato de etila e TEA (4,74 mmol e 10,5 mmol adicionais, respectivamente) levou a um rendimento de 82,10%.

6.1.1.7 Síntese do éster etílico do ácido 6-(4-clorobenzoil)-4,5,6,6a-tetrahidro-3aH-pirrólo[3,2-d]isoxazol-3-carboxílico **87a** (cicloaduto da enamida *p*-cloro)



O procedimento nesta etapa foi semelhante àquele exposto na seção anterior 6.1.6, com a distinção de que, ao invés de enecarbamato endocíclico foi utilizada a enamida *p*-cloro **84a**.

Enamida *p*-Cl (1,0916 g; 5,52 mmol em 26,76 mL de THF), clorooximinacetato de etila **10** (0,859 g; 5,66 mmol em 5,16 mL de THF), TEA (1 mL; 7,17 mmol)⁴¹.

O isolamento do produto através de coluna cromatográfica de sílica gel (acetato/hexano – 4:6) apresentou um rendimento de 69,56%.

Propriedades físicas:

- Sólido levemente amarelado
- $R_f = 0,38$ (acetato de etila/hexano – 1:1)
- Ponto de fusão: 63-65 °C

Dados espectroscópicos:

RMN de ^1H (CDCl_3 , δ , ppm, 300 MHz, temperatura ambiente), presença de rotâmeros.

1,36 (t; $J = 7,0$ Hz; 3H); 2,19 (ml; 1H); 2,37 (ddl; $J = 5,9$ Hz; $J = 12,9$ Hz; 1H); 3,17 (sl; 1H); 4,07 (m; 1H); 4,35 (m; 3H); 6,16 (sl; 1H, rotâmero em 6,97); 7,4 (dl; $J = 8,4$ Hz; 2H); 7,6 (ml; 2H).

RMN de ^{13}C (CDCl_3 , δ , ppm, 75 MHz, temperatura ambiente).

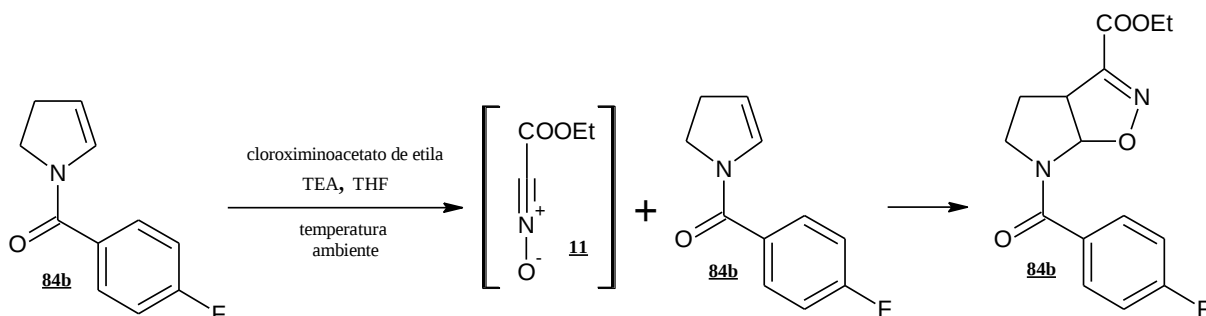
14,0 (CH_3); 27,8 (CH_2); 43,5 (CH_2); 51,1 (CH); 62,3 (CH_2); 95,8 (CH); 128,6 (CH); 129,5 (CH); 133,1 (C); 137,0 (C); 152,2 (C); 159,7 (C=O); 168,5 (C=O).

⁴¹ Um excesso de 2,29 mmol do precursor clorooximinacetato de etila foi empregado.

I.V. – FT (janela de KBr, cm^{-1}), principais sinais.

2.985, 1.724, 1.650, 1.591, 1.408, 1.270, 1.180, 1.132, 1.015, 931, 836, 756.

6.1.1.8 Síntese do éster etílico do ácido 6-(4-fluorobenzil)-4,5,6,6a-tetrahidro-3aH-pirrolo[3,2-d]isoxazol-3-carboxílico **87b** (cicloaduto da enamida *p*-flúor)



A reação seguiu curso semelhante daquele apresentado na seção 6.1.6, com a diferença que, neste caso, a enamida *p*-flúor **84b** substituiu o enecarbamato endocíclico.

Enamida *p*-flúor (1,0111 g; 5,288 mmol em 17,23 mL de THF), clorooximinacetato de etila **10** (0,8884 g; 5,8627 mmol em 6,4 mL de THF), TEA (0,91 mL; 6,52 mmol)⁴².

Após purificação por coluna cromatográfica de sílica gel (acetato de etila/hexano – 3:7) o cicloaduto foi obtido num rendimento de 106,36%.

Propriedades físicas:

- Sólido branco
- R_f = 0,39 (acetato de etila/hexano – 1:1)
- Ponto de fusão: 74 °C

Dados espectroscópicos:

RMN de ^1H (CDCl_3 , δ , ppm, 300 MHz, temperatura ambiente), presença de rotâmeros.

1,38 (t; J = 7,0 Hz; 3H); 2,22 (m; 1H); 2,40 (dd; J = 6,0 Hz; J = 13,5 Hz; 1H); 3,20 (m; 1H); 4,12 (t; J = 8,0 Hz; 1H); 4,36 (m; 3H); 6,22 (sl; 1H); 7,12 (m; 2H); 7,69 (sl; 2H).

⁴² Uma vez que CCD revelou que uma fração da enamida *p*-flúor permanecia inalterada nas quantidades referidas dos reagentes, proporções excedentes foram aplicadas para seu consumo: 2,9313 mmol de clorooximinacetato de etila (em 3,2 mL de THF) e 4,22 mmol de TEA.

RMN de ^{13}C (CDCl_3 , δ , ppm, 75 MHz, temperatura ambiente).

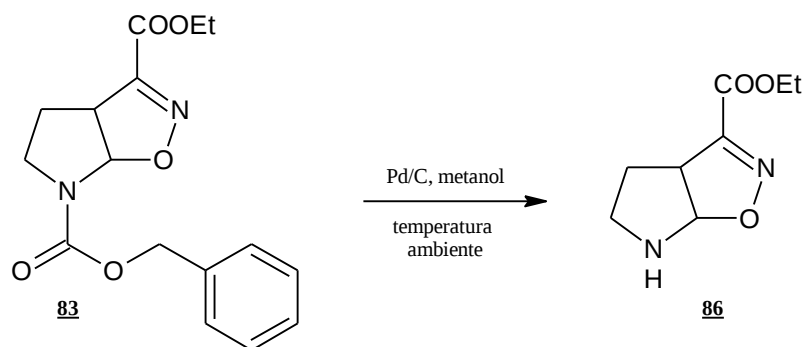
14,08 (CH_3); 27,95 (CH_2); 43,53 (CH_2); 51,19 (CH); 62,4 (CH_2); 96,17 (CH); 115,6 (d; $J = 21,5$ Hz; CH); 130,4 (CH); 131,0 (C); 152,4 (C); 159,8 ($\text{C}=\text{O}$); 164,1 (d; $J = 250,0$ Hz; $\text{C}-\text{F}$); 168,7 ($\text{C}=\text{O}$).

I.V. – FT (janela de KBr, cm^{-1}), principais sinais.

3.030, 2.986, 2.860, 1.721, 1.652, 1.600, 1.509, 1.408, 1.270, 1.131, 931, 853.

6.1.2 Síntese dos aldeídos derivados do heterobícclo 2-isoxazolina[5,4-b]pirrolidínico

6.1.2.1 Síntese do éster do ácido 3a,4,5,6a-tetrahidropirrolo[3,2-d]isoxazol-3-carboxílico **86** (desproteção do nitrogênio do enecarbamato)



Para a execução da hidrogenólise, a um balão contendo o cicloaduto do enecarbamato **83** (1,2812 g; 4,02 mmol) foi adicionado metanol PA (93,2 mL), sob agitação, solubilizando completamente o reagente. Em seguida, foram inseridas quantidades catalíticas de Pd/C (35 mg), sendo então o balão acoplado a um sistema para borbulhamento de hidrogênio molecular (via seringa).

Após cerca de uma hora sob borbulhamento do referido gás, uma CCD da reação confirmou o total consumo do cicloaduto do enecarbamato, caracterizando o fim da síntese do cicloaduto desprotegido **86**.

A mistura reacional foi filtrada a vácuo (funil de vidro sinterizado, portando uma camada do agente filtrante celite) e o solvente foi removido sob pressão negativa (evaporador rotatório).

O rendimento da reação foi 88,19%. Não houve necessidade de método complementar para purificação do produto.

Propriedades físicas:

- Óleo incolor
- R_f = 0,2 (acetato de etila/hexano 3:7)

Dados espectroscópicos:

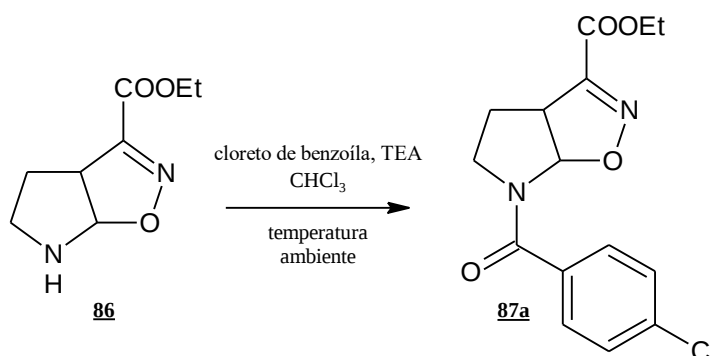
RMN de ¹H (CDCl₃, δ, ppm, 300 MHz, temperatura ambiente).

1,35 (t; J = 6,0 Hz; 3H); 2,07 (m; 2H); 2,81 (ml; 2H); 3,12 (m; 1H); 3,87 (m; 1H); 4,32 (m; 2H); 6,07 (d; J = 6,9 Hz; 1H).

RMN de ¹³C (CDCl₃, δ, ppm, 75 MHz, temperatura ambiente).

14,0 (CH₃); 29,9 (CH₂); 42,8 (CH); 49,1 (CH₂); 61,9 (CH₂); 100,8 (CH); 152,3 (C); 160,5 (C).

6.1.2.2 Síntese do éster etílico do ácido 6-(4-clorobenzoil)-4,5,6,6a-tetrahidro-3aH-pirrolo[3,2-d]isoxazol-3-carboxílico **87a** (acilação do nitrogênio N-7)



Em posse do cicloaduto desprotegido **86**, obtido no procedimento anterior, este foi solubilizado em um balão com a adição de CHCl₃ (84,8 mL). Logo após, sob intensa agitação, foram adicionadas TEA (0,48 mL; 3,42 mmol) e, por gotejamento, a solução orgânica do cloreto de 4-clorobenzoíla (0,43 mL; 3,45 mmol em CHCl₃).

Dez minutos após a adição do agente acilante cloreto de 4-clorobenzoíla, uma CCD (acetato de etila/hexano – 4:6) indicou a formação do cicloaduto N-acilado **87a**, que foi confirmada por outra preparada uma hora após a adição deste.

O isolamento do produto mediante emprego de coluna cromatográfica de sílica gel proporcionou um rendimento de 48,14%⁴³.

Propriedades físicas:

- Sólido levemente amarelado
- R_f = 0,38 (acetato de etila/hexano – 1:1)
- Ponto de fusão: 63-65 °C

Dados espectroscópicos:

RMN de ¹H (CDCl₃, δ, ppm, 300 MHz, temperatura ambiente), presença de rotâmeros.

1,36 (t; J = 7,0 Hz; 3H); 2,19 (ml; 1H); 2,37 (ddl; J = 5,9 Hz; J = 12,9 Hz; 1H); 3,17 (sl; 1H); 4,07 (m; 1H); 4,35 (m; 3H); 6,16 (sl; 1H, rotâmero em 6,97); 7,4 (dl; J = 8,4 Hz; 2H); 7,6 (ml; 2H).

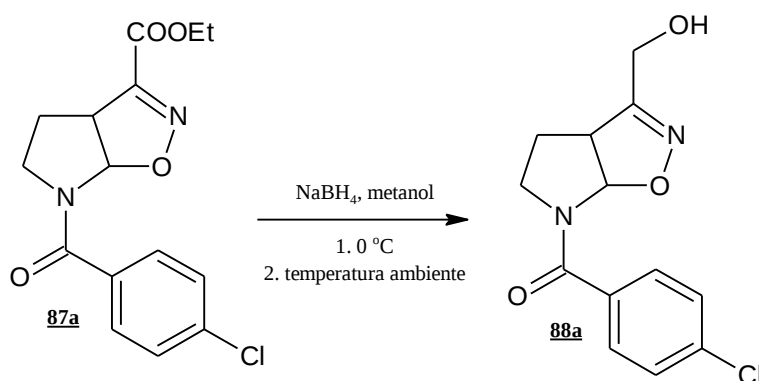
RMN de ¹³C (CDCl₃, δ, ppm, 75 MHz, temperatura ambiente).

14,0 (CH₃); 27,8 (CH₂); 43,5 (CH₂); 51,1 (CH); 62,3 (CH₂); 95,8 (CH); 128,6 (CH); 129,5 (CH); 133,1 (C); 137,0 (C); 152,2 (C); 159,7 (C=O); 168,5 (C=O).

I.V. – FT (janela de KBr, cm⁻¹), principais sinais.

2.985, 1.724, 1.650, 1.591, 1.408, 1.270, 1.180, 1.132, 1.015, 931, 836, 756.

6.1.2.3 Síntese do álcool (4-clorofenil)-(3-hidroximetil-3a,4,5,6a-tetrahidro-pirroló[3,2-d]isoxazol-6-il-metanona **88a** (síntese do álcool isoxazolinico *p*-cloro)



⁴³ Quando um excesso de cloreto de 4-clorobenzoíla (7,64 mmol) e TEA (8,14 mmol) foi implementado, o procedimento alcançou um rendimento de 81,90% do produto.

Ao balão contendo o éster do cicloaduto *p*-cloro **87a** (2,38 g; 7,37 mmol), foi introduzido metanol previamente seco (218 mL) para solubilização do reagente, sob agitação, sendo a solução esfriada por banho de gelo próximo a 0 °C. Estabilizada a temperatura, foram inseridos cada um dos três equivalentes de NaBH₄ (849,044 mg no total, 283,0146 por equivalente), sendo o intervalo entre eles de 5 minutos.

Uma hora após a adição do primeiro equivalente do agente redutor NaBH₄, o banho de gelo foi retirado, sendo a geração do produto monitorada por CCD (acetato de etila/hexano – 1:1).

Confirmado o fim da reação, o metanol foi removido por pressão negativa (evaporador rotatório), e ao conteúdo remanescente foram juntados acetato de etila e água, a fim de proceder a extração. A fase orgânica foi seca com NaSO₄ anidro, teve o solvente evaporado à pressão negativa e, após execução de coluna cromatográfica de sílica gel, rendeu 79,78% do álcool isoxazolinico **88a** desejado⁴⁴.

Propriedades físicas:

- Óleo levemente amarelado
- R_f = 0,11 (acetato de etila/hexano – 1:1)

Dados espectroscópicos:

RMN de ¹H (CDCl₃, δ, ppm, 300 MHz, temperatura ambiente), presença de rotâmeros.

2,00-2,20 (m; 1H); 2,30 (dd, J = 5,7 Hz; 1H); 2,90-3,65 (m; 2H); 4,00 (m; 1H); 4,35 (d; J = 14,1 Hz; 1H); 4,44 (d; J = 14,1 Hz; 1H); 5,97 (d; J = 7,0 Hz; 1H) rotâmero em 6,72; 7,40 (d; J = 8,1; 2H); 7,64 (dl; J = 8,0 Hz; 2H).

RMN de ¹³C (CDCl₃, δ, ppm, 75 MHz, temperatura ambiente).

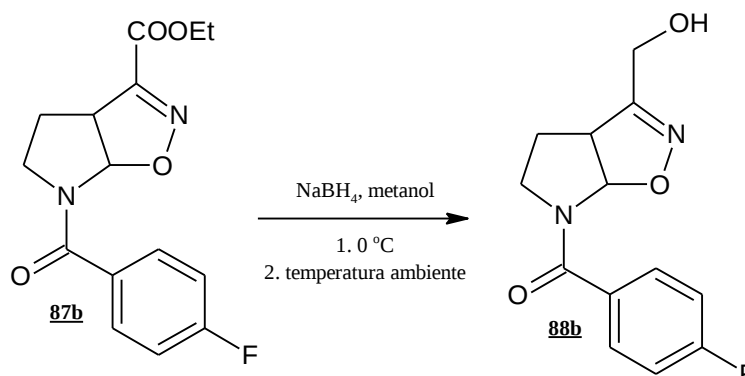
26,7 (CH₂); 43,4 (CH₂) rotâmero em 47; 52,6 (CH); 56,8 (CH₂) 93,3 (CH) rotâmero em 91; 128,6 (CH); 129,6 (CH); 133,3 (C); 136,9 (C); 158,9 (C=N); 169,1 (C=O).

I.V. – FT (janela de KBr, cm⁻¹), principais sinais.

3.508, 3.080, 2.970, 1.632, 1.505, 1.420, 1.215, 848.

⁴⁴ Quantidades adicionais de seis equivalentes, necessários para total consumo do reagente éster metílico, intermediário formado durante a reação, ocasionaram um aumento no rendimento para 84,13%.

6.1.2.4 Síntese do álcool (4-fluorofenil)-(3-hidroximetil-3a,4,5,6a-tetrahidro-pirrolol[3,2-d]isoxazol-6-il-metanona **88b** (síntese do álcool isoxazolíneo *p*-flúor)



Procedimento semelhante àquele descrito na seção anterior 6.1.11.

Éster do cicloaduto *p*-flúor **87b** (1,7127 g; 5,59 mmol), NaBH₄ (643,3 mg no total, 211,4 mg para cada um dos três equivalentes); metanol (164,9 mL)⁴⁵.

Após extração com acetato de etila/água e purificação em coluna cromatográfica de sílica gel, o produto **88b** foi obtido em um rendimento de 87,46%.

Propriedades físicas:

- Óleo incolor
- R_f = 0,10 (acetato de etila/hexano – 1:1)

Dados espectroscópicos:

RMN de ¹H (CDCl₃, δ, ppm, 300 MHz, temperatura ambiente), presença de rotâmeros.

2,06 (m; 1H); 2,27 (dd; J = 12,6; J = 5,7 Hz; 1H); 3,00 (m; 1H) rotâmero em 3,40; 4,00-4,20 (m, 2H); 4,24 (m; 2H); 5,39 (t; J = 6,0 Hz; 1H OH); 6,03 (d; J = 7,5 Hz; 1H) rotâmero em 6,53; 7,33 (m; 2H); 7,67 (m; 2H).

RMN de ¹³C (CDCl₃, δ, ppm, 75 MHz, temperatura ambiente).

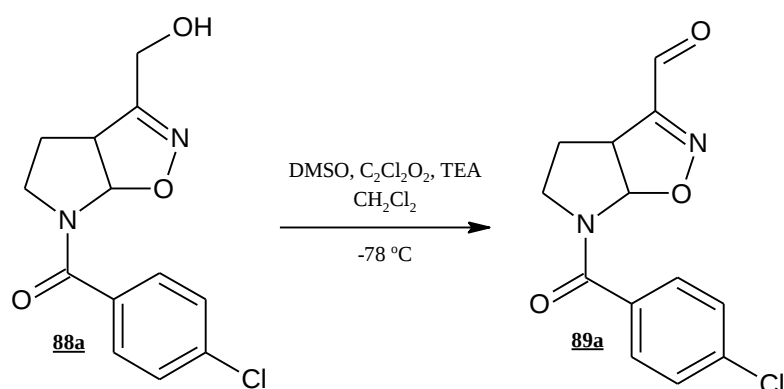
25,9 (CH₂) rotâmero em 27,3 (CH₂); 43,5 (CH₂) rotâmero em 47,4; 52,8 (CH) rotâmero em 50,8; 55,2 (CH₂); 92,7 (CH) rotâmero em 90,1; 115,3 (d; J = 21 Hz; CH); 130,3 (CH); 132,1 (C); 159,9 (C=N); 164,7 e 161,5 (d; J = 240 Hz; C); 167,9 (C=O).

⁴⁵ Para total consumo do éster metílico, intermediário na reação, três equivalentes adicionais do agente redutor NaBH₄ foram utilizados.

I.V. – FT (janela de KBr, cm^{-1}), principais sinais.

3.506, 3.052, 2.970, 2.884, 1.639, 1.597, 1.500, 1.415, 1.210, 1.153, 845.

6.1.2.5 Síntese do 6-(4-clorobenzoil)-4,5,6,6a-tetrahidro-3aH-pirrolo[3,2-d]isoxazol-3-carbaldeído 89a (síntese do aldeído isoxazolinico *p*-cloro)



A um balão contendo $\text{C}_2\text{Cl}_2\text{O}_2$ (0,49 mL; 5,65 mmol) e CH_2Cl_2 (9,57 mL), arrefecido a aproximadamente $-78\text{ }^\circ\text{C}$ (banho de gelo seco/etanol), sob intensa agitação, foi adicionada a solução de DMSO seco (0,77 mL; 10,89 mmol em 2,18 mL de CH_2Cl_2). Dois minutos após a adição do DMSO, a solução do álcool isoxazolinico 88a (1,1627 g; 4,14 mmol em 2,6 mL de CH_2Cl_2) passou a ser gotejada no meio reacional durante cinco minutos. Quinze minutos após a lenta adição do álcool isoxazolinico, foi inserida na reação TEA (2,92 mL; 20,80 mmol), mantendo a agitação e o banho de gelo por ainda cinco minutos. Concluído o tempo, água destilada foi jogada dentro do balão para interromper a reação.

Após extração CH_2Cl_2 /água, a fase orgânica foi seca em NaSO_4 anidro, filtrada a vácuo (funil sinterizado) e removida em pressão negativa (evaporador rotatório). Uma CCD (acetato de etila/hexano – 4:6) confirmou a formação do produto 89a.

O isolamento do produto por cromatografia em coluna de sílica gel rendeu 92,32%⁴⁶ de um sólido levemente amarelado.

Propriedades físicas:

⁴⁶ Tendo por base uma reação prévia em que o rendimento obtido foi baixíssimo (15,15%), neste procedimento foram utilizados um excesso de 100 % para DMSO, $\text{C}_2\text{Cl}_2\text{O}_2$ e TEA.

- Sólido amorfo levemente amarelo
- R_f = 0,43 (acetato de etila/hexano – 2:3)
- Ponto de fusão: 124 °C

Dados espectroscópicos:

RMN de ¹H (DMSO-D₆, δ, ppm, 300 MHz, temperatura ambiente), presença de rotâmeros.

2,00-2,40 (m; 2H); 3,07 (m; 1H) rotâmero em 3,94; 4,16 (m; 2H); 6,30 (d; J = 6,6 Hz; 1H) rotâmero em 6,81; 7,61 (sl; 4H); 9,81 (s, 1H).

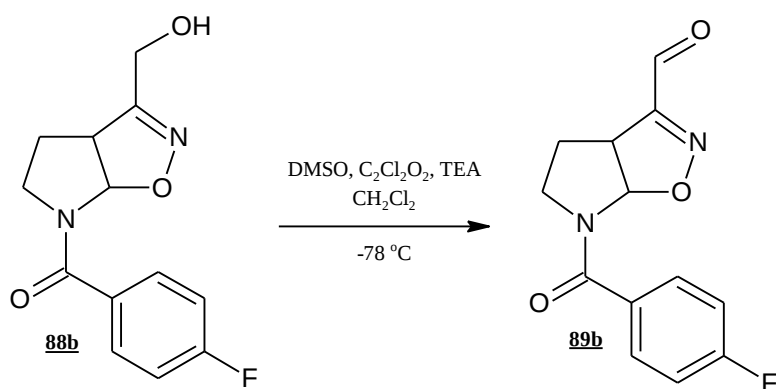
RMN de ¹³C (DMSO-D₆, δ, ppm, 75 MHz, temperatura ambiente).

26,2 (CH₂) rotâmero em 27,6; 43,6 (CH₂) rotâmero em 46,7; 48,6 (CH) rotâmero em 47,3; 96,9 (CH) rotâmero em 94,0; 128,6 (CH); 129,6 (CH).

I.V. – FT (janela de KBr, cm⁻¹), principais sinais.

3.030, 2.980, 2.861, 1.650, 1.626, 1.580, 1.398, 1.250, 1.090, 915, 843.

6.1.2.6 Síntese do 6-(4-fluorobenzoil)-4,5,6,6a-tetrahidro-3aH-pirrolo[3,2-d]isoxazol-3-carbaldeído **89b** (síntese do aldeído isoxazolinico *p*-flúor)



Procedimento semelhante àquele exposto na seção anterior 6.1.2.5.

Álcool isoxazolínico *p*-flúor **88b** (1,2824 g; 4,85 mmol em 3,0 mL de CH₂Cl₂), C₂Cl₂O₂ (0,51 mL; 5,95 mmol em 11,01 mL de CH₂Cl₂), DMSO (0,85 mL; 11,94 mmol em 2,50 mL de CH₂Cl₂), TEA (3,43 mL; mmol)⁴⁷.

Após extração CH₂Cl₂/água, secagem com NaSO₄ anidro, filtração (funil de vidro sinterizado) e remoção da fase orgânica (evaporador rotatório), a execução de coluna cromatográfica de sílica gel possibilitou a obtenção de um sólido branco **89b** em um rendimento de 78,15%.

Propriedades físicas:

- Sólido branco amorfo
- R_f = 0,45 (acetato de etila/hexano – 2:3)
- Ponto de fusão: 129 °C.

Dados espectroscópicos:

RMN de ¹H (CDCl₃, δ, ppm, 300 MHz, temperatura ambiente), presença de rotâmeros.

2,10-2,20 (m; 2H); 3,13 (sl; 1H) rotâmero em 3,66; 4,04 (t; J = 8,1 Hz; 1H); 4,44 (sl; 1H); 6,24 (sl; 1H); 7,12 (t; J = 8,4 Hz; 2H); 7,69 (sl; 2H); 9,88 (s; 1H).

RMN de ¹³C (CDCl₃, δ, ppm, 75 MHz, temperatura ambiente).

27,3 (CH₂); 43,4 (CH₂); 48,4 (CH); 97,1 rotâmero em 94,3; 115,6 (d; J = 21 Hz; CH), 130,5 (CH); 132,0 (C), 159,1 (C=N), 162,5 e 165,8 (d; J = 250 Hz); 168,6 (C=O); 185,2 (C=O).

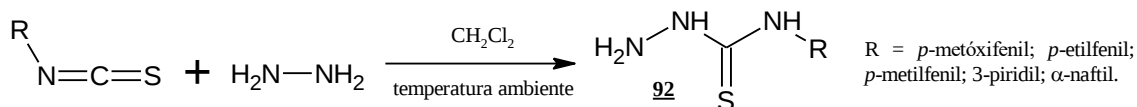
I.V. – FT (janela de KBr, cm⁻¹), principais sinais.

3.048, 2.960, 2.857, 1.700, 1.626, 1.590, 1.388, 1.230, 854.

6.1.3 Síntese das tiossemicarbazonas derivadas do heterobiciclo isoxazolina[5,4-b]pirrolidínico

6.1.3.1 Síntese das tiossemicarbazidas substituídas 92

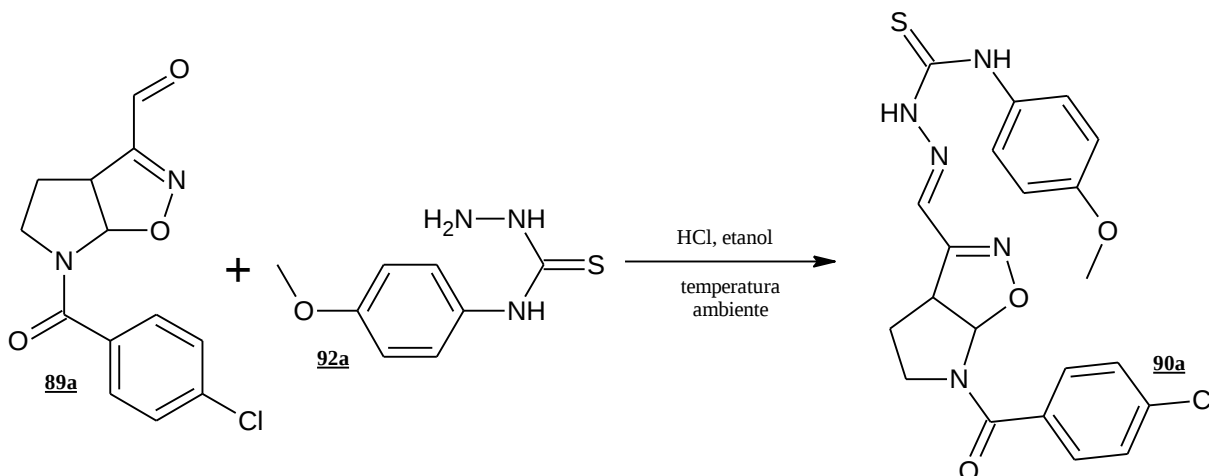
⁴⁷ A reação utilizou o dobro das quantidades acima calculadas para C₂Cl₂O₂ (1,02 mL no total), DMSO (1,7 mL no total) e TEA (6,86 mL no total).



A soluções de diferentes isotiocianatos (0,5 mmol) em diclorometano (10 mL) foi adicionado hidrato de hidrazina, à temperatura ambiente, sob agitação. Após o período de duas horas, o precipitado formado foi filtrado, lavado com diclorometano e seco em dessecador a vácuo. Em alguns casos, a precipitação da tiossemicarbazida ocorreu após adição de *n*-hexano.

Os produtos obtidos foram utilizados na reação subsequente: condensação com os aldeídos.

6.1.3.2 Síntese da N-(4-metóxi-fenil)-N-(4-cloro-fenil)-3a,4,5,6a-tetrahidro-pirrólo[3,2-d]isoxazolo-6-il-metanona-hidrazina-carbotiamida **90a**



A um balão contendo tiossemicarbazida *p*-metóxi-fenil **92a** (60 mg; 0,304 mmol), foram adicionados etanol PA (14 mL) e duas gotas de HCl concentrado, sob agitação e à temperatura ambiente. Em seguida, foi inserido à reação a solução etanólica do aldeído isoxazolinico *p*-cloro **89a** (85 mg; 0,304 mmol).

A reação foi acompanhada por CCD (acetato de etila/hexano – 1:1), que determinou o fim da reação. Após recristalização em etanol, um pó branco **90a** foi obtido em um rendimento de 71,88%.

Propriedades físicas:

- Pó branco
- R_f = 0,37 (acetato de etila/hexano – 7:3)
- Ponto de fusão: 163-166 °C

Dados espectroscópicos:

RMN de ¹H (DMSO-D₆, δ, ppm, 300 MHz, temperatura ambiente), presença de rotâmeros.

2,4-2,6 (m; 2H); 3,08 (sl; 1H) rotâmero em 3,45; 3,78 (s; 3H); 4,1 (sl; 1H); 4,39 (t; 1H); 6,42 (sl; 1H) rotâmero em 6,72; 6,95 (d; 2H); 7,38 (d; 2H); 7,55-7,6 (sl; 4H); 8,0 (s; 1H); 9,9 (s; 1H); 12,05 (s; 1H).

RMN de ¹³C (DMSO-D₆, δ, ppm, 75 MHz, temperatura ambiente).

27,8 (CH₂); 43,8 (CH₂); 50,8 (CH); 55,03 (OCH₃); 94,5 (CH); 113,5 (CH); 127, 8 (CH); 128,5 (CH); 129,5 (CH); 131,7 (C); 132 (C); 133 (C=N); 156,9 (C); 157,2 (C=N); 168 (C=O); 177 (C=S).

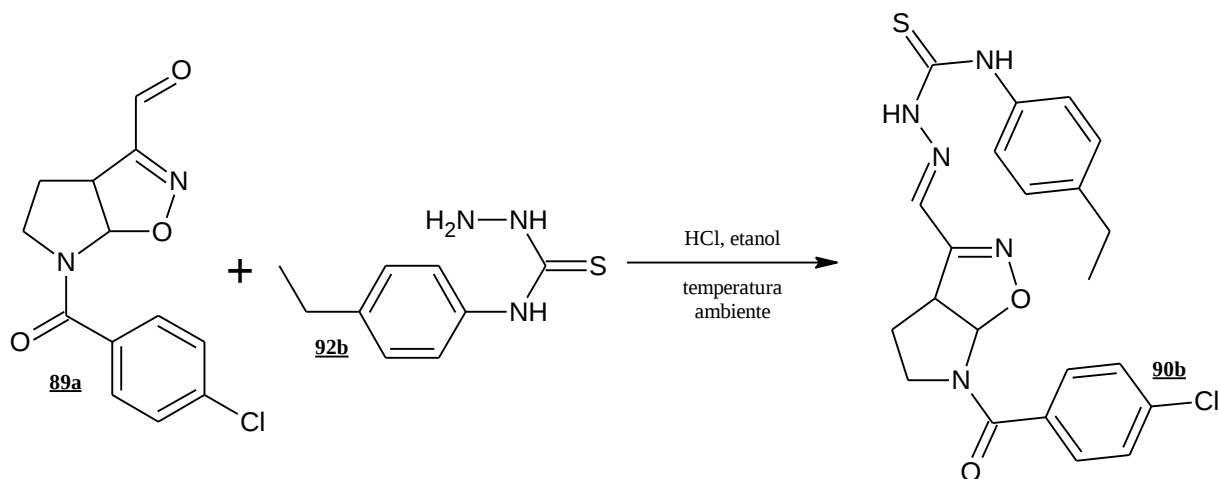
I.V. – FT (cm⁻¹), principais sinais.

3190, 3009, 1617, 1520, 1428, 1408, 1244, 1192, 1178, 1092, 1025, 930, 919, 838, 740.

HRMS *m/z* [M+H]⁺ - (MALDI-TOF)

457,810

6.1.3.3 Síntese da N-(4-etil-fenil)-N-(4-cloro-fenil)-3a,4,5,6a-tetrahidro-pirroló[3,2-d]isoxazolo-6-il-metanona-hidrazina-carbotiamida **90b**



Ao balão portando o aldeído isoxazolínico *p*-cloro **89a** (103,7 mg; 0,372 mmol) solubilizado em etanol PA (9 mL), foram adicionadas duas gotas de HCl concentrado, sob intensa agitação e à temperatura ambiente. Logo após, a tiossemicarbazida *p*-etilfenil **92b** (70 mg; 0,358 mmol) foi agregada à solução.

A análise por CCD (acetato/hexano – 1:1) determinou o fim da reação. A recrystalização em etanol rendeu um pó de coloração levemente amarela **90b**, em um rendimento de 52,33%.

Propriedades físicas:

- Pó levemente amarelo
- $R_f = 0,52$ (acetato de etila/hexano – 7:3)
- Ponto de fusão: 177-181 °C

Dados espectroscópicos:

RMN de ^1H (DMSO- D_6 , δ , ppm, 300 MHz, temperatura ambiente), presença de rotâmeros.

1,2 (t; 3H); 2,22-2,34 (m; 2H); 2,6 (q; 2H); 3,08 (sl; 1H) rotâmero em 3,45; 4,10 (sl; 1H); 4,38 (t; 1H); 6,24 (sl; 1H) rotâmero em 6,72; 7,22 (d; 2H); 7,38 (d; 2H); 7,6-7,67 (sl; 4H); 8,0 (s; 1H); 9,92 (s; 1H); 12,08 (s; 1H).

RMN de ^{13}C (DMSO- D_6 , ppm, 75 MHz, temperatura ambiente).

15,8 (CH_3); 18,7 (CH_2); 27,8 (CH_2); 43,8 (CH_2); 50,5 (CH); 94,8 (CH); 126 (CH); 127,5 (CH); 128,5 (CH); 129,5 (CH); 133 (CH); 134,2 (C); 135,2 (C); 136,1 (C); 141,2 (C); 158 (C=N); 168 (C=O); 176,5 (C=S).

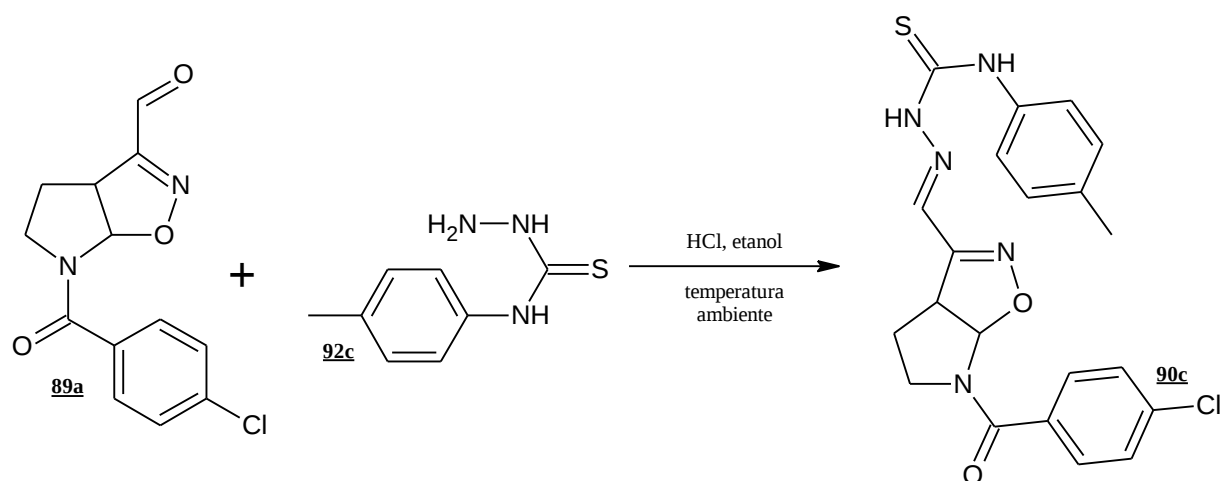
I.V. – FT (cm^{-1}), principais sinais.

3323, 3201, 2966, 2887, 1638, 1531, 1414, 1272, 1189, 1178, 1089, 919, 858, 833.

HRMS m/z $[M+H]^+$ - (MALDI-TOF)

455,834

6.1.3.4 Síntese da N-(4-metil-fenil)-N-(4-cloro-fenil)-3a,4,5,6a-tetrahidro-pirrolo[3,2-d]isoxazolo-6-il-metanona-hidrazina-carbotiamida **90c**



O procedimento foi semelhante àquele apresentado na seção 6.1.3.3.

Aldeído isoxazolinico *p*-cloro **89c** (70,2 mg; 0,252 mmol), tiossemicarbazida *p*-metilfenil **92c** (45,8 mg; 0,252 mmol), HCl (2 gotas), etanol PA (8 mL).

Após recristalização, foi obtida a tiossemicarbazona **90c** de interesse em um rendimento de 70,86%.

Propriedades físicas:

- Pó levemente amarelado
- R_f = 0,47 (acetato de etila/hexano – 7:3)
- Ponto de fusão: 153-157 °C.

Dados espectroscópicos:

RMN de 1H (DMSO- D_6 , δ , ppm, 300 MHz, temperatura ambiente), presença de rotâmeros.

2,25-2,35 (m; 2H); 2,31 (s; 3H); 3,06 (sl; 1H) rotâmero em 3,46; 4,39 (m; 1H); 6,22 (sl; 1H) rotâmero em 6,71; 7,2 (d; 2H); 7,35 (d; 2H); 7,6-7,65 (sl; 4H); 8,0 (s; 1H); 9,92 (s; 1H); 12,05 (s; 1H).

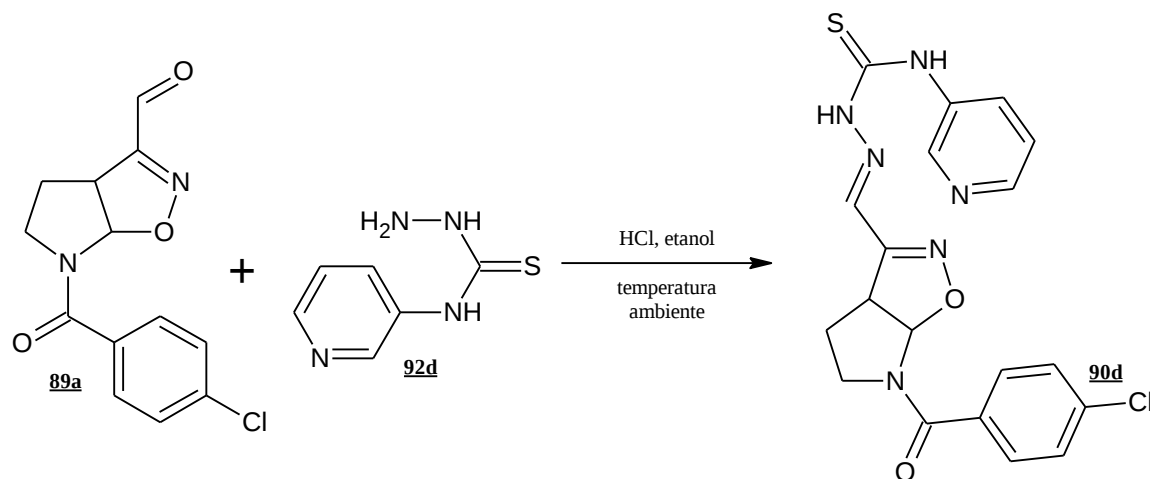
RMN de ^{13}C (DMSO- D_6 , δ , ppm, 75 MHz, temperatura ambiente).

20,8 (CH_3); 27,8 (CH_2); 43,8 (CH_2); 50,6 (CH); 94,5 (CH); 126 (CH); 128,5 (CH); 128,7 (CH); 129,5 (CH); 133 (CH); 134,2 (C); 135 (C); 135,2 (C); 136,1 (C); 158 ($\text{C}=\text{N}$); 168 ($\text{C}=\text{O}$); 177 ($\text{C}=\text{S}$).

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

3459, 3191, 3001, 2857, 1626, 1514, 1489, 1416, 1395, 1253, 1177, 1091, 931, 894, 838, 757.

6.1.3.5 Síntese da N-(3-piridil)-N-(4-cloro-fenil)-3a,4,5,6a-tetrahidro-pirroló[3,2-d]isoxazolo-6-il-metanona-hidrazina-carbotiamida **90d**



O procedimento empregado foi semelhante àquele exposto na seção 6.1.3.2.

Aldeído isoxazolínico *p*-cloro **89a** (106 mg; 0,380 mmol), tiossemicarbazida 3-piridil **92d** (63,8 mg; 0,380 mmol), HCl (2 gotas), etanol PA (8 mL).

Propriedades físicas:

- Pó amarelo
- R_f = 0,15 (acetato de etila)
- Ponto de fusão: 202-205 °C (com carbonização)

Dados espectroscópicos:

RMN de ^1H (DMSO- D_6 , δ , ppm, 300 MHz, temperatura ambiente), presença de rotâmeros.

2,25-2,35 (m; 2H); 3,1 (sl; 1H) rotâmero em 3,42; 4,1 (sl; 1H); 4,48 (t; 1H); 6,28 (sl; 1H) rotâmero em 6,74; 7,6-7,68 (sl; 4H); 7,9 (m; 1H); 8,1 (s; 1H); 8,7 (m; 2H); 9,2 (s; 1H); 10,62 (s; 1H); 12,62 (s; 1H).

RMN de ^{13}C (DMSO- D_6 , δ , ppm, 75 MHz, temperatura ambiente).

28 (CH_2); 43,8 (CH_2); 50,1 (CH); 95 (CH); 126 (CH); 128,5 (CH); 129,5 (CH); 134,2 (C); 135 ($\text{HC}=\text{N}$); 135,3 (C-Cl); 138,1 (C); 139 (CH); 139,5 (CH); 140,8 (CH); 158 ($\text{C}=\text{N}$); 168 ($\text{C}=\text{O}$); 177 ($\text{C}=\text{S}$).

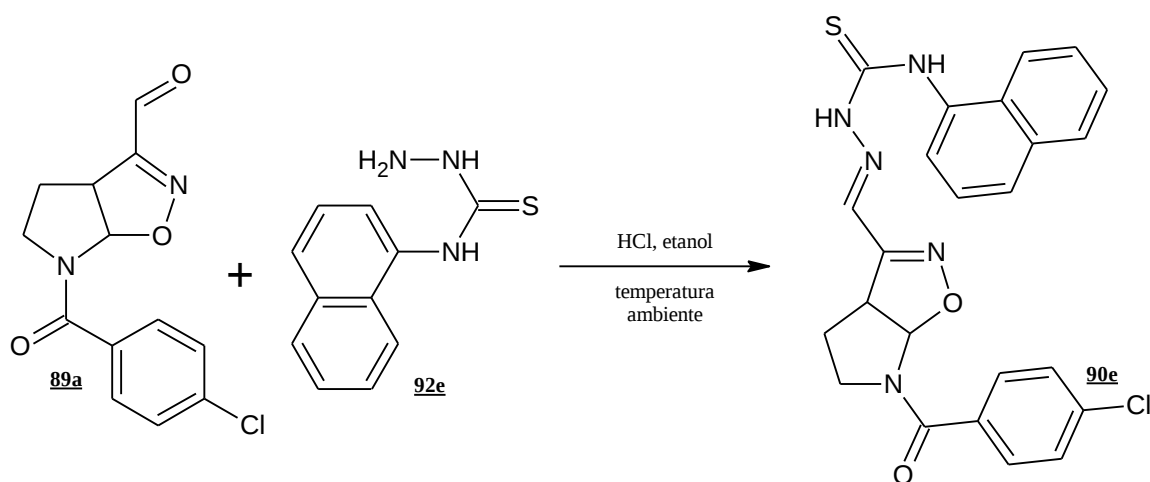
I.V. – FT (cm^{-1}), principais sinais.

3127, 2972, 2587, 2037, 1655, 1558, 1527, 1465, 1416, 1277, 1207, 917, 836, 746.

HRMS m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ - (MALDI-TOF)

428,912

6.1.3.6 Síntese da N-(α -naftil)-N-(4-cloro-fenil)-3a,4,5,6a-tetrahidro-pirrólo[3,2-d]isoxazolo-6-il-metanona-hidrazina-carbotiamida **90e**



O procedimento aqui implementado seguiu o mesmo curso daquele descrito na seção 6.1.3.2.

Aldeído isoxazolinico *p*-cloro **89a** (100,6 mg; 0,360 mmol), tiossemicarbazida α -naftil **92e** (77,9 mg; 0,359 mmol), HCl (2 gotas), etanol PA (15 mL).

A recristalização da tiossemicarbazona **90e** em questão levou a um rendimento de 74,02%.

Propriedades físicas:

- Pó branco
- R_f = 0,49 (acetato de etila/hexano – 7:3)
- Ponto de fusão: 228-236 °C (com carbonização)

Dados espectroscópicos:

RMN de ¹H (DMSO-D₆, δ , ppm, 300 MHz, temperatura ambiente), presença de rotâmeros.

2,22 (m; 1H); 2,42 (m; 1H); 3,05 (sl; 1H) rotamêro em 3,45; 4,1 (sl; 1H); 4,4 (t; 1H); 6,22 (sl; 1H) rotâmerno em 6,76; 7,56-7,64 (sl; 4H); 7,56 (sl; 4H); 7,84 (m; 1H); 7,9 (m; 1H); 7,98 (m; 1H); 8,06 (s; 1H); 10,37 (s; 1H); 12,23 (s; 1H).

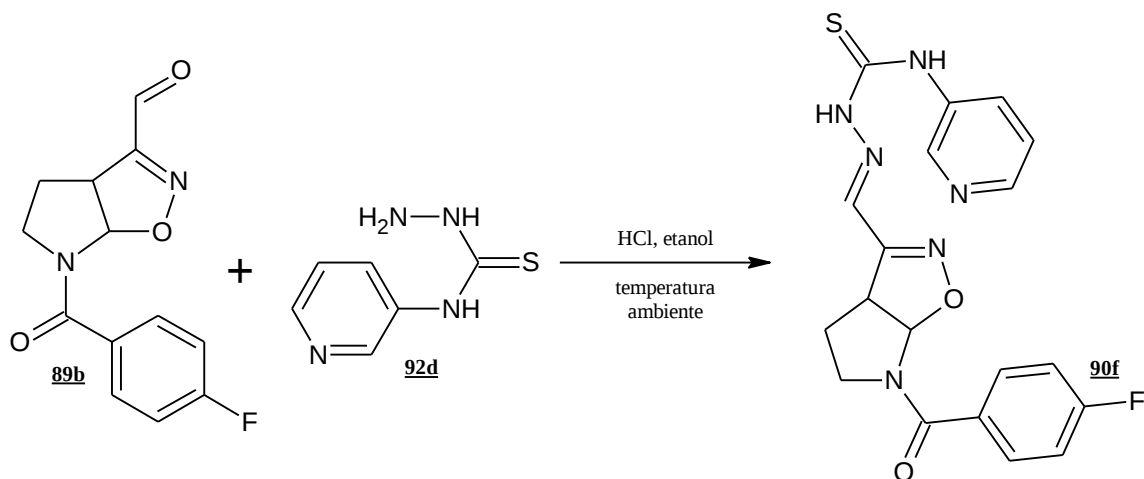
RMN de ¹³C (DMSO-D₆, δ , ppm, 75 MHz, temperatura ambiente).

27,74 (CH₂); 43,71 (CH₂); 50,61 (CH); 94,64; 122,98 (CH); 125,37 (CH); 126,08 (CH); 126,20 127,04 (CH); 128,04 (CH); 128,44 (CH); 129,59 (CH); 130,23 (C); 132,91 (CH); 133,65 (C); 134,25 (C); 135,20 (C); 158,20 (C=N); 168 (C=O); 178,13 (C=S).

I.V. – FT (cm⁻¹), principais sinais.

3330, 3223, 2994, 1612, 1542, 1595, 1426, 1270, 1201, 1167, 1089, 901, 831, 797.

6.1.3.7 Síntese da N-(3-piridil)-N-(4-flúor-fenil)-3a,4,5,6a-tetrahidro-pirrolol[3,2-d]isoxazolo-6-il-metanona-hidrazina-carbotiamida **90f**



A reação foi executada de modo análogo ao método empregado na seção 6.1.3.2.

Aldeído isoxazolinico *p*-flúor **89b** (100 mg; 0,381 mmol), tiossemicarbazida 3-piridil **92d** (64,1 mg; 0,381 mmol), HCl (2 gotas), etanol PA (15 mL).

A recristalização resultou no rendimento de 79,45% da referida tiossemicarbazona **90f**.

Propriedades físicas:

- Pó levemente amarelo
- $R_f = 0,13$ (acetato de etila)
- Ponto de fusão: 212-215 °C (com carbonização).

Dados espectroscópicos:

RMN de ^1H (DMSO- D_6 , δ , ppm, 300 MHz, temperatura ambiente), presença de rotâmeros.

2,22-2,38 (m; 2H); 3,1 (sl; 1H) rotâmero em 3,5; 4,1 (sl; 1H); 4,48 (t; 1H); 6,3 (sl; 1H) rotâmero em 6,78; 7,3 (sl; 2H); 7,7 (sl; 2H); 7,9 (m; 1H); 8,1 (s; 1H); 8,7 (m; 2H); 9,2 (s; 1H); 10,62 (s; 1H); 12,62 (s; 1H).

RMN de ^{13}C (DMSO- D_6 , δ , ppm, 75 MHz, temperatura ambiente).

28 (CH_2); 43,8 (CH_2); 50,1 (CH); 95 (CH); 116 (dd; 21 Hz; CH); 126 (CH); 128,5 (CH); 129,5 (CH); 135 ($\text{HC}=\text{N}$); 132 (C); 135 (CH); 138,1 (C); 139 (CH); 139,5 (CH); 140,8 (CH); 158 ($\text{C}=\text{N}$); 168 ($\text{C}=\text{O}$); 177 ($\text{C}=\text{S}$).

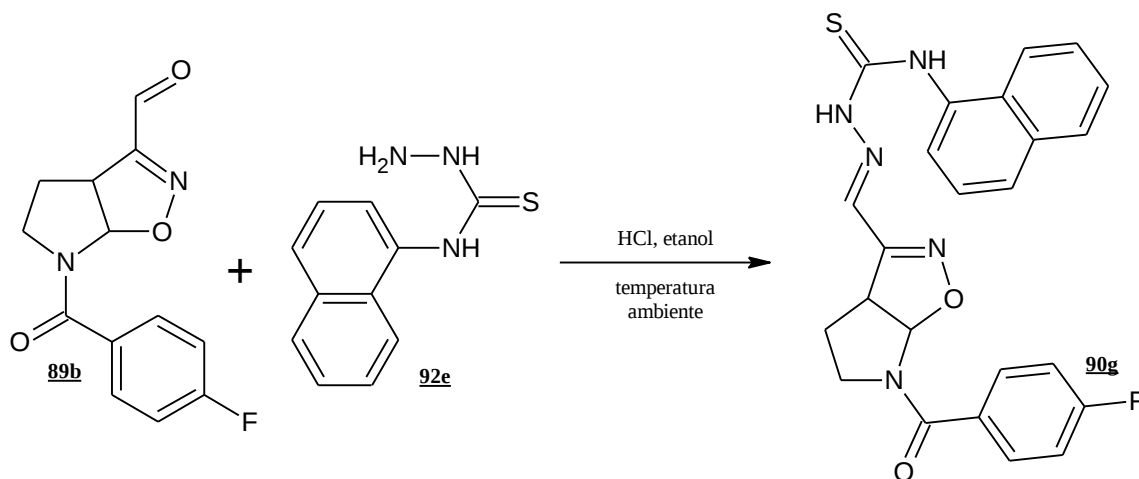
I.V. – FT (cm^{-1}), principais sinais.

Conferir APÊNDICE E.

HRMS m/z [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ - (MALDI-TOF)

413,034

6.1.3.8 Síntese da N-(α -naftil)-N-(4-flúor-fenil)-3a,4,5,6a-tetrahidro-pirrólo[3,2-d]isoxazolo-6-il-metanona-hidrazina-carbotiamida **90g**



O procedimento reacional foi semelhante ao demonstrado na seção 6.1.3.2.

Aldeído isoxazolíneo *p*-flúor **89b** (100 mg; 0,381 mmol), tiossemicarbazida α -naftil **92e** (82,8 mg; 0,381 mmol), HCl (2 gotas), etanol PA (15 mL).

Propriedades físicas:

- Pó levemente amarelo
- $R_f = 0,45$ (acetato de etila/hexano – 7:3)
- Ponto de fusão: 228-235 °C (com carbonização).

Dados espectroscópicos:

RMN de ^1H (DMSO- D_6 , δ , ppm, 300 MHz, temperatura ambiente), presença de rotâmeros.

2,2 (m; 1H); 2,4 (m; 1H); 3,12 (sl; 1H) rotamêro em 3,52; 4,1 (sl; 1H); 4,4 (t; 1H); 6,23 (sl; 1H) rotâmero em 6,72; 7,34 (s; 2H); 7,56 (s; 4H); 7,65 (s; 2H); 7,81 (s; 1H); 7,92 (s; 1H); 7,98 (s; 1H); 10,42 (s; 1H); 12,24 (s; 1H).

RMN de ^{13}C (DMSO- D_6 , δ , ppm, 75 MHz, temperatura ambiente).

27,77 (CH₂); 43,68 (CH₂); 50,58 (CH); 94,78 (CH); 115,18-115,47 (dd; 21 Hz; CH); 122,98 (CH); 125,37 (CH); 126,08 (CH); 126,20 (CH); 127,04 (CH); 128,04 (CH); 130,23 (C); 131,95 (C); 131,92 (C); 132,96 (CH); 133,65 (C); 135,20 (C); 158,19; 161,48; 164,78; 178,13 (C=S).

I.V. – FT (cm⁻¹), principais sinais.

3326, 3229, 3055, 2989, 2886, 1626, 1542, 1500, 1417, 1271, 1216, 1200, 1167, 1108, 927, 894, 844.

HRMS *m/z* [M+H]⁺ - (MALDI-TOF)

461,813

6.2 ÂMBITO BIOLÓGICO

6.2.1 Teste citotóxico

As linhas de células tumorais humanas utilizadas NCI-H292, HEp-2, HT-29 foram acondicionadas em meio de cultura DMEM, e MCF-7 e HL-60, mantidas em meio RPMI. Ambos os meios com as respectivas células foram suplementados com soro fetal bovino (10%) e solução 1% de antibióticos (penicilina e estreptomicina). As células permaneceram em estufa a 37 °C e a uma atmosfera úmida enriquecida com 5% de CO₂.

As células NCI-H292, HEp-2, HT-29 e MCF-7 (10⁵ células/mL), bem como HL-60 (0,3x10⁶ células/mL), foram inseridas em placas de 96 poços e incubadas por 24 horas. Em seguida, os compostos a serem testados, dissolvidos em DMSO (1%), foram administrados às culturas de células numa concentração de 25 µg/mL. O fármaco doxorrubicina (5 µg/mL) foi empregado como padrão.

Após 72 horas da segunda incubação, foi adicionado às culturas de células 25 µL de MTT (5 mg/mL) e, após outras 3 horas de incubação, os meios de cultura contendo MTT foram aspirados e 100 µL de DMSO foram inseridos em cada poço. A absorbância foi mensurada em um leitor de microplacas, utilizando um comprimento de onda de 560 nm.

O procedimento foi executado em quadruplicatas e a percentagem de inibição foi calculada no programa GraphPad Prism© versão 5.0.

As moléculas testadas na concentração de 25 µg/mL apresentaram o seguinte percentual de inibição:

Tabela 02 – Porcentagem de inibição do crescimento das linhas de células tumorais pelos compostos finais⁴⁸

	NCI- H292	SEM	HT-29	SEM	HEp-2	SEM	MCF- 7	SEM	HL-60
90^a	0,0	0,0	0,0	0,0	18,1	3,5	23,3	0,8	30,3
90b	40,7	0,1	0,0	0,0	25,8	0,2	13,0	0,8	46,2
90d	13,9	3,5	5,3	0,9	26,9	2,8	26,5	0,1	45,8
90e	21,6	1,4	1,6	0,2	22,7	2,2	7,9	0,2	30,9
90f	25,2	3,2	6,0	0,7	11,9	1,8	20,0	0,1	16,5
90g	18,1	3,4	9,1	0,6	21,7	1,6	25,4	1,4	53,0

O critério de avaliação da citotoxicidade com base no percentual de inibição do crescimento foi estabelecida por Rodrigues *et al* (2014), onde: alta atividade (95 a 100% de inibição), atividade moderada (70 a 90% de inibição) e sem atividade (menor que 50%). A partir disso, foi possível afirmar que os compostos testados não apresentaram atividade citotóxica satisfatória contra as linhas tumorais empregadas.

⁴⁸ O composto LASOF-NB3 não pôde ser avaliado a tempo.

7. CONCLUSÕES

Neste trabalho foi apresentada a síntese de uma série inédita de tiossemicarbazonas isoxazolínicas aza-bicíclicas, como extensão dos trabalhos anteriormente realizados no grupo de pesquisa. A geração do núcleo isoxazolínico aza-bicíclico foi possível graças à metodologia de cicloadição 1,3-dipolar entre enamidas/enecarbamatos endocíclicos e óxido de nitrila, resultando em bons rendimentos.

A conversão dos ésteres dos cicloadutos aos seus respectivos aldeídos propiciou a reação de condensação entre estes compostos carbonilados e diversas tiossemicarbazidas substituídas, ocasionando a formação de sete novos derivados tiossemicarbazônicos como moléculas de interesse, em rendimentos satisfatórios.

A caracterização desses compostos mediante utilização das técnicas de RMN de ^1H e ^{13}C (uni e bidimensional – COSY, DEPT, HMQC, HMBC), infravermelho e de Massas possibilitou sua completa elucidação estrutural, a partir da constatação de sinais diagnósticos, comprovando o sucesso da síntese.

Testes de citotoxicidade *in vitro* contra cinco linhagens de células tumorais foram executados, destacando-se três de seis moléculas avaliadas. No entanto, utilizando critérios estabelecidos na literatura, a despeito dos resultados encontrados frente a algumas linhas neoplásicas especificamente, foi possível afirmar sua falta de atividade satisfatória.

8. PERSPECTIVAS

- Desenvolver um meio de purificação adequado aos compostos que não puderam ser isolados pelas formas convencionais.
- Ampliar a série das tiosemicarbazonas isoxazolina aza-bicíclicas, contemplando anéis piperidínicos (de seis membros).
- Tentar a obtenção de cristais adequados dos produtos isoxazolínicos aza-bicíclicos para realização de análise cristalográfica.
- Executar os testes para verificação de atividade antichagásica sobre as formas evolutivas epimastigota e tripomastigota de *Trypanosoma cruzi*, complementando os dados anteriores do grupo de pesquisa.
- Complementar o teste de citotoxicidade do produto faltante **90c**.

REFERÊNCIAS

- ABOLHASANI, H. *et al.* Design, Synthesis and *in vitro* Cytotoxicity Evaluation of New 3',4'-bis(3,4,5-trisubstituted)-4'H-spiro[indene-2,5'-isoxazol]-1(3H)-one Derivates as Promising Anticancer Agents. **Letters in Drug Design & Discovery**. San Francisco, v. 11, n. 10, p. 1149-1161, 2014.
- AGGARWAL, R.; BANSAL, A.; MITTAL, A. Synthesis and antimicrobial activity of 3-(2-thienyl)-4-arylo-5-hydroxy-5-trifluoromethyl- Δ^2 -isoxazolines and 3-(2-thienyl)-4-arylo-5-hydroxy-5-trifluoromethylisoxazoles. **Journal of Fluorine Chemistry**. Amsterdam, v. 145, p. 95-101, 2013.
- ALLEY, M. C. *et al.* Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. **Cancer Research**. Baltimore, v. 48, p. 589- 601, 1988.
- ARANCIBIA, R. *et al.* Synthesis, characterization and *in vitro* anti-*Trypanosoma cruzi* and anti-*Mycobacterium tuberculosis* evaluations of cyrhetrenyl and ferrocenyl thiosemicarbazones. **Journal of Organometallic Chemistry**. Lausanne, v. 755, p. 1-6, 2014.
- ARAÚJO NETA, M. S. **Síntese de novas 4-acil-semicarbazidas e 1,2,4-triazóis isoxazolínicos com potenciais atividades biológicas**. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 2014.
- ASHTON, W. T. *et al.* Nonpeptide Angiotensin II Antagonists Derived from 4*H*-1,2,4-Triazoles and 3*H*-Imidazo[1,2-*b*][1,2,4]triazoles. **Journal of Medicinal Chemistry**. Washington, v. 36, p. 591-609, 1993.
- BANO, S. *et al.* Synthesis, biological evaluation and molecular docking of some substituted pyrazolines and isoxazolines as potencial antimicrobial agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**. Paris, v. 95, p. 96-103, 2015.
- BARTHI, N. *et al.* Synthesis and In Vitro Antiprotozoal Activity of 5-nitrothiophene-2-carboxaldehyde Thiosemicarbazone Derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. New York, v. 12, p. 3475-3478, 2002.
- BASAPPA, M. S. K. *et al.* Novel δ^2 -isoxazolines as group II phospholipase A₂ inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. New York, v. 14, p. 3679-3681, 2004.
- BLATT, A. H.; STONE JR, J. F. The oximes os alpha, beta-unsaturated ketones and the Beckmann rearrangement. II. **Journal of the American Chemical Society**. Easton, v. 53, n. 11, p. 4134-4149, 1931.
- BLAU, L. *et al.* Design, synthesis and biological evaluation of new aryl thiosemicarbazone as antichagasic candidates. **European Journal of Medicinal Chemistry**. Paris, v. 67, p. 142-151, 2013.

BRITTA, E. A. *et al.* Cell death and ultrastructural alterations in *Leishmania amazonensis* caused by new compound 4-nitrobenzaldehyde thiosemicarbazone derived from S-limonene. **BMC Microbiology**. London, v. 14, p. 236-248, 2014.

_____. 4-nitrobenzaldehyde thiosemicarbazone: a new compound derived from S-(-)-limonene that induces mitochondrial alterations in epimastigotes and tripomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology**. Cambridge, v. 142, p. 978-988, 2015.

BRUNO, S. *et al.* Discovery of Covalent Inhibitors of Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase, A Target for the Treatment of Malaria. **Journal of Medicinal Chemistry**. Washington, v. 57, p. 7465-7471, 2014.

CANEVA, C. *et al.* Synthesis and biological evaluation of (acyl)hydrazones and thiosemicarbazones obtained via in situ condensation of iminium salts with nitrogen-containing nucleophiles. **Molecular Diversity**. Leiden, v. 19, p. 669-684, 2015.

CARDOSO, M. V. O. *et al.* 2-Pyridyl thiazoles as novel anti-*Trypanosoma cruzi* agents: Structural design, synthesis and pharmacological evaluation. **European Journal of Medicinal Chemistry**. Paris, v. 86, p. 48-59, 2014.

CHIYANZU, I. *et al.* Synthesis and Evaluation of Isatins and Thiosemicarbazone Derivatives against Cruzain, Falcipain-2 and Rhodesain. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. New York, v. 13, p. 3527-3530, 2003.

CUNHA, S.; DA SILVA, T. L. One-pot and catalyst-free synthesis of thiosemicarbazones via multicomponent coupling reactions. **Tetrahedron Letters**. Elmsford, v. 50, p. 2090-2093, 2009.

DE ALMEIDA, G. C. **Síntese e avaliação preliminar da atividade antimicrobiana e antichagásica de novas isoxazolil-aril-semicarbazonas e tiossemicarbazonas, e isoxazolil-nitrofurfuril-hidrazonas**. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 2010.

DE ALMEIDA, V. M. **Síntese assimétrica de 3-carboxamidas enantiomericamente puras e de hidrazidas e aril hidrazonas, derivadas do novo heterociclo 7-(benzoil)-2-isoxazolin[5,4-b]pirrolidina. Avaliação das atividades biológicas**. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 2008.

DE ALMEIDA, V. M. *et al.* Synthesis of new aza-bicyclic 2-isoxazolines by 1,3-cycloaddition of endocyclic enecarbamates and enamides with nitrile oxides. **Tetrahedron Letters**. Elmsford, v. 50, p. 684-687, 2009.

DE OLIVEIRA, J. F. Synthesis of thiophene-thiosemicarbazones derivatives and evaluation of their *in vitro* and *in vivo* antitumor activities. **European Journal of Medicinal Chemistry**. Paris, v. 104, p. 148-156, 2015.

_____. *et al.* Synthesis of new aza-bicyclic 2-isoxazolines by 1,3-dipolar cycloaddition of endocyclic enecarbamates and enamides with nitrile oxides. **Tetrahedron Letters**. Elmsford, v. 50, p. 684-687, 2009.

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.** Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 2003.

DUFFY, K. J. *et al.* Identification of a Pharmacophore for Thrombopoietic Activity of Small, Non-Peptidyl Molecules. 1. Discovery and Optimization of Salicylaldehyde Thiosemicarbazone Thrombopoietin Mimics. **Journal of Medicinal Chemistry**. Washington, v. 45, p. 3573-3575, 2002.

ESPÍNDOLA, J. W. P. *et al.* Synthesis and structure-activity relationship study of a new series of antiparasitic aryloxy thiosemicarbazones inhibiting *Trypanosoma cruzi* cruzain. **European Journal of Medicinal Chemistry**. Paris, v. 101, p. 818-835, 2015.

ESWARAN, R. *et al.* Synthesis, crystal structure, DNA and protein binding studies of novel binuclear Pd(II) complex of 6-methoxy-2-oxo-1,2-dihydroquinoline-3-carbaldehyde-4(N,N)-dimethylthiosemicarbazone. **Journal of Inorganic Biochemistry**. New York, v. 155, p. 1-8, 2016.

ETTARI, R. *et al.* Development of novel dipeptide-like rhodesain inhibitors containing the 3-bromoisoxazoline warhead in a constrained conformation. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. Oxford, v. 23, p. 7053-7060, 2015.

FRANK, E. Synthesis of novel steroids 16-spiroisoxazolines by 1,3-dipolar cycloaddition, and an evaluation of their antiproliferative activities in vitro. **Molecular Diversity**. Leiden, v. 18, p. 521-534, 2014.

FUJII, N. *et al.* Discovery of potent thiosemicarbazone inhibitors of rhodesain and cruzain. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. New York, v. 15, p. 121-123, 2005.

GAAMOSSI, I. *et al.* Synthesis, characterization and X-ray structure of glycosyl-1,2-isoxazoles and glycosyl-1,2-isoxazolines prepared via 1,3-dipolar cycloaddition. **Journal of Molecular Structure**. Amsterdam, v. 1048, p. 130-137, 2013.

GREENBAUM, D. C. *et al.* Synthesis and Structure-Activity Relationships of Parasitocidal Thiosemicarbazone Cysteine Protease Inhibitors against *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma brucei*, and *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Medicinal Chemistry**. Washington, v. 47, n. 12, p. 3212-3219, 2004.

GRUNDMANN, C.; DATTA, S. K. Nitrile Oxides. III. Cycloaliphatic and Aliphatic Stable Nitrile Oxides. **The Journal of Organic Chemistry**. Washington, v. 34, n. 6, p. 2016-2018, 1969.

GUIDINI, E. *et al.* Discovery of a novel isoxazoline derivative of prednisolone endowed with a robust anti-inflammatory profile and suitable for topical pulmonary administration. **Steroids**. Stoneham, v. 95, p. 88-95, 2015.

HAMEED, A. *et al.* Me₃N-promoted synthesis of 2,3,4,4a-tetrahydroxanthene-1-one: preparation of thiosemicarbazone derivatives, their solid state self-assembly and antimicrobial properties. **New Journal of Chemistry**. Paris, v. 39, p. 9351-9357, 2015.

HUISGEN, R. The Concerted Nature of 1,3-Dipolar Cycloadditions and the Question of Diradical Intermediates. **The Journal Organic Chemistry**. Washington, v. 41, n. 3, p. 403-419, 1976.

_____. 1,3-Dipolar Cicloadditions: Past and Future. **Angewandte Chemie International Edition**, Weinheim, v. 2, n. 10, p. 565-632, 1963.

_____; MLOSTON, G.; LANGHALS, E. First Two-Step 1,3-Dipolar Cycloadditions: Nonstereospecificity. **Journal of the American Chemical Society**. Easton, v. 108, n. 20, p. 6401-6402, 1986.

IUPAC. **Comission on Nomenclature of Organic Chemistry**: A Guide to IUPAC Nomenclature of Organic Compounds. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1993. Disponível em: <http://www.acdlabs.com/iupac/nomenclature/93/r93_469.htm>. Acesso em: 05 Jan 2016.

_____. A. D. McNaught; A. Wilkinson. **Compendium of Chemical Terminology**. Ed.2. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1997. Disponível em: <http://goldbook.iupac.org/search.py?search_text=cycloaddition>. Acesso em: 25 Nov 2015.

KANEMASA, S.; NISHIUCHI, M.; WADA, E. Regiocontrol of Nitrile Oxide Cycloaddition to Allyl Alcohols. Synthesis of 4-Substituted and 4,4-Disubstituted 5-Hydroxymethyl-2-Isoxazolines. **Tetrahedron Letters**. Elmsford, v. 33, n. 10, p. 1357-1360, 1992.

KANG, I.-J. *et al.* Isatin- β -thiosemicarbazones as potent herpes simplex vírus inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. New York, v. 21, p. 1948-1952, 2011.

KARTHIKEYAN, K. *et al.* Synthesis and antinociceptive activity pirazolyl isoxazolines and pyrazolyl isoxazoles. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. New York, v. 19, p. 3370-3373, 2009.

KRAUS, G. A.; NEUENSCHWANDER, K. A Facile Synthesis of N-2-Acyl-2-pyrrolines. **The Journal of Organic Chemistry**. Washington, v. 46, p. 4971-4972, 1981.

LI, M.-X. *et al.* Synthesis, crystal structures, and biological activities of 2-thiophene N(4)-methylthiosemicarbazone and its unusual hexanuclear silver(I) cluster. **Inorganic Chemistry Communications**. New York, v. 13, p. 1268-1271, 2010.

MANDAWAD, G. G. *et al.* An efficient synthesis of isoxazoline libraries of thiofene analogs and its antimycobacterial investigation. **Medicinal Chemistry Research**. Cambridge, v. 23, p. 4455-4463, 2014.

MARQUES, R. A. **Síntese de 3-aril-2-isoxazolinaz aza-bicíclicas, potenciais anti-inflamatórios**. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 2013.

MATESANZ, A. I.; HERNÁNDEZ, C.; SOUZA, P. New bioactive 2,6-diacetylpyridine bis(*p*-chlorophenylthiosemicarbazone) ligand and its Pd(II) and Pt(II) complexes: Synthesis, characterization, cytotoxic activity and DNA binding ability. **Journal of Inorganic Biochemistry**. New York, v. 138, p. 16-23, 2014.

MATTOS, M. C. S.; KOVER, W. B. Ciclo-adição de óxidos de nitrila ao limoneno: Síntese química e regioespecífica de 2-isoxazolininas 3-substituídas. **Química Nova**. São Paulo, v. 17, n. 2, p. 119-123, 1994.

MAZOIR, N. Aromatization of (Z) and (E)- α -atlantones isolated from *Cedrus atlantica* essential oil followed by condensation with thiosemicarbazide: synthesis of new thiadiazolines derivatives. **Tetrahedron Letters**. Elmsford, v. 57, p. 278-280, 2016.

MCMURRY, J. Orbitais e Química Orgânica: Reações Pericíclicas. In: _____. **Química Orgânica**. 7. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2012. cap. 30, p. 1099-1123.

MOERSCH, G. W.; WITTLE, E. L.; NEUKLIS, W. A. The decarboxylation of 3-carboxy-2-isoxazolines. **The Journal of Organic Chemistry**. Washington, v. 30, n. 4, p. 1272-1274, 1965.

MOREIRA, D. R. M. *et al.* Conformational restriction of aryl thiosemicarbazones potent and selective anti-*Trypanosoma cruzi* compounds which induce apoptotic parasite death. **European Journal of Medicinal Chemistry**. Paris, v. 75, p. 467-478, 2014.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**. Amsterdam, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

NOMURA, Y. *et al.* One-step synthesis and structural confirmation of 1-pyrroline trimer. **Chemistry Letters**. Tokyo, v. 6, n. 6, p. 693-696, 1977.

OMURA, K.; SWERN, D. Oxidation of alcohols by “activated” dimethyl sulfoxide. A preparative, steric and mechanistic study. **Tetrahedron**. Oxford, v. 34, p. 1651-1660, 1978.

PEROLD, G. W.; STEYN, A. P.; REICHE, F. V. K. The Structures of Isoxazoline Compounds: A Spectral Study. **Journal of the American Chemical Society**. Easton, v. 79, n. 2, p. 462-465, 1957.

PETERING, H. G. *et al.* The Synthesis and Antitumor Activity of Several Thiosemicarbazones Related to Kethoxal Bis(thiosemicarbazone). **Journal of Medicinal Chemistry**. Washington, v. 9, n. 3, p. 420-421, 1966.

PRABHU, R. N.; PAL, S. Copper-free Sonogashira reactions catalyzed by a palladium(II) complex bearing pyrenealdehyde thiosemicarbazone under ambient conditions. **Tetrahedron Letters**. Elmsford, v. 56, p. 5252-5256, 2015.

PRAJAPTI, S. K. *et al.* Synthesis and biological evaluation of novel Δ^2 -isoxazoline fused cyclopentane derivatives as potential antimicrobial and anticancer agents. **Medicinal Chemistry Communications**. London, v. 6, p. 839-845, 2015.

PRUITTI, J. R. *et al.* Isoxazolines and Isoxaoles as Factor Xa Inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. New York, v. 10, p. 685-689, 2000.

QUADRELLI, P. *et al.* From Cyclopentadiene to Isoxazoline-Carbocyclic Nucleosides; Synthesis of Highly Active Inhibitors of Influenza A Virus H₁N₁. **European Journal of Organic Chemistry**. Weinheim, v. 2013, n. 21, p. 4655-4665, 2013.

QUILICO, A.; D'ALCONTRES, G. S.; GRÜNANGER, P. A New Reaction os Ethylenic Double Bonds. **Nature**. v. 166, p. 226-227, 1950.

REIS, S. L. G. B. *et al.* Síntese e avaliação preliminar da atividade antinociceptiva de novas isoxazolil-aril-hidrazonas. **Química Nova**. São Paulo, v. 34, n. 1, p. 76-81, 2011.

RIGOLINO, D. *et al.* Investigation of the salicylaldehyde thiosemicarbazone scaffold for inhibition of influenza vírus PA endonuclease. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**. Berlin, v. 20, p. 1109-1121, 2015.

RODRIGUES, F. A. R. *et al.* Mefloquine-Oxazolidine Derivatives: A New Class of Anticancer Agents. **Chemical Biology & Drug Design**. Oxford, v. 83, p. 126-131, 2014.

SIADATI, A. S. An example of a stepwise mechanism for the catalyst-free 1,3-dipolar cycloaddition between a nitrile oxide and an elctron rich alkene. **Tetrahedron Letters**. Elmsford, v. 56, p. 4857-4863, 2015.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. KIEMLE, D. J. Espectrometria no infravermelho. In: _____. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7. ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos Editora Ltda, 2006. cap. 2, 70-122.

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B. Aldeídos e Cetonas I: Adição Nucleofílica ao Grupo Carbonila. In: _____. **Química Orgânica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos Editora Ltda, 2009. cap. 16, p. 1-46.

TENÓRIO, R. P. Tiossemicarbanonas: métodos de obtenção, aplicações sintéticas e importância biológica. **Química Nova**. São Paulo, v. 28, n. 6, p. 1030-1037, 2005.

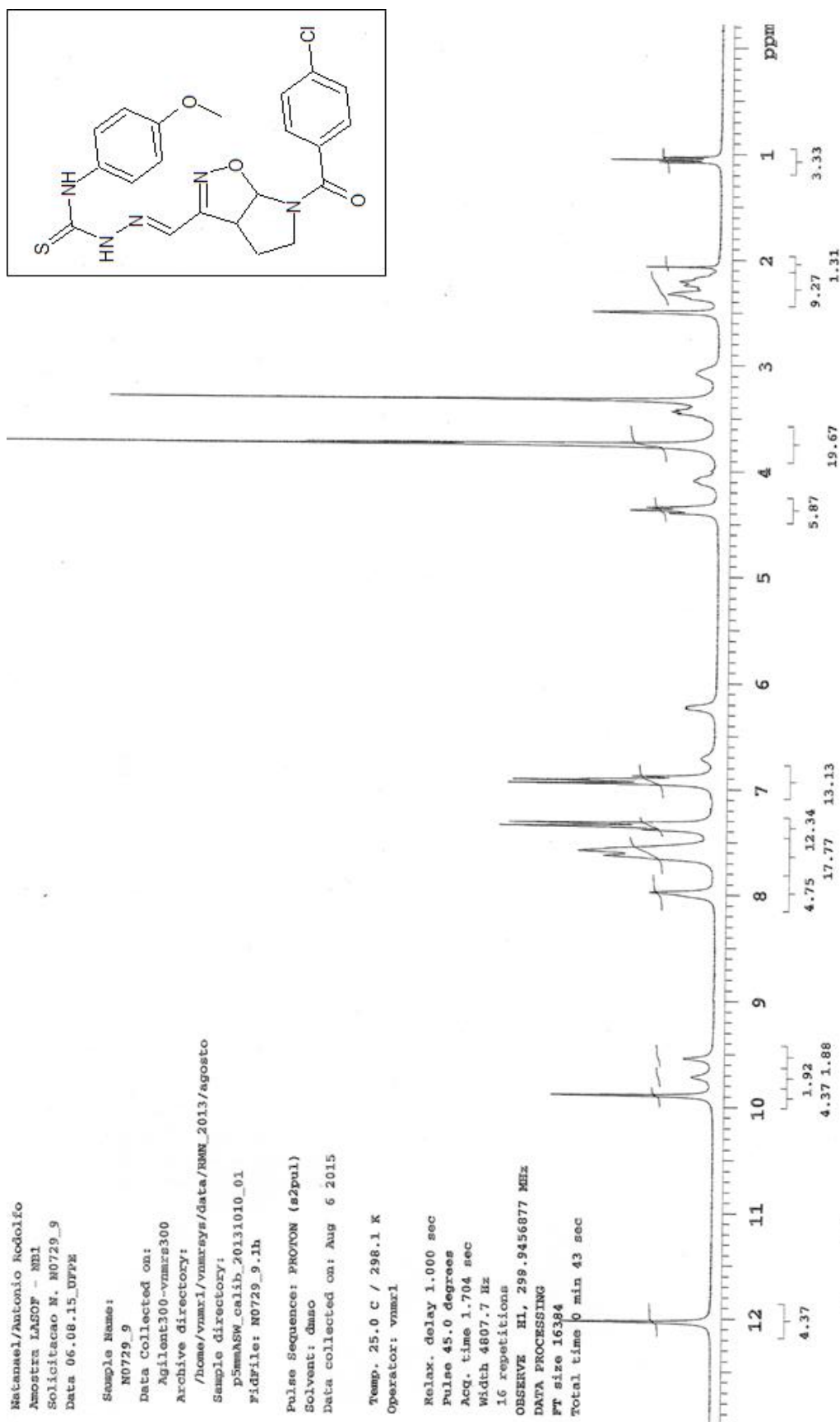
THANH, N. D. *et al.* Synthesis and antibacterial and fungical activities of *N*-(tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosyl)thiosemicarbazones of substituted 4-formylsydones. **Chemistry Central Journal**. New York, v. 9, p. 60-74, 2015.

TROGU, E. *et al.* Acid-Base-Catalysed Condensation Reaction in Water: Isoxazolines and Isoxazoles from nitroacetates and dipolarophiles. **Chemistry**. Weinheim, v. 18, p. 2081-2093, 2012.

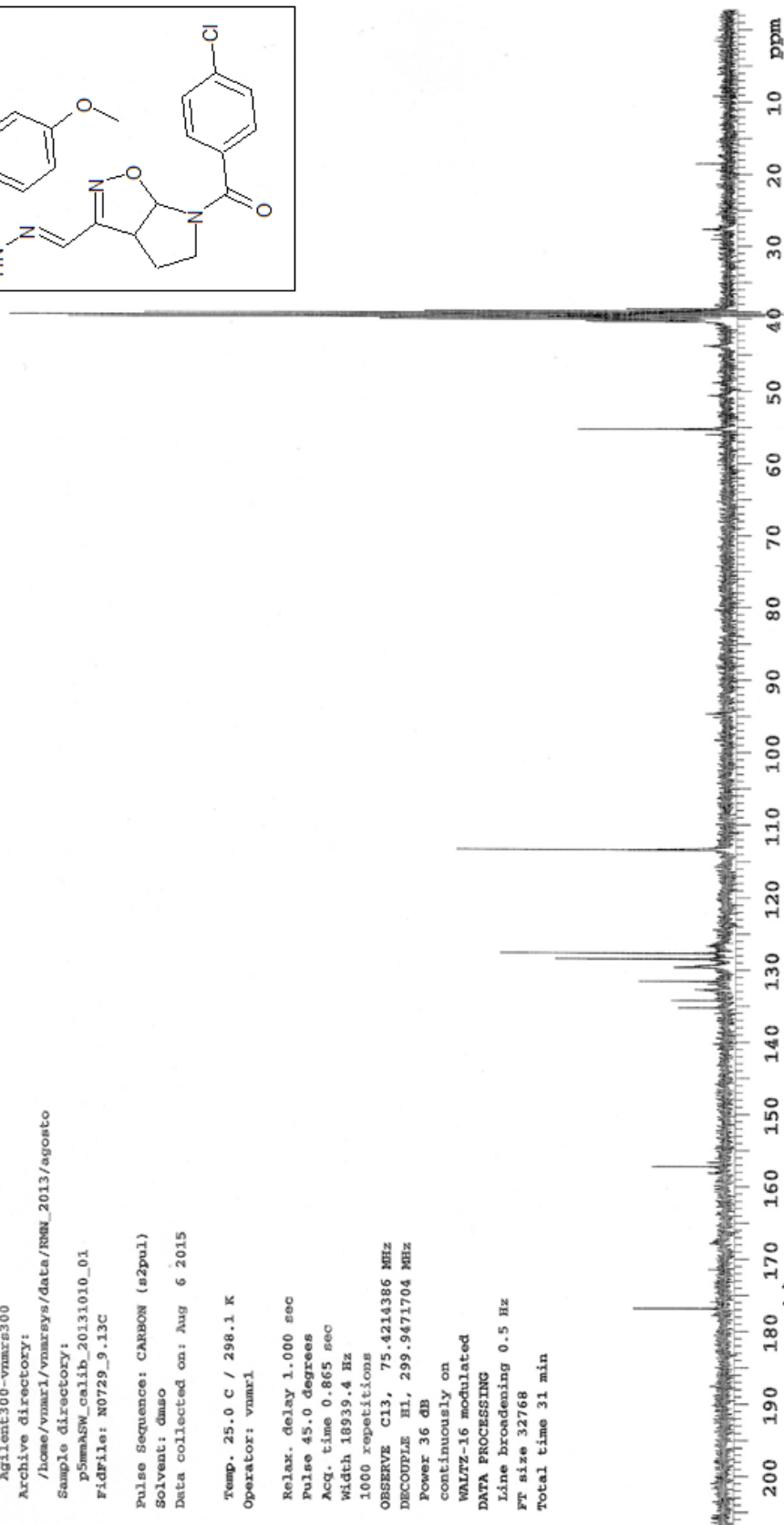
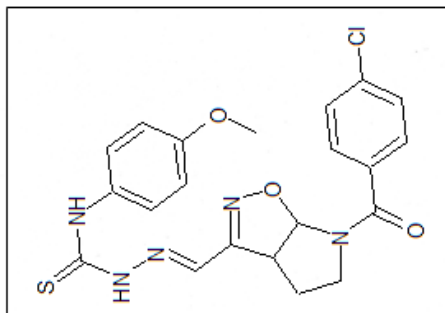
WOODWARD, R. B.; HOFFMAN, R. Stereochemistry of Electrocyclic Reactions. **Journal of the American Chemical Society**. Easton, v. 87, n. 2, p. 395-397, 1965.

XIE, J. *et al.* Inhibitory effect of synthetic aromatic heterocycle thiosemicarbazone derivatives on mushroom tyrosinase: Insights from fluorescence, ¹H NMR titration and molecular docking studies. **Food Chemistry**. London, v. 190, p. 709-716, 2016.

APÊNDICE A – Espectroscopia de RMN ^1H de 90a



Abene Ribeiro
 Centro Analítico / DQF
 61773



Watanael/Antonio Rodolfo
Amostra LASOF NBI P OMe
Solicitaçao N. N0729_9
Data 06.08.15 UFPE

```
Sample Name:
N0729_9
Data Collected on:
Agilent300-vnmrs300
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrsys/data/RNN_2013/agosto
Sample directory:
p5mna5w_calib_20131010_01
Fidfile: N0729_9.13C
```

Pulse Sequence: CARBOW (s2pul)
Solvent: dmsd
Data collected on: Aug 6 2015
Temp. 25.0 C / 298.1 K
Operator: vnmr1

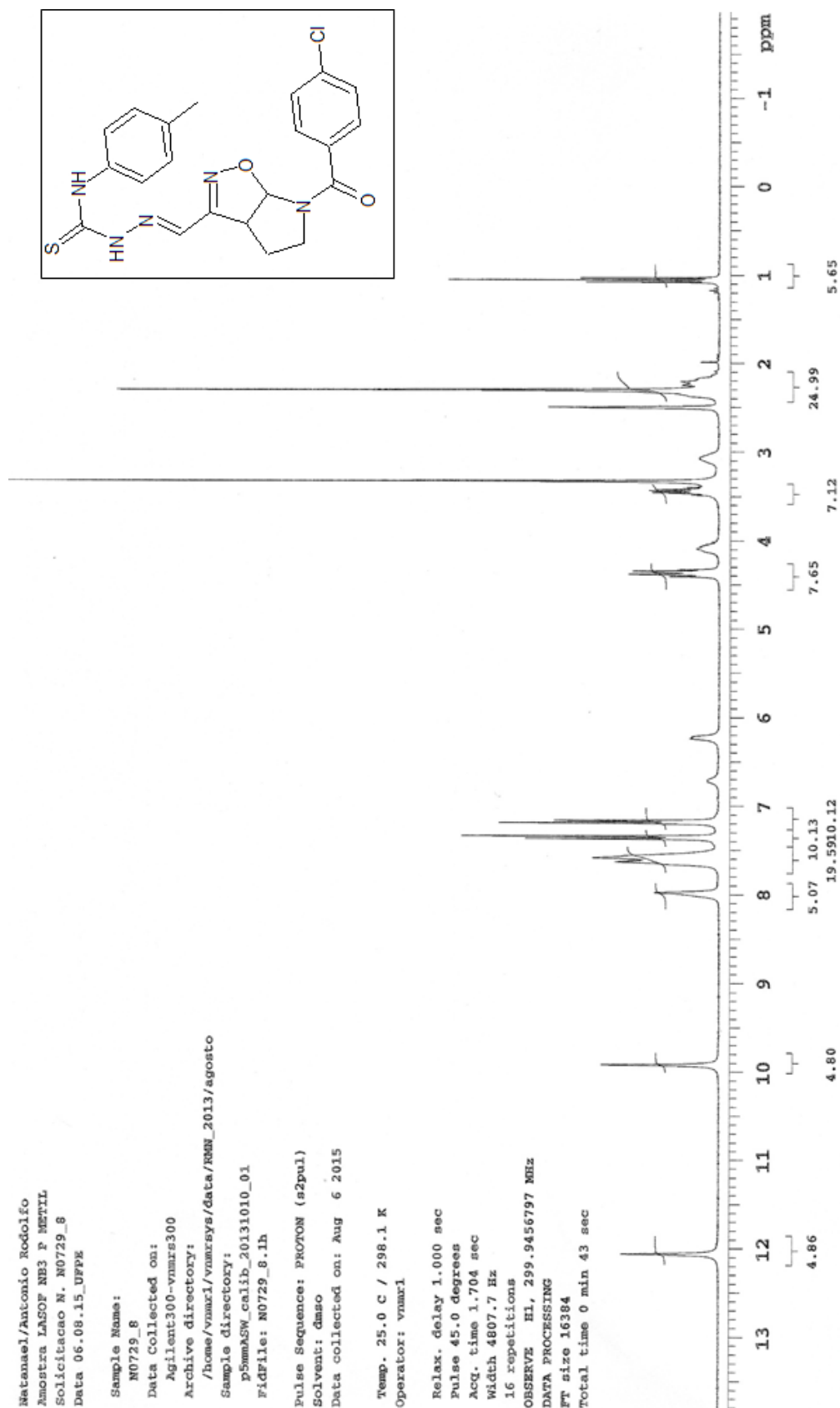
Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 0.865 sec
Width 18939.4 Hz
1000 repetitions

OBSERVE C13, 75.4214386 MHz
DECOUPLE H1, 299.9471704 MHz

Power 36 dB
continuously on
WALTZ-16 modulated

DATA PROCESSING
Line broadening 0.5 Hz
Ft size 32768
Total time 31 min

 **Alene Ribeiro**
Abene Silva Ribeiro
Central Acadêmica / DNE

APÊNDICE C – Espectroscopia de RMN ^1H de 90c

Abene Silva Ribeiro
 Central Analítica / DQF

APÊNDICE D – Espectroscopia de RMN ^{13}C de 90c

Natanael/Antonio Rodolfo
 Amostra LASOP ME3 P MEYL
 Solicitação N. N0729_8
 Data 06.08.15_UFPE

Sample Name:
 N0729_8
 Data Collected on:
 Agilent300-vnmr300
 Archive directory:
 /home/vnmr1/vnmr300/data/RRR_2013/agosto
 Sample directory:
 p5maasw_calib_20131010_01
 F1File: CARBON

Pulse Sequence: CARBON (s2pul)
 Solvent: dmsc
 Data collected on: Aug 6 2015

Temp. 25.0 C / 298.1 K
 Operator: vnmr1

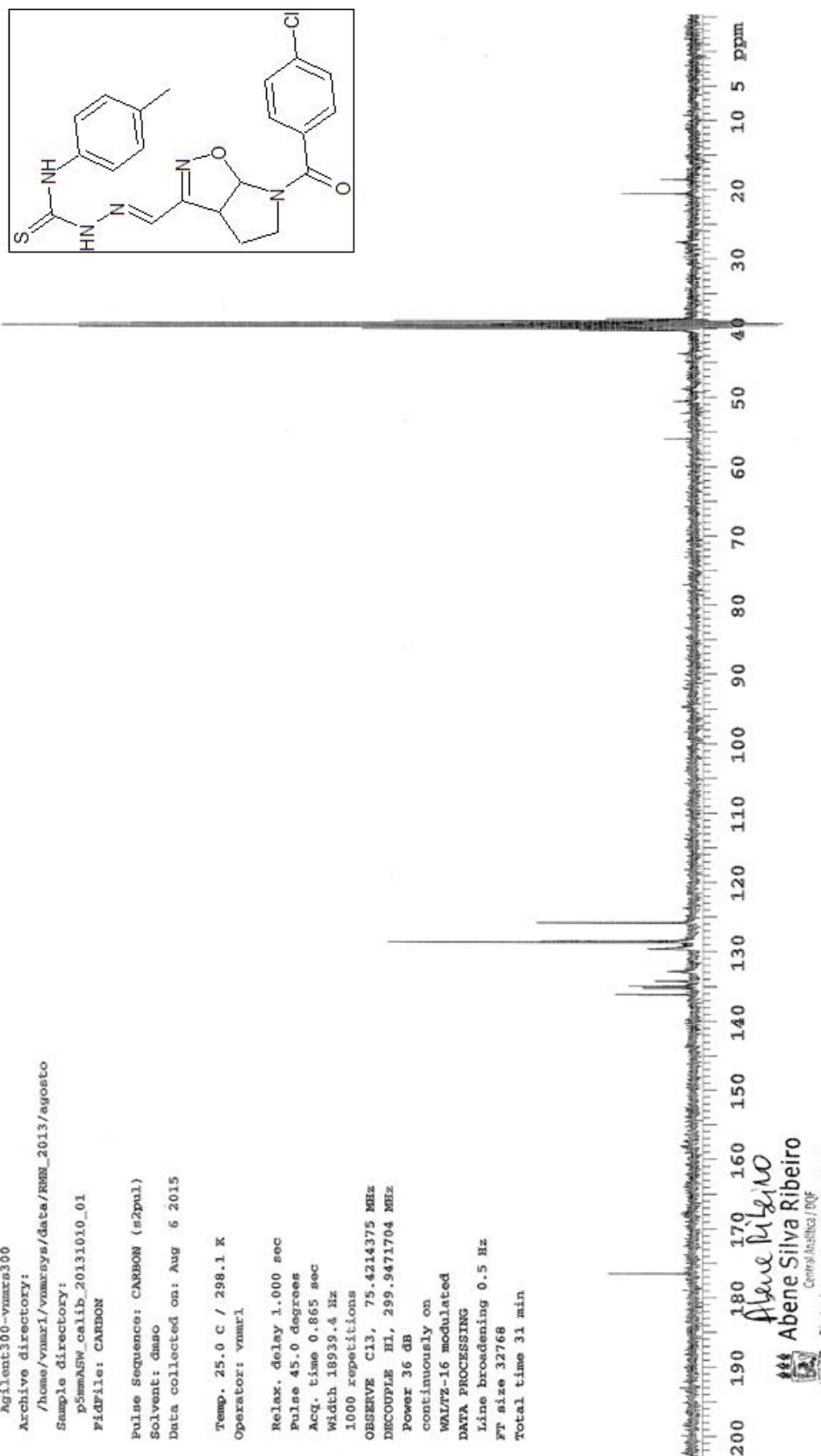
Relax. delay 1.000 sec
 Pulse 45.0 degrees
 Acq. time 0.865 sec
 Width 18939.4 Hz
 1000 repetitions

OBSERVE C13, 75.4214375 MHz
 DECOUPLE H1, 299.9471704 MHz
 Power 36 dB

continuously on
 WALTZ-16 modulated

DATA PROCESSING

Line broadening 0.5 Hz
 FT size 32768
 Total time 31 min



APÊNDICE F – Espectroscopia de RMN ^{13}C de 90e

