



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

JULIANA CORDEIRO SILVA

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE
NOVAS ARIL Δ^2 - 1,2,4 OXADIAZOLINAS BICÍCLICAS *PARA-*
SUBSTITUÍDAS.**

RECIFE - PE
Novembro, 2012.

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

JULIANA CORDEIRO SILVA

MESTRANDA

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE
NOVAS ARIL Δ^2 - 1,2,4 OXADIAZOLINAS BICÍCLICAS PARA-
SUBSTITUÍDAS.**

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

PROF. Dr. ANTÔNIO RODOLFO DE FARIA
ORIENTADOR

PROFa. Dra. TERESINHA GONÇALVES DA SILVA
COORIENTADORA

Recife – PE
Novembro de 2012.

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário: Aécio Oberdam, CRB4-1895

S586s Silva, Juliana Cordeiro.
Síntese e avaliação da atividade antimicrobiana de novas aril Δ^2 - 1,2,4
oxadiazolinas bicíclicas para-substituídas. / Juliana Cordeiro Silva. - Recife: o
autor, 2012.
115 f.; 30 cm.

Orientador: Antônio Rodolfo de Faria.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro
de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas. Recife, 2012.

Inclui referências.

1. Química farmacêutica. 2. Antimicrobianos. 3. Candida albicans. 4.
Mycobacterium smegmatis. I. Faria, Antônio Rodolfo de (Orientador). II.
Título.

615.3 CDD (23.ed.) UFPE (CCS 2017-283)

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

JULIANA CORDEIRO SILVA

MESTRANDA

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE
NOVAS ARIL Δ^2 - 1,2,4 OXADIAZOLINAS BICÍCLICAS *PARA-*
SUBSTITUÍDAS.**

Banca Examinadora

Prof. Antonio Rodolpho de Faria DCFAR/UFPE (Presidente)

Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Janete Magali de Araújo DCFAR/UFPE (Membro Externo Titular)

Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Valderes Moraes de Almeida

Centro Regional de Ciências Nucleares (CRCN) - (Membro Externo Titular)

Universidade Federal de Pernambuco

**A DEUS, QUE É O AUTOR E CONSUMADOR DA MINHA FÉ E
RESPONSÁVEL POR TUDO O QUE SOU.**

**AOS MEUS PAIS, QUE ME AMARAM E ME DERAM TODA FORÇA
PARA TER SER TUDO O QUE CONQUISTEI.**

**À TODOS QUE DIRETA OU INDIRETAMENTE CONTRIBUÍRAM
PARA A REALIZAÇÃO DESSE GRANDE PROJETO**

AGRADECIMENTOS

- A Deus, que tem cuidado de mim e tem me proporcionado momentos incríveis e oportunidades únicas e sem o qual jamais chegaria onde cheguei.
- Ao meu orientador Antonio Rodolfo de Faria, pela oportunidade, pela ajuda, por ceder o laboratório e por me passar seus valiosos conhecimentos.
- Aos meus pais Uzzai e Judite, que me amaram e me apoiaram incondicionalmente em cada momento dessa longa jornada que é a vida, me ensinando a lutar pelo que realmente eu desejo e a sempre me erguer nos momentos difíceis que a vida nos proporciona.
- Ao meu irmão Uzzai Filho e a minha prima Cláudia pelo carinho, apoio e compreensão.
- A Sérgio que testemunhou cada momento difícil vivido, pelo seu amor, sua compreensão e principalmente pela disposição e doação que estavam sempre presentes em seus atos.
- As minhas amigas Márcia, Andréa, Leilane e Jannieres que estiveram realmente presente comigo em todos os momentos dessa árdua, mas, gratificante, jornada da vida acadêmica.
- Ao meu amigo Pedro, pelo companheirismo, pela disposição em sempre me ouvir e pela generosidade dos seus atos nos momentos em que mais precisei.
- Aos meus colegas de laboratório, especialmente Natanael, que sempre esteve disposto a ceder parte do seu tempo para ajudar nesse projeto.
- A todos os professores que fazem parte do PPGCF por nos doarem seus conhecimentos e nos darem novas perspectivas.
- A Prof. Janete Magali pelo apoio e pela disponibilidade em realizar os testes para atividade biológica.
- Aos todos os funcionários do DCFar, especialmente Fátima, Iguacy e Margareth.

***Agrada-te do Senhor e Ele satisfará os
desejos do teu coração!***

SL 37:4

Resumo

A crescente procura por substâncias com atividade biológica vem demonstrando que os heterociclos são de grande importância na síntese de compostos de interesse na química farmacêutica. Oxadiazolinas são compostos heterocíclicos e esse núcleo é extensamente relatado na literatura como responsáveis por atividades anti-inflamatórias, como antimicrobianos, além de outras e a sua síntese química foi o principal objetivo a ser alcançado. Para a síntese das novas aril Δ^2 -1,2,4-oxadiazolinas bicíclicas *para*-substituídas, principal classe de novas moléculas sintetizadas, foi utilizada a cicloadição 1,3 dipolar (1,3 DCA), como único método de obtenção, para tanto, foi planejada a obtenção de novos derivados por meio da cicloadição 1,3-dipolar, na qual se utilizou a 1-pirrolina, substância que age como dipolarófilo, e os cloretos de hidroiiminoila *p*-substituídos, estes agindo como precursores do óxido de benzonitrila, substâncias que agem como dipolo do tipo alenila, sendo este formado *in situ*. Dessa cicloadição, originou-se uma série de novos biciclos cujo rendimento não é muito variável, apesar de serem usados dois procedimentos distintos, o procedimento descrito na literatura e o procedimento com o uso do ultrassom. As reações obtiveram os rendimentos variando entre 74% e 81%. Levou-se em consideração o tempo das reações, a minimização dos aparatos utilizados, facilidade do manejo em relação às vidrarias, critérios estes que definiram o procedimento com o ultrassom como sendo melhor a ser usado nessas reações. Esta nova série foi submetida a testes biológicos, mais precisamente, foram testadas quanto à sua atividade antimicrobiana para os microorganismos: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, *Mycobacterium smegmatis*. e ao final verificou-se que o composto 2-[[[4-(metiloxonio)cicloexilideno]metilideno]amino]oxi]pirrolidina-1-ide apresentou atividade considerável, com halos de inibição que vão de 22 mm para *Candida albicans* e 25 mm para *Mycobacterium smegmatis*. Mas ao submeter o composto para o teste da CMI verificou-se que o composto possui atividade antimicrobiana insuficiente pois apresentou a CMI de 1000µg/ml, para os dois microorganismos e o ideal para um antimicrobiano é de aproximadamente 10µg/ml.

Palavras chave: Química Farmacêutica. Antimicrobianos. *Candida Albicans*. *Mycobacterium smegmatis*.

Abstract

The growing demand for substances with biological activity has demonstrated that the heterocycles are of great importance in the synthesis of compounds of pharmaceutical chemistry interest. Oxadiazolinas are heterocyclic compounds and this core is extensively reported in the literature as responsible for activities anti-inflammatory, antimicrobial, and other and their chemical synthesis was the main goal to be achieved. For the synthesis of new aryl-1,2,4- Δ^2 oxadiazolines to bicyclic-substituted major class of new molecule synthesized, we used the 1,3 dipolar cycloaddition (1,3 DCA) as one method of obtaining for Therefore, it was planned to obtain new derivatives by 1,3-dipolar cycloaddition, which was used in the 1-pyrroline, a substance that acts as Dipolarophile, chlorides and p-substituted hidroiminoila, these acting as precursors oxide benzonitrile, substances that act as alenyl dipole type, which is formed in situ. Thus cycloaddition, originated a range of new bicycles whose yield is not very variable, although use two different procedures, the procedure and the procedure described in the literature using the Ultrasson. The reactions obtained yields ranging between 74% and 81%. Took into consideration the time of reactions, minimizing the apparatus used, ease of management regarding glassware, these criteria that defined the procedure with ultrasson as better to be used in these reactions. This new series was subjected to biological testing, more precisely, were tested for their antimicrobial activity against the microorganisms: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, *Mycobacterium smegmatis*. and at the end it was found that the compoundnds 2-[[[4-(metiloxonio)cicloexilideno]metilideno]amino]oxi]pirrolidina-1-ide showed considerable activity, with zones of inhibition ranging from 22 mm to 25 mm and *Candida albicans* for *Mycobacterium smegmatis*. But by subjecting the compound to test the CMI was found that the compound has insufficient antimicrobial activity for the IMC of 1000 μ g/ml presented for both microorganisms and is ideal for an antimicrobial approximately 10 μ g/ml.

Keywords: Pharmaceutical Chemistry. Anti-Infective Agents. *Candida Albicans*.
Mycobacterium smegmatis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Interação Fármaco-Receptor	24
Figura 2. Dipirona, Metronidazol e Losartana	25
Figura 3. Pirrol, Triazol e Oxazol	27
Figura 4. Oxadiazóis, Oxadiazolinas e Oxadiazolidinas	27
Figura 5. Exemplo de moléculas com Núcleo Oxadiazolínico	28
Figura 6. Isoxazóis, Oxadiazóis e Triazois	29
Figura 7. Exemplo de Orbitais HOMO e LUMO	30
Figura 8. Fórmula geral da Oxima	32
Figura 9. Fórmula da Cetoxima e Aldoxima respectivamente	33
Figura 10. Exemplo da Aldoxima e Cetoxima	33
Figura 11. Exemplo de $\Delta^2 - 1,2,4$ oxadiazolina bicíclica <i>para</i> -substituída	39
Figura 12. Oxadiazolina complexada com a Platina	40
Figura 13. 3(3-fluorometila)-4-fenila-5(3-metoxifenila)- $\Delta^2 - 1,2,4$ oxadiazolina bicíclica	40
Figura 14. Exemplo de Oxadiazolina indutoras da analgesia e com propriedades anti-inflamatórias	41
Figura 15. Exemplo de Oxadiazolina com propriedades anti-inflamatórias	42
Figura 16. Exemplo de Oxadiazolina com propriedades Broncodilatadoras	42
Figura 17. Exemplo de Oxadiazolina com propriedades Antitumorais	43
Figura 18. Exemplo de Oxadiazolina que possuem atividade anti-HIV	43

Figura 19. Exemplo de Oxadiazolina que modulam a expressão e genes exógenos	43
Figura 20. 4-cloro-benzaldoxima e 4-nitro-benzaldoxima	45
Figura 21. 4-metóxi-benzaldoxima e 4-toluil-benzaldoxima	45
Figura 22. N-clorosuccinimida (NCS)	46
Figura 23. Cloretos de Hidroxiiminoila <i>para</i> -cloro, <i>para</i> -nitro, <i>para</i> -metóxi e <i>para</i> -toluil substituídos	46
Figura 24. Δ^2 -1,2,4-oxadiazolinas bicíclicas <i>para</i> -metóxi e <i>para</i> -cloro	51
Figura 25. Δ^2 -1,2,4-oxadiazolinas bicíclica <i>para</i> -nitro e <i>para</i> -toluil.	51
Figura 26. Deslocamentos químicos da 3-(4-clorofenil)-5,6,7,7-a-(tetraidropirrol)[1,2- <i>d</i>][1,2,4]oxadiazolina	52
Figura 27. Espectro no Infravermelho (Janela de KBr, cm ⁻¹) da 3-(4-clorofenil)-5,6,7,7-a-(tetraidropirrol)[1,2- <i>d</i>][1,2,4]oxadiazolina	52
Figura 28. Espectro de RMN ¹ H da 3-(4-clorofenil)-5,6,7,7-a-(tetraidropirrol)[1,2- <i>d</i>][1,2,4]oxadiazolina	53
Figura 29. Espectro de RMN ¹³ C da 3-(4-clorofenil)-5,6,7,7-a-(tetraidropirrol)[1,2- <i>d</i>][1,2,4]oxadiazolina	53
Figura 30. Deslocamentos químicos da 3-(4-metilfenil)-5,6,7,7-a-(tetraidropirrol)[1,2- <i>d</i>][1,2,4]oxadiazolina	54
Figura 31. Espectro no infravermelho (Janela de KBr, cm ⁻¹) da 3-(4-metilfenil)-5,6,7,7-a-(tetraidropirrol)[1,2- <i>d</i>][1,2,4]oxadiazolina	55
Figura 32. Espectro de RMN ¹ H da 3-(4-metilfenil)-5,6,7,7-a-(tetraidropirrol)[1,2- <i>d</i>][1,2,4]oxadiazolina	55
Figura 33. Espectro de RMN ¹³ C da 3-(4-metilfenil)-5,6,7,7-a-(tetraidropirrol)[1,2- <i>d</i>][1,2,4]oxadiazolinal	56

Figura 34. Deslocamentos químicos da 3-(4-nitrofenil)-5,6,7,7-a-(tetraidropirrol)[1,2- <i>d</i>][1,2,4]oxadiazolina	56
Figura 35. Espectro no infravermelho (Janela de KBr, cm ⁻¹) da 3-(4-nitrofenil)-5,6,7,7-a-(tetraidropirrol)[1,2- <i>d</i>][1,2,4]oxadiazolina	57
Figura 36. Espectro de RMN ¹ H da 3-(4-nitrofenil)-5,6,7,7-a-(tetraidropirrol)[1,2- <i>d</i>][1,2,4]oxadiazolina	57
Figura 37. Espectro de RMN ¹³ C da 3-(4-nitrofenil)-5,6,7,7-a-(tetraidropirrol)[1,2- <i>d</i>][1,2,4]oxadiazolina	58
Figura 38. Deslocamentos químicos da 2-[(4-(metiloxonio)cicloexilideno)metilideno}amino)oxi]pirrolidina-1-ide	59
Figura 39. Espectro de RMN ¹ H da 2-[(4-(metiloxonio)cicloexilideno)metilideno}amino)oxi]pirrolidina-1-ide	62
Figura 40. Espectro no infravermelho (Janela de KBr, cm ⁻¹) da 2-[(4-(metiloxonio)cicloexilideno)metilideno}amino)oxi]pirrolidina-1-ide	62
Figura 41. Espectro de RMN ¹³ C da 2-[(4-(metiloxonio)cicloexilideno)metilideno}amino)oxi]pirrolidina-1-ide	63

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Geometria do 1,3 dipolo	30
Esquema 2. Tipos de interação HOMO e LUMO	31
Esquema 3. Interação dipolo e dipolarófilo e diferença de energia	31
Esquema 4. Exemplos de moléculas tipo Alila e tipo Alenila	32
Esquema 5. Cicloadição 1,3 dipolar	32
Esquema 6. Síntese da oxima $R_1 = H$ = Aldoxima e $R_1 = CH_3$ = Cetoxima	35
Esquema 7. Obtenção do Óxido de nitrila empregando o NBS	36
Esquema 8. Obtenção do Cloreto empregando o Cl_2 gasoso	37
Esquema 9. Formação do Cloreto pelo tratamento da Aldoxima com NCS em DMF	37
Esquema 10. Rota sintética do Cloreto de Hidroxiiminoila <i>para</i> -substituído	38
Esquema 11. Síntese do Nitroimidazol $\Delta^2 - 1,2,4$ oxadiazolina	39
Esquema 12. Rota de síntese do cicloaduto $\Delta^2 - 1,2,4$ 43 bicíclica <i>para</i> -substituída	
Esquema 13. Rota de síntese do Trímero $\Delta^1 -$ pirrolina	46
Esquema 14. Síntese da Oxima <i>para</i> -substituída	47
Esquema 15. Síntese do Cloreto de Hidroxiiminoila <i>para</i> -substituído	47
Esquema 16. Visão geral da Síntese de novas $\Delta^2 - 1,2,4$ oxadiazolina bicíclica <i>para</i> -substituída	48
Esquema 17. Síntese do Trímero $\Delta^1 -$ pirrolina	51
Esquema 18. Mecanismo de Síntese das Oximas	53
Esquema 19: Mecanismo de Reação das Oximas com NCS	55

Esquema 20. Cicloadição 1,3 dipolar entre a Δ^1 – pirrolina e os derivados do N-óxido de nitrila	58
Esquema 21. Síntese do cicloaduto	59
Esquema 22: Esquema de abertura do anel da Δ^2 – 1,2,4 oxadiazolina bicíclica <i>para</i> -metóxi	67
Esquema 23. Síntese das oximas <i>para</i> -substituídas	75
Esquema 24. Reação da síntese dos cloretos de hidroxiiiminoila <i>para</i> -substituídos	78
Esquema 25: Cicloadição 1,3 dipolar para a formação das aril Δ^2 -1,2,4-oxadiazolinas bicíclicas <i>para</i> -substituídas	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Aspecto e Rendimento das Oximas de acordo com o radical ligado ao anel aromático	80
Tabela 2. Aspecto e Rendimento dos cloretos de hidroxiiminoila <i>para</i> -substituídos de acordo com o radical ligado ao anel aromático	84
Tabela 3. Massa das Oxadiazolinas obtidas pelo procedimento 1	86
Tabela 4. Aspectos e rendimentos dos cicloadutos Procedimento 1	86
Tabela 5. Massa das Oxadiazolinas obtidas pelo procedimento 2	88
Tabela 6. Aspectos e rendimentos dos cicloadutos Procedimento 2	88
Tabela 7. Diâmetro em mm dos Halos de Inibição Microorganismo x Cicloaduto	99

Lista de Abreviaturas e Siglas

CCD = Cromatografia em Camada Delgada

CHCl₃ = Clorofórmio

CH₂Cl₂ = Diclorometano

Cl = Grupo Cloro

CMI = Concentração Mínima Inibitória

CMB = Concentração Mínima Bactericida

HCl = Ácido Clorídrico

HOMO – *Highest Occupied Molecular Orbital* - Orbital Molecular Ocupado de Maior Energia

IV = Infravermelho

IT-TOF – *Ion Trap/Time of Flight* - Armadilha de Íons/Tempo de Voo

LC – *Liquid Chromatography* - Cromatografia Líquida

LUMO – *Lowest Unoccupied Molecular Orbital* - Orbital Molecular Não-Ocupado de Menor Energia

Me = Grupo Metila

MeOH = Metanol

NCS = N-clorosuccinimida

NO₂ = Grupo Nitro

OMe = Grupo Metóxi

Py = Piridina

RMN = Ressonância Magnética Nuclear

TEA = Trietilamina

THF = Tetraidrofurano

Sumário

1 INTRODUÇÃO	24
2 REVISÃO DE LITERATURA	29
2.1 Cicloadição 1,3 Dipolar	29
2.2 Oximas e Cloretos de hidroxiiiminoila	33
2.3- Oxadiazolinas	39
3 OBJETIVOS	45
3.1 Gerais	45
3.2 Específicos	45
4 METODOLOGIA	48
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
5.1 Preparação do Trímero Δ^1 – Pirrolina	53
5.2 Síntese das Oximas <i>para</i> -substituídas	54
5.3 Síntese do Cloreto de Hidroxiiiminoila	55
5.4 Síntese das aril Δ^2 -1,2,4-oxadiazolinas bicíclicas <i>para</i> - substituídas	58
5.4.1. 3-(4-clorofenil)-5,6,7,7-a-(tetraidropirrol) 1,2-<i>d</i>][1,2,4]oxadiazolina	62
5.4.2. 3-(4-metóxifenil)-5,6,7,7-a-(tetraidropirrol) [1,2-<i>d</i>][1,2,4]oxadiazolina	64
5.4.3. 3-(4-clorofenil)-5,6,7,7-a-(tetraidropirrol) [1,2-<i>d</i>][1,2,4]oxadiazolina	66
5.4.4. 3-(4-clorofenil)-5,6,7,7-a-(tetraidropirrol) [1,2-<i>d</i>][1,2,4]oxadiazolina	68
6 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	73
6.1 Materiais e Métodos	73
6.2 Síntese e Caracterização Estrutural do Trímero da Δ^1 –PIRROLINA	75

6.3 Síntese e Caracterização Físico-Química das Oximas <i>para</i> – substituídas	76
6.3.1 4-cloro-benzaldoxima	76
6.3.2 4-metóxi-benzaldoxima	77
6.3.3 4-toluil-benzaldoxima	78
6.3.4 4-nitro-benzaldoxima	78
6.4 Síntese e Caracterização Físico-Química dos cloretos de hidroxiiminoila <i>p</i> -substituídos	79
6.4.1 4-cloro- <i>N</i> - cloreto de hidroxibenzecarboximidoíla	80
6.4.2 <i>N</i> -metóxi-4-cloreto de hidroxibenzecarboximidoíla	81
6.4.3 <i>N</i> -hidróxi-4-cloreto de hidroxibenzecarboximidoíla	82
6.4.4 4-nitro- <i>N</i> -cloreto de hidroxibenzecarboximidoíla	82
6.5 Reação de cicloadição 1,3 dipolar para a formação das Δ^2 -1,2,4-oxadiazolinas bicíclicas <i>para</i> -substituídas 62	83
Procedimento 1	84
6.5.1 Reação de cicloadição 1,3 dipolar para a formação da 3-(4-clorofenil)-5,6,7,7-a-(tetraidropirrol)[1,2- <i>d</i>][1,2,4]oxadiazolina	85
Procedimento 2	86
6.5.2 Reação de cicloadição 1,3 dipolar para a formação da 3-(4-clorofenil)-5,6,7,7-a-(tetraidropirrol)[1,2- <i>d</i>][1,2,4]oxadiazolina	86
6.6 Caracterização Físico-Química e Estrutural das aril Δ^2 -1,2,4-oxadiazolinas bicíclicas <i>para</i> -substituída	87
6.6.1. 3-(4-clorofenil)-5,6,7,7-a-tetraidropirrol [1,2- <i>d</i>][1,2,4]oxadiazolina	87
6.6.2. 3-(4-nitrofenil)-5,6,7,7-a-tetraidropirrol 1,2- <i>d</i>][1,2,4]oxadiazolina	88
6.6.3. 3-(4-metilfenil)-5,6,7,7-a-tetraidropirrol 1,2- <i>d</i>][1,2,4]oxadiazolina	89

6.6.4 - 2-[[[4(metiloxonio)cicloexilideno]metilideno}amino)oxi] pirrolidina-1-ide	89
7 ESTUDO BIOLÓGICO	93
7.1 Revisão de Literatura	93
7.2 Avaliação da atividade biológica	96
7.3 Materiais	97
7.4 Metodologia	97
7.5 Resultados e discussão	98
7.6 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CMI)	99
8 CONCLUSÕES	101
9 PERSPECTIVAS	107
REFERÊNCIAS	110

Parte 1

Capítulo I

- **Introdução**

- **Revisão de
literatura**

Capítulo II

- **Objetivos**

Capítulo III

- **Metodologia**

Capítulo I – Introdução e Revisão de Literatura

1 - Introdução

A Química Medicinal em suas inúmeras atribuições engloba o planejamento racional de novas substâncias bioativas, envolvendo a síntese ou a modificação molecular de substâncias; o isolamento de princípios ativos naturais (plantas, animais, minerais); a identificação ou elucidação da estrutura; a descrição das moléculas desde a sua constituição atômica (passando por relações entre a estrutura e propriedades) até suas características estruturais quando da(s) interação (ões) com os diferentes sistemas biológicos; a compreensão em nível molecular de processos bioquímicos, farmacológicos, toxicológicos e farmacocinéticos.¹

Esta complexa tarefa envolve múltiplos fatores, responsáveis pela resposta terapêutica desejada e decorrente da complexidade dos sistemas biológicos, abrangendo diversos conceitos de diferentes disciplinas, não podendo ser cumprida aleatoriamente.

Para que seja atingido o objetivo de síntese de um novo composto-protótipo ou uma nova entidade química, que possa representar novo candidato a fármaco, elege-se o melhor alvo-farmacológico para aquela aplicação terapêutica e, em função do nível de conhecimento estrutural disponível sobre este receptor, identifica-se a melhor estratégia para a construção da arquitetura molecular do novo ligante desejado.²

Além dessas questões abordadas acima, verifica-se que a introdução de um grupo substituinte na molécula de um fármaco promove alterações químico-estruturais que, por sua vez modificam suas propriedades físico-químicas. O arranjo espacial dos átomos que compõe os grupos funcionais da molécula de um fármaco expressos por meio de suas propriedades físico-químicas, influenciam direta ou indiretamente na interação fármaco-receptor.

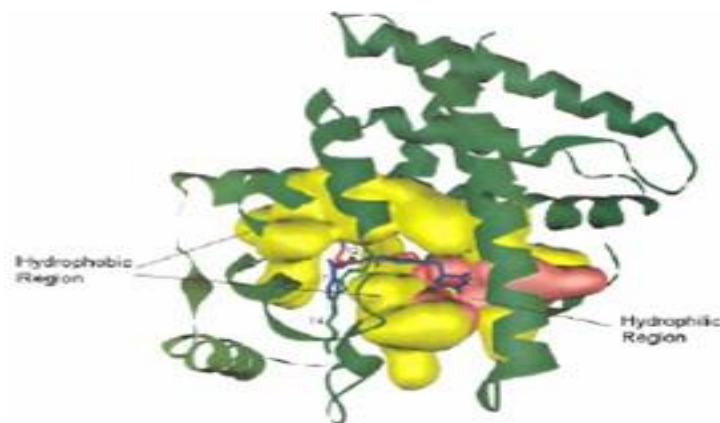


Figura 1: Interação Fármaco - Receptor

Observando todos esses fatos, se torna necessária a existência de estudos que visem a obtenção dessas moléculas, da melhor maneira possível. Usando estratégias de modificações moleculares tais como a hibridização molecular, o bioisosterismo clássico podemos, assim, obter a otimização da atividade farmacológica, uma vez que poderemos prever sua elevada seletividade, suas propriedades físico-químicas e sua toxicidade reduzida, condições essas, essenciais a qualquer candidato a fármaco.

Para tanto, novas moléculas são planejadas de forma que possuam grupos farmacofóricos semelhantes, ou mesmo iguais, aos de moléculas com atividade comprovada e relatada na literatura. A comprovação de que temos um novo análogo com atividade semelhante e, desta maneira, candidato a fármaco, se dá por meio de protocolos farmacológicos *in vivo*³.

Dessa forma, baseada nessas estratégias de modificações moleculares citadas acima, é que se encontra o objetivo principal desse trabalho, onde foi desenvolvida a síntese e caracterização química de novos compostos a partir de heterocíclicos nitrogenados de cinco membros, com atividades biológicas previamente estudadas e fortemente citadas em literatura.

A crescente procura por substâncias com atividade biológica vem demonstrando que os heterociclos são de grande importância na síntese de compostos de interesse biológico. Tendo em vista que na natureza mais da metade dos compostos apresentam anéis heterocíclicos em suas estruturas, esta classe de compostos

possui destacada importância na pesquisa e desenvolvimento de novos produtos com propriedades farmacológicas.

Os compostos heterocíclicos são uma classe de importância incontestável na química medicinal, pois eles, particularmente, compõem classes de medicamentos bastante utilizados na terapêutica atual, de acordo com vários artigos científicos.

Muitos destes compostos heterocíclicos são fármacos mundialmente consumidos que apresentam atividades farmacológicas diversificadas, tais como antihipertensiva (losartan) **(3)**, antiviral (ribavirina), antitumoral (carbamato de fluorouracila), antifúngica (fluconazol), antiinflamatória e analgésica (dipirona) **(1)**, antiprotozoária (metronidazol) **(2)**, inibidora da β -lactamase (tazobactama sódica) e antimicrobiana (benzilpenicilina) ⁴ **(Figura 2)**.

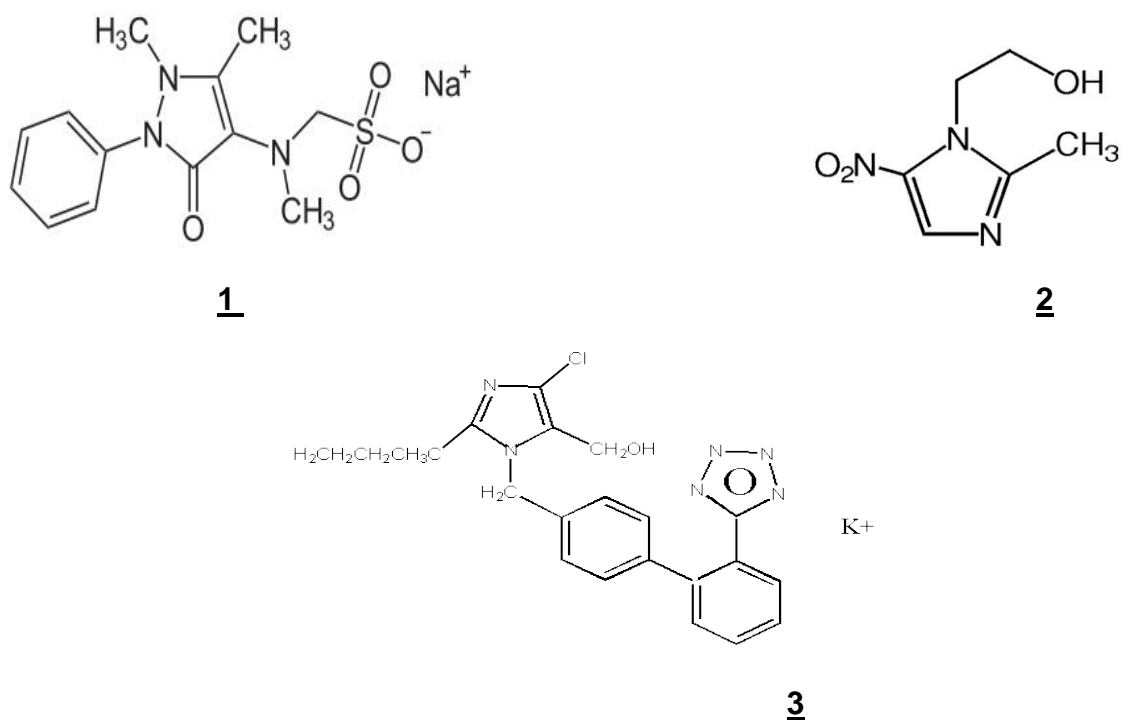


Figura 2: Dipirona (1), Metronidazol (2), Losartana (3)

Os heterocíclicos aromáticos nitrogenados de cinco membros, contendo um ou mais átomos de nitrogênio, pertencem à classe de substâncias denominada genericamente de azol, sendo que o mais simples deles é o pirrol **(4)**; mesmo os compostos heterocíclicos de cinco membros contendo átomos de enxofre ou

oxigênio, adicionalmente a um átomo de nitrogênio, recebem a denominação de azol, sendo chamados, respectivamente, de tiazol (5) e oxazol(6)⁴ (**Figura 3**).

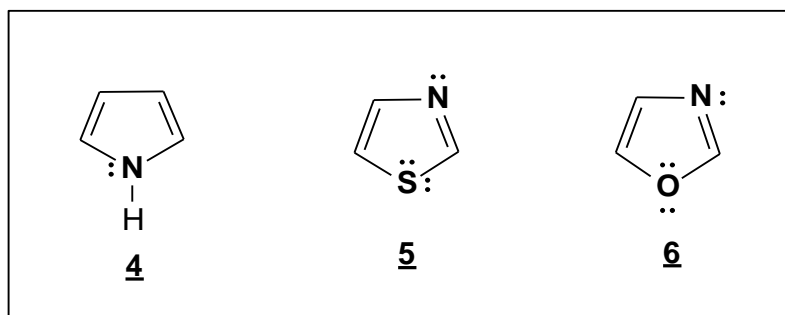


Figura 3: Pirrol, Tiazol e Oxazol

O trabalho foi baseado, principalmente, nos compostos denominados oxadiazóis, pois o grau de semelhança em relação à sua síntese e à sua atividade biológica com os compostos denominados oxadiazolinas é muito elevado⁵ (**Figura 4**).

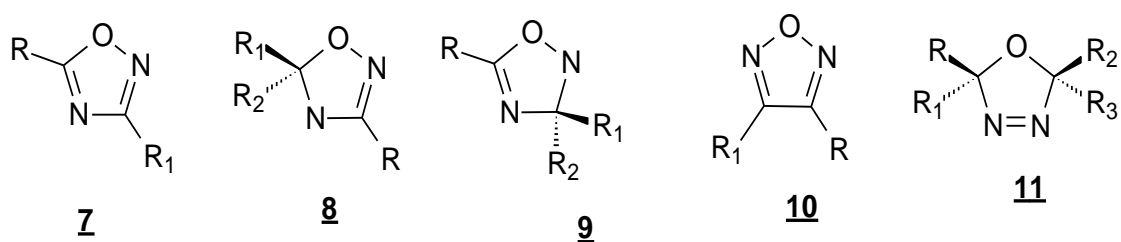


Figura 4: Oxadiazóis, Oxadiazolinas

Para a síntese das novas aril Δ^2 -1,2,4-oxadiazolinas *para*-substituídas, que são objetivos deste trabalho, foi utilizada a cicloadição 1,3-dipolar (1,3 DCA), como único método de obtenção, pois baseado na literatura, esse tipo de reação faz parte dos procedimentos mais úteis para a síntese de heterocíclicos de cinco membros, e estas reações são particularmente empregadas quando o controle estereoquímico da reação é requerido.⁶

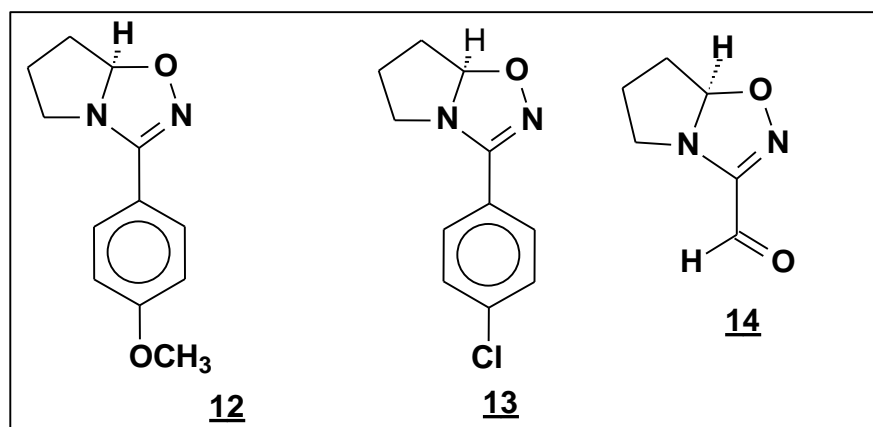


Figura 5: Exemplos de Moléculas com Núcleo Oxadiazolínico

A cicloadição 1,3-dipolar de óxidos de nitrila com ligações insaturadas entre carbonos tem provado ser muito útil para a síntese de isoxazolininas e isoxazoles, substâncias essas que têm estruturas muito semelhantes à substância sintetizada no presente trabalho. Essas substâncias são encontradas numa ampla variedade de heterociclos contendo nitrogênio, que são componentes moleculares de um grande número de produtos naturais e componentes biologicamente ativos⁶³.

Capítulo 1

2- Revisão de Literatura

2.1- Cicloadição 1,3 Dipolar

As reações de cicloadição 1,3-dipolar (1,3-DCA) estão entre os processos mais importantes em química orgânica, permitindo a síntese de uma grande variedade de heterociclos de cinco membros.

A reação de cicloadição é um dos processos mais importantes para a síntese de heterociclos de cinco membros, podendo fornecer diferentes compostos (figura 6), tais como: isoxazóis (**13 e 14**), oxadiazóis (**15 e 16**) e triazóis (**17 e 18**)²⁷.

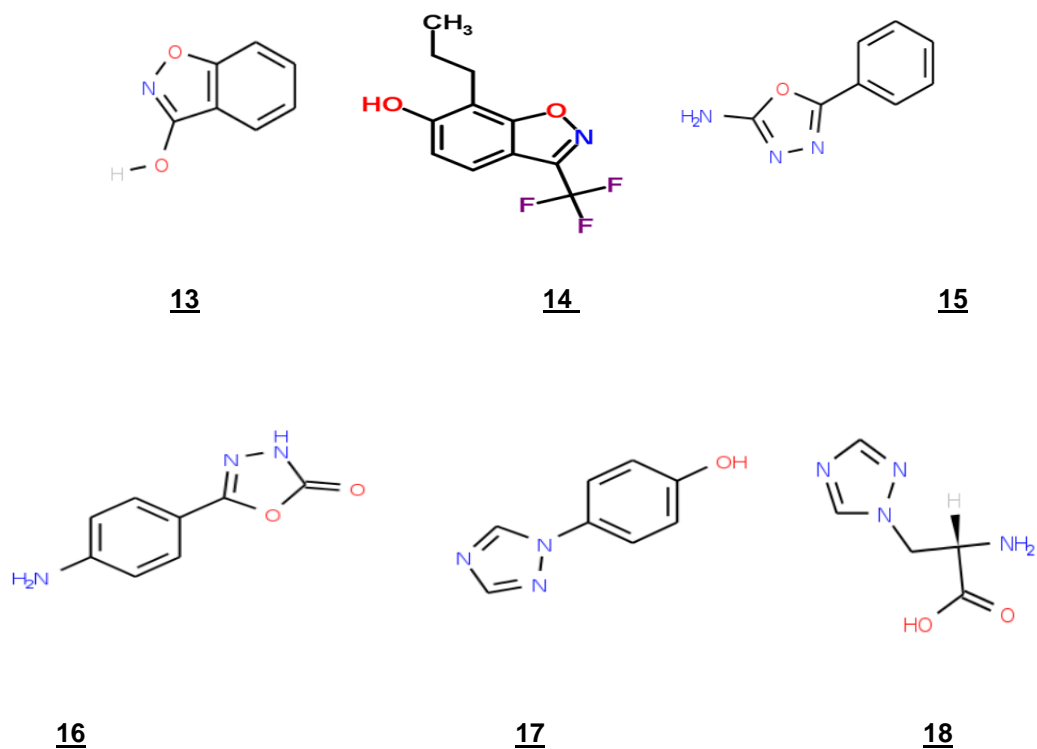


Figura 6: Isoxazóis (13 e 14), Oxadiazóis (15 e 16) e Triazóis (17 e 18)

A reação de cicloadição 1,3-dipolar envolve a participação de dois elétrons π do dipolarófilo e quatro elétrons π do dipolo. Este processo ocorre por um mecanismo concertado (única etapa) ou não concertado (com a existência de

estados de transição) e estereoespecífico, onde os reagentes interagem em planos paralelos fornecendo os respectivos cicloadutos⁸.

As reações de cicloadição são regidas pelos Orbitais Moleculares de Fronteira HOMO e LUMO do 1,3- dipolo e do dipolarófilo. Essa teoria dos Orbitais Moleculares de Fronteira é utilizada para explicar a regioselectividade desta cicloadição (**Figura 7**).

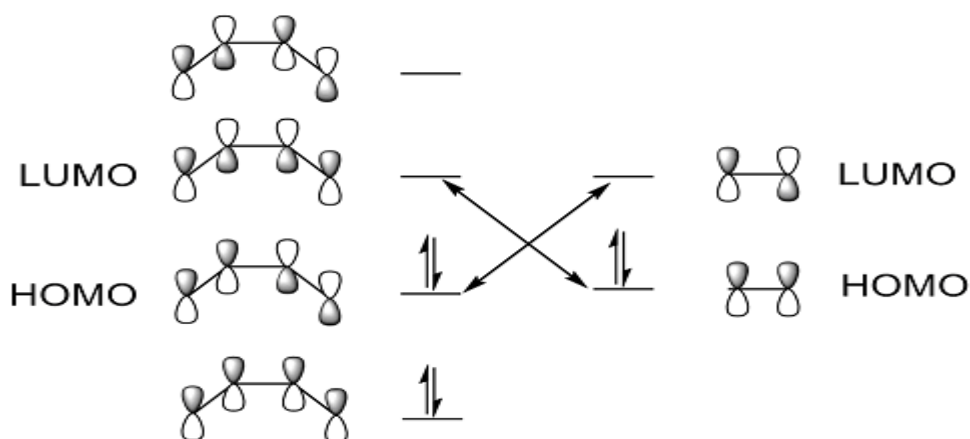
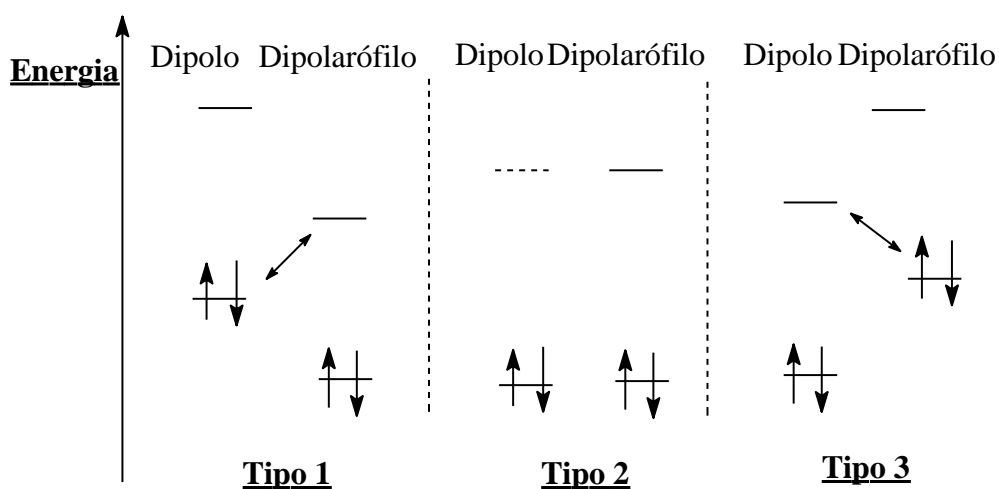


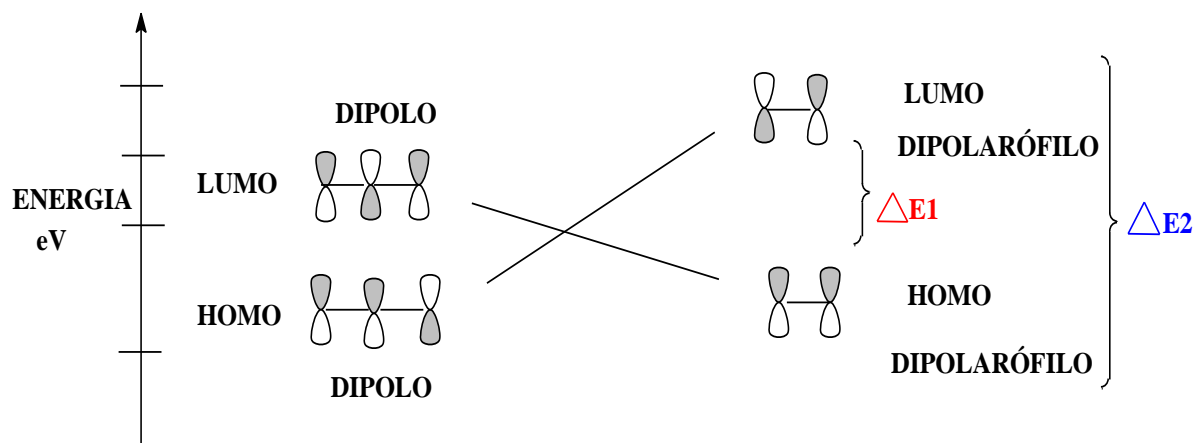
Figura 7: Exemplo de Orbitais HOMO e LUMO.

A teoria do orbital molecular de fronteira afirma que as interações mais importantes ocorrem entre o Orbital Molecular Ocupado de mais Alta Energia (HOMO) de um dos reagentes e o Orbital Molecular Não Ocupado de mais Baixa Energia (LUMO) de outro reagente⁹. Essa interação ocorre de três maneiras diferentes, explicado no **Esquema 1**.



Esquema 1: Tipos de Interação entre os Orbitais HOMO e LUMO

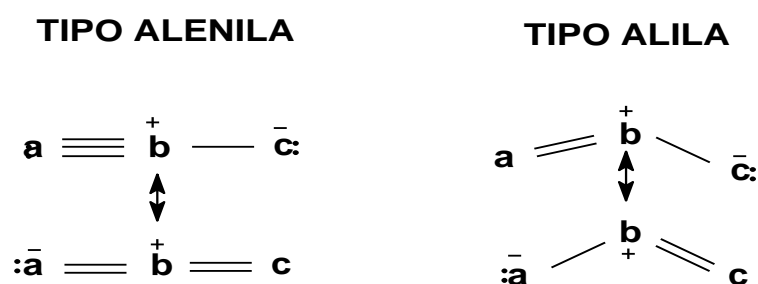
Essa descrição sobre a teoria dos orbitais de fronteira evidencia a ligação mais favorável entre esses dois orbitais com mesma simetria e dimensões próximas. O $LUMO_{dipolo}$ pode interagir com o $HOMO_{dipolarófilo}$ e o $HOMO_{dipolo}$ com o $LUMO_{dipolarófilo}$, onde interação favorecida é aquela que apresentar a menor diferença de energia (ΔE) entre esses orbitais²⁸, como é o caso da cicloadição 1,3 dipolar entre uma imina cíclica e *N*-óxido de nitrila (**Esquema. 2**).



Esquema 2: Interação Dipolo-Dipolarófilo e a Diferença de Energia

O 1,3-dipolo é definido como uma espécie que é representada por uma estrutura zwitteriônica, que sofre cicloadições com um sistema dipolarófilo.

Existem duas classificações para os tipos de 1,3-dipolos, são elas: o ânion tipo alila e o ânion tipo propargila/alenila (**Esquema 3**).

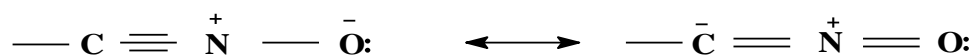


Esquema 3: Gemoetria do 1,3 Dipolo

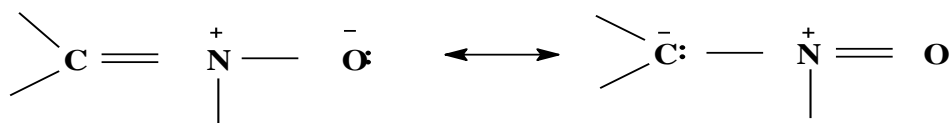
O ânion tipo alila abrange os compostos que possuem quatro elétrons π em três orbitais paralelos p_z , que estão ortogonais ao plano do dipolo. O átomo central pode ser um átomo de nitrogênio, oxigênio ou enxofre, sendo que este possui hibridização sp^2 , o que irá conferir uma geometria angular a este tipo de dipolo.¹¹ O

1,3-dipolo do tipo ânion alenila tem um orbital π extra, localizado no plano ortogonal, e é linear.

***N*- Óxido de Nitrila (Tipo Alenila)**



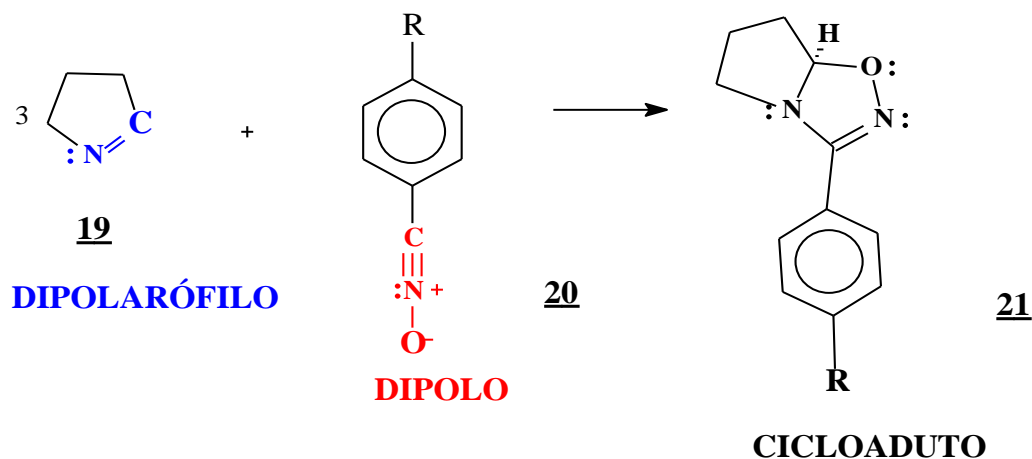
Nitronas (Tipo Alila)



Esquema 4: Exemplo de Molécula Alenila e Tipo Alila

Já o ânion do tipo propargila/alenila abrange os compostos que apresentam um orbital π extra, localizado no plano ortogonal ao orbital molecular (MO) do plano p_z . Neste, o átomo central limita-se ao nitrogênio, com hibridização sp o que confere uma geometria linear a este tipo de ânion¹¹ (**Esquema 4**).

Essa reação de cicloadição 1,3 dipolar entre os óxidos de nitrilas, estes derivados dos cloretos de hidroximiinoila, agindo como dipolo e a 1- pirrolina (imina) agindo como o dipolarófilo é principal reação para a obtenção de novas aril Δ^2 -1,2,4-oxadiazolinas presentes nesse trabalho (**Esquema 5**).



Esquema 5: Cicloadição 1,3 dipolar

2.2 - Oximas e Cloretos de hidroximiinoila

As oximas são iminas formadas a partir de reação de aldeídos e cetonas com uma amina primária (RNH_2). Esta é uma molécula que se caracteriza pela formação de uma ligação dupla carbono-nitrogênio. As iminas obtidas a partir da reação do aldeído ou cetona com a hidroxilamina hidrocloreto são denominadas de Oximas (**Figura 8**).

Essas moléculas têm sua variação de nome de acordo com o reagente usado, as aldoximas são as oximas com a utilização dos aldeídos como reagente e cetoximas são aquelas em que se utilizam as cetonas (**Figura 9**).

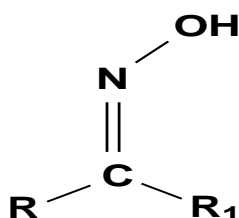


Figura 8: Fórmula Geral da Oxima

As oximas são geralmente substâncias sólidas cristalinas e que possuem pouca solubilidade em água, cujo a fórmula geral é $\text{RR}'\text{C} = \text{NOH}$, onde o R é algum tipo de substituinte orgânico e R' pode ser um outro grupo orgânico ou um hidrogênio (**Figura 10**).

Podem ser classificadas como ácidos fracos de Lewis quando forem dissolvidas em bases diluídas ou como bases fracas de Lewis quando formarem sais com certos tipos de ácidos minerais.

As oximas geralmente são obtidas através de reações de condensação entre a substância carbonilada e a amina²³.

Vários métodos diferentes são relatados na literatura para sua obtenção, como por exemplo, a condensação do aldeído ou cetona com a hidroxilamina na presença de sílica gel em meio livre de solvente, obtendo altos rendimentos²⁴.

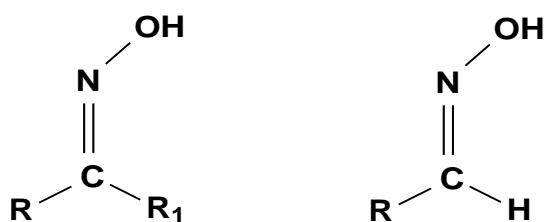


Figura 9: Fórmula Cetoxima e Aldoxima respectivamente

Também foi desenvolvida uma técnica onde os reagentes são submetidos à irradiação ultrassom juntamente com a resina de troca iônica e borato de sódio, obtendo altos rendimentos em curtos tempos de reação²⁵.

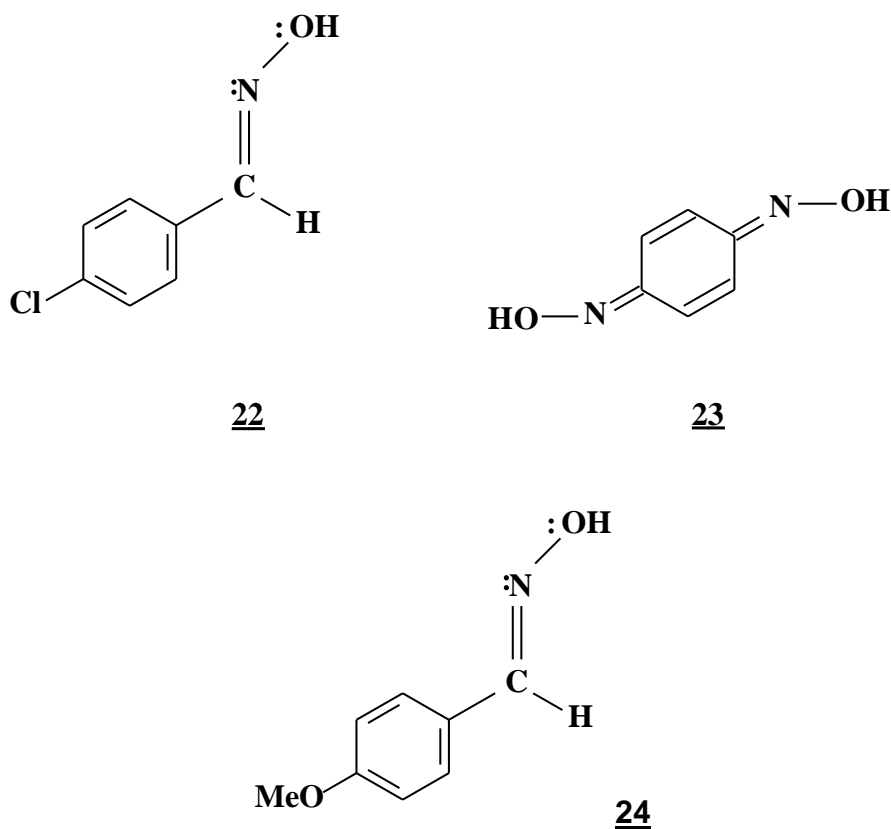
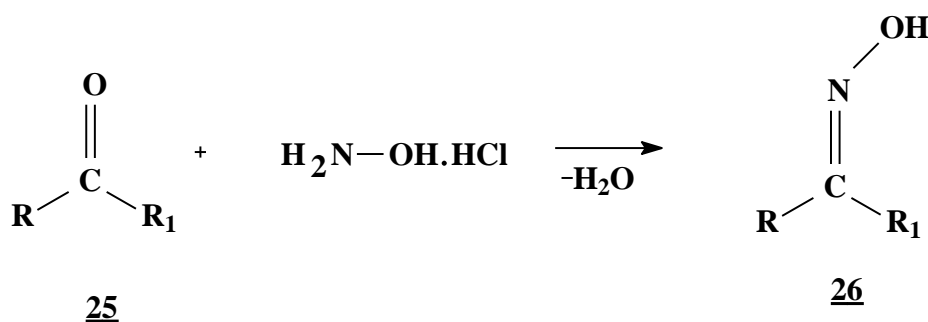


Figura 10: Exemplos de Aldoximas e Cetoximas

Outro exemplo citado foi a obtenção da oxima é obtida de modo mais simples, onde é utilizado, apenas, a água como solvente. Esta técnica torna a reação menos agressiva, além de proporcionar bons rendimentos²².

O mecanismo da reação se dá por um processo reversível onde se utiliza um ácido como catalisador, que se inicia com a adição nucleofílica de uma amina primária ao grupo carbonila, seguida da transferência de um próton do nitrogênio para o oxigênio, ocorrendo assim a formação de um amino álcool neutro. Depois desse processo, ocorre a protonação do oxigênio presente no amino álcool pelo catalizador ácido, onde o (-OH) é convertido em um grupo de saída melhor (-OH₂⁺), ocorrendo a perda de água e com a consequente produção do íon imínio. A perda do próton do nitrogênio gera a imina como o produto e regenera o catalisador ácido. Essa formação é bastante lenta e requer o pH do meio controlado, variando entre 4 e 5²⁶ (Esquema 6).

As oximas têm grande aplicação na química orgânica, como por exemplo, a proteção do grupo carbonila em moléculas orgânicas, o que a torna um importante intermediário em rotas sintéticas devido à possibilidade de regeneração de seu substrato²².



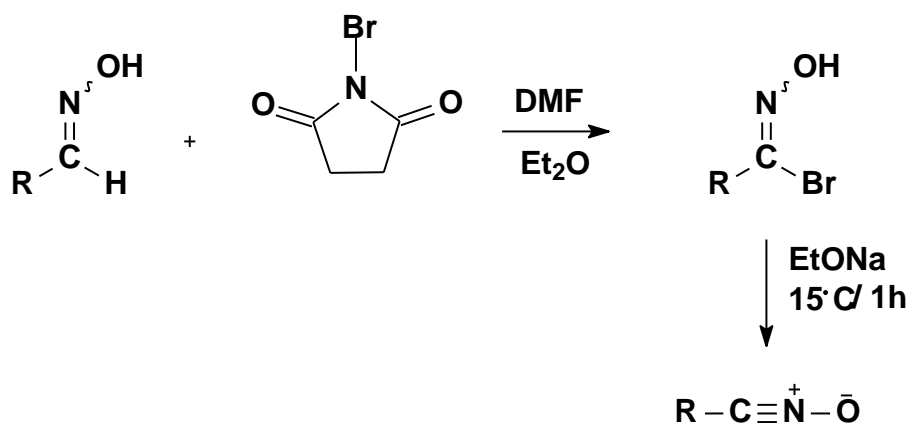
Esquema 6: Síntese da Oxima, R₁ = H = Aldoxima e R₁ = CH₃ = Cetoxima

Os cloretos de hidroxiiminoila são moléculas obtidas a partir das oximas, onde já existem descritas na literatura metodologias que explicitam a sua obtenção. Os cloretos de hidroxiiminoila são formados a partir da cloração da oximas onde se utiliza reagentes como *N*-clorosuccinimida (NCS) na função de substituição do hidrogênio, presente na ligação nitrila da oxima, pelo átomo de cloro, o que confere a nova molécula um bom grupo de saída, pois será necessário esse grupo de saída quando ocorrer a reação de cicloadição entre os cloretos de hidroxiiminoila e a Δ^1 – pirrolina. Esse derivado do óxido de nitrila formado reage com um dipolarófilo produzindo o produto desejado³⁴. Ainda que seja um composto eficiente para o preparo de uma variedade de heterociclos, estes apresentam como fatores

limitantes a pouca disponibilidade de nitrocompostos, bem como a possibilidade de formação de diferentes produtos laterais³⁵.

Em 1967, autores reportaram pela primeira vez a halogenação de aldoximas utilizando hipobromito de sódio (NaOBr) em solução alcalina, com posterior desidroalogenação dos respectivos haletos de iminoíla, para que fosse produzido o óxido de nitrila³⁶.

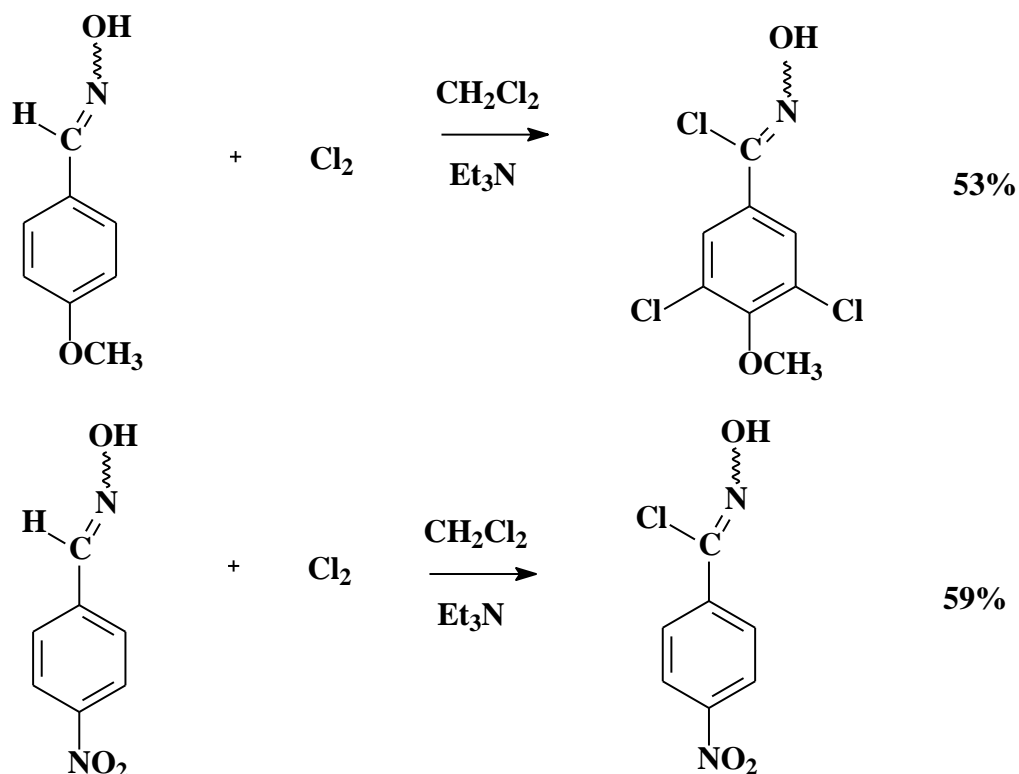
No ano seguinte, os mesmos autores demonstraram a formação de óxidos de nitrila a partir do tratamento de aldoximas com *N*-bromo-succinimida (NBS) em uma solução de *N,N*-dimetil-formamida (DMF) e uma base (etóxido de sódio ou trietilamina). Esta reação era conduzida a baixa temperatura e produziu bons rendimentos³⁷ (**Esquema 7**).



Esquema 7: Obtenção de Óxido de nitrila empregando o NBS

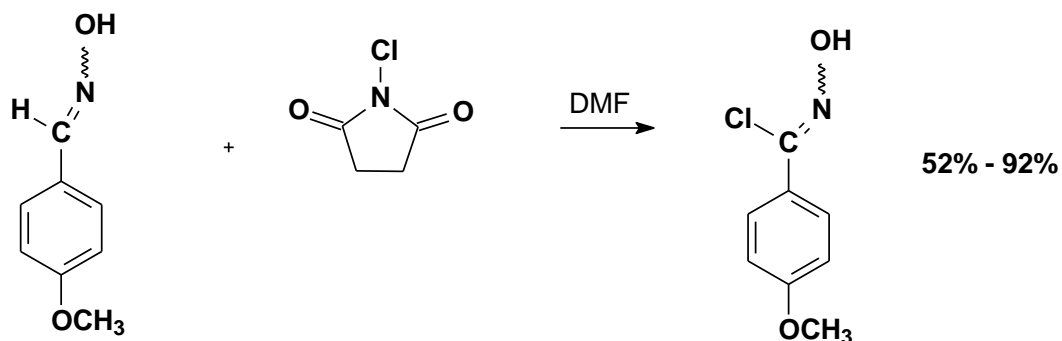
Em 1971 foi investigado o uso de cloro gasoso (Cl_2) na cloração de benzoaldoximas com diferentes substituintes. O autor concluiu que a formação do cloreto de iminoíla era influenciada pela natureza do solvente e do grupo substituinte (elétron-doador ou elétron-receptor) presente no anel aromático (**Esquema 8**).

Uma limitação bastante significativa para essa metodologia é a possibilidade de cloração do anel aromático quando a benzoaldoxima contém substituinte elétron-doador³⁸.



Esquema 8: Obtenção do Cloreto de Hidroxiiminoíla empregando o Cl_2 gasoso

Alguns anos depois, foi proposto a obtenção dessa classe de compostos a partir do tratamento de aldoximas com *N*-cloro-succinimida (NCS) em *N,N*-dimetil-formamida (DMF) (**Esquema 9**). Essa metodologia substituiu a desidroalogenação oxidativa de aldoximas utilizando Cl_2 , pois a cloração do anel aromático só ocorreria na presença de um grupo fortemente ativador³⁹.

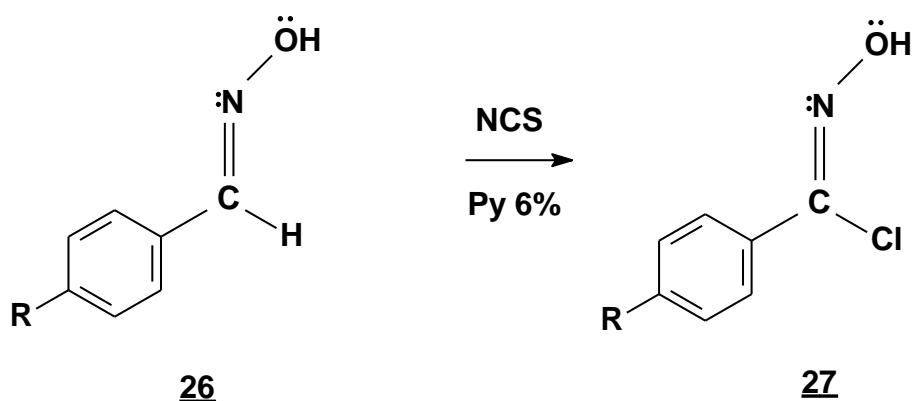


Esquema 9: Formação do Cloreto de Hidroxiiminoíla pelo tratamento da aldoxima com NCS em DMF

Outro procedimento descrito na literatura para síntese dos cloretos envolvendo halogenação de oxima consistui no tratamento de aldoximas com hipoclorito de sódio (NaOCl). Esse método ainda é bem empregado por utilizar um reagente de baixo custo. Porém, a reação necessita de monitoramento, já que o NaOCl é termolábil e fotossensível⁴⁰.

Outra descrição é o uso de *N*-cloro-*N*-sódio-4-metil-benzeno-sulfonamida (Cloramina T) na conversão, *in situ*, de aldoximas em óxidos de nitrila. A reação utilizando cloramina-T converte toda aldoxima em seu respectivo cloreto sem que haja cloração do anel aromático. Esta reação ocorre com aldoximas aromáticas e alifáticas fornecendo bons rendimentos⁴¹.

Baseado nos procedimentos citados acima, se obteve o procedimento utilizado pelo grupo de pesquisa, onde a cloração da aldoxima é realizada pelo NCS em presença de uma solução de piridina à 6%, que age como catalisadora da reação (**Esquema 10**).



Esquema 10: Síntese do Cloreto de Hidroxiiminoila *para*-substituído

2.3- Oxadiazolinas

Oxadiazolinas representam uma classe de heterociclos que, embora conhecidas por mais de um século, são bastante limitadas em número¹².

As oxadiazolinas são compostos formados por um anel de cinco membros, onde estão presentes dois heteroátomos de nitrogênio e um heteroátomo de oxigênio (**Figura 11**). Elas recebem sua classificação de acordo com a posição da

ligação π , com o grau de oxidação do heterociclo e varia também, de acordo com a disposição dos heteroátomos no anel¹³.

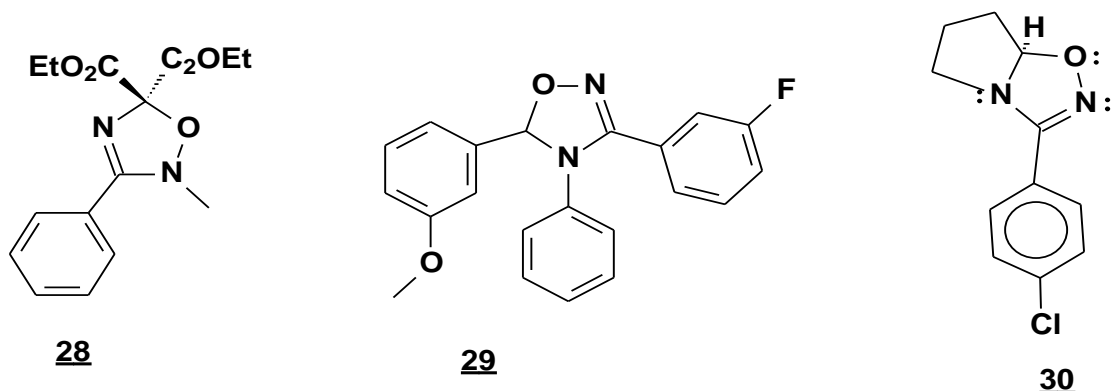
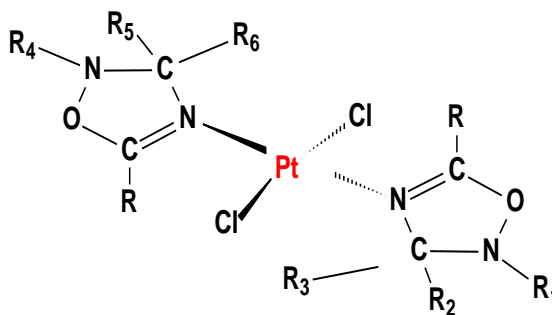


Figura 11: Exemplos de Oxadiazolinas cíclicas

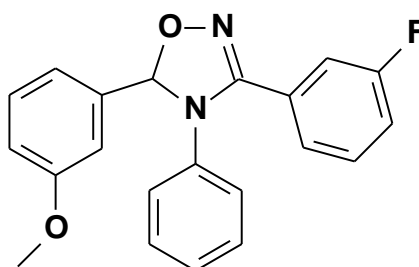
Devido a essas três variáveis químicas, estas moléculas possuem diversas particularidades que as diferenciam quanto as suas propriedades químicas, como por exemplo, a reatividade. A variação da posição dos heteroátomos do anel vai conferir à molécula as suas particularidades e classificação de cada espécie formada¹³. Na literatura, diversos métodos para obtenção de oxadiazolinas são relatados. Nos próximos parágrafos serão descritos alguns dos principais.

O primeiro relato da síntese de um derivado 1,2,4- oxadiazolina através condensação de benzamidoxima com acetaldeído formando o ciclo. Esta rota foi considerada uma das mais sólidas e diretas para a síntese das 1,2,4 –oxadiazolinas bicíclicas¹⁴.

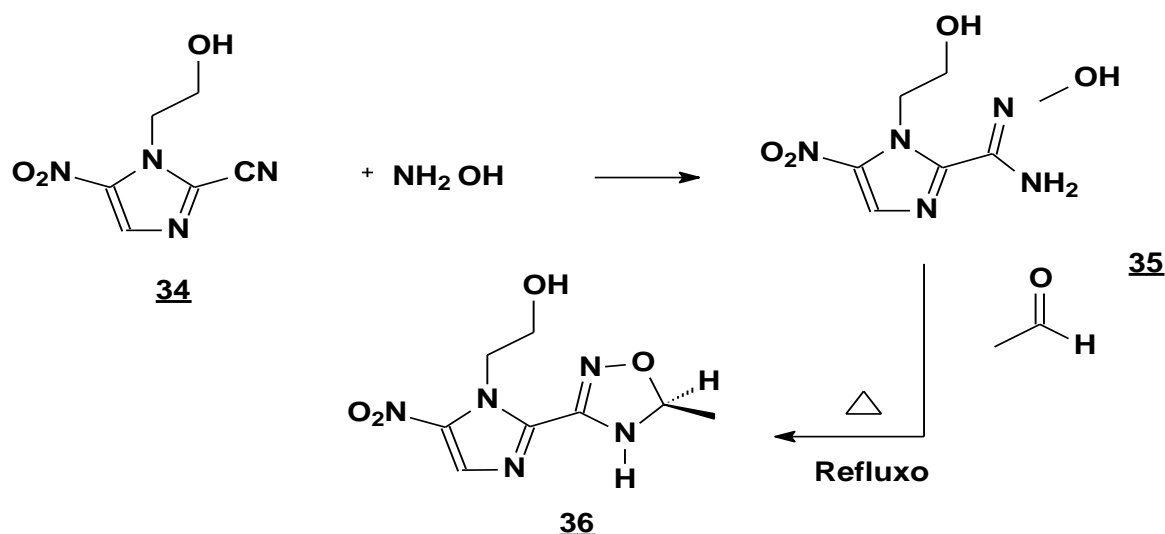
Foi citada na literatura uma síntese onde usou-se a platina (IV) em [3 + 2] cicloadição de nitronas para organonitrilas para fornecer as 1,2,4-oxadiazolinas (32) e, em seguida, estendeu esta metodologia para a primeira síntese assimétrica de oxadiazolinas usando um ligante sulfoxido quirais¹⁵ (**Figura12**).

**32****Figura 12: Oxadiazolina Complexada com Platina**

Em outro trabalho, o autor sintetizou a α -cloro-benzaldoxima, que, na presença de trietilamina, foi convertida no *N*-óxido de nitrila. Este composto reagiu, então, com a bezilidenoanilina solubilizada em éter, produzindo a 3-(3-fluorofenila)-4-fenila-5-(3-metoxifenila)- Δ^2 -1,2,4-oxadiazolina (**29**)¹⁹ (Figura 13).

**29****Figura 13: 3-(3-fluorofenila)-4-fenila-5-(3-metoxifenila)- Δ^2 -1,2,4-oxadiazolina**

Observou-se também a descrição da síntese de nitroimidazolil- Δ^2 -1,2,4-oxadiazolinas, na qual a hidroxilamina foi condensada com a nitrila substituinte do anel imidazólico (**34**), para a formação da carboxamidoxima (**35**) (Esq. 11), que sob aquecimento em refluxo, foi reagida com aldeídos de cadeia curta, tais como acetaldeído e butiraldeído. O produto resultante dessa reação foi agitado com éter, no qual a oxadiazolina, contendo o radical 5-nitro-imidazoila (**36**) no carbono da posição 3, precipitou²¹ (Esquema 11).



Esquema 11: Síntese do nitroimidazolil- Δ^2 -1,2,4-oxadiazolinas

Mais recentemente, foi descrita uma via mais eficiente e mais rápida para a síntese dessas oxadiazolinas através da 1,3 cicloadição dipolar, onde se usa os derivados de óxidos de nitrila e as iminas¹⁶.

Baseado nessas descrições literárias foi realizado a 1,3-cicloadição dipolar usando como reagentes a Δ^1 -pirrolina (função imina) e os cloretos de hidroxiiminoila *p*-substituídos (função óxidos de nitrila), formando uma série inédita de aril Δ^2 -1,2,4-oxadiazolinas bicíclicas *p*-substituídas. Estes heterociclos têm recebido uma maior atenção devido a sua atividade biológica e promissora utilidade como intermediários sintéticos.

De acordo com o autor as oxadiazolinas foram descritas como indutoras de analgesia e com atividade anti-inflamatória (37), sendo esta comparada à da aspirina¹⁷ (Figura 14). O núcleo oxadiazolínico 29, modificando seus radicais, foi descrito como tendo com propriedades anti-inflamatórias (Figura 15).

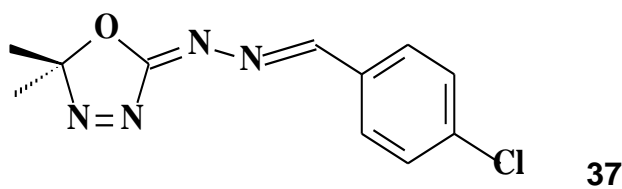
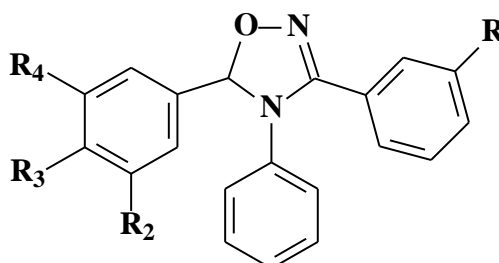


Figura 14: Exemplo de oxadiazolina indutora de analgesia e com propriedades anti-inflamatórias

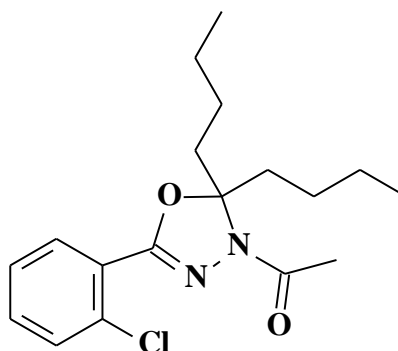
Além dessas atividades descritas acima, podemos descrever outras atividades já comprovadas e relatadas pela literatura como propriedades broncodilatadoras **38** (Figura 16), anticolinérgicas, hipertensivas, sedativas, diuréticas, antiulcerativas, vasodilatadoras e analépticas respiratórias¹⁸.



29

Figura 15: Exemplo de oxadiazolina com propriedades anti-inflamatórias

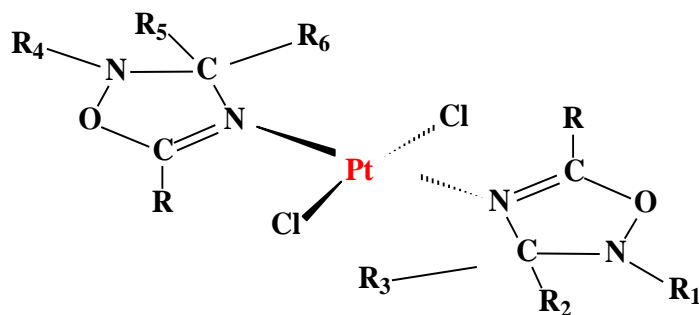
Também foi feita a síntese e avaliação da atividade antifúngica (**36**) como potenciais inibidores da quitina sintase, enzima responsável pela biossíntese da quitina em fungos, o que segundo a literatura obteve ótimos resultados¹⁹.



38

Figura 16: Exemplo de oxadiazolina com propriedades broncodilatadoras

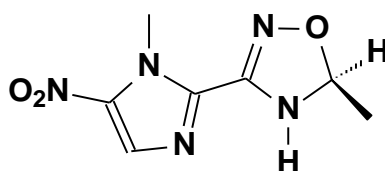
Existem outros exemplos de oxadiazolinas que possuem atividades antitumorais **32**, onde há o relato da síntese usando uma série de complexos de platina contendo oxadiazolinas como ligantes²⁰ (Figura 17).



32

Figura 17: Exemplo de oxadiazolína com propriedades antitumorais

Outros relatos também descrevem o núcleos oxadiazolínicos que possuem atividades anti-HIV (**39**), exibindo até 74% de supressão²¹ (**Figura 18**).

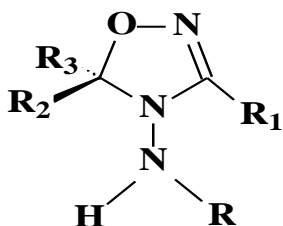


39

Figura 18: Exemplo de oxadiazolína que possuem atividade anti-HIV

Propriedades anticonvulsivantes¹² e atividades amebicidas²¹, também foram evidenciadas. Além de ser usado, no controle dos endoparasitas²⁹.

Outro relato importante foi a síntese de ligantes oxadiazolínicos responsáveis por modular a expressão de genes exógenos por meio de um complexo receptor de ecdisona. Estes compostos são úteis em aplicações, tais como, terapia gênica, produção de proteínas e anticorpos em larga escala regulação de características em organismos transgênicos³³ (**Figura 19**).



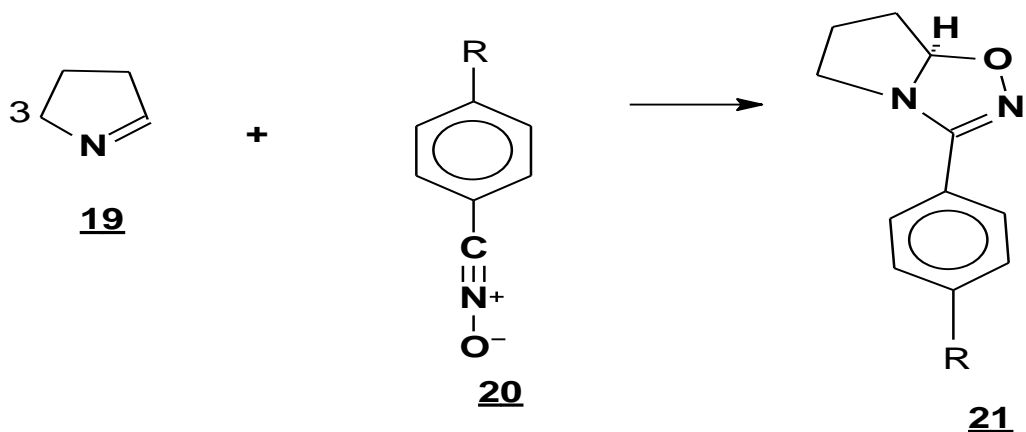
40 **Figura 19: Oxadiazolína que modulam a expressão de genes exógenos**

Capítulo II - Objetivos

3- Objetivos

3.1- Gerais

O presente trabalho tem como objetivo principal a síntese nova série de aril Δ^2 -1,2,4-oxadiazolinas bicíclicas *para*-substituídas, através da cicloadição 1,3-dipolar entre a Δ^1 -pirrolina e o N-óxido de nitrila. Assim como, explorar quimicamente e realizar testes que comprovem a atividade antimicrobiana destes novos heterociclos obtidos (**Esquema. 12**).



Esquema 12: Rota de Síntese do Cicloaduto aril Δ^2 -1,2,4-oxadiazolinas bicíclicas *para*-substituí

3.2- Específicos

- Sintetizar o trímero da Δ^1 -pirrolina;
- Fazer a destrimerização, através do processo de destilação do trímero da Δ^1 -pirrolina;

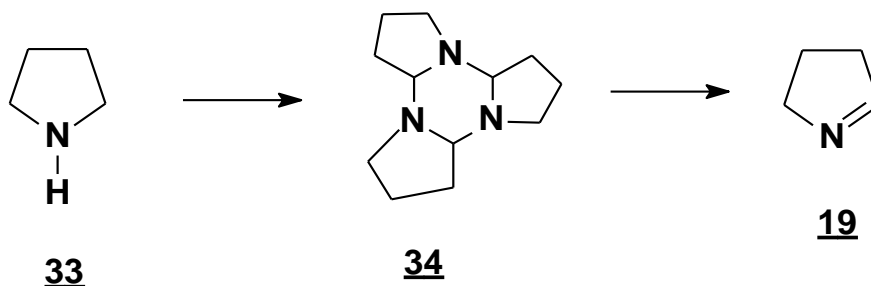
- Síntese das oximas *para*-substituídas e ativação através da cloração das mesmas, para dar origem aos cloretos de hidroxiiiminoila *para*-substituídos;
- Cicloadição 1,3-dipolar entre o monômero Δ^1 -pirrolina e os *N*-óxidos de nitrilas;
- Fazer a purificação dos cicloadutos obtidos através do método de cromatografia por coluna *flash*;
- Determinar as propriedades físico-químicas (ponto de fusão e *R_f*) dos compostos obtidos;
- Elucidar a estrutura desses compostos por análise de RMN de ^1H , RMN de ^{13}C , GC-MS, LCMS-IT-TOF e IV.
- Avaliação da atividade antimicrobiana dos compostos formados.

Capítulo III – Metodologia

4 - Metodologia

Este trabalho teve como objetivo a síntese da nova série aril Δ^2 -1,2,4 oxadiazolinas bicíclicas *para*-substituídas. Para tanto, foi lançado mão de uma metodologia utilizada em sínteses de outros biciclos, que possuem como base as isoxazolininas³¹.

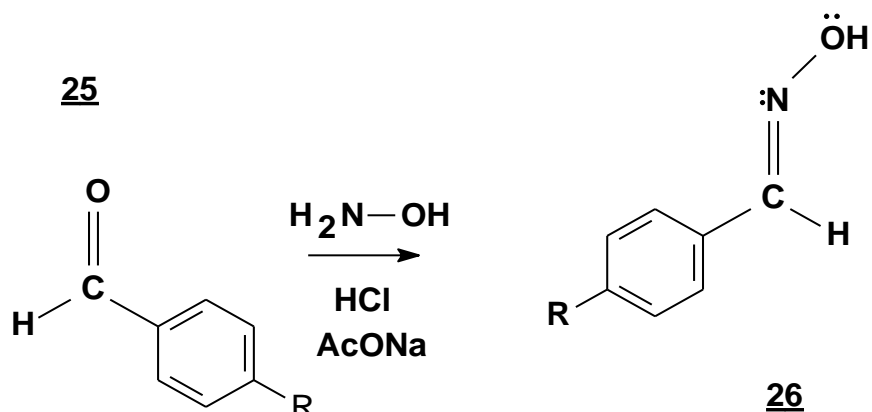
O primeiro produto envolvido na reação para a obtenção dessa nova série foi o trímero Δ^1 - pirrolina, sintetizado através da oxidação catalítica da pirrolidina pelo persulfato de sódio, tendo o nitrato de prata (AgNO_3) como catalizador dessa reação (**Esquema 13**).



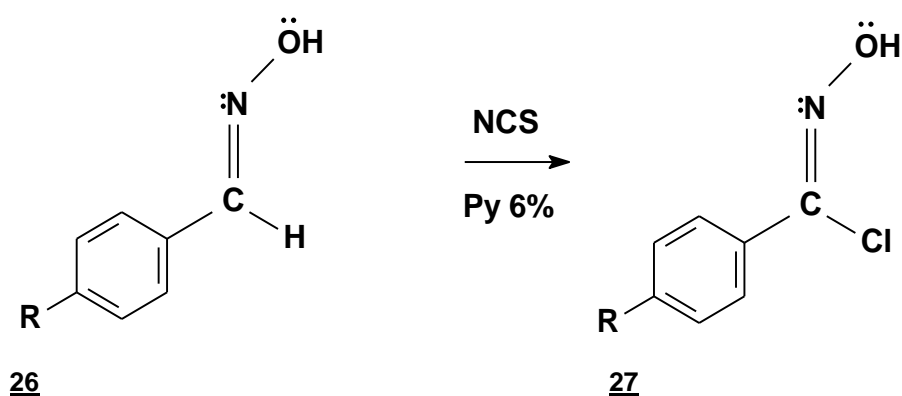
Esquema 13: Rota da Síntese do Trímero Δ^1 - pirrolina

Além do trímero Δ^1 - pirrolina, foram sintetizadas, também, as oximas e estas foram obtidas através da reação de condensação entre aldeídos e a hidroxilamina, onde os aldeídos utilizados foram previamente escolhidos (**Esquema 14**).

A partir destas oximas formadas deu-se origem aos cloretos de hidroxiiminoila *para*-substituídos, onde estes tiveram sua obtenção através da cloração da oxima, ocorrendo a substituição do átomo de hidrogênio do carbono ligado ao nitrogênio (ligação nitrila), por um átomo de cloro, utilizando o NCS como doador do átomo de cloro, na presença de clorofórmio como solvente e utilizando a solução de piridina a 6% como catalizador da reação. Essa reação ocorre à temperatura ambiente e necessita de vidrarias totalmente secas, pois é uma reação anidra (**Esquema 15**).



Esquema 14: Síntese da Oxima *para*-substituída

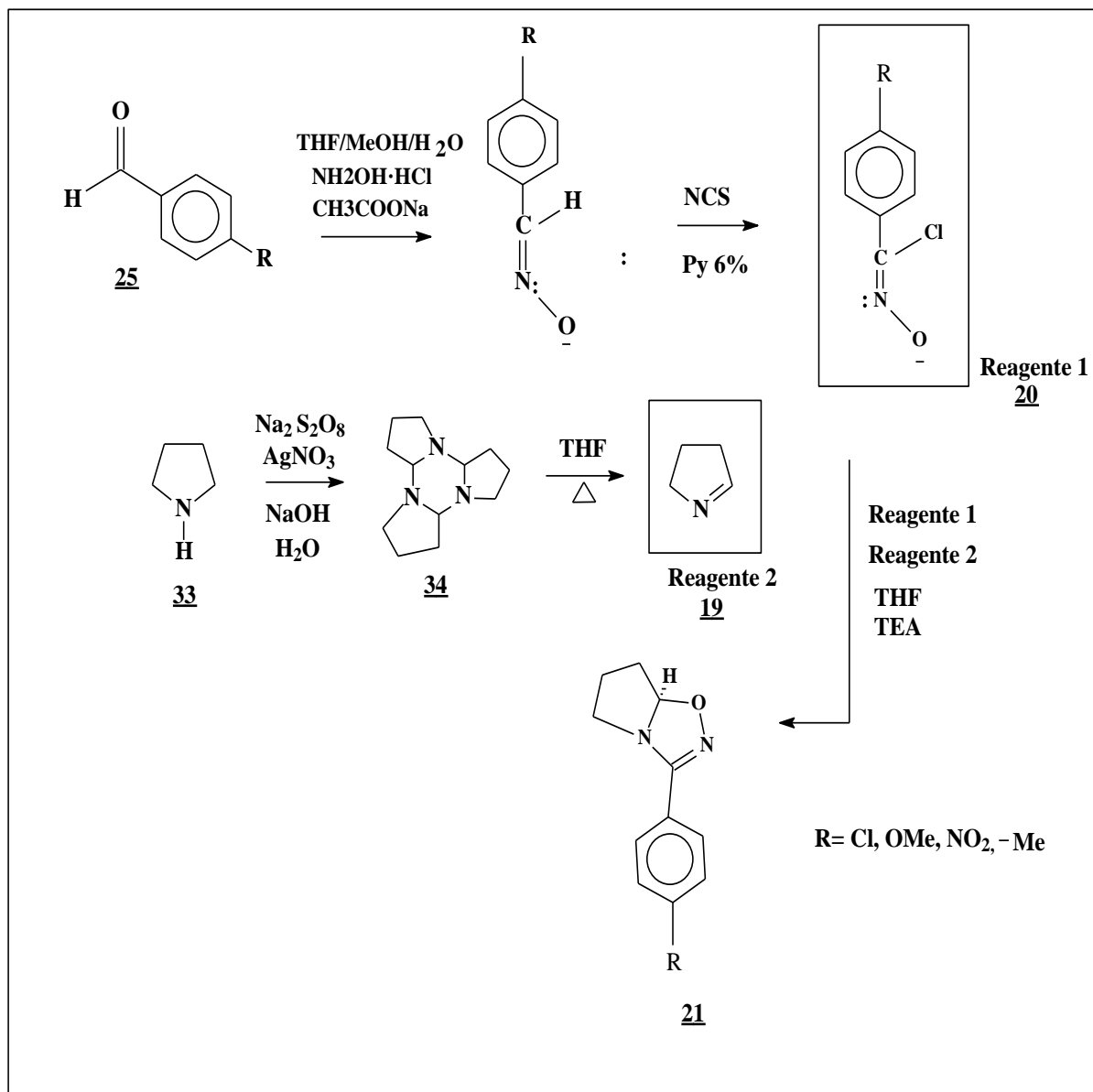


Esquema 15: Síntese do Cloreto de hidroxiiiminoila *para*-substituído

A partir dessas duas classes de moléculas foram feitas reações de cicloadição 1,3 dipolar para que, enfim, fosse formada a nova série de aril Δ^2 -1,2,4-oxadiazolinas bicíclicas *para*-substituídas, que é o foco principal do presente trabalho.

Apesar, dessa série ser inédita, possuem relatos na literatura que comprovam as atividades biológicas para o núcleo oxadiazolínico, apenas. Este pode ter função chave no que concerne a atividade biológica de inúmeras moléculas, ou seja, eles têm a função de grupos farmacóforos dos seus derivados. Baseado nesses relatos e utilizando algumas técnicas de planejamento de fármacos foi realizada a síntese com moléculas que visaram a melhoria da atividade biológica em relação ao núcleo oxadiazolínico ligado a outros tipos de radicais.

Por essa razão, este heterociclo foi utilizado como base para a síntese das novas moléculas com o propósito de posterior avaliação biológica para as atividades antimicrobianas de cada composto formado.



Esquema 16: Visão geral da síntese de novas aril Δ^2 -1,2,4-oxadiazolinas bicíclicas para-substituídas.

O esquema 16 representa uma visão geral das reações envolvidas nesse trabalho, visando a obtenção da nova série de aril Δ^2 -1,2,4-oxadiazolinas bicíclicas para-substituídas.

PARTE II

Estudo Químico

Capítulo IV

- Resultados e Discussão

Capítulo V

- Procedimentos experimentais

Capítulo IV – Resultado e discussão

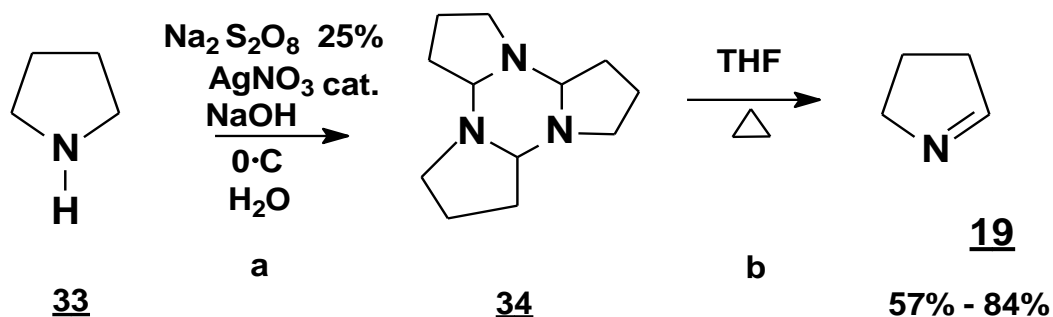
5- Resultados e Discussão

5.1 - Preparação do Trímero Δ^1 – Pirrolina³⁰

A preparação do trímero Δ^1 -pirrolina **19**, um dos produtos utilizados na síntese do novo ciclo, ocorre através da oxidação catalítica da pirrolidina **33**, onde o agente responsável por essa oxidação é o persulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$), a reação ocorre em meio básico e se utiliza o nitrato de prata (AgNO_3) como catalisador (Etapa a).

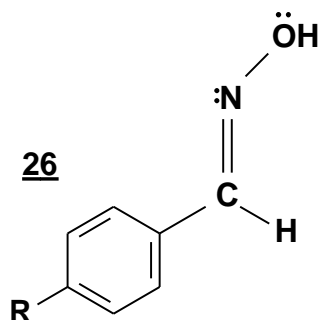
Devido à grande reatividade e instabilidade do monômero³², vai ocorrer sua trimerização no meio reacional, formando o seu respectivo trímero **34**, que não poderá ser usado dessa forma na cicloadição, por isso é feita a sua destilação com tetrahidrofurano (THF) (etapa b), para obtenção do monômero e seu uso imediato na reação de cicloadição (**Esquema 17**).

O rendimento da reação pode variar entre 57% e 84%, dependendo das condições dos reagentes e das condições em que foi feita sua reação.



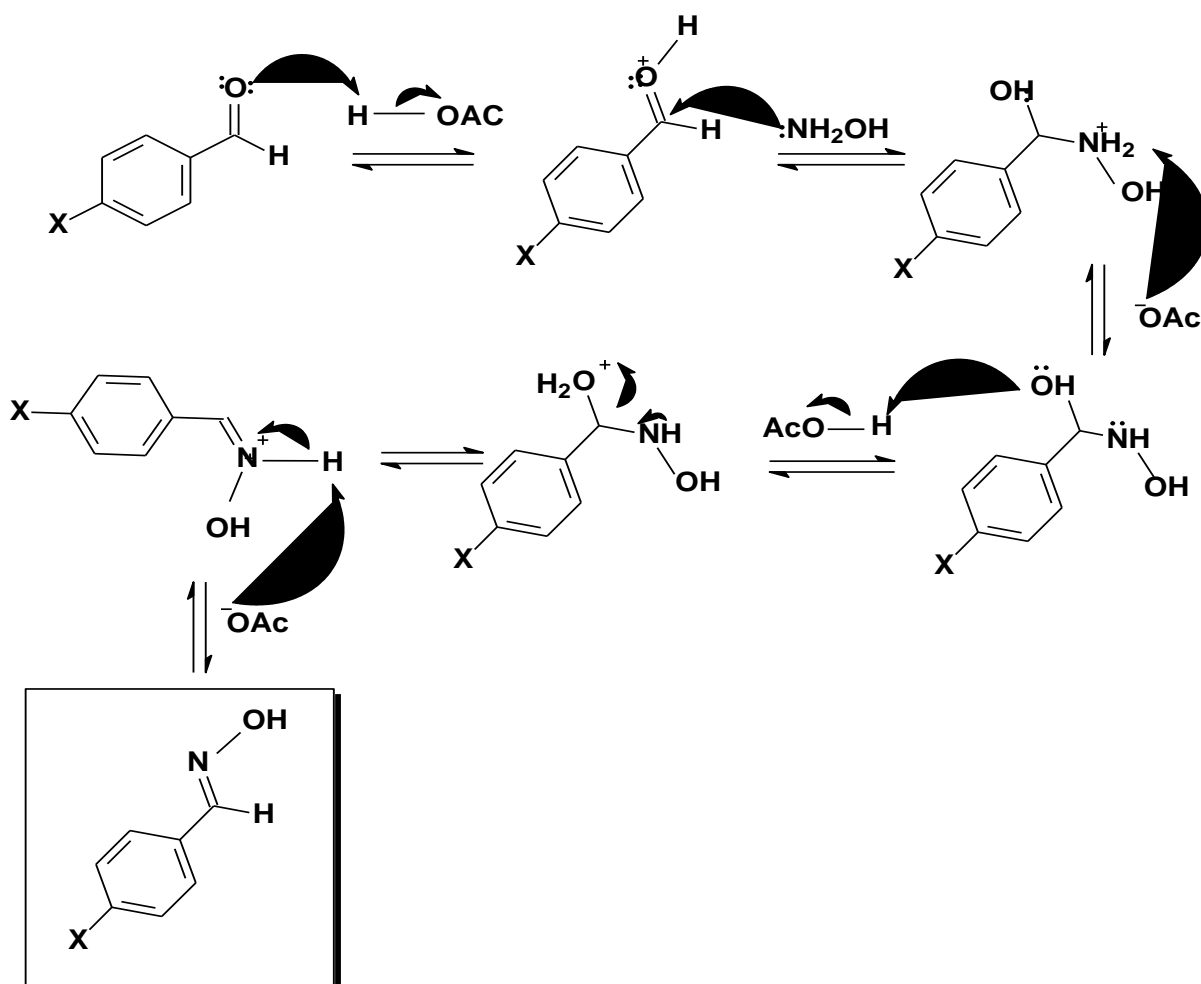
Esquema 17: Síntese do Trímero Δ^1 - pirrolina

5.2 - Síntese das Oximas *para*-substituídas (26)



A síntese do grupo funcional oxima se dá a partir da reação entre os aldeídos previamente escolhidos e a hidroxilamina, inicialmente. Nesse processo utilizou-se o tetraidrofurano (THF), metanol (MeOH) como solventes da reação e a água para posterior extração³¹.

O mecanismo de reação está representado no **Esquema 18**.



Esquema 18: Mecanismo da síntese das Oximas

Nesse processo utilizou-se o tetraidrofurano (THF), metanol (MeOH) como solventes da reação e a água para posterior extração³¹.

Os átomos ou grupos ligados ao anel aromático dos benzaldeídos utilizados foram: -Cl (**41**), -OCH₃ (**43**), -CH₃ (**44**) e -NO₂ (**42**) (Figuras 20 e 21).

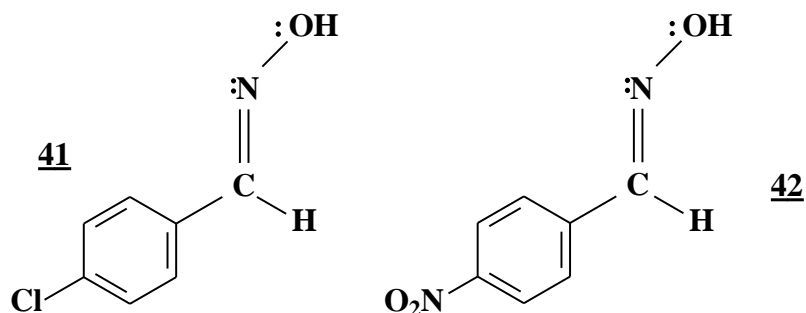


Figura 20: 4-cloro-benzaldoxima e 4-nitro-benzaldoxima

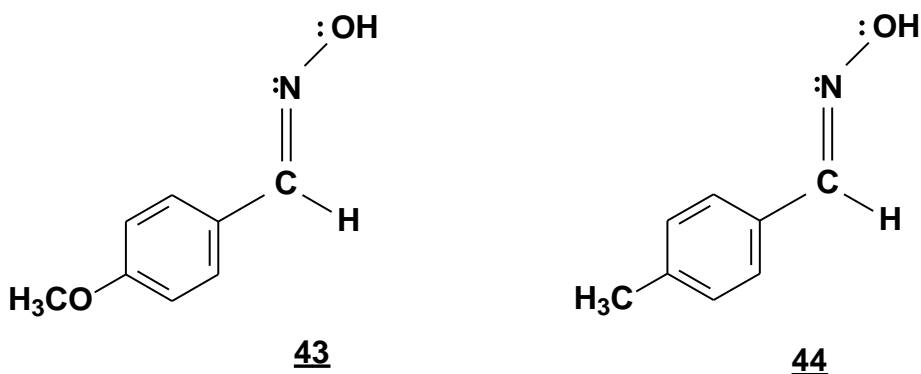
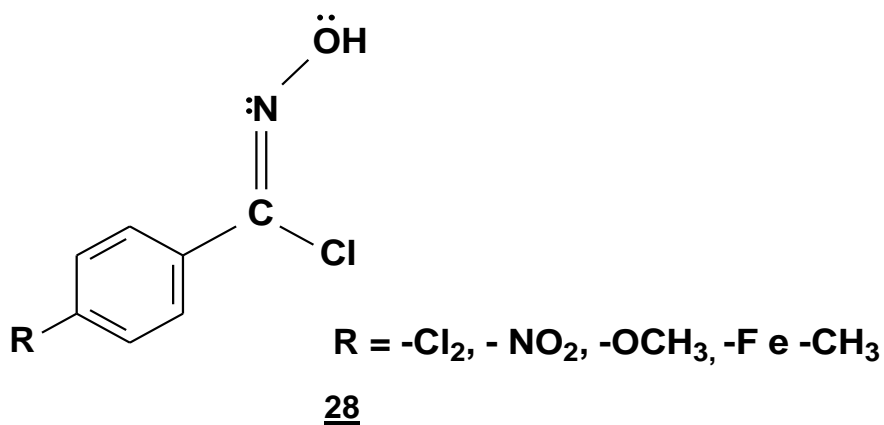


Figura 21: 4-metóxi-benzaldoxima e 4-toluil-benzaldoxima

As oximas foram obtidas na forma de cristais, cuja cor variou de acordo com o aldeído utilizado na reação e rendimento dessa reação pode variar entre 84% e 97%.

5.3 - Síntese do Cloreto de Hidroxiiminoila *para*-substituídos (28)



A partir das oximas formadas, tem-se o reagente principal para a formação dos cloretos de hidroxiiminoila *para*-substituídos.

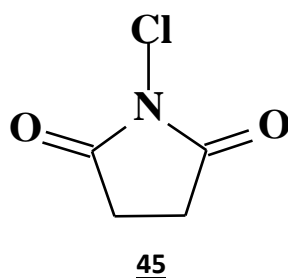
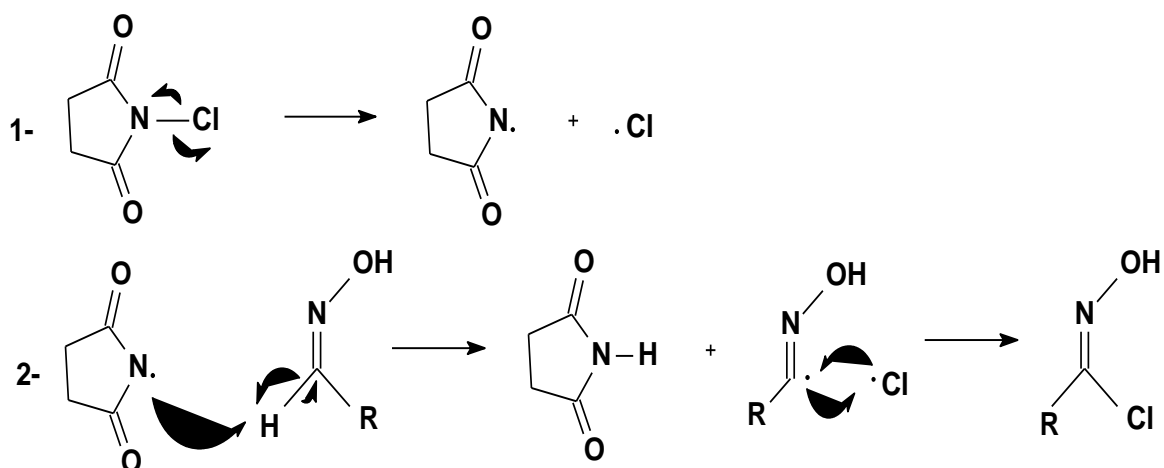


Figura 22: N-Clorosuccinimida

A reação ocorre utilizando o *N*-clorosuccinimida (**Figura 22**) como agente responsável pela doação de um átomo de cloro para a substituição do hidrogênio ligado ao carbono da nitrila. (**Esquema 19**).



Esquema 19: Mecanismo da reação das Oximas com o NCS

Essa reação favorece a cicloadição, pois, com o átomo de cloro presente na molécula tem-se um bom grupo de saída, quando o biciclo é formado.

Os cloretos de hidroxiiminoila *para*-substituídos, foram obtidos na forma de cristais e na forma de óleo, variando a coloração de acordo com o radical ligado ao anel aromático (**Figura 23**).

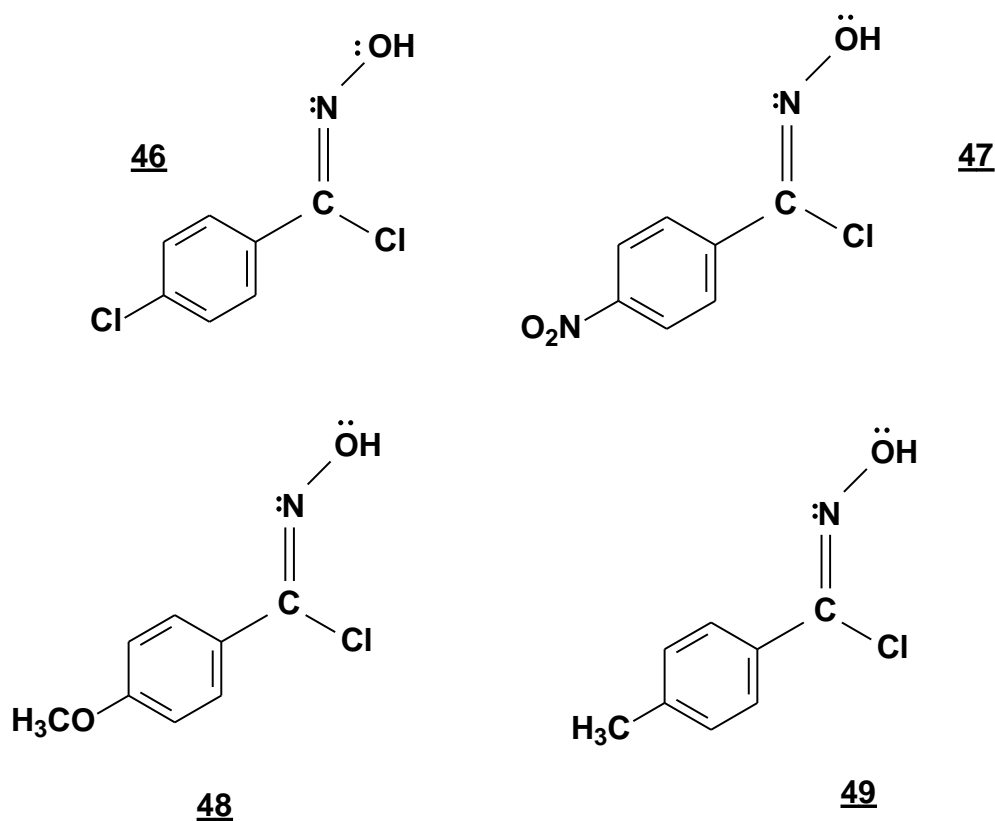
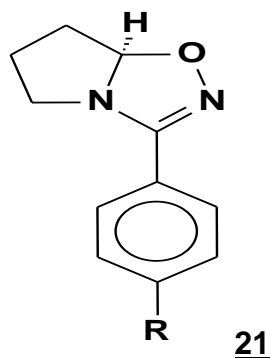


Figura 23: Cloretos de Hidroxiiminoila *para*-cloro (46), *para*-nitro (47), *para*-metóxi (48) e *para*-toluol (49) substituído

Os rendimentos das reações variam entre 78% a 88%, e essa variação pode estar relacionada ao tipo de substituinte ligado ao anel aromático do benzaldeído.

5.4 – Síntese das aril Δ^2 -1,2,4-oxadiazolinas bicíclicas *para* – substituídas (**21**)



As aril Δ^2 -1,2,4-oxadiazolinas bicíclicas *p*-substituídas foram formadas através da cicloadição 1,3-dipolar entre o monômero Δ^1 – Pirrolina **19** e os cloretos de hidroxiiminoila *para*-substituídas **46**, **47**, **48**, **49**. Essas reações são regidas pela Teoria dos Orbitais Moleculares de Fronteira, de acordo com o **Esquema 18**.

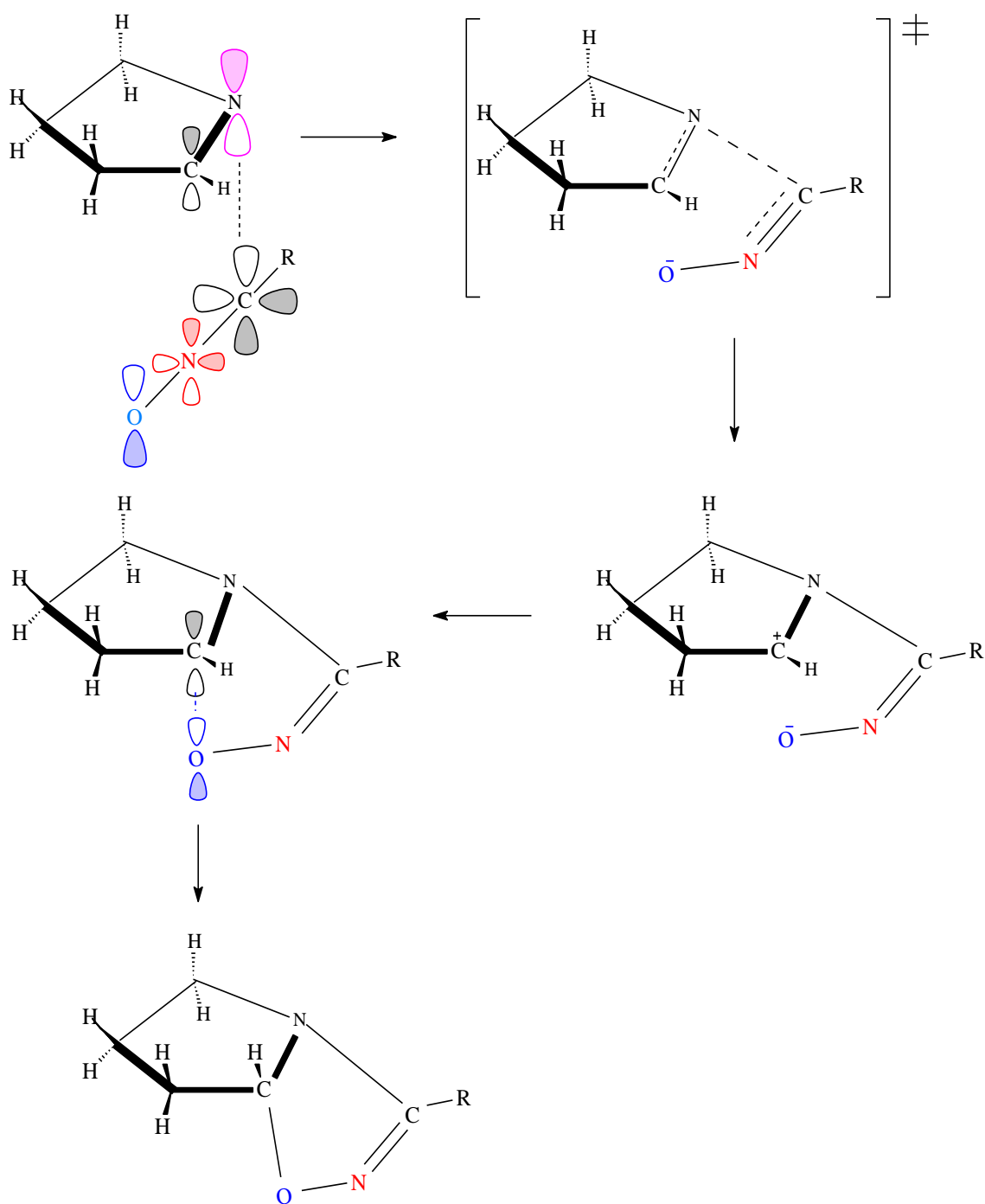
As reações de cicloadição 1,3-dipolar, ou [3+2], de um dipolo, neste trabalho os derivados do *N*-óxido de nitrila, com alquenos (dipolarófilos) envolvem quatro elétrons π do 1,3-dipolo, distribuídos por três átomos, e dois elétrons π do dipolarófilo.

As reações de cicloadição dipolares são classificadas de acordo com as energias relativas dos orbitais moleculares de fronteira do dipolo e do dipolarófilo: Reações controladas pelos orbitais HOMO do dipolo/ LUMO do dipolarófilo, as Reações controladas pelos orbitais LUMO do dipolo/ HOMO do dipolarófilo e por fim, as reações controladas pelos orbitais HOMO e LUMO de ambos. Portanto, uma análise dos coeficientes e dos níveis de energia dos orbitais HOMO e LUMO do dipolo e do dipolarófilo, nos indicará a possível reatividade e seletividade do sistema.

A Δ^1 – Pirrolina é uma imina cíclica que possuem uma dupla ligação, esta rica em elétrons e devido a isso seus orbitais HOMO possuem alta energia e são assimétricos. Por outro lado, os derivados dos *N*-óxidos de nitrilas, possuem o orbital LUMO mais estabilizado e com baixa energia relativa, fazendo com que a diferença

de energia entre esses orbitais (ΔE_1) seja menor do que se a reação ocorresse inversamente com o HOMO do dipolo e LUMO do dipolarófilo.

Logo, chega-se a conclusão que a análise das energias relativas de orbitais de fronteira indica que a reação de cicloadição 1,3-dipolar da Δ^1 -pirrolina com os derivados do *N*-óxido de nitrila será regida pelo HOMO da Δ^1 -pirrolina e LUMO dos derivados do *N*-óxido de nitrila, o que leva a um estado de transição de menor energia.

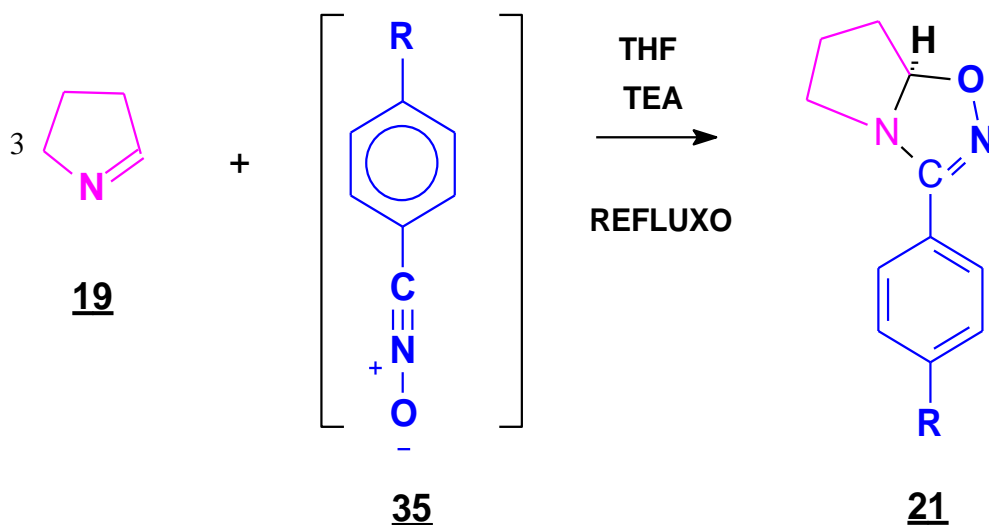


Esquema 20: Cicloadição 1,3 dipolar entre a Δ^1 -pirrolina e os derivados do N-óxido de Nitrila

Essa reação de cicloadição realizada tornou-se bem sucedida devido à alta reatividade e às propriedades eletrônicas dos derivados dos *N*-óxidos de nitrila que estão na reação como dipolo assim como a reatividade da insaturação presente na imina cíclica que estão na reação como dipolarófilos.

O primeiro passo é a reação entre a trietilamina (TEA) ao cloreto de hidroxiiminoila *para* - substituído, o que levará à formação do *N*-óxido de nitrila, composto de grande reatividade.

À medida que o *N*-óxido de nitrila vai se formando no meio reacional, vai ocorrendo outro ataque nucleofílico, desta vez pelo monômero Δ^1 -pirrolina ao *N*-óxido de nitrila, havendo, assim a formação do cicloaduto, objetivo principal deste trabalho (Esquema 19).



Esquema 21: Síntese do Cicloaduto Oxadiazolínico

O rendimento desta reação irá variar de acordo com alguns fatores, dentre eles deve-se dar uma maior atenção à forma de adição do cloreto de hidroxiiminoila ao meio reacional. Leva-se em consideração que assim que o precursor entra em contato com a TEA começa a formação do *N*-óxido de nitrila, e assim que é formado inicia-se a reação da cicloadição entre os dois reagentes.

Por esse motivo, a adição da solução do cloreto de hidroximiinoila em THF foi feita de forma bastante lenta, pois à medida que o dipolo é formado, ocorre uma reação secundária de dimerização do *N*-óxido de nitrila.

A adição rápida do precursor leva à formação de uma grande quantidade do dímero, e como consequência irá ocorrer perdas na concentração desse dipolo no meio reacional, o que irá ocasionar uma diminuição considerável no rendimento da reação. Após o término da adição da solução do precursor, aguarda-se o tempo necessário para o término da reação.

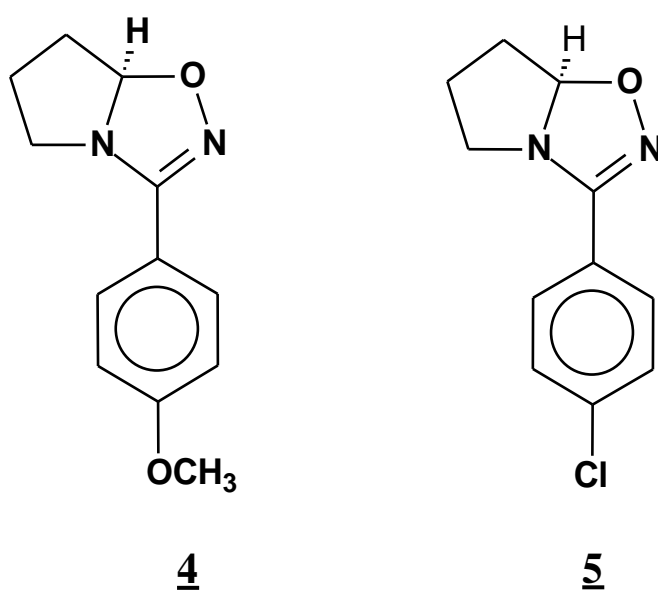


Figura 24: aril Δ^2 -1,2,4-oxadiazolinas bicíclicas *para*-metóxi e *para*-cloro.

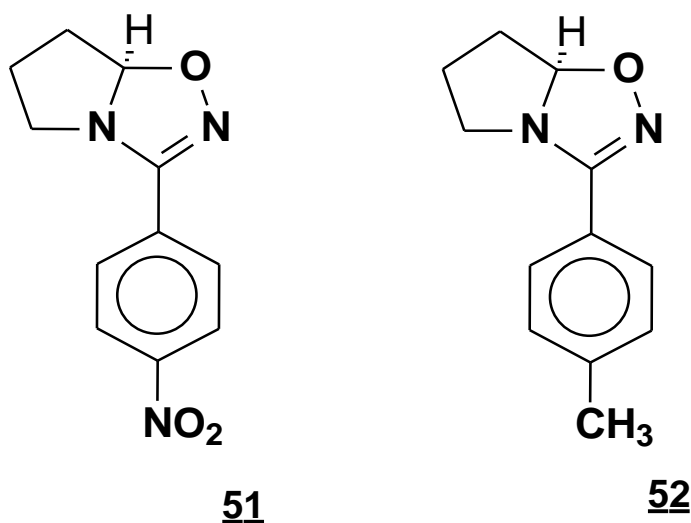


Figura 25: aril Δ^2 -1,2,4-oxadiazolinas bicíclica *para*-nitro e *para*-toluol.

Para confirmação dos resultados utilizou-se as técnicas de identificação pelos métodos espectrométricos de RMN de ^{13}C e de ^1H , IV e LC/MS-IT-TOF. Segue cada heterociclo formado com seus respectivos deslocamentos químicos de acordo com o RMN ^1H e ^{13}C .

5.4.1 - 3-(4-clorofenil)-5,6,7,7-a-tetraidropirrol [1,2-d] [1,2,4] oxadiazolina

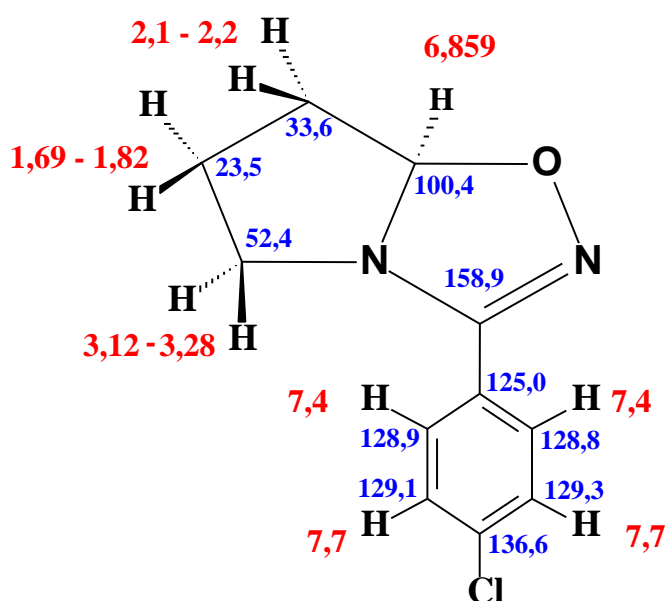


Figura 26: Deslocamentos químicos da 3-(4-clorofenil)-5,6,7,7-a-tetraidropirrol [1,2-d] [1,2,4] oxadiazolina

As figuras 27,28 e 29 mostram os espectros de Infravermelho, RMN ^1H e RMN ^{13}C do composto 3-(4-clorofenil)-5,6,7,7-a-tetraidropirrol [1,2-d] [1,2,4] oxadiazolina.

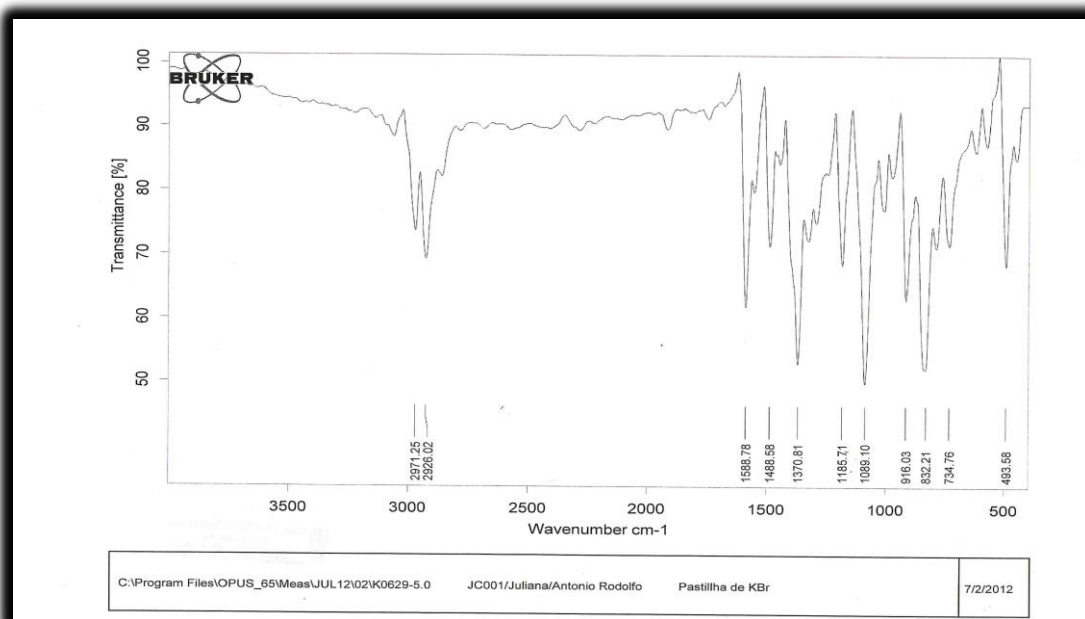


Figura 27: Espectro no Infravermelho (Janela de KBr, cm-1) da 3-(4-clorofenil)-a-tetraidropirrol [1,2-d] [1,2,4] oxadiazolina

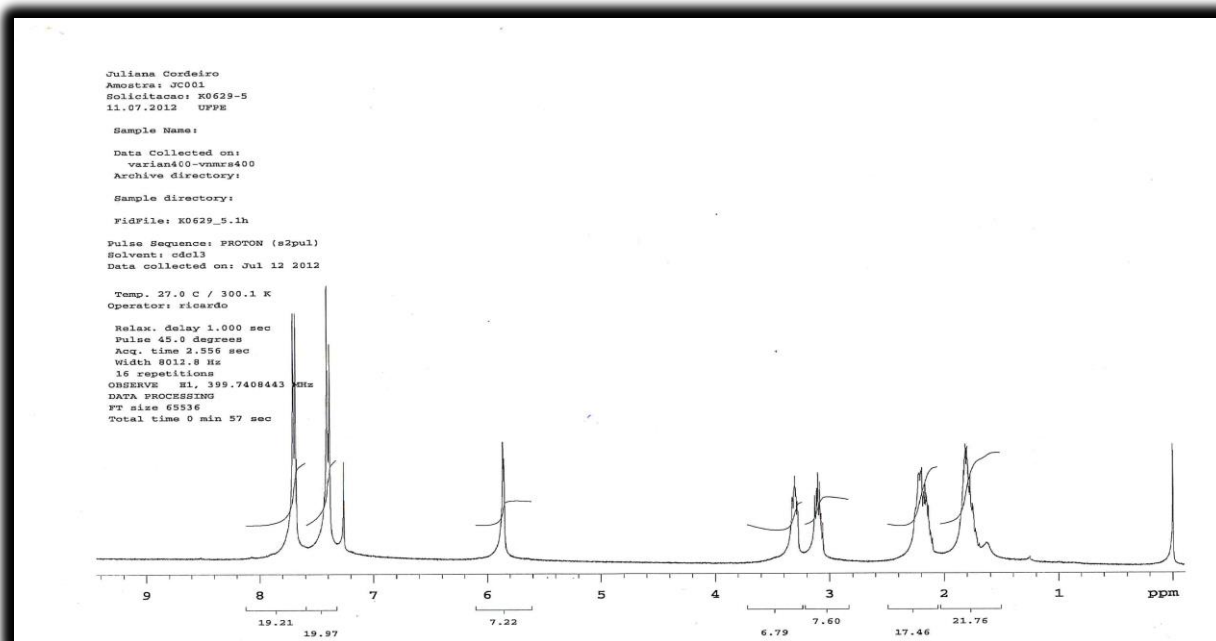


Figura 28: Espectro de RMN ^1H da 3-(4-clorofenil)-5,6,7,7-tetraidropirrol [1,2-d] [1,2,4] oxadiazolina

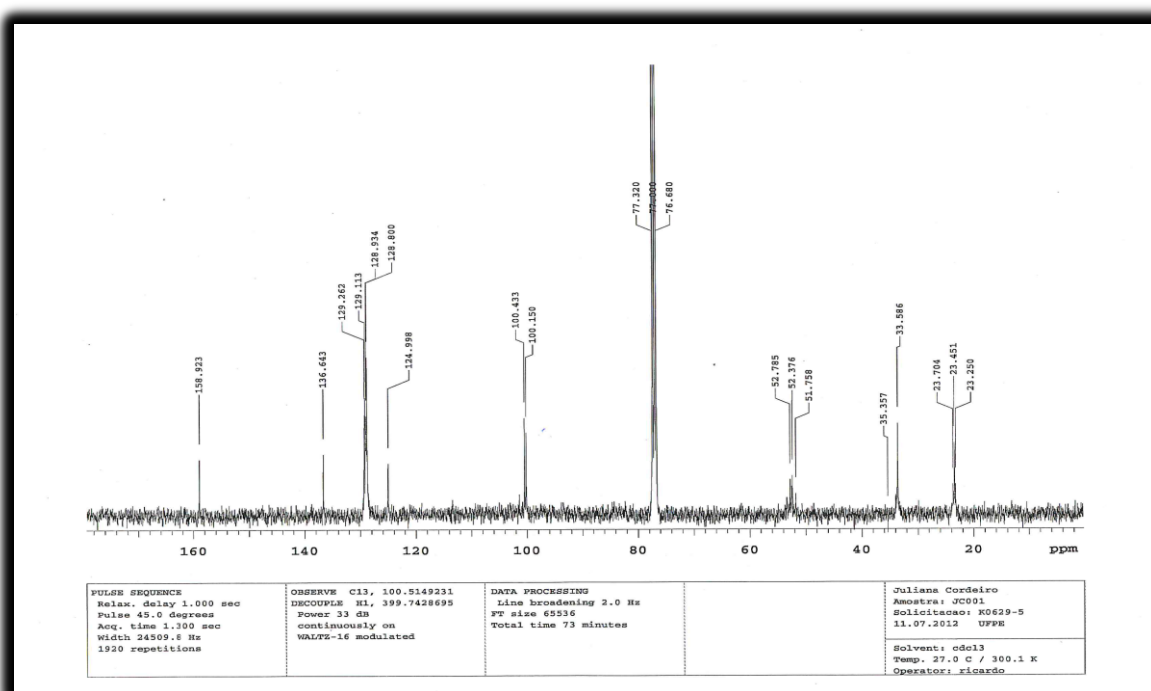


Figura 29: Espectro de RMN ^{13}C da 3-(4-clorofenil)-5,6,7,7-tetraidropirrol [1,2-d] [1,2,4] oxadiazolina

Os sinais característicos do novo heterociclo, de uma forma geral, são respectivamente 5,85 ppm no RMN de ^1H , referente ao hidrogênio ligado ao carbono quiral, próximo ao átomo de oxigênio, tornando-o desblindado e o sinal de 100,43 ppm em RMN de ^{13}C , referente ao carbono quiral. Esses sinais determinam que houve, de fato, a formação do cicloaduto desejado.

O sinal dos Hidrogênios ligados ao anel benzênico que são mais desblindados, por estarem próximos ao átomo de cloro ligado ao anel são evidenciados em um dubleto no RMN de ^1H em 7,7 ppm. No RMN de ^{13}C pode-se destacar o carbono do anel aromático ligado ao átomo de cloro cujo sinal é de 136,6 ppm. No IV-FT, é destacada a banda característica da ligação Cloro-Benzeno em torno de $1089,2\text{ cm}^{-1}$, outra banda é evidenciada em torno de $2971,81\text{ cm}^{-1}$ referente a vibração aromática em decorrência da deformação axial C-H aromáticos e a banda evidenciada em torno de $832,21\text{ cm}^{-1}$ referente a ligação Cl-C.

5.4.2- 3-(4-metilfenil)-5,6,7,7-a-tetraidropirrol [1,2-d] [1,2,4] oxadiazolina

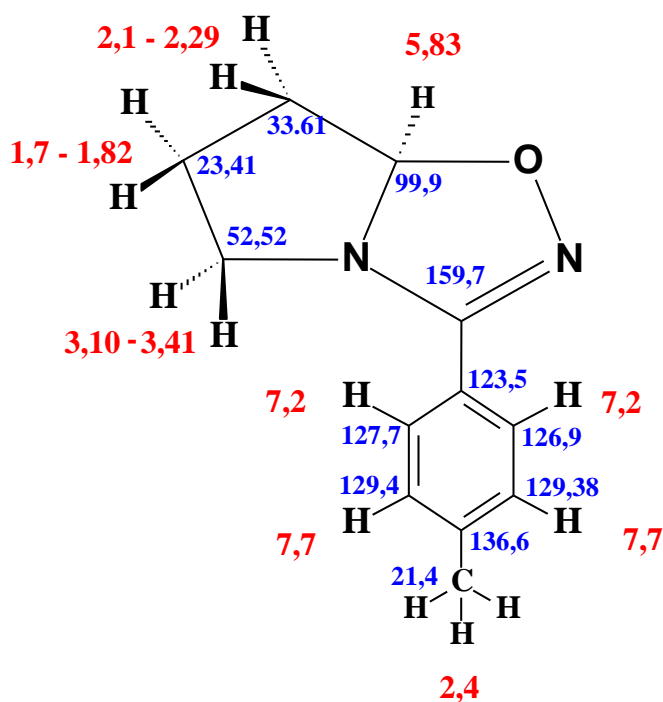


Figura 30: Deslocamentos químicos da 3-(4-metilfenil)-5,6,7,7 a-tetraidropirrol [1,2-d] [1,2,4] oxadiazolina

As figuras 31,32 e 33 mostram os espectros de Infravermelho, RMN ^1H e RMN ^{13}C do composto **3-(4-metilfenil)-5,6,7,7-a-tetraidropirrol [1,2-d] [1,2,4] oxadiazolina**

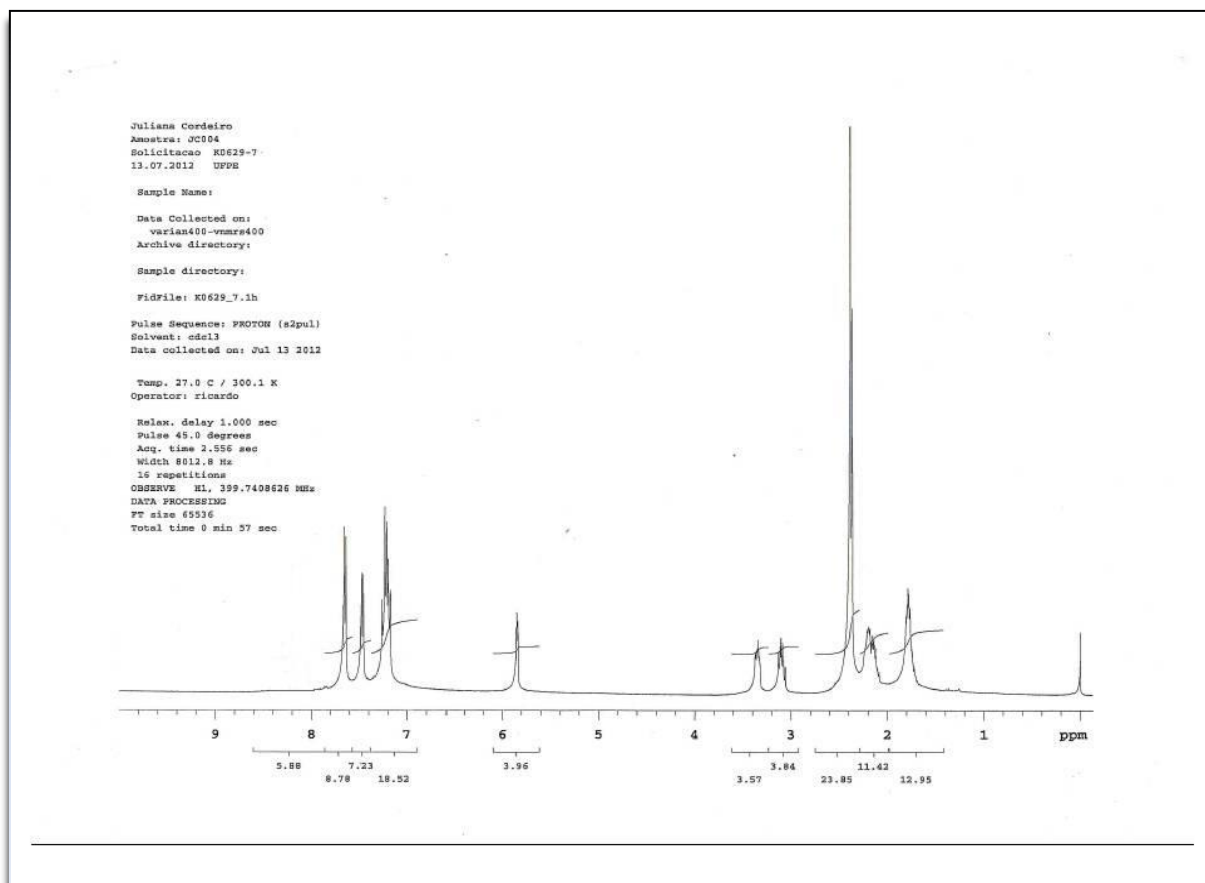


Figura 31: Espectro no infravermelho (Janela de KBr, cm⁻¹) da 3-(4-metilfenil)-5,6,7,7-tetraidropirrol [1,2-d] [1,2,4] oxadiazolina

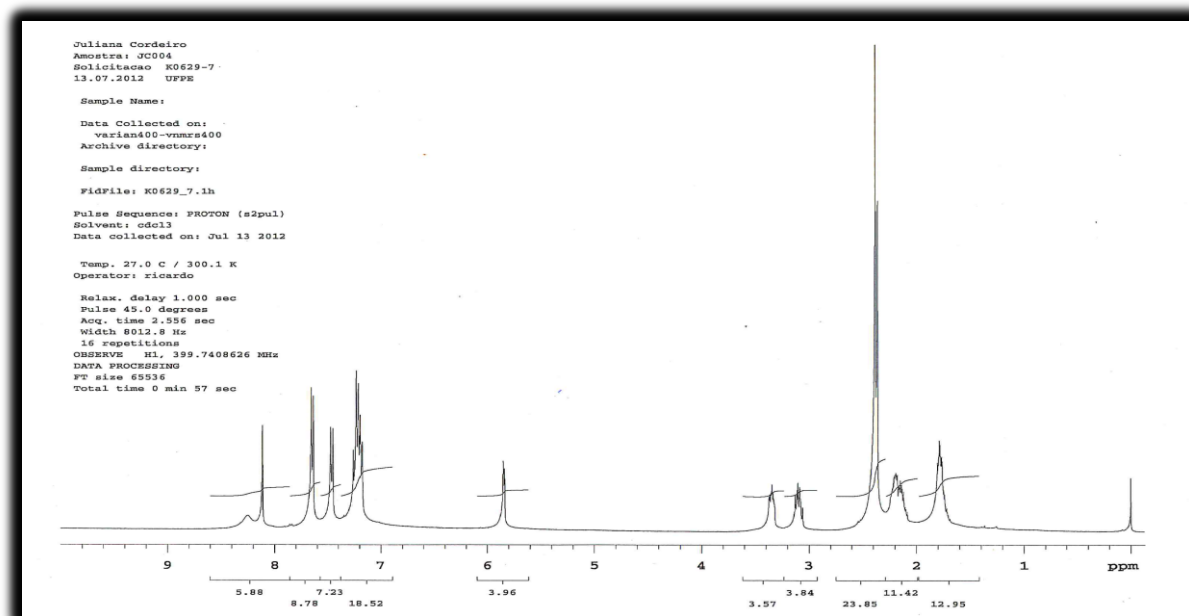


Figura 32: Espectro de RMN ¹H da 3-(4-metilfenil)-5,6,7,7-tetraidropirrol [1,2-d] [1,2,4] oxadiazolina

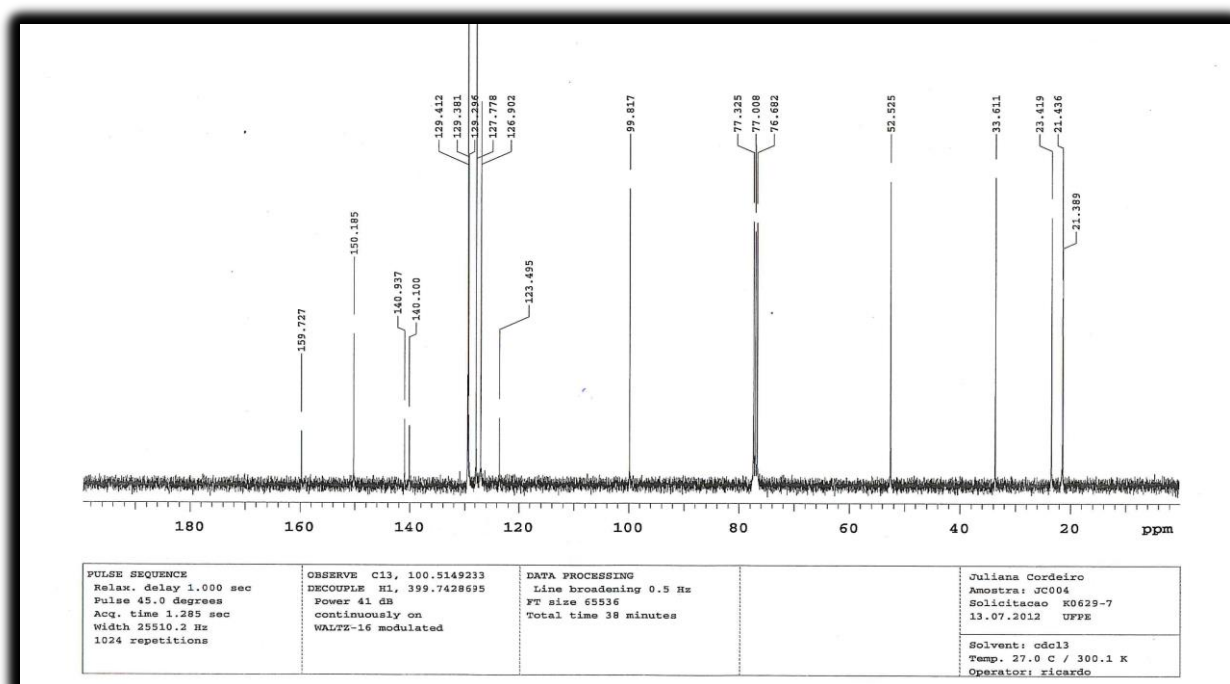


Figura 33: Espectro de RMN ^{13}C da 3-(4-metilfenil)-5,6,7,7-a-tetraidropirrol [1,2-d] [1,2,4] oxadiazolina

5.4.3- 3-(4-nitrofenil)-5,6,7,7-a-tetraidropirrol [1,2-d] [1,2,4] oxadiazolina

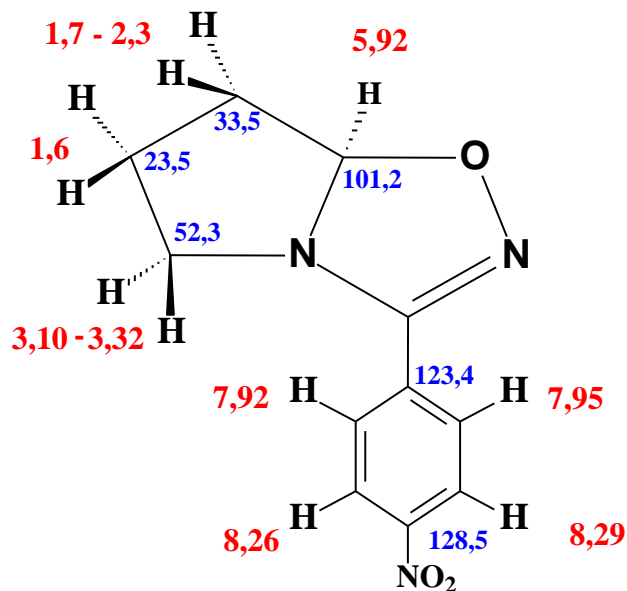


Figura 34: Deslocamentos químicos da 3-(4-nitrofenil)-5,6,7,7-a-tetraidropirrol [1,2-d] [1,2,4] oxadiazolina

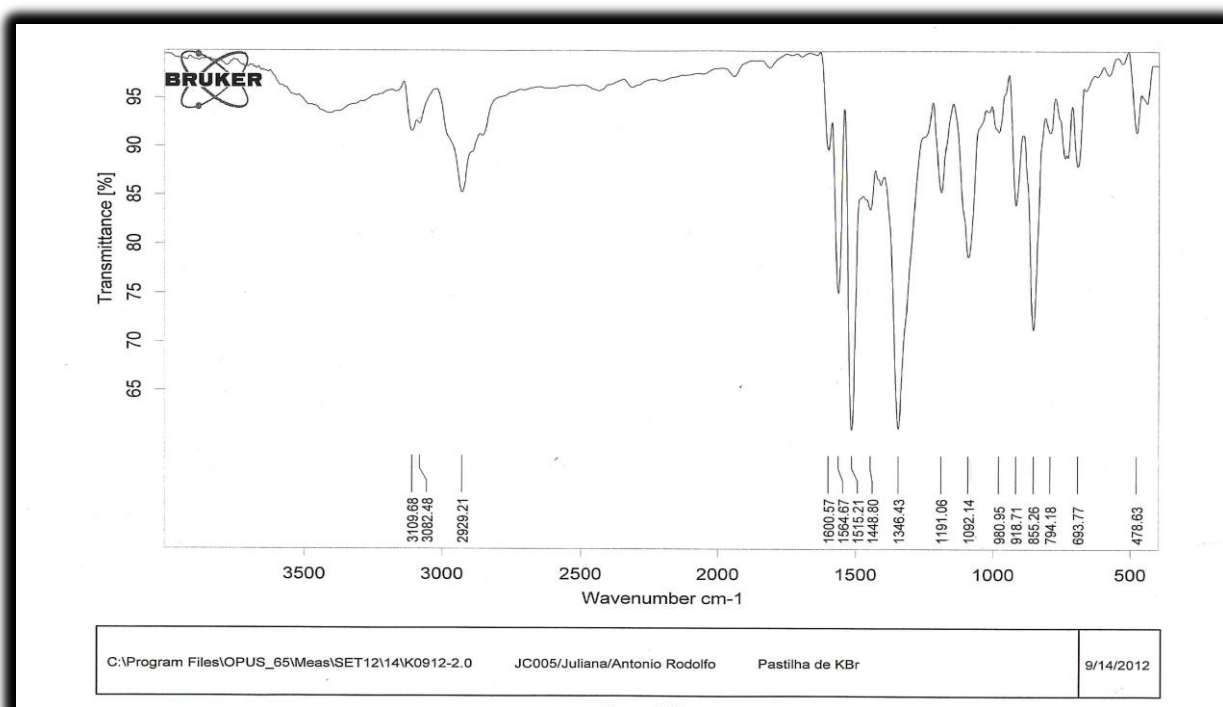


Figura 35: Espectro no infravermelho (Janela de KBr, cm-1) da 3-(4-nitrofenil)-5,6,7,7-a-tetraidropirrol [1,2-d] [1,2,4] oxadiazolina

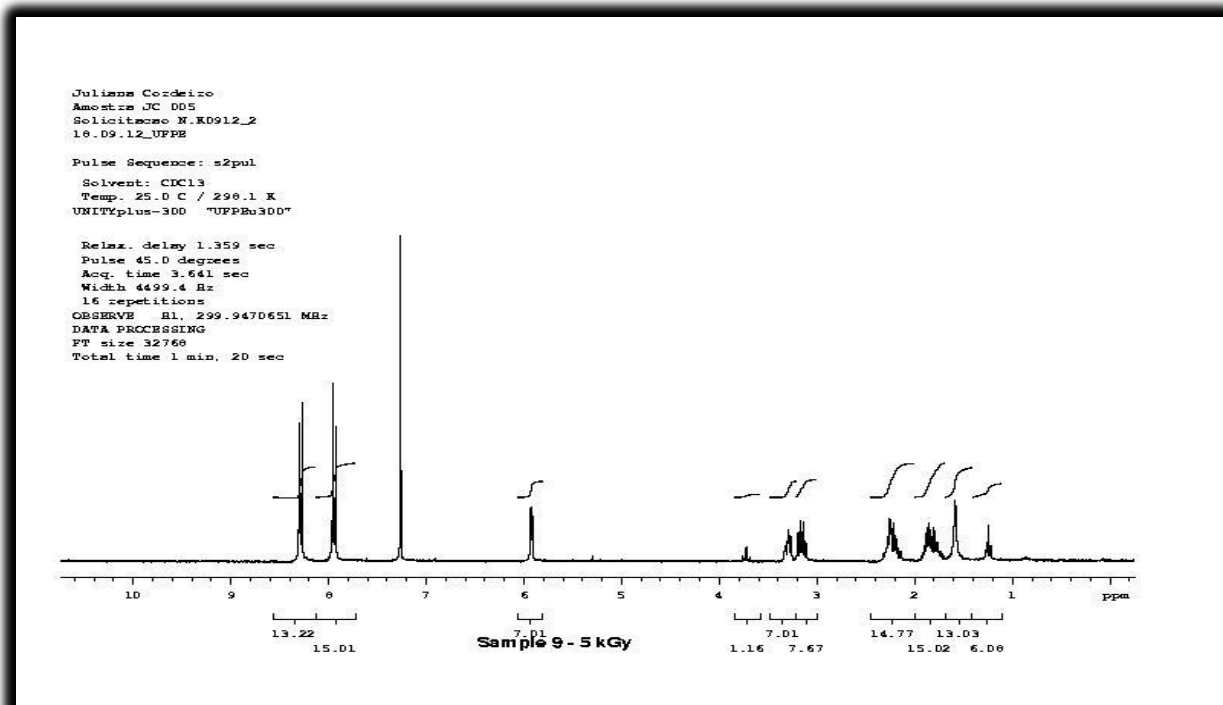


Figura 36: Espectro de RMN ^1H da 3-(4-nitrofenil)-5,6,7,7-a-tetraidropirrol [1,2-d] [1,2,4] oxadiazolina

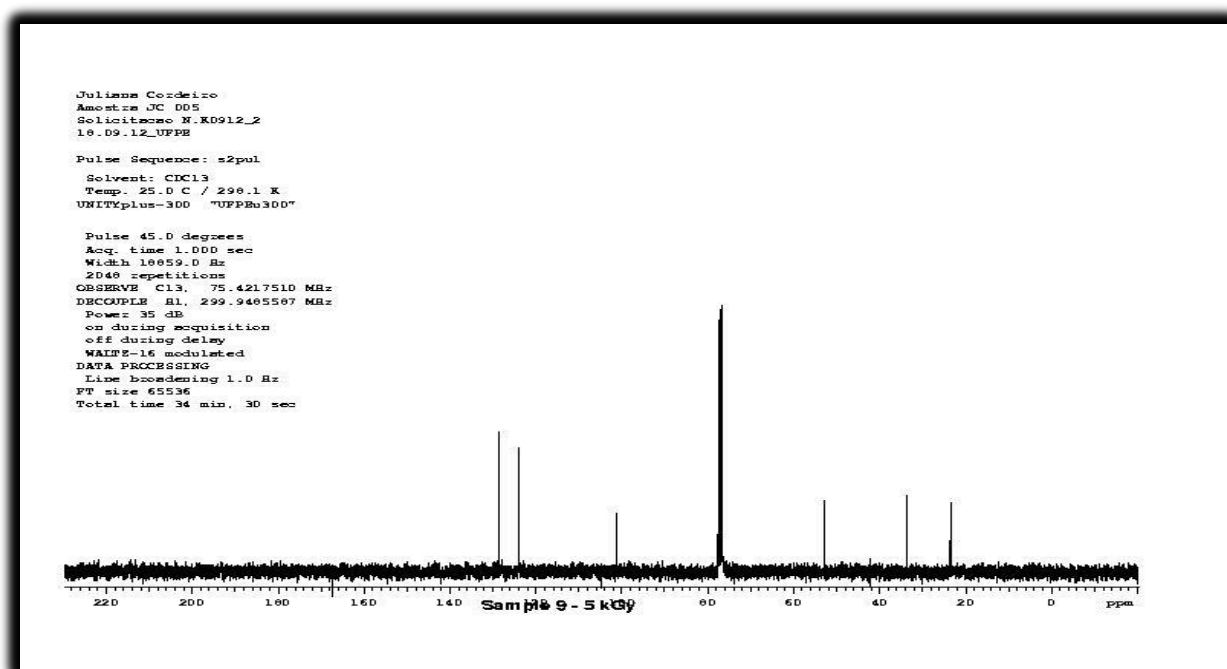
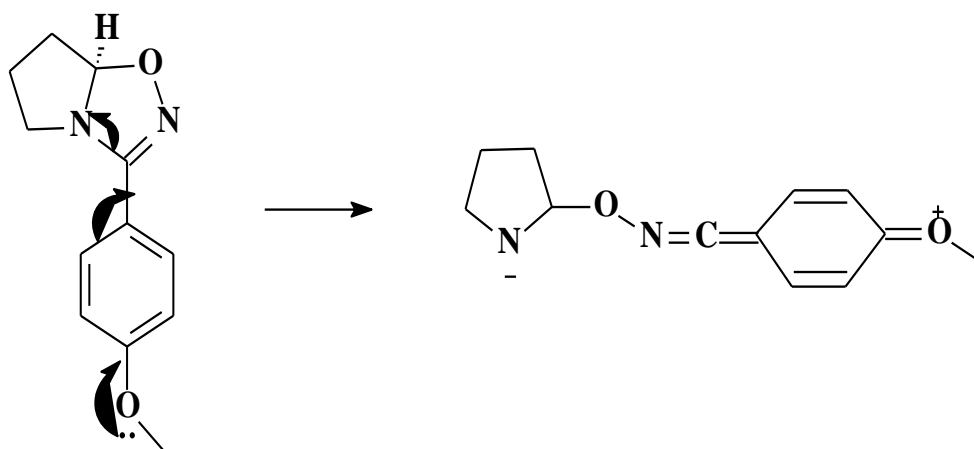


Figura 37: Espectro de RMN ^{13}C da 3-(4-nitrofenil)-5,6,7,7-a-tetraidropirrol [1,2-d] [1,2,4] oxadiazolina

5.4.4- 2-[[[4-(metiloxonio)cicloexilideno]metilideno}amino)oxi]pirrolidina-1-ide

Uma particularidade observada nesse composto formado foi a abertura do anel oxadiazolínico, que pode ser supostamente explicado devido o efeito doador de elétrons do grupo metóxi, isso pode ter favorecido essa abertura, causando a formação de um produto de degradação. O **Esquema 22** demonstra a provável estrutura resultante da abertura do anel oxadiazolínico.



Esquema 22: Abertura do anel oxadiazolínico

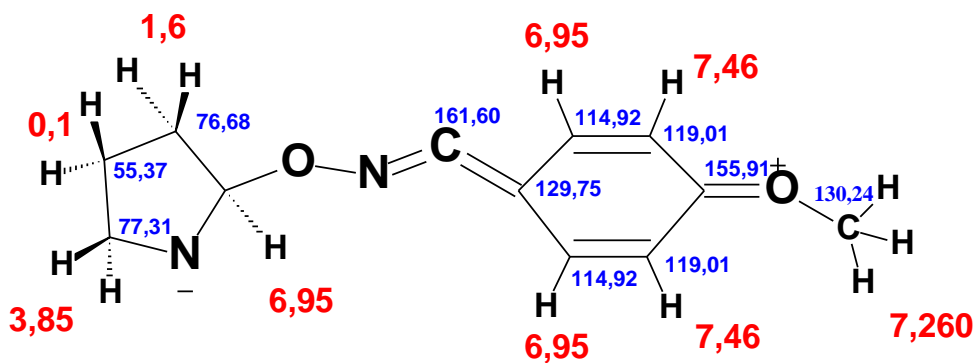


Figura 38: Deslocamentos Químicos da 2-[[[4-(metiloxonio)cicloexilideno]metilideno}amino]oxi]pirrolidina-1-ide

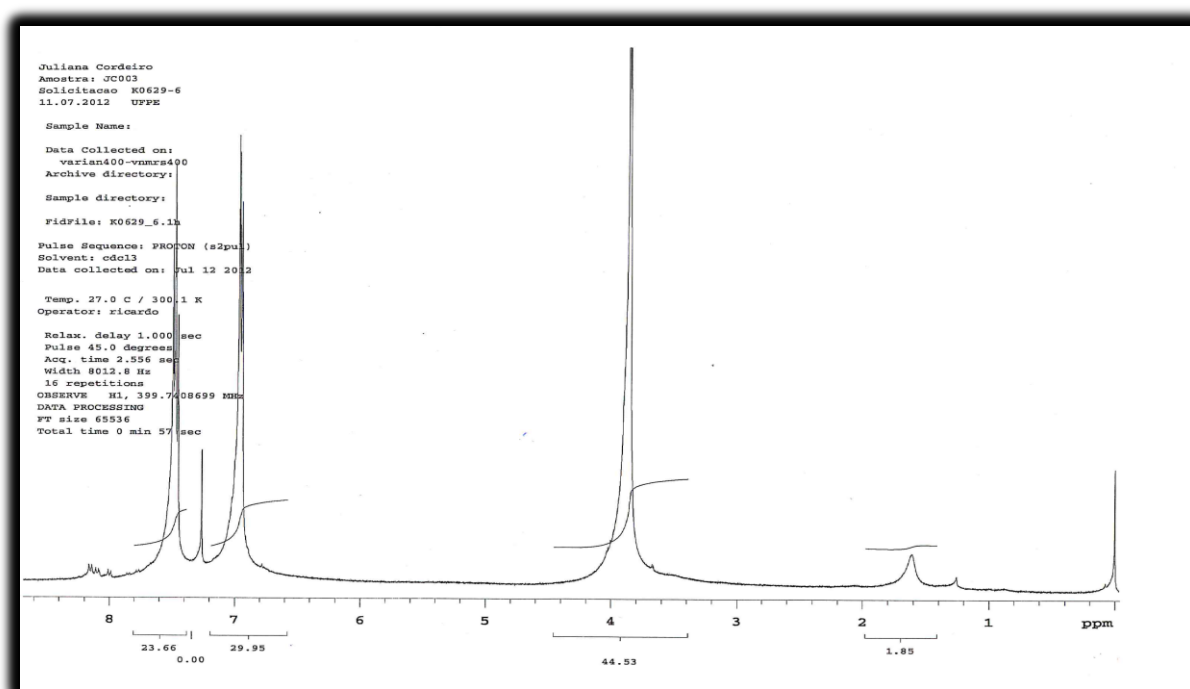


Figura 39: Espectro de RMN ^1H da 2-[[[4-(metiloxonio)cicloexilideno]metilideno}amino]oxi]pirrolidina-1-ide

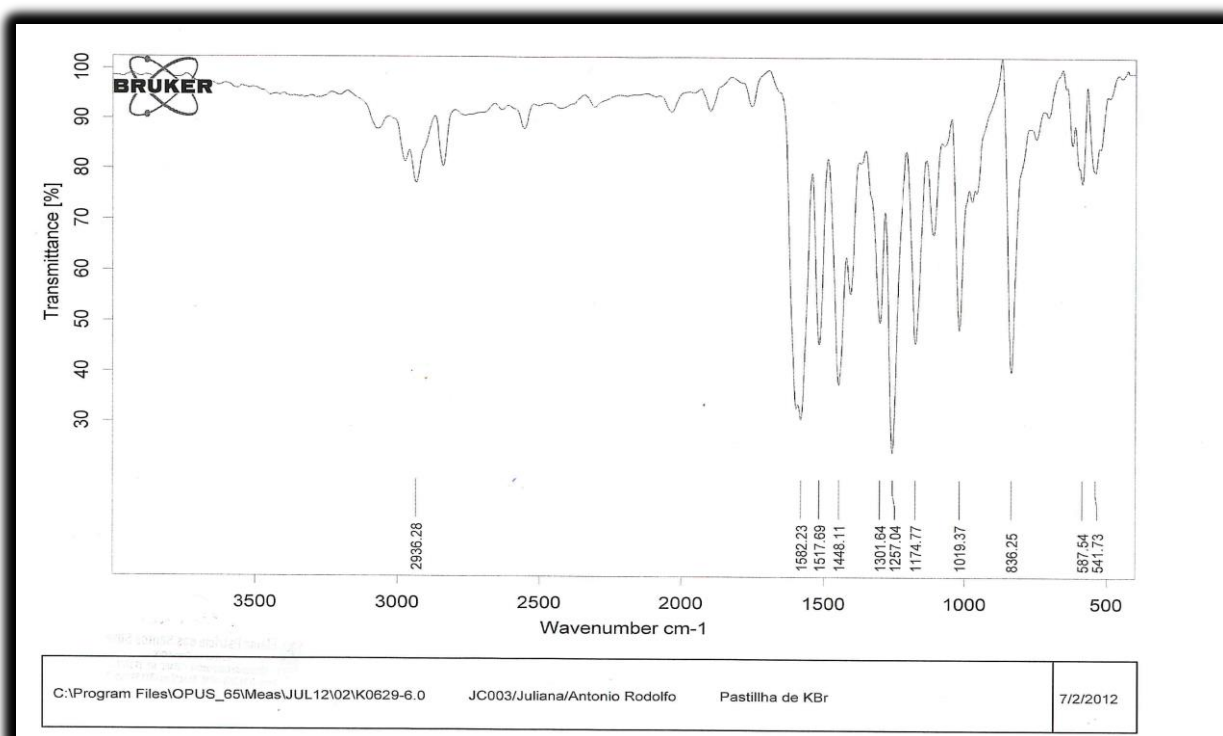


Figura 40: Espectro no infravermelho (Janela de KBr, cm-1) da 2-[[[4-(metiloxonio)cicloexilideno]metilideno]amino]oxi]pirrolidina-1-ide

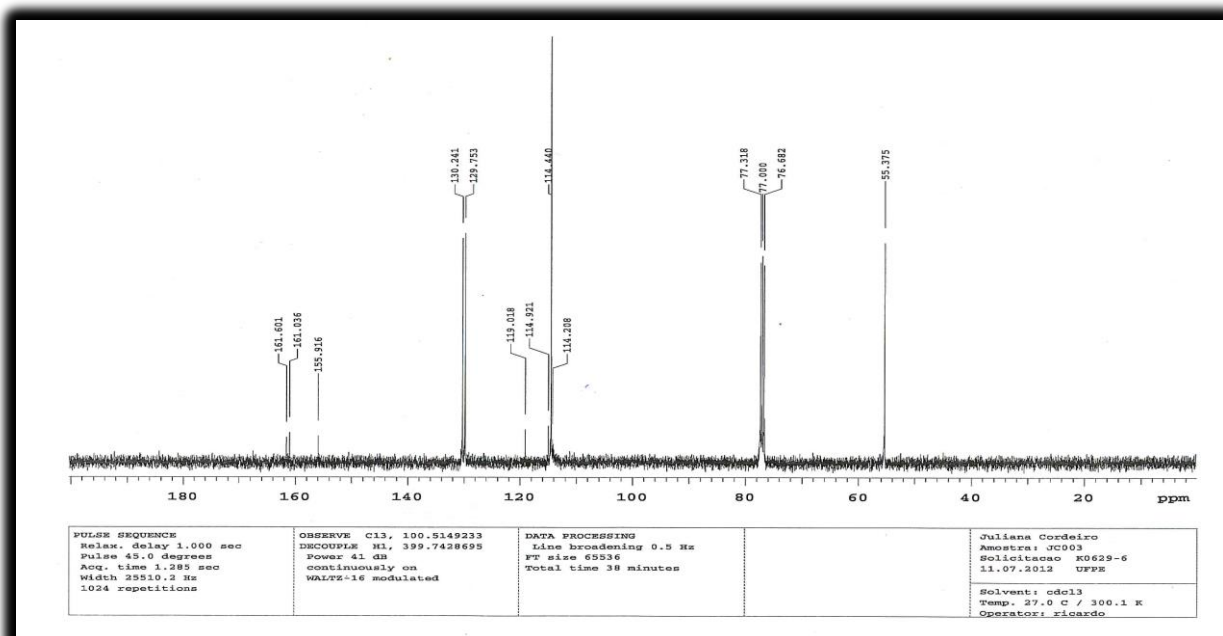


Figura 41: Espectro de RMN ^{13}C da 2-[[[4-(metiloxonio)cicloexilideno]metilideno]amino]oxi]pirrolidina-1-ide

Diferenciando os sinais dos espectros da substância 2-[[[4-(metiloxonio)cicloexilideno]metilideno]amino]oxi]pirrolidina-1-ide em relação às oxadiazolinas formadas, podemos observar a inexistência do sinal em torno de 100 ppm no RMN ^{13}C e do sinal em torno de 5 ppm no RMN ^1H , que são os sinais característicos da formação do anel oxadiazolínico.

Deve se levar em conta que dois procedimentos diferentes foram utilizados para a síntese da nova série de aril Δ^2 -1,2,4-oxadiazolinas bicíclicas *para*-substituídas, um deles é bem citado, usado e descrito na literatura, já o segundo foi posto em prática pelo grupo de pesquisa, que é o procedimento com o Ultrasson, este foi posto em prática depois de alguns testes, o que resultou na descoberta de um novo método mais simples para a síntese do mesmo grupo de moléculas.

Os rendimentos do procedimento usualmente empregado variaram entre 70% à 80%. Já os rendimentos do procedimento recentemente descoberto variaram entre 73,% à 82%.

Fazendo uma comparação entre os rendimentos dos compostos obtidos pelos dois procedimentos, observa-se que as diferenças nos rendimentos não são consideráveis, portanto não se deve tomá-lo como principal diferencial entre os dois métodos. O que devemos levar em consideração é o tempo de obtenção dos compostos que é muito menor no procedimento com o Ultrasson do que na síntese usual citada na literatura, onde se leva muito tempo para que os mesmos compostos sejam formados. Além do fator tempo, existem outros fatores que também devem ser considerados como a quantidade de vidrarias utilizadas e o grau de dificuldade para o manuseio das mesmas.

Todos estes resultados primeiramente foram confirmados experimentalmente, através do acompanhamento das reações por CCD, onde se percebe a formação de apenas um produto. Isto confirma todo o estudo teórico da reação, evidenciando a alta regioseletividade esperada.

Capítulo V - Procedimentos Experimentais

6 - Procedimentos Experimentais

6.1 – Materiais e Métodos

As reações de cicloadição 1,3-dipolar, e a síntese dos cloretos de hidroxiiminoila são extremamente sensíveis à umidade e foram realizadas sob atmosfera de argônio, em aparato previamente seco, em estufa, por no mínimo 4h, em uma temperatura de 110°C. Já a reação de preparação do trímero Δ^1 – pirrolina e a reação de síntese das oximas não requereu esses cuidados com a umidade, uma vez que são reações que utilizam água para dissolução dos componentes.

O solvente aprótico tetraidrofurano foi tratado com sódio e foi adicionada a benzofenona como indicadora de umidade nesse solvente, e foi destilado antes de ser usado nas reações. Já o clorofórmio e a trietilamina foram previamente tratados com hidreto de cálcio e também destilados, antes de serem adicionados às reações.

O acetato de etila e o *n*-hexano, utilizados nas colunas cromatográficas e na CCD como componentes do sistema eluente, foram bidestilados.

Os demais solventes e reagentes utilizados quando não especificados foram adicionados ao meio reacional sem prévio tratamento.

As análises realizadas por cromatografia em camada delgada (CCD) foram efetuadas em cromatofolhas de alumínio (gel de sílica 60), com espessura de 0,2 mm, contendo indicador para radiação ultravioleta, no comprimento de onda de 254 nm (UV254). A visualização das manchas foi efetuada com lâmpada de U.V. ENF – 2400 C/F, ácido fosfomolibdico 7% em etanol, seguido de aquecimento ou por absorção de vapor de iodo.

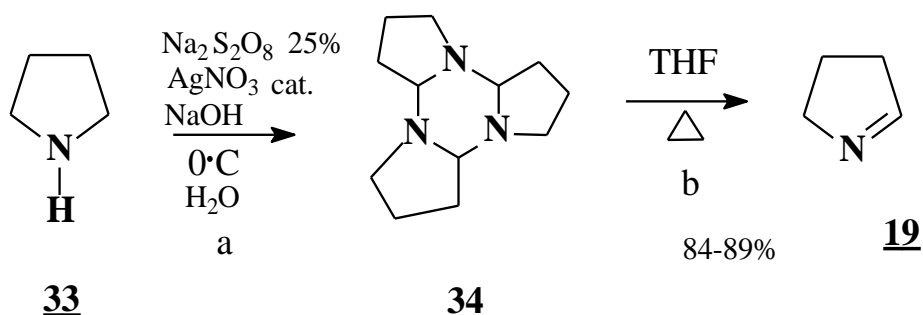
As colunas cromatográficas foram empacotadas com sílica gel 60 (230–400 mesh ASTM Macherey-Nagel) e eluídas sob pressão (Flash).

Os espectros no infravermelho (IV-FT) foram obtidos em aparelhos Bruker IFS 66 (transformada de Fourier), com as frequências das bandas de absorção sendo expressas em cm⁻¹, utilizando pastilhas ou janelas de KBr.

Os espectros de RMN de ¹H e de ¹³C foram obtidos em aparelhos Varian Unity 300 MHz, sendo os deslocamentos químicos (δ) expressos em ppm, tendo

como padrão interno o tetrametilsilano (TMS). Os solventes utilizados para as análises foram o clorofórmio deuterado, CDCl_3 . Os sinais dos espectros de RMN de ^1H são descritos da seguinte forma: deslocamento químico (ppm), multiplicidade (s = singlete, d = dubleto, dl = dubleto largo, t = tripuleto, tl = tripuleto largo, q = quarteto, dd = duplo dubleto, dt = duplo tripuleto, ddl = duplo dubleto largo, m = multipuleto, ml = multipuleto largo, sl = sinal largo), constante de acoplamento (Hz) e integração dos sinais, indicando o número de hidrogênios por sinal.

6.2 – Síntese e Caracterização Estrutural do Trímero da Δ^1 – PIRROLINA



Esquema 17: Síntese do trímero da Δ^1 – PIRROLINA

Uma solução aquosa de persulfato de sódio 25% (33,82 g; 144 mmols; 90 mL água) foi adicionada muito lentamente e sob vigorosa agitação, sobre uma solução de pirrolidina **33** (11,6 mL; 144 mmols), hidróxido de sódio (11,50 g; 288 mmols) e nitrato de prata (0,118 g; 0,65 mmol) em 90 mL de água a 0°C .

Ao término da adição da solução de persulfato de sódio, a solução foi deixada em agitação por mais 1 hora a 0°C e, em seguida, por 3 horas à temperatura ambiente.

Uma solução de cor escura foi extraída com o solvente diclorometano (3 x 40 mL). A fase orgânica resultante foi seca com sulfato de sódio anidro e, após remoção do solvente, obteve-se 8,44 g de um líquido amarelado viscoso, correspondendo a um rendimento de 84% do trímero **34**.

Como esse procedimento foi realizado por várias vezes, houve variações da massa obtida e consequentemente, variação dos rendimentos, estes ficaram na faixa entre 84% e 89%.

Para ser usado em um dos métodos para a obtenção do cicloaduto **21**, o trímero **34** passou por uma destilação com o solvente aprótico THF, para que ele sofresse destrimerização e fosse empregado na reação na sua forma de monômero **19**. O mesmo foi utilizado sem qualquer purificação adicional na reação de cicloadição 1,3 dipolar, o mais rápido possível, devido a sua instabilidade.

Propriedades Físicas do composto 19

- Óleo amarelo viscoso;
- Sensível a solventes próticos

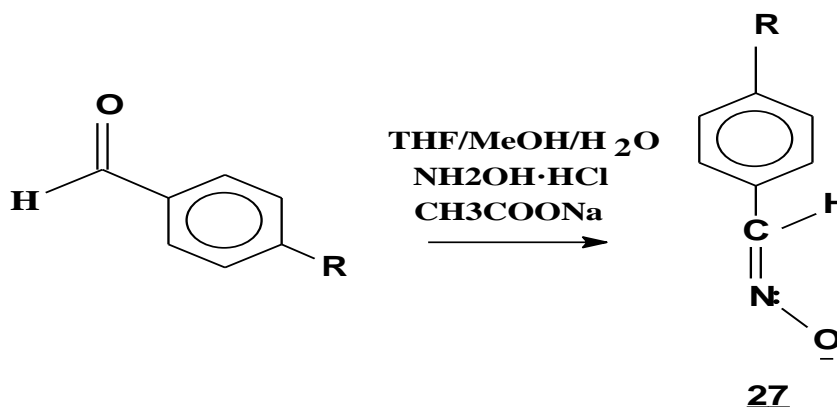
Dados Espectrométricos do composto 19

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

(parte do monômero está presente devido ao equilíbrio).

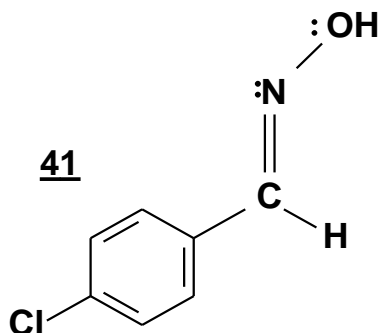
1,75 (m); 2,28 (m); 2,50 (m); 2,99 (m); 3,82(m); 7,59 (s).

6.3 - Síntese e Caracterização Físico-Química das Oximas *para* – substituídas (Esquema 21)



Esquema 23: Síntese das oximas *para* – substituídas

6.3.1 – 4-cloro benzaldoxima (41)



Em um balão de fundo redondo contendo o solvente THF (30 ml), não destilado, adiciona-se, sob agitação, o benzaldeído *para*-cloro substituído (1,569 ml e 11 mmols) para que seja solubilizado. Após essa solubilização adiciona-se o metanol (30 ml) e a água (30 ml). Em seguida, é adicionado o hidrocloreto de hidroxilamina (1,5287g e 22 mmols), após a total solubilização deste reagente é adicionado o acetato de sódio anidro (2,706g e 33 mmols). Todo esse processo deve ocorrer sob vigorosa agitação.

A reação permaneceu dessa forma durante toda a noite e apenas no dia seguinte, após ser adicionada mais 60 ml de água foi feita a sua extração. Essa extração foi feita com o CH_2Cl_2 (2 x 50 ml). Em seguida a fase orgânica foi lavada com uma solução aquosa saturada de bicarbonato de sódio (15 ml) em um funil de decantação.

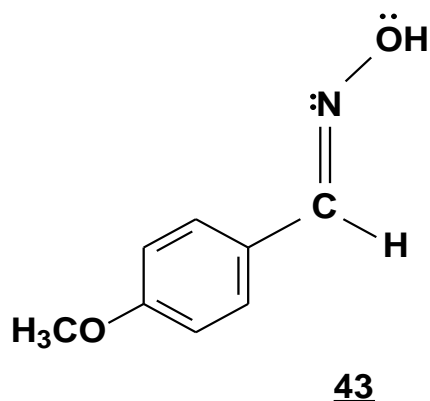
Após a separação, a fase orgânica foi seca com o carbonato de sódio, previamente seco na estufa por 24hs, e em seguida foi retirado o solvente através do processo de rota-evaporação. O sólido resultante foi lavado com o solvente hexano, de preferência em baixa temperatura e após a filtração em funil sinterizado têm-se a respectiva oxima.

Características:

Fórmula Molecular: $\text{C}_7\text{H}_6\text{ClNO}$; P.M.: 155,5 g/mol; Sólido de coloração branca;

Massa Obtida: 1,5132 g; Rendimento: 88% ; Rf: 0,23; P.F.: 73-76 °C

6.3.2 – 4-metóxi benzaloxima (43)



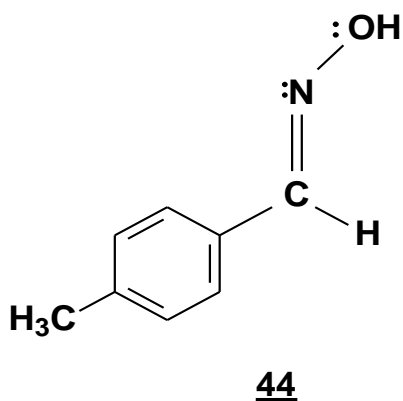
O procedimento sintético para esta molécula é o mesmo citado na Síntese da 4-cloro benzaldoxima.

Características:

Fórmula Molecular: $C_8H_9NO_2$; P.M.: 151 g/mol; Sólido de coloração amarela;

Massa Obtida: 1,6132 g; Rendimento: 90%; P.F.: 60 - 61 °C; Rf: 0,23

6.3.3 – 4-toluil benzaldoxima (44)



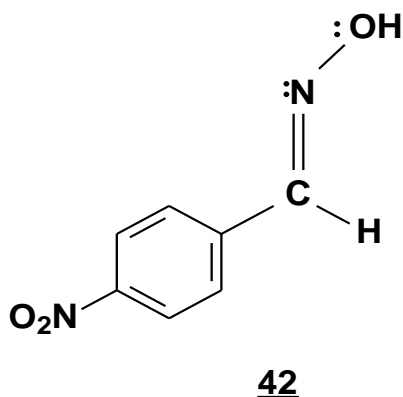
O procedimento sintético para esta molécula é o mesmo citado na Síntese da 4-cloro benzaldoxima.

Características:

Fórmula Molecular: C_8H_9NO ; P.M.: 135 g/mol; Óleo viscoso transparente;

Massa Obtida: 2,8756 g; Rendimento: 96%; P.F.: 59-61 °C; Rf: 0,23

6.3.4 – 4-nitro benzaldoxima (45)



O procedimento sintético para esta molécula é o mesmo citado acima na Síntese da 4-cloro benzaldoxima

Características:

Fórmula Molecular: $C_7H_6N_2O_3$; P.M.: 166 g/mol; Sólido de coloração amarela

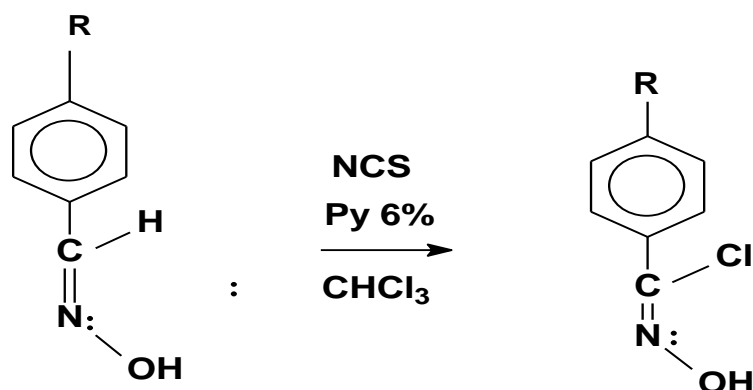
Massa Obtida: 3,4796 g; Rendimento: 95%; P.F.: 132-134 °C; Rf: 0,23

Os rendimentos e aspectos das reações foram variados e estão descritos na **Tabela 1**.

Tabela 1: Aspecto e Rendimento das Oximas

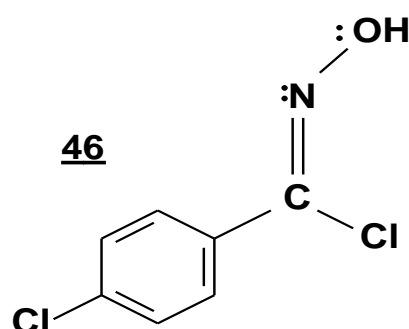
Aspecto/Rendimento das Oximas <i>para</i> – substituídas		
Substituinte	Coloração	Rendimento
R = Cl	Branco	88%
R = OCH ₃	Amarelo	90%
R = CH ₃	Branco	96%
R = NO ₂	Amarelo	95%

6.4 – Síntese e Caracterização Físico-Química dos cloretos de hidroxiiminoila *p*-substituídos (Esquema 22)



Esquema 24: Reação da síntese dos cloretos de hidroximiinoila *p*-substituídos

6.4.1– Síntese do 4-cloro-*N*- cloreto de hidroxibenzenocarboximinoila (46)



Em um balão de fundo redondo, o mesmo que será utilizado na reação, pesa-se o *N*-clorosuccinimida (NCS) (0,8736g e 6,5412 mmols) e em seguida adiciona-se o clorofórmio (10,49 ml), esse processo deve ser feito sob agitação vigorosa, para que todo NCS seja solubilizado. Após a solubilização do NCS, adiciona-se a solução de piridina 6% (0,5025 ml) que exercerá a função de catalisadora da reação. A oxima *para*-substituída (1 g e 6,15 mmols) deve ser adicionada a esta mistura de uma única vez e em último lugar.

Essa reação tem o objetivo de substituir o átomo de hidrogênio da ligação nitrila pelo átomo de cloro e essa cloração ocorre quando o NCS que está em suspensão desaparece totalmente. O tempo para que essa reação ocorra totalmente é de no máximo duas horas, o controle é feito pela CCD a cada 20 minutos e o padrão para eluição é de 20% do solvente acetato de etila em relação ao solvente *n*-hexano.

Após a cloração da oxima *p*-substituída pelo NCS, adiciona-se aproximadamente 4 a 5 gotas de Ácido Clorídrico (HCL) concentrado e aproximadamente 20 ml de água para que não haja nenhum resquício de NCS no meio reacional.

Após esse processo, dá-se início a extração do cloreto de hidroximinoila *p*-substituído, utilizando o solvente diclorometano (CH₂Cl₂) 3 x 25 ml. Recolhe-se a fase orgânica resultante, faz-se a secagem com Na₂SO₄ anidro e inicia-se o processo de rota-evaporação do solvente, para que resulte apenas o produto final. Os cloretos de hidroximinoila foram usados sem nas reações de ciclodição sem a prévia purificação.

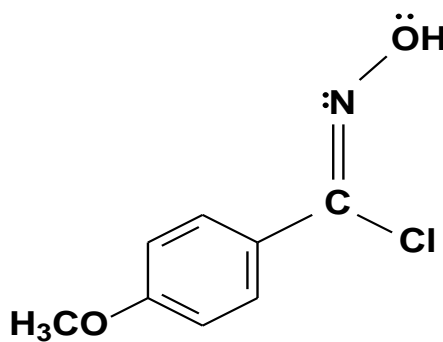
Características:

Fórmula Molecular: C₇H₅Cl₂NO; P.M.: 190,0267 g/mol;

Sólido de coloração branca; Massa Obtida: 0,3988 g;

Rendimento: 86%; Rf: 0,23

6.4.2- *N*-hidroxi-4-cloreto de hidroxibenzenocarboximinoila (48)



48

O Procedimento da síntese é o mesmo do 4-cloro-N- cloreto de hidroxibenzenocarboximinoila, variando apenas as quantidades dos reagentes e o tipo de oxima utilizada.

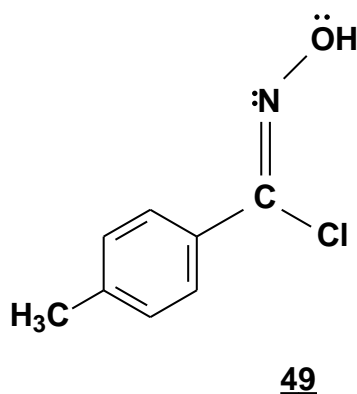
Características:

Fórmula Molecular: $C_8H_8ClNO_2$; P.M.: 185,70 g/mol;

Sólido de coloração amarela; Massa Obtida: 0,4718 g;

Rendimento: 79%; Rf: 0,23

6.4.3– N-hidroxi-4-cloreto de metilbenzenocarboximinoila (49)



O Procedimento da síntese é o mesmo do 4-cloro-N- cloreto de hidroxibenzenocarboximinoila, variando apenas as quantidades dos reagentes e o tipo de oxima utilizada.

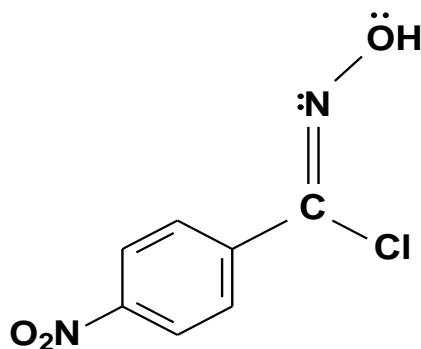
Características:

Fórmula Molecular: C_8H_8ClNO ; P.M.: 169,6082 g/mol;

Óleo viscoso transparente; Massa Obtida: 0,4182g;

Rendimento: 84%; Rf: 0,23

6.4.4– 4-nitro-N- cloreto de hidroxibenzenocarboximinoila (47)

**47**

O Procedimento da síntese é o mesmo do 4-cloro-N-cloreto de hidroxibenzenocarboximinoila, variando apenas as quantidades dos reagentes e o tipo de oxima utilizada.

Características:

Fórmula Molecular: $C_7H_5ClN_2O_3$; P.M.: 200,5 g/mol;

Sólido de coloração amarela; Massa Obtida: 0,6143 g;

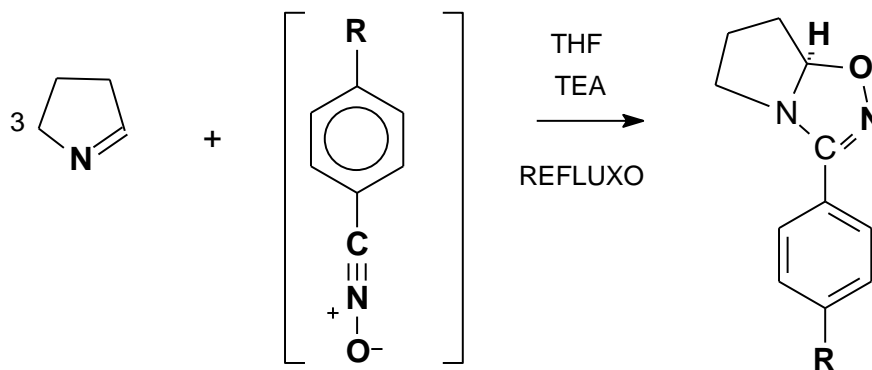
Rendimento: 87%; Rf: 0,23

O rendimento da reação irá variar de acordo com o ligante presente na posição *para* do anel benzênico e está descrito na **Tabela 2**:

Tabela 2: Aspecto e Rendimento dos Cloretos de hidroxiiiminoila *para*-substituídos

Aspecto /Rendimento dos Cloretos de Hidroxiiiminoila <i>para</i>- substituídas		
Substituinte	Aspecto	Rendimento
R = Cl	Cristais Brancos	86%
R = OCH₃	Cristais Amarelos	79%
R = CH₃	Óleo Transparente	84%
R = NO₂	Cristais Amarelos	87%

6.5 - Reação de cicloadição 1,3 dipolar para a formação das aril Δ^2 -1,2,4-oxadiazolinas bicíclicas *para*-substituídas (Esquema 23)

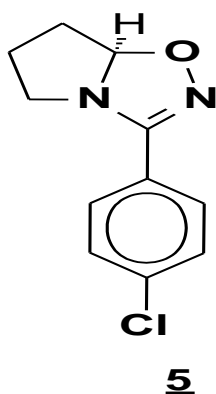


Esquema 25: Cicloadição 1,3 dipolar para a formação das aril Δ^2 -1,2,4-oxadiazolinas bicíclicas *para*-substituídas

Para a realização da síntese da nova série de aril Δ^2 -1,2,4-oxadiazolinas bicíclicas *para*-substituídas foram propostos dois procedimentos distintos, um já é bem descrito na literatura, enquanto o segundo foi proposto pelo grupo de pesquisa que é o método em que se usa o ultrassom, os dois procedimentos serão devidamente descritos nos parágrafos a seguir.

Procedimento 1

6.5.1- Reação de cicloadição 1,3 dipolar para a formação da 3-(4-clorofenil)- 5,6,7,7-a-tetraidropirrol[1,2-d][1,2,4]oxadiazolina (5)



Em um balão de 250 ml de fundo redondo, contendo o trímero Δ^1 -pirrolina (0,1238 g e 0,5983 mmols) foi adicionado o THF (aprox. 7 ml), esse balão já continha um agitador magnético, pois esta reação deve ocorrer sob forte agitação.

Após a adição do THF o balão foi acoplado ao microdestilador, que já possuía uma bexiga de argônio e um balão de duas bocas acoplados a ele e em seguida foi devidamente colocado em um banho de silicone á uma temperatura de, aproximadamente 90 °C.

Cerca de uma hora e meia depois da codestilação iniciar-se, o balão com o destilado (incolor) foi levado à refluxo acoplado, desta vez, a um condensador. Nesse processo o banho de silicone foi mantido, pois a temperatura deve estar na faixa entre 80 °C e 90 °C.

Esse refluxo do codestilado durou cerca de trinta minutos e após esse tempo adicionou-se a TEA (0,2970 ml e 2,1324 mmols) e por fim a solução do cloreto de hidroxiiiminoila *para*-substituído (0,3988 g e 1,0006 mmols) e THF (aprox. 5ml deste para solubilizar aquele). Essa adição deve ser feita de forma muito lenta para evitar a excessiva formação de sub-produtos indesejáveis formado no meio reacional, fazendo com que diminua o rendimento da reação. Terminado esse processo deixa-se a reação em refluxo por mais uma hora e meia e então se desliga o aquecimento e deixa-se apenas sob agitação à temperatura ambiente. A reação permanece, por aproximadamente vinte e quatro horas e enfim o produto é filtrado em kitassato e funil sinterizado. O filtrado foi seco com Na₂SO₄ e filtrado novamente, e enfim, transferido para um balão cônico e levado ao rotaevaporador para a retirada do solvente. Após isso o produto foi lacrado e levado ao freezer.

Todo o processo da reação é acompanhado por CCD e o sistema de eluição das placas cromatográficas é 20% de acetato em hexano.

As concentrações de todos os reagentes da reação irão variar de acordo com o cicloadulto desejado. Mas, o procedimento descrito acima é o mesmo para todos os produtos almejados neste trabalho.

Na **Tabela 3** está descrito a massa obtida de cada cicloadulto formado.

Tabela 3: Massa das Oxadiazolinas obtidas pelo procedimento 1

Massa dos Cicloadutos	
R = Cl	0,5174 g
R=NO ₂	0,5179 g
*R=OCH ₃	0,5802 g
R=CH ₃	0,4047 g

*Oxadiazolina não formada

Na **Tabela 4** estão descritos os aspectos e os respectivos rendimentos dos produtos obtidos, utilizando esse procedimento.

Tabela 4: Rendimentos dos Cicloadutos Procedimento 1

Substituente	Rendimento
R = Cl	80%
*R = OCH ₃	70%
R = CH ₃	76%
R = NO ₂	77%

*Cicloaduto não formado

Procedimento 2 – Reação com o uso do Ultrasson

6.5.2- Reação de cicloadição 1,3 dipolar para a formação da 3-(4-clorofenil)- 5,6,7,7-a-tetraidropirrol[1,2-d][1,2,4]oxadiazolina (5)

Em um balão de duas bocas, onde será feita a reação, adiciona-se o trímero Δ^1 -pirrolina (0,1238 g e 0,5983 mmols), e o THF (aprox. 7 ml), em seguida acopla uma das bocas ao agitador eletrônico, onde o mesmo permanece em um banho com água no recipiente do ultrasson. A outra boca do balão é vedada com um septo de borracha e é por esta outra boca que serão adicionados os demais reagentes.

O trímero Δ^1 -pirrolina permanece no banho por meia hora com o solvente (é possível programar o tempo de uso no aparelho) e em seguida segue-se com a adição dos outros reagentes. O próximo reagente é a TEA (0,2970 ml e 2,1324 mmols), a sua adição é feita com a seringa através do septo. Terminado a adição da TEA deixa-se a por cerca de 20 minutos e prossegue-se com a adição do cloreto de hidroxiiminoila *para*-substituído (0,3988g e 1,0006 mmols). Essa adição do cloreto deve ser feita lentamente, para que não ocorra a formação de sub-produtos no ambiente reacional, diminuindo o seu rendimento.

Após a adição do Cloreto a reação permanece por meia hora e ao final desse período é feita a avaliação através da CCD, cujo sistema de eluição é de 20% Acetato/Hexano. O tempo de reação irá variar de produto para produto, portanto, o acompanhamento pela CCD é de suma importância para a verificação da formação dos mesmos. O tempo das reações deste trabalho foi de no máximo 2 horas.

Ao comprovar o término da reação o produto é filtrado em kitassato e funil sinterizado. O filtrado foi seco com Na_2SO_4 , e, enfim, transferido para um balão cônico e levado ao rotaevaporador para a retirada do solvente. Após a evaporação o produto foi lacrado e levado ao freezer.

As concentrações de todos os reagentes da reação irão variar de acordo com o cicloaduto desejado. Mas, o procedimento descrito acima é o mesmo para todos os produtos almejados neste trabalho. Na **Tabela 5** estão descritas as massas dos produtos obtidos.

Tabela 5: Massa das Oxadiazolinas obtidas pelo procedimento 2

Massa dos Cicloadutos	
R = Cl	0,5185 g
*R = OCH₃	0,5816 g
R = CH₃	0,4757 g
R = NO₂	0,5222 g

*Oxadiazolina não formada

Na **Tabela 6** estão descritos os aspectos e os respectivos rendimentos dos produtos obtidos, utilizando esse procedimento.

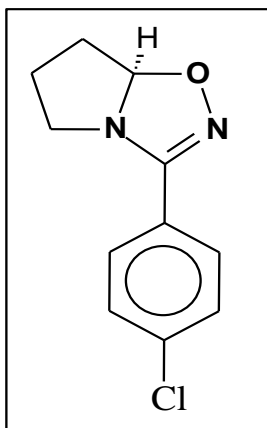
Tabela 6: Rendimentos dos cicloadutos Procedimento com o Ultrassom

Substituinte	Rendimento
R = Cl	82%
*R = OCH ₃	73%
R = CH ₃	77%
R = NO ₂	78%

*Oxadiazolina não formada

6.6 – Caracterização Físico-Química e Estrutural das aril Δ^2 -1,2,4-oxadiazolinas bicíclicas *para*-substituída

6.6.1- 3-(4-clorofenil)- 5,6,7,7-a-tetraidropirrol[1,2-d][1,2,4]oxadiazolina



Fórmula e Massa Molecular:

C₁₁H₁₁ClN₂O, 222,67 g/mol

Propriedades Físicas:

Cristais de coloração branca; P.F.: 60,2-61,7 °C; Rf: 0,23

Dados Espectrométricos:

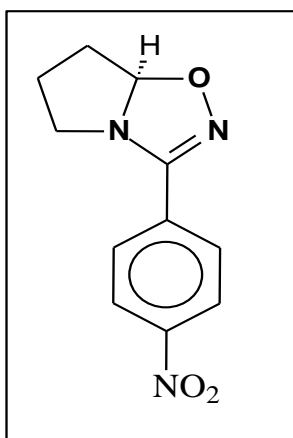
RMN de ^1H [400 MHz; CDCl_3 ; δ (ppm); J (Hz); t.a.

1,8 (m; 1,827-1,695; 2H); 2,143 (m; 2,213-2,101; 2H); 5,853 (d; J=4; 1H); 7,260 (s, 1H); 7,402 ppm (d; J=8; 2H); 7,70 (d; J=8; 2H)

IVFT (Janela de KBr; cm^{-1} , principais sinais)

832,21; 1089,20; 1185,71; 1370,81; 2971,25.

6.6.2- 3-(4-nitrofenil)- 5,6,7,7-a-tetraidropirrol[1,2-d][1,2,4]oxadiazolina



Fórmula e Massa Molecular:

$\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_3$, 233,22 g/mol

Propriedades Físicas:

Cristais de coloração amarela; P.F.: 133,1-135,2 °C; Rf: 0,23

Dados Espectrométricos:

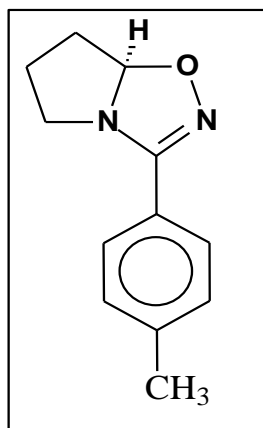
RMN de ^1H [400 MHz; CDCl_3 ; δ (ppm); J (Hz); t.a.

1,6 (m; 1,58-1,71; 2H); 2,1 (m; 1,71-2,31; 2H); 3,151 (m; 3,104-3,196; 1H); 3,3 (m; 3,29-3,260; 1H); 5,921 ppm (m; 5,911-5,931; 1H); 7,93 (d; J=4,09; 2H), 8,275 (d; J=4,77; 2H)

IVFT (Janela de KBr; cm^{-1} , principais sinais)

1191,06; 1515,21; 1564,67; 3109,68; 3082,48.

6.6.3- 3-(4-metilfenil)- 5,6,7,7-a-tetraidropirrol[1,2-d][1,2,4]oxadiazolina



Fórmula e Massa Molecular:

$C_{12}H_{14}N_2O$, 202,25 g/mol

Propriedades Físicas:

Óleo viscoso transparente; Rf: 0,23

Dados Espectrométricos:

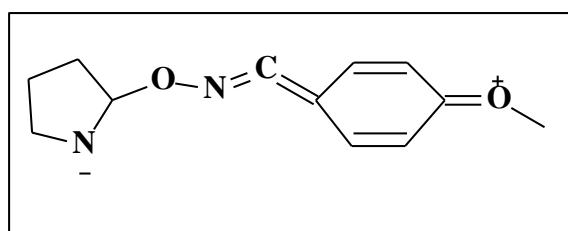
RMN de 1H [400 MHz; $CDCl_3$; δ (ppm); J (Hz); t.a.

1,780 (m; 1,805-1,721; 2H); 2,158 (m; 2,085-2,222; 2H); 2,378 (d; J=6,6; 3H); 3,101 (m; 3,058-3,127; 1H); 3,3304 (m; 3,318-3,370; 1H); 5,848 (d; J=3,2; 1H); 7,209 (m; 7,173-7,256; 2H); 7,466 (d; J=5,2; 1H); 7,646 (d; J=2,7; 1H).

IVFT (Janela de KBr; cm^{-1} , principais sinais)

1116,21; 1375,09; 2909,57; 3274,53.

6.6.4 - 2-[(4-(metiloxonio)cicloexilideno)metilideno]amino)oxi]pirrolidina-1-ide



Fórmula e Massa Molecular:

$C_{12}H_{18}N_2O_2$, 222,2835 g/mol

Propriedades Físicas:

Cristais de coloração branca; Rf: 0,23

Dados Espectrométricos:

RMN de 1H [400 MHz; $CDCl_3$; δ (ppm); J (Hz); t.a.

1,6 (m; a,51-1,71; 1H); 3,85 (m; 3,845-3,901; 3H); 6,953 (m; 6,936-6,965; 2H); 7,260 (s; 3H); 7,469 (m, 7,449-7,491; 2H);

IVFT (Janela de KBr; cm^{-1} , principais sinais)

836,25; 1257,04; 1582,23; 2936,28.

PARTE III

Estudo Biológico

Capítulo VI

Estudo biológico

Capítulo VI - Estudo Biológico

Capítulo VI

6 – Estudo Biológico

7.1- Revisão de Literatura

O arsenal terapêutico atualmente disponível permite o tratamento da maioria das doenças. No entanto, a eficácia da quimioterapia depende de fatores como a incidência de resistência microbiana, efeitos colaterais e tóxicos, baixa eficácia e seletividade. Estes fatos demonstram a grande necessidade de desenvolvimento de novos agentes bioativos, com eficácia comprovada, para o tratamento dessas enfermidades e que possuam toxicidade e efeitos colaterais compatíveis com a condição de fármaco.

A terapia antimicrobiana encontra-se, atualmente, sobre constante pressão desses agentes etiológicos, uma vez que, continuamente, os agentes antimicrobianos existentes sofrem queda de eficácia, pois os mecanismos naturais de adaptação presentes nas espécies biológicas, atuam por induzir resistência aos microorganismos⁴² que são os alvos da quimioterapia antimicrobiana^{43,44}.

De acordo com este contexto, a pesquisa por novos agentes antimicrobianos se torna uma questão de urgência, pois a cada dia diminui o número de agentes antimicrobianos totalmente eficazes⁴⁵.

Essa ineficácia crescente da terapêutica antimicrobiana se torna um grande desafio para o Sistema Público de Saúde, desde que foi introduzido o primeiro agente com essa função, as penicilinas naturais e posteriormente, as semi-sintéticas, e mais atualmente a ineficácia terapêutica mútua para os diversos antimicrobianos, em decorrência da multiresistência⁴⁶.

O uso extensivo de penicilina após a Segunda Guerra Mundial⁴⁷ desencadeou o surgimento das primeiras cepas de bactérias Gram-positivas não susceptíveis a antibióticos penicilínicos, conhecidos como PRSP (“penicillin-resistant” *Streptococcus pneumoniae*). Da mesma forma, os antibióticos lançados no mercado nos anos seguintes, como os análogos penicilínicos meticilina e cefalosporina, além de tetraciclina e eritromicina aos poucos foram se tornando limitados, devido ao

desenvolvimento de resistência múltipla em cepas de enterococos e estafilococos infecciosos. A última linha de defesa contra a ameaça do *Staphylococcus aureus* surgiu a partir da descoberta do antibiótico glicopeptídico vancomicina⁴⁸.

A inexistência da ação terapêutica dos antimicrobianos, de uma forma geral, decorre, tanto em função do desenvolvimento de mecanismos biológico que induzem essa resistência aos fármacos que são empregados mais comumente, como pela inadequada indicação e dose terapêutica incorreta desses agentes. Esses dois fatores estão intimamente ligados e são, de fato, os causadores do surgimento de uma grande quantidade de microorganismos patogênicos multi-resistentes à diversos antimicrobianos de uso corrente⁴⁴.

Formalmente, o aparecimento de bactérias resistentes a antibióticos pode ser considerado como uma manifestação natural regida pelo princípio evolutivo da adaptação genética de organismos a mudanças no seu meio ambiente⁴⁹. Como o tempo de duplicação das bactérias pode ser de apenas 20 min, existe a possibilidade de serem produzidas muitas gerações em apenas algumas horas, havendo, portanto, inúmeras oportunidades para uma adaptação evolutiva⁵⁰.

De acordo com os mecanismos de resistência dos microorganismos, podemos encaixar os agentes antimicrobianos nas seguintes classificações:

- 1- Agentes que vão atuar inibindo a biossíntese ou ativar as enzimas que degradam a parede bacteriana, causando a perda da estabilidade e por fim levando a uma lise celular. Nessa classe se encaixam as penicilinas, cefalosporinas, cabapenemas, outros derivados β – lactâmicos, a vancomicina e alguns anti-fungicos como o miconazol.
- 2- Agentes que agem diretamente na membrana celular dos microorganismos, alterando sua permeabilidade, como as tetraciclinas.
- 3- Agentes que inibem ou alteram a síntese proteica, que afetam o metabolismo dos ácidos nucleicos.
- 4- Agentes anti-metabólicos que bloqueiam algumas reações bioquímicas específicas como a inibição do ácido fólico pelas sulfonamidas.
- 5- Os agentes anti-retrovirais que mimetizam unidades de ácido nucleico^{44,46}.

As bactérias podem ser classificadas em sensíveis ou resistentes aos agentes antimicrobianos. A resistência pode ser definida pela ocorrência de cepas bacterianas que não mais respondem à ação esperada do agente antimicrobiano, na faixa de concentração considerada segura para o uso terapêutico⁵⁷.

As bactérias são microorganismos cujo material genético encontra-se em processo contínuo de alteração, o que favorece o surgimento dessas variações resistentes dentro de um ambiente seletor. A resistência antimicrobiana ocorre quando a bactéria adquire genes que permitem a interferência no mecanismo de ação do antibiótico por mutação espontânea de DNA ou por transformação e transferência de plasmídeos⁵¹.

Dentre os diferentes mecanismos de resistência descritos para microorganismos, aqueles mais importantes em bactérias podem ser classificados^{52, 53} em 3 grupos distintos: Destruição do antibiótico onde, as enzimas catalisam a degradação do antibiótico ou modificam grupos funcionais farmacologicamente importantes presentes em sua estrutura, criando funções inativas para o reconhecimento molecular. Os antibióticos BETA-lactam inibem as proteínas que unem a penicilina (PBP) na parede celular bacteriana. Bactérias como estafilococos desenvolveram resistência a antibióticos BETA-lactam, adquirindo a habilidade de produzir BETA-lactamase, que destrói o antibiótico, e adquirindo a nova PBP, que não é suscetível à inibição antibiótica.; Efluxo contínuo do antibiótico⁵⁴, os genes mutantes superexpressam proteínas transportadoras de membrana responsáveis pela entrada e saída de substâncias no meio citoplasmático, fazendo com que a retirada do antibiótico para o meio extracelular seja mais rápida⁵⁵ que a sua difusão pela membrana bacteriana, mantendo uma concentração insuficiente para atuar como bloqueador de funções celulares. Espécies de estreptococos na verdade alteram seus ribossomos para prevenir a adesão de eritromicina, tetraciclina, estreptomicina e gentamicina; Reprogramação e modificação da estrutura-alvo⁵⁵, onde os alvos macromoleculares do antibiótico, como ribossomos, proteínas e constituintes da parede celular, são estruturalmente modificados a partir de genes que os expressam, afetando o reconhecimento do fármaco pelo alvo diminuindo sua potência. Fluoroquinolonas agem inibindo DNA-girase e topoisomerase IV,

ambas enzimas envolvidas na síntese do DNA bacteriano. A resistência a fluoroquinolona, entretanto, pode se desenvolver por meio de alterações no acesso ou nas próprias enzimas-alvo. Alterações nessas enzimas incluem mutações desenvolvidas com DNA-girase, que tendem a ocorrer em bactérias gram-negativas resistentes a fluoroquinolonas ou mutações em topoisomerase IV, que ocorrem mais em bactérias gram-positivas resistentes a fluoroquinolonas⁵⁸. Além do DNA cromossômico, as células bacterianas podem conter pequenas moléculas circulares de DNA denominadas plasmídios. Certos plasmídios possuem genes responsáveis pela síntese de enzimas que destroem um antibiótico antes que ele destrua a bactéria. São os chamados plasmídios R (de resistência aos antibióticos). Eles também possuem genes que permitem sua passagem de uma bactéria para outra (fator F). Quando dois ou mais tipos de plasmídios R estão presentes em uma mesma bactéria, os genes de um deles podem passar para outro por recombinação gênica: conjugação, transformação e transdução. Esse mecanismo faz com que surjam plasmídios R portadores de diversos genes para resistência a diferentes antibióticos⁵⁹.

Organismos provocadores de doenças possuem uma capacidade extraordinária para se adaptarem e, nomeadamente, para adquirirem e transmitirem resistência antimicrobiana. Além disso, a utilização excessiva e descontrolada de agentes antimicrobianos favorece o crescimento de organismos resistentes. Apesar da resistência antimicrobiana existir mesmo antes do aparecimento dos agentes antimicrobianos no tratamento médico, a relação entre as concentrações utilizadas e o aumento da resistência aos microorganismos é do conhecimento geral.

Mediante essa problemática em relação à resistência bacteriana aos agentes antimicrobianos é que a busca à novos agentes mais eficazes se torna incessante, pois a cada dia é mais necessário o uso desse tipo de medicamento para as patologias atuais.

7.2 – Avaliação da atividade biológica

A avaliação da atividade antimicrobiana foi realizada pelo Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE, sob a responsabilidade da Professora Janete Magali de Araújo.

7.3 – Materiais

Para determinação da atividade antimicrobiana foram utilizados os seguintes materiais: placas de Petri, os meios de cultura, os microorganismos pertencentes à coleção de culturas do Departamento de Antibióticos da UFPE, Pipetas, discos de papel, tubos de ensaio, clorofórmio como controle.

7.4 – Metodologia

A atividade antimicrobiana foi determinada pelo método de difusão em ágar. Foram usados discos de 6 mm de diâmetro, os quais foram embebidos por uma solução dos produtos em análise de 150 µg/ disco, e colocados na superfície do meio já semeado com o microorganismo teste. Após o período de incubação adequado a cada microorganismo, foram realizadas as leituras medindo-se os halos de inibição em mm⁵⁶. A metodologia foi de acordo com a padronização da NCCLS (Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard 8^a ed.), utilizando suspensão microbiana padronizada na escala MacFarland 0,5. Os testes foram realizados em triplicata e os resultados expressos em mm pela média aritmética do diâmetro dos halos de inibição formado ao redor dos discos nas 3 repetições⁶⁰. O teste controle foi realizado com discos embebidos em clorofórmio.

Para determinação quantitativa CMI e CMB foi utilizada a técnica de Kirb e Bauer (60), onde quantidades variadas da solução da substância (1,0, 0,8, 0,6, 0,4, 0,2, 0,1mL) foram pipetadas em placas de Petri esterilizadas e em seguida adicionado o meio de cultura liquefeito. Os microrganismos-teste foram semeados em forma de estrias sobre a superfície do meio. As culturas foram incubadas durante 24 h de 30 a 37 °C, considerando-se o intervalo entre a última placa onde houve crescimento bacteriano e a primeira onde houve inibição⁶¹.

Os testes foram realizados frente a bactérias Gram-negativas, Gram-positivas e fungos, fornecidas pela Coleção de Culturas do Departamento de Antibióticos da UFPE, tendo sido utilizados os seguintes microrganismos: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, *Mycobacterium smegmatis*. Cada microrganismo tem sua devida numeração de acordo com o banco de dados do Laboratório de Antibióticos da UFPE. Os inóculos foram obtidos a partir de culturas recentes dos microrganismos-teste, preparando-se suspensões padronizados pela turvação equivalente ao tubo 0,5 da escala de MacFarland, em solução fisiológica ⁶².

7.5 Resultados e discussão

A **Tabela 7**, apresenta os resultados qualitativos do teste com os discos embebidos das substâncias de 1 a 3, o controle e as bactérias e fungos utilizados.

Tabela 7: Diâmetro em mm dos Halos de Inibição Microorganismo x Cicloaduto

Diâmetro em mm dos Halos de Inibição Microorganismo x Cicloaduto				
Microorganismo	1=Cl	2= CH₃	3=NO₂	Controle
<i>Escherichia coli</i>	6/6/-	6/6/-	-	6/6/-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	7/7/7	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	8/8/8	7/7/7	7/7/7
<i>Micrococcus luteus</i>	8/8/6	13/12/10	-	-
<i>Bacillus subtilis</i>	-	8/7/8	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	6/6/7	-	-
<i>Candida albicans</i>	10/10/8	21/20/22	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	-	-

<i>Mycobacterium</i>	10/10/8	20/25/-	-	-
<i>smegmatis</i>				

De acordo com a **Tabela 7** a maioria dos halos formados teve seus diâmetros insuficientes para se comprovar sua atividade biológica como antimicrobianos, a atividade mais expressiva foi da substância 2 (Δ^2 -1,2,4-oxadiazolina bicíclica *para*-toluil), para a *Candida albicans* e *Mycobacterium smegmatis*, onde foi observados halos entre 21 e 25 mm de diâmetro. Logo, apenas, dessa substância foi realizada a Concentração Inibitória Mínima, que é a concentração de antimicrobiano necessária para inibir o crescimento bacteriano, de forma que quanto menor o MIC, maior a potência da substância testada.

7.6 – Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CMI)

A atividade antimicrobiana, expressa pela Concentração Inibitória Mínima foi determinada pelo processo de microdiluição sucessiva, onde diferentes concentrações do composto a ser analisado foi testado em presença de *Candida albicans* e *Mycobacterium smegmatis* em meio de cultura líquido. Essas microdiluições originaram concentrações decrescentes a fim de se determinar a menor concentração do composto testado onde o crescimento microbiano foi inibido.

O resultado da CMI para a Δ^2 -1,2,4-oxadiazolina bicíclicas *para*-toluil foi de 1000 μ g/ml, e a Concentração Mínima Bactericida (CMB) foi de 500 μ g/ml, para a *Mycobacterium smegmatis*. O resultado da CMI da mesma substância para *Candida albicans* ficou em Concentração Mínima Inibitória acima de 1000 μ g/ml Concentração Mínima Bactericida foi de 1000 μ g

Este composto foi considerado um inibidor fraco uma vez que para um antimicrobiano ideal exige-se que o resultado da CMI seja de no máximo 10 μ g/ml. Logo, conclui-se que, no geral, este composto não possui atividade antimicrobiana considerável.

Para nos aproximarmos dessa idealidade, seria necessário o desenvolvimento de uma nova droga ou a modificação da estrutura, para que essa

não induzisse resistência antimicrobiana e fosse eficaz em baixas concentrações, e o mais importante é que não seja tão agressivo ao organismo do hospedeiro.

Ainda não se pode precisar por qual mecanismo de ação essa série oxadiazolínica possa atuar. No entanto, há relatos da literatura comprovando que existem núcleos dessa natureza química que são responsáveis por atividade antimicrobiana. Como os fármacos possuem seu receptor específico, o que se pode concluir é que talvez essas estruturas não se liguem de forma correta aos receptores, o que se leva a repensar numa nova estratégia de modificação desses compostos com a finalidade de atingir o seu alvo específico.

PARTE IV

Conclusões

Capítulo VII

- *Conclusões*

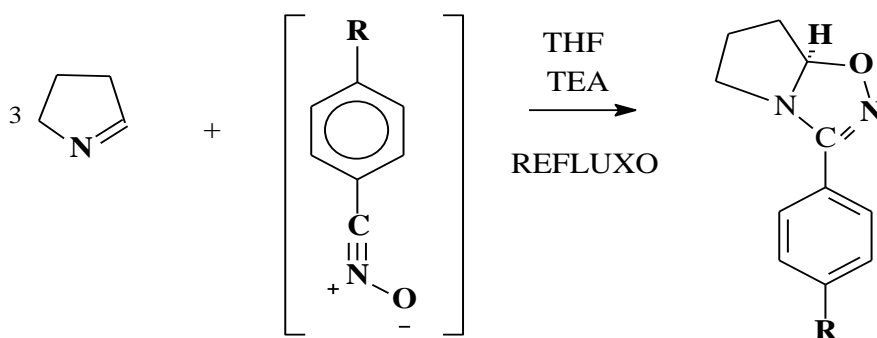
- *Perspectivas*

Capítulo VII- Conclusões

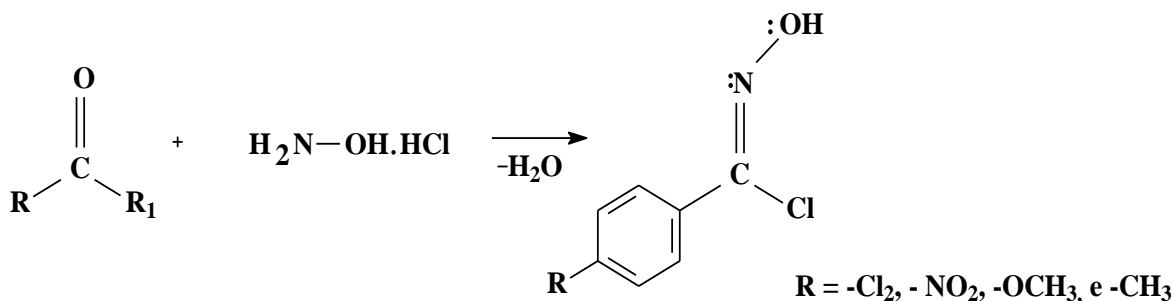
Capítulo VII

Conclusões

Neste trabalho, foi desenvolvido o novo heterobícclo aril Δ^2 – 1,2,4 oxadiazolinas *para* – substituídas, por meio da reação de cicloadição [3+2] dipolar entre o óxido de nitrila, derivado dos cloretos de hidroxiiminoila *para* - substituídos, e a Δ^1 -pirrolina. Como foi pormenorizada no capítulo IV, a teoria dos Orbitais Moleculares de Fronteira previu o que foi proposto neste trabalho, tornando possível a síntese desse novo heterobícclo.

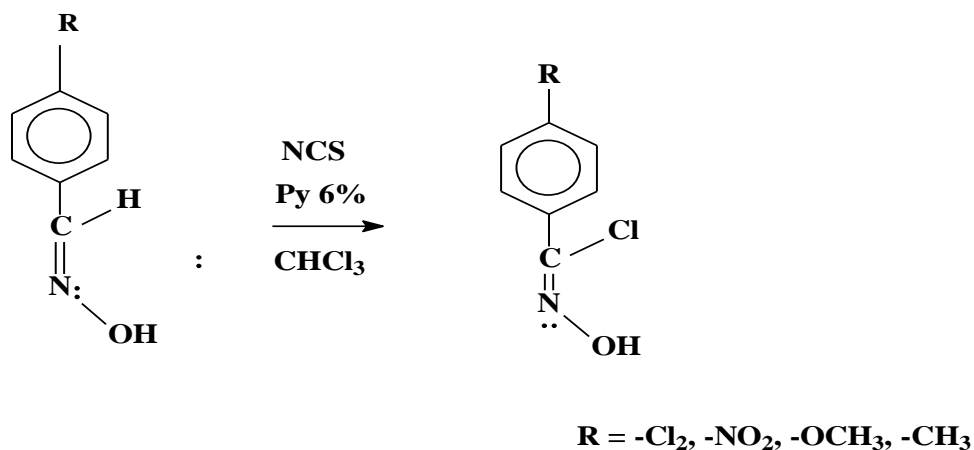


As oximas obtidas com rendimentos variáveis entre 88% e 96%, foram devidamente sintetizado e utilizado como base para reações que foram fundadas em metodologias tradicionais e já descritas em literatura. Cada oxima teve seu aspecto físico e coloração específico e sua síntese foram acompanhadas através da CCD 20% acetato em hexano conforme demonstrado nas tabelas 1 e 2.



Os cloretos de hidroxiiminoíla, um dos produtos essenciais na sequência de reações de condensação que culminaram nos produtos finais, mostrou-se um

composto bastante instável, já que, quando sintetizado deveriam ser usados de preferência imediatamente ou no máximo no dia seguinte à sua síntese. Eles foram obtidos em temperatura ambiente, por reações simples, que duraram em torno de 1,5 a 2 horas. Cada produto formado possuiu aspecto e coloração diferenciada e rendimentos que variaram entre 79% e 87%.



As aril Δ^2 – 1,2,4 oxadiazolinas *para* – substituídas, foram obtidas por dois procedimentos diferenciados, um já bem descrito na literatura e o outro utilizando o Ultrasson. Cada procedimento teve seus rendimentos diferenciados, onde no procedimento 1 esses rendimentos variaram entre 70% e 80%, já no procedimento, com o Ultrasson os rendimentos variaram entre 73% e 82%.

Na avaliação da atividade antimicrobiana, as aril Δ^2 – 1,2,4 oxadiazolinas *para* – substituídas não exibiram atividade de forma a ser considerada, apesar 3-(4-metilfenil)- 5,6,7,7-a-tetraidropirrol[1,2-d][1,2,4]oxadiazolina apresentar halos de inibição de 21mm para *Candida Albicans* e 25mm para *Mycobacterium smegmatis*,

Capítulo VII

9- Perspectivas

A obtenção dessa nova série de compostos, as aril Δ^2 – 1,2,4 oxadiazolinas *para*-substituídas provenientes da cicloadição 1,3 dipolar entre o trímero da Δ^1 – pirrolina e os cloretos de hidroxiiiminoila, traz consigo promissoras possibilidades de modalidades sintéticas, visando obtenção de novas classes de moléculas.

O novo biciclo pode se enquadrar em planejamentos racionais de novas moléculas contendo tais núcleos, e que segundo a literatura apresenta uma gama de atividades biológicas diferentes para cada forma de modificação.

Diante dessa abordagem, podemos vislumbrar a síntese de novas moléculas com vários tipos de modificação em sua estrutura, visando a melhoria da atividade antimicrobiana, já que com essa estrutura descrita neste trabalho, não obteve-se uma atividade tão considerável, quanto se esperava.

Ainda é pretendido dar continuidade a ensaios mais específicos concernentes à atividade antimicrobiana dos heterociclos formados, e de outros que ainda estão por purificar. Além disso, também pretende-se fazer a realização de testes para comprovação de sua atividade antiinflamatória e indutora de analgesia, através de teste mais robustos e específicos para tal atividade e que não foi relatada nesse estudo, a falta de tempo para esse processo.

Referências

Referências

- 1 - Tavares A. do A., Montanari C. A., QUÍMICA MEDICINAL: 25 ANOS DE PLANEJAMENTO RACIONAL DE FÁRMACOS., *Quim. Nova*, Vol. 25, Supl. 1, 39-44, **2002**.
- 2 - Yogeeswari P., Ragavendran J. V., et, al., Discovery of 4-Aminobutyric Acid Derivatives Possessing Anticonvulsant and Antinociceptive Activities: A Hybrid Pharmacophore Approach., *J. Med. Chem*, 50, 2459-2467, **2007**.
- 3 - Ispikoudi M., Amvrazis M., Convenient synthesis and biological profile of 5-amino-substituted 1,2,4-oxadiazole derivatives., *European Journal of Medicinal Chemistry* 45, 5635 e 5645, **2010**.
- 4 - Júlio O. F. M., Donnici C. L., et al., HETEROCICLOS 1,2,3-TRIAZÓLICOS: HISTÓRICO, MÉTODOS DE PREPARAÇÃO, APLICAÇÕES E ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS., *Quim. Nova*, Vol. 29, No. 3, 569-579, **2006**.
- 5 - Wagner G., Garland T., Synthesis of 5-trichloromethyl- Δ^4 -1,2,4-oxadiazolines and their rearrangement into formamidine derivatives., *Tetrahedron Letters* 49, 3596–3599, **2008**.
- 6 - Bokach N. A., Kukushkin V. Y., 1,3-Dipolar cycloaddition of nitrones to free and coordinated nitriles: routes to control the synthesis of 2,3-dihydro_1,2,4-oxadiazoles., *Russian Chemical Bulletin, International Edition*, Vol. 55, No. 11, pp. 1869—1882, November, **2006**.
- 7 - Satoshi M., Sota O., Generation of Nitrile Oxides from Oximes Using t-BuOI and Their Cycloaddition., *Organic Letters* Vol. 13, No. 11, 2966–2969, **2011**.

8- Pelissier, H.; Asymmetric 1,3-dipolar cycloadditions. *Tetrahedron Letters* 63, 3235–3285, **2007**.

9 - Fleming, I. *Frontier Orbitals and Organic Chemical Reactions*, Wiley, **1976**.

10 - HIMO, F.; LOVELL, T.; HILGRAF, R.; ROSTVTSEV, V. V.; NOODLEMAN, L.; SHARPLESS, K. B.; FOLKIN, V. V.; Cooper(I)-catalyzed synthesis of azoles. DFT Study predicts unprecedented reactivity and intermediates. *J Am. Chem. Soc.* 127: 210-216, **2005**.

11- GOTHELF, K. V.; JØRGENSEN, K. A.; Asymmetric 1,3-dipolar cycloaddition reactions. *Chem. Rev.* 98: 863-909, **1998**.

12 - Naidu B. N., Sorenson M. E., Facile One-Pot Synthesis of 2,3,5-Substituted 1,2,4-Oxadiazolines from Nitriles in Aqueous Solution., *Organic Letters*, Vol. 7, No. 7, 1391-1393, **2005**.

13 - Gilchrist, T. L. *Heterocyclic Chemistry*, Longman Scientific & Technical, New York, USA, **1992**.

14 - Tiemann, F. *Ber.*, 22, 2412-2417, **1989**.

15 - Wagner, G.; Pombeiro, A. J. L.; Kukushkin, V. Y. *J. Am. Chem. Soc.*, 122, 3106-3111, **2000**.

16 - Lin, X.-F.; Zhang, J.; Cui, S.-L.; Wang, Y.-G. *Synthesis* **2003**, 1569-1573.

17- Warkentin, J.; Ramakrishnan, K.; Jain, R. C.; Wandelmaier, F. W. *United States Patent*, Patent number 4009276, **1977**.

19- Qian, X.; Yang, Q.; Wang, N.; Liu, F.; Ke, S. *Bioorg. Med. Chem. Letters* **2009**, 19, 332.

18- Delalande, S. A. *Derwent World Patents Index*, Patent Number FR2262513-A, **1975**.

20- Coley, H. M.; Sarju, J.; Wagner, G. *J. Med. Chem.* **2008**, 51, 135.

21- Asato, G. ; Berkelhammer, G. *United States Patent*, Patent Number 3658832, **1972**.

22 - Ritter M., Souza A., Síntese de Oximas em meio aquoso e regeneração de aldeídos., XIX Mostra Científica, **2010**.

23 –KOU, H-Z et al. Synthesis Crystal Structure and Magnetic properties of Oxime Bridged Polynuclear Ni (II) and Cu (II) Complexes. *Inorganic Chemistry*, v. 44, n. 3, p. 709-715, **2005**.

24- KIASAT, Ali Reza; KAZEMI, Foad; NOURBAKHS, Kazem. A Clean Conversion of Carbonyl Compounds to Oximes Using Silica Gel Supported Hydroxylamine Hydrochloride. *Synthetic Communications*, Ahvaz, v. 179, p. 1193-1196, **2004**.

25 - SHAABANI, Ahmed; RAHMATI, Abbas; NADERI, Soheila. Ultrasound-Promoted Rapid Oxidative Cleavage of Oximes with NaBrO₃/Ion Exchange Resin. **Synthetic Communications**, Tehran, v. 17, p. 4035-4042, **2007**.

26- McCauley K.M., et al Dichloroacetylene is not a precursor to dichlorinated vinylcobaloxime and vinylcobalamin in the cobalt-catalyzed dechlorination of perchloroethylene. **Inorganic Chemistry**. V. 41, p. 5844-5849, **2002**.

27- Rodrigues, R.C., De Aguiar, A.P. A simple and efficient method for the synthesis of nitrile oxide from aldoxime using trichloroisocyanuric acid. *Synthetic Communications*, 31 (20), p. 3075-3080, **2001**.

28- Woodward, R. B., Hoofmann, R. Stereochemistry of Electrocyclic Reactions. *Journal of the American Chemical Society*, 87 (2), 395-397, **1965**.

29- Claisse et al., *United States Patent*, Patent number US4012377, **1997**.

30 - Kraus, G. A.; Neuenschwander, K. *J. Org. Chem.* **1981**, 46, 4791.

31 - Reis, S. L. G. B.; De Almeida, V. M., De Almeida, G. C.; Boaviagem, K. M.; Mendes, C. C. B.; Góes, A. J. S.; Magalhães, L. R.; Da Silva, T. G; De Faria, A. R. Síntese e avaliação preliminar da atividade antinociceptiva de novas isoxazolil-aril-hidrazonas., *Química Nova*, 30, **2010**i.

32 – A. P. Kosikowski, M. Admczyk, Methods for the stereoselective cis cyanohydroxylation and Carboxihydroxylation of olefins. *J. Org. Chem.* 1983, 48, 366.

33- Hormann, R. E.; Chortyk O.; Le, D. P. *United States Patent*, Patent number US007304162B2, **2007**.

34- Mukaiyama, T., Hoshino, T. The reactions of primary nitroparaffins with isocyanates. *Journal of the Americal Chemical Society*, 82 (2), p. 5339-5342, **1960**.

35- Shimizu, T., Hayashi, Y., Shibafuchhi H., Teramura, K. A convenient preparative method of nitrile oxides by the dehydration of primary nitro compounds with ethyl chloroformate or benzenesulfonyl chloride in presence of triethylamine. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 59, p. 2827-2831, **1986**.

36 - Grundmann, C., Richter, R. Nitrile oxide. Basic, Substituted, Stable Nitrile Oxide. *The Journal of Organic Chemistry*, 32, p.2308-2312, **1967**.

37- Grundmann, C., Richter, R. Nitrile oxide. An improved method for the preparation of nitrile oxides from the aldoximes. *The Journal of Organic Chemistry*, 33, p.476-478, **1968**.

38 - Chiang, Y. H. Chlorination of Oximes. I. Reaction and mechanism of the chlorination of oximes in commercial chloroform and methylene chloride. *Journal Organic Chemistry*, 36 (15), p. 2146-2155, **1971**.

- 39 - Liu, K.J., Shelton, B.R., Howe, R.K. A particularly convenient preparation of benzohydroximinoyl chlorides: nitrile oxide precursors. *Journal of Organic Chemistry*, 45, p. 3916-3919, **1980**.
- 40 - Lee, G.A. A Simplified synthesis of unsaturated nitrogen-heterocycles using nitrile betaines. *Synthesis Communications*, 6, p. 508-509, 1982.
- 41 - Hassner, A., Rai, K.M.L. A new method for the generation of nitrile oxides and its application of the synthesis of 2-isoxazolines. *Synthesis Communications*, 1, p. 57-59, **1989**.
- 42- Varaldo, P. E.; *J. Antimicrob. Chemother. P.* 50, 1, **2002**.
- 43- Patrick G. L., *An Introduction to Medicinal Chemistry*, 2 Ed., Oxford University Press, **2001**.
- 44- Rang H. P., Dale M. M., Ritter J. M., *Farmacologia*, 4 Ed., Editora Guanabara-Koogan, **2001**.
- 45 - Wise, R.; *J. Antimicrob. Chemother.* 51, Suppl. S2, ii5, **2003**.
- 46 – Trabulsi, L. R.; Alterthun, F.; Gamtertzt, O. S.; Candeias, J. A. M.; *Microbiologia*, 3a ed., Atheneu: Rio de Janeiro, **1999**.
- 47- Silverman, R. B.; *The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action*, Academic Press: Washington, p. 5, **1992**.
48. Korolkovas, A.; França, F. F. A. C.; Cunha, B. C. A.; *Dicionário Terapêutico Guanabara*, 7a ed., Guanabara Koogan S.A.: Rio de Janeiro, **2000**.
- 49 - Patel, R.; *J. Antimicrob. Chemother.*, 51, Suppl. S3, iii13, **2003**.
- 50 - 5. Nicolaou, K. C.; Boddy, C. N. C.; Bräse, S.; Winssinger, N.; *Angew. Chem.*, 38, 2097, Int. Ed **1999**.

- 51 – Bozdogan B, Berrezouga L, Kuo MS, Yurek DA, Farley KA, Stockman BJ, Leclercq R. A new resistance gene, *linB*, conferring resistance to lincosamides by nucleotidylation in *Enterococcus faecium* HM1025. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43: 925-999. **1999.**
- 52 - Kehoe, L. E.; Snidwongse, J.; Courvalin, P.; Rafferty, J. B.; Murray, I. A.; 278, 29963, *J. Biol. Chem.* **2003.**
- 53 - Kehoe, L. E.; Snidwongse, J.; Courvalin, P.; Rafferty, J. B.; Murray, I. A.; *J. Biol. Chem.*, 278, 29963, **2003.**
54. Emmerson, A. M.; Jones, A. M.; *J. Antimicrob. Chemother.* 51, Suppl.S1, 13, **2003.**
55. Andersson, M. I.; MacGowan, A. P.; *J. Antimicrob. Chemother.* 51, Suppl. S1, 12, **2003.**
- 56 - Bauer, A.W., W.M.M. Kirby, J.C. Sherris & M. Tenckhoff *Amer. J. Clin. Pathol.* **45:** 493-6. **1966.**
- 57- Godman A. G., Rall T. W., Nies A. S., Taylor P., *As Bases Farmacológicas da Terapêutica* , Ed. 11, MacGraw-Hill, **2000.**
- 58 - Luna VA, Coates P, Eady EA, Cove JH, Nguyen TT, Roberts MC. A variety of grampositive bacteria carry mobile *mef* genes. *J. Antimicrob. Chemother.* 44: 19-25. **1999.**
- 59 - Lodder G, Schwarz S, Gregory P and Dyke K. Tandem duplication in *erm C* translational attenuator of the macrolide-lincosamidestreptogramin B resistance plasmid pSES6 from *Staphylococcus equorum*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40:215-217. **1996.**
- 60 - Kirby, J.C., Bauer, A., W.M.M. Tenckhoff & M. Turck *Amer. J. Clin. Pathol.* 48: 522-6, **1969.**

61 - Grove, D.C. & W.A. Randall Medical Encyclopedia Inc. Vol. 2, Nº 1, p.188-98. **1955.**

62 - Murray, P.R. et al. "Medical Microbiology in Oral Microbiology". 2 ed. S. Louis, Missouri: Mosby. p. 381-93, **1994.**

63 - Abd El-hafez, O. M.; El-khrisy, E. D.; Badria, F.; Fathy, A. D. *Arch. Pharmacol Res.*, 26, 686, **2003.**

64 - Lima, P. C., Lima, L. M.; Da Silva, K. C.; Leda, P. H.; Miranda, A. L. P.; Fraga, C. A. M; Barreiro, E. J. *Eur. J. Med. Chem.*, 35, 187, **2000.**