

Universidade Federal de Pernambuco  
Centro de Biociências  
Programa de pós-graduação em inovação terapêutica

RAFAELA CRISTINA DA SILVA PASSOS

OBTENÇÃO DE NOVOS DERIVADOS ISOXAZOLÍNICOS POR HIBRIDAÇÃO  
MOLECULAR E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIBACTERIANO E  
ANTIFÚNGICO

Recife

2012

RAFAELA CRISTINA DA SILVA PASSOS

OBTENÇÃO DE NOVOS DERIVADOS ISOXAZOLÍNICOS POR HIBRIDAÇÃO  
MOLECULAR E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIBACTERIANO E  
ANTIFÚNGICO

Dissertação apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Inovação Terapêutica, Área de  
Concentração Síntese de Fármacos  
da Universidade Federal de  
Pernambuco como requisito parcial  
para obtenção do grau Em MESTRE  
em Inovação Terapêutica

Orientador: Prof. Dr. Antônio Rodolfo

Recife

2012

Catálogo na Fonte:  
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Passos, Rafaela Cristina da Silva

Obtenção de novos derivados isoxazolínicos por hibridação molecular e avaliação do potencial antibacteriano e antifúngico / Rafaela Cristina da Silva Passos. – Recife, 2012.

82 f. : il.

Orientador: Antônio Rodolfo de Faria  
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica, Recife, 2012.

Inclui referências e anexos

1. Farmacologia 2. Agentes anti-infecciosos 3. Antibiótico 4. Penicilina  
I. Faria, Antônio Rodolfo (orient.) II. Título.

615.1

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2017-526

**Rafaela Cristina Da Silva Passos**

Obtenção de novos derivados isoxazolínicos por hibridação molecular e avaliação do potencial antibacteriano e antifúngico

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, Área de Concentração Síntese de Fármacos da Universidade Federal de Pernambuco como requisito parcial para obtenção do grau Em MESTRE em Inovação Terapêutica

Orientador: Prof. Dr. Antônio Rodolfo

Aprovada em: 30/11/2012

**Banca Examinadora**

---

Prof. Dr. Antônio Rodolfo de Faria (Orientador)

Universidade Federal de Pernambuco

---

Profa. Dra. Maria do Carmo Alves de Lima (Examinador interno)

Universidade Federal de Pernambuco

---

Profa. Dra. Ana Beatriz Sotero Squera (Examinador externo)

Universidade Federal de Pernambuco

## AGRADECIMENTOS

- Primeiramente agradeço a Deus, pois sem Ele nada disso teria sido possível e eu não haveria chegado até aqui.
- À minha família, em especial aos meus pais e à minha tia Audeni, que sempre acreditaram em mim e me dispensaram apoio incondicional diante das adversidades.
- A Julio, pelas palavras de incentivo e pela alegria que sempre me proporciona.
- Ao meu orientador, Antônio Rodolfo de Faria pela oportunidade e por ter idealizado este trabalho, conduzindo-o da melhor maneira possível.
- A Família LASOF: Hugo por quem eu tenho um carinho mais que especial, Ronmilson, Hellen, Marlene, Lucas, Adriano, Charles e Natanael, por todos os momentos de alegria e de descontração vividos em nosso dia-dia.
- A todos os professores que fazem parte do PPGIT por compartilharem conosco de seus conhecimentos.
- Ao CNPq pela contribuição financeira.
- Ao PPGIT, em especial à professora Suely Galdino, coordenadora do programa e a Paulo Germano, secretário do programa por serem sempre atenciosos e solícitos comigo.
- E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a elaboração desse trabalho.

Muito Obrigada!

## RESUMO

A presente dissertação possui como objetivo descrever a síntese de derivados isoxazolínicos, com funcionalidades químicas variadas, por hibridação molecular, bem como, avaliação biológica do potencial antibacteriano e antifúngico. Pois, na literatura, há um grande número de trabalhos que buscam obter derivados de semicarbazonas, tiosemicarbazonas e hidrazonas contendo heterociclos, com aplicações farmacológicas, como antibacteriana e antifúngica; e, as isoxazolininas também são um grupo de moléculas com amplo perfil farmacológico, possuindo atividade antibacteriana e antifúngica. Desta forma, seis novos derivados isoxazolil-aryl-semicarbazonas, tiosemicarbazonas e hidrazonas foram desenvolvidos através de uma condensação catalítica ácida da semicarbazida, tiosemicarbazida ou hidrazida com aldeídos isoxazolínicos. No presente estudo, ésteres, derivados da reação de cicloadição [3+2] do óxido de nitrila (CEFNO) com enecarbamato *N*-benziloxicarbonil-2-pirrolina, foram reduzidos aos respectivos álcoois pelo NaBH<sub>4</sub>, que em seguida, foram submetidos a uma oxidação de Swern, resultando nos aldeídos isoxazolínicos. Os testes antibacterianos e antifúngicos foram realizados *in vitro*, frente às bactérias e aos fungos da coleção do Departamento de Antibióticos da UFPE. Os derivados testados demonstraram pouca atividade frente ao relatado na literatura. Entretanto, a baixa solubilidade em água dos mesmos e o método utilizado talvez sejam responsáveis por tal problema, que será resolvido com o incremento da solubilidade destes produtos e com melhorias no método de avaliação biológica.

Palavras chave: Hidrazonas. Antibacteriano. Antibiótico. Penicilina.

## ABSTRACT

The present dissertation aims to describe the synthesis of isoxazoline derivatives, with chemical functionalities stranded, by molecular hybridization, as well as biological evaluation of antibacterial and antifungal potential. For, in the literature, there are a large number of studies that seek to obtain derivatives of semicarbazones, thiosemicarbazones and hydrazones containing heterocycles, with pharmacological applications, such as antibacterial and antifungal; and, isoxazolines are also a group of molecules with broad pharmacological profile, possessing antibacterial and antifungal activity. In the literature, there are a large number of works that seek to obtain derivatives semicarbazones, thiosemicarbazones and hydrazones containing heterocycles with pharmacological applications such as antibacterial and antifungal, the isoxazolines are also a group of molecules with broad pharmacological profile having antibacterial and antifungal activity. Thus, six novel isoxazolyl-aryl semicarbazones, thiosemicarbazones and hydrazones were developed through an acidic condensation catalyst of semicarbazide, thiosemicarbazide or hydrazide with aldehydes isoxazoline. In the present study, esters, derivatives cycloaddition reaction [3 +2] nitrile oxide (CEFNO) with enecarbamate N-benzyloxycarbonyl-2-pyrroline were reduced by NaBH<sub>4</sub> to the corresponding alcohols, which were then subjected to an oxidation Swern, resulting in aldehydes isoxazoline. Antibacterial and antifungal tests were performed in vitro on the bacteria and fungi collection of the Department of Antibiotics UFPE. The derivatives tested showed little activity against the reported literature. However, the low water solubility thereof and method may be responsible for this problem, which is solved with the increased solubility of these products and with improved method for biological evaluation.

Keywords: Hydrazones. Antibacterial. Antibiotic. Penicillin.

**LISTA DE FIGURAS**

<b>Figura 01</b>	Anel 2-Isoxazolina	21
<b>Figura 02</b>	Alcalóides Isoxazolínicos naturais	21
<b>Figura 03</b>	<i>N</i> -isoxazolil-2 iodobenzamida	24
<b>Figura 04</b>	Estrutura da oxacilina e cloxacilina	25
<b>Figura 05</b>	Heterociclo contendo núcleo isoxazolina	25
<b>Figura 06</b>	Isoxazolinas e Isoxazol 3,5-dissubstituídos	26
<b>Figura 07</b>	Isoxazolidina 5-imidazoil substituídas	27
<b>Figura 08</b>	Estrutura química genérica das Semicarbazonas e Tiosemicarbazonas	27
<b>Figura 09</b>	Tiosemicarbazona ligante	30
<b>Figura 10</b>	Semicarbazonas e Tiosemicarbazonas	31
<b>Figura 11</b>	Semi/Tiosemicarbazonas ligantes de complexos metálicos	31
<b>Figura 12</b>	Fragmento triatômico mínimo que caracteriza as hidrazonas	32
<b>Figura 13</b>	Gyromitrina, hidrazona de ocorrência natural	32
<b>Figura 14</b>	Compostos hidrazônicos	33
<b>Figura 15</b>	Derivados de hidrazona	34

<b>Figura 16</b>	Análogos de hidrazonas	34
<b>Figura 17</b>	Isoxazolina aza-bicíclica <i>N</i> -benzoilada	35
<b>Figura 18</b>	Estrutura dos derivados obtidos	44
<b>Figura 19</b>	Espectros de, RMN de <sup>1</sup> H e IV-FT da tiossemicarbazona <i>p</i> -F	51
<b>Figura 20</b>	Halos de Inibição	53

**LISTA DE ESQUEMAS**

<b>Esquema 1</b>	Rotas de síntese para N-alkilação de semicarbazonas	22
<b>Esquema 2</b>	Síntese do antibiótico Vermiculina	22
<b>Esquema 3</b>	Síntese do antibiótico Tienamicina	23
<b>Esquema 4</b>	Esquema de formação de Semi/Tiossemicarbazonas	28
<b>Esquema 5</b>	Sínteses de Heterociclos a partir de Hidrazonas	33
<b>Esquema 6</b>	Cicloadição [2+3] entre enecarbamato endocíclico e <i>N</i> -óxido de nitrila CEFNO	35
<b>Esquema 7</b>	Rota sintética utilizada neste trabalho para obtenção das semicarbazonas e tiossemicarbazonas derivadas do heterociclo 2-isoxazolina[5,4- <i>b</i> ] pirrolidina	39
<b>Esquema 8</b>	Rota sintética utilizada neste trabalho para obtenção das hidrazonas do heterociclo 2-isoxazolina[5,4- <i>b</i> ] pirrolidina	41
<b>Esquema 9</b>	Rota sintética utilizada para obtenção do éster do heterociclo 2-isoxazolina [5,4- <i>b</i> ]pirrolidina <i>N</i> -benzoilado	45
<b>Esquema 10</b>	Síntese dos álcoois isoxazolínicos	47
<b>Esquema 11</b>	Síntese dos aldeídos isoxazolínicos	48
<b>Esquema 12</b>	Síntese das semicarbazonas e tiossemicarbazonas do 2-biciclo isoxazolínico pirrolidínico	49
<b>Esquema 13</b>	Síntese das hidrazonas isoxazolínicas	52
<b>Esquema 14</b>	Síntese do trímero da 1-Pirrolina	56

<b>Esquema 15</b>	Síntese do <i>N</i> -(benziloxicarbonil)-2-pirrolina	57
<b>Esquema 16</b>	Síntese do éster 6-benzil-3-etil do ácido 3a,4,5,6a-tetrahidropirroló [3,2-d]isoxazol-3,6-dicarboxílico	58
<b>Esquema 17</b>	Síntese do éster etílico do ácido 3a,4,5,6,6a-tetrahidropirroló[3,2- d]isoxazol-3-carboxílico	59
<b>Esquema 18</b>	Síntese do éster etílico do ácido 6-(4-fluorobenzoil)-4,5,6a tetrahidro-3ah-pirroló[3,2-d]isoxazol-3-carboxílico	60
<b>Esquema 19</b>	Síntese do éster etílico do ácido 6-(4-clorobenzoil)-4,5,6,6a-tetrahidro-3ah-pirroló[3,2-d]isoxazol-3-carboxílico	61
<b>Esquema 20</b>	Obtenção do álcool (4-fluorofenil)-(3-hidroximetil- 3a,4,5,6a-tetrahidro-pirroló[3,2-d]isoxazol-6-il-metanona	62
<b>Esquema 21</b>	Obtenção do álcool (4-clorofenil)-(3-hidroximetil-3a,4,5,6a-tetrahidro-pirroló[3,2-d]isoxazol-6-il-metanona	64
<b>Esquema 22</b>	Obtenção do 6-(4-fluorbenzoil)-4,5,6,6a-tetrahidro-3ahpirroló[3,2-d] isoxazol-3-carbaldeído	65
<b>Esquema 23</b>	Obtenção do 6-(4-clorobenzoil)-4,5,6,6a-tetrahidro-3ah-pirroló[3,2-d] isoxazol-3-carbaldeído	66
<b>Esquema 24</b>	Obtenção da tetrahidro-pirroló[3,2-d]isoxazolo-6-il-metanona-hidrazina-carboxiamida	67
<b>Esquema 25</b>	Obtenção da tetrahidro-pirroló[3,2-d]isoxazolo-6-il-metanona-hidrazina carbotioamida	68
<b>Esquema 26</b>	Obtenção da tetrahidro-pirroló[3,2-d]isoxazolo-6-il-metanona-	69

hidrazina-carboxiamida

- Esquema 27** Obtenção da tetrahydro-pirrol[3,2-d]isoxazolo-6-il-metanona-hidrazina-carbotioamida 69
- Esquema 28** Síntese da hidrazida do ácido-6-(4-fluoro-benzoil)- 4,5,6,6a-tetrahydro-3ah-pirrol[3,2-d]isoxazol-3-carboxílico 70
- Esquema 29** Síntese da benzeno sulfonil hidrazida do ácido-6-(4-cloro-benzoil)-4,5,6,6a tetrahydro-3ah-pirrol[3,2-d]isoxazol-3-carboxílico 71

**LISTA DE QUADROS**

<b>Quadro 1</b>	Substituintes e rendimentos dos álcoois isoxazolínicos pirrolidínicos	45
<b>Quadro 2</b>	Substituintes e rendimentos dos aldeídos isoxazolínicos pirrolidínicos	46
<b>Quadro 3</b>	Substituintes e rendimentos das isoxazolil-semicarbazonas e tiosemicarba- zonas pirrolidínicas	47
<b>Quadro 4</b>	Substituintes e rendimentos das isoxazol-hidrazonas	50

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>18</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b>	<b>21</b>
2.1	ISOXAZOLINAS	21
2.1.1	<b>Generalidades</b>	<b>21</b>
2.1.2	<b>Química</b>	<b>22</b>
2.1.3	<b>Propriedades biológicas</b>	<b>24</b>
2.2	SEMICARBAZONAS E TIOSEMICARBAZONAS	27
2.2.1	<b>Generalidades</b>	<b>27</b>
2.2.2	<b>Química</b>	<b>27</b>
2.2.3	<b>Propriedades biológicas</b>	<b>29</b>
2.3	HIDRAZONAS	31
2.3.1	<b>Generalidades</b>	<b>31</b>
2.3.2	<b>Química</b>	<b>32</b>
2.3.3	<b>Propriedades biológicas</b>	<b>33</b>
<b>3.</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>37</b>
3.1	OBJETIVO GERAL	37
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
<b>4.</b>	<b>METODOLOGIA</b>	<b>39</b>
4.1	ABORDAGEM I: OBTENÇÃO DAS SEMICARBAZONAS E TIOSSEMI-CARBAZONAS DOS HETEROCICLOS 2-ISOXAZOLINA[5,4- <i>B</i> ]PIRROLIDINA.....	39
4.2	ABORDAGEM II- OBTENÇÃO DAS HIDRAZONAS DO HETEROCICLO 2-ISOXAZOLINA[5,4- <i>B</i> ]PIRROLIDINA.....	40
4.3	ABORDAGEM III- ESTUDO ANTIBACTERIANO E ANTIFÚNGICO.....	41
<b>5.</b>	<b>RESULTADO E DISCUSSÃO</b>	<b>44</b>
5.1	SÍNTESE DO ÉSTER ISOXAZOLÍNICO A PARTIR DO ENECARBAMATO ENDOCÍCLICO N-(BENZOILCARBONIL)-2-PIRROLINA	45
5.2	SÍNTESE RACÊMICA DAS SEMICARBAZONAS E TIOSSEMICARBAZONAS DERIVADAS DE N-(BENZOIL)-2-	46

	ISOXAZOLINA[5,4- <i>B</i> ] PIRROLIDINA	
5.2.1	<b>Síntese dos álcoois isoxazolínicos</b>	<b>47</b>
5.2.2	<b>obtenção dos aldeídos isoxazolínicos, através da oxidação de swern dos álcoois isoxazolínicos</b>	<b>48</b>
5.2.3	<b>Obtenção de isoxazolil-semicarbazonas e tiossemicarbazonas</b>	<b>49</b>
5.3	SÍNTESE DAS HIDRAZONAS, DERIVADAS DA MISTURA RACÊMICA DO HETEROBICICLO 2-ISOXAZOLINA[5,4- <i>B</i> ]PIRROLIDINA	51
5.4	ESTUDO BIOLÓGICO	53
6.	<b>PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL</b>	<b>55</b>
6.1	SÍNTESE RACÊMICA DOS DERIVADOS SEMICARBAZONAS E TIOSEMICAR-BAZONAS DE 2-ISOXAZOLINAS PIRROLIDÍNICAS	56
6.1.1	<b>Trímero da 1-pirrolina (isômero <math>\alpha</math>)</b>	<b>56</b>
6.1.2	<b><i>N</i>-(benziloxicarbonil)-2-pirrolina</b>	<b>57</b>
6.1.3	<b>Éster 6-benzil-3-etil do ácido 3a,4,5,6a-tetrahidropirrolo [3,2-d]isoxazol-3,6-dicarboxílico</b>	<b>58</b>
6.1.4	<b>Éster etílico do ácido 3a,4,5,6,6a-tetrahidropirrolo[3,2-d]isoxazol-3-carboxílico</b>	<b>59</b>
6.1.5	<b>Éster etílico do ácido 6-(4-fluorobenzoil)-4,5,6a tetrahydro-3ah-pirrolo[3,2-d]isoxazol-3-carboxílico</b>	<b>60</b>
6.1.6	<b>Éster etílico do ácido 6-(4-clorobenzoil)-4,5,6,6a- tetrahydro-3ah-pirrolo[3,2-d]isoxazol-3-carboxílico</b>	<b>61</b>
6.1.7	<b>Obtenção do álcool (4-fluorofenil)-(3-hidroximetil- 3a,4,5,6a-tetrahydro-pirrolo[3,2-d]isoxazol-6-il-metanona</b>	<b>62</b>
6.1.8	<b>Obtenção do álcool (4-clorofenil)-(3-hidroximetil-3a,4,5,6a-tetrahydro-pirrolo[3,2-d]isoxazol-6-il-metanona</b>	<b>64</b>
6.1.9	<b>Obtenção do 6-(4-flúorbenzoil)-4,5,6,6a-tetrahydro- 3ahpirrolo[3,2-d]isoxazol-3-carbaldeído</b>	<b>65</b>
6.1.10	<b>obtenção do 6-(4-clorobenzoil)-4,5,6,6a-tetrahydro-3ah-pirrolo[3,2-d]isoxazol-3-carbaldeído</b>	<b>66</b>
6.1.11	<b>Obtenção da tetrahydro-pirrolo[3,2-d]isoxazolo-6-il-metanona-hidrazina-carboxiamida</b>	<b>67</b>
6.1.12	<b>Obtenção da tetrahydro-pirrolo[3,2-d]isoxazolo-6-il-metanona-</b>	<b>68</b>

	<b>hidrazina-carbotioamida</b>	
<b>6.1.13</b>	<b>Obtenção da tetrahydro-pirrolo[3,2-d]isoxazolo-6-il-metanona-hidrazina-carboxiamida</b>	<b>69</b>
<b>6.1.14</b>	<b>obtenção da tetrahydro-pirrolo[3,2-d]isoxazolo-6-il-metanona-hidrazina-carbotioamida</b>	<b>69</b>
<b>6.2</b>	<b>SÍNTESE RACÊMICA DOS DERIVADOS BENZENO-SULFONIL-HIDRAZONAS 2- ISOXAZOLINAS PIRROLIDÍNICAS</b>	<b>70</b>
<b>6.2.1</b>	<b>Obtenção da benzeno sulfonil hidrazida do ácido-6(4-flúor-benzoil)- 4,5,6,6a-tetrahydro-3ah-pirrolo[3,2-d]isoxazol-3-carboxílico</b>	<b>70</b>
<b>6.2.2</b>	<b>Obtenção da benzeno sulfonil hidrazida do ácido-6-(4-cloro-benzoil)- 4,5,6,6a-tetrahydro-3ah-pirrolo[3,2-d]isoxazol-3-carboxílico</b>	<b>71</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>73</b>
<b>8</b>	<b>PERSPECTIVAS</b>	<b>74</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>75</b>
	<b>ANEXOS</b>	<b>82</b>

# INTRODUÇÃO

## 1. INTRODUÇÃO

Compostos heterocíclicos estão distribuídos na natureza, desempenhando papel essencial no desenvolvimento da vida no planeta. Assim, um grande número desses compostos é conhecido e este número vem crescendo rapidamente nas últimas décadas, proporcionalmente ao desenvolvimento dos processos de síntese, o que demonstra o fato pelo qual os compostos heterociclos são alvos constantes do interesse de pesquisadores em várias áreas da química <sup>(8)</sup>.

Dentre os inúmeros heterociclos existentes, as isoxazolininas (heterociclo de cinco membros contendo átomos de oxigênio e nitrogênio ligados entre si além de uma ligação dupla <sup>(16)</sup>) são uma classe de muito interesse, pois compostos contendo o núcleo isoxazolinina são conhecidos por apresentarem diversas atividades biológicas de grande interesse clínico, dentre elas as propriedades antibacteriana e antifúngica <sup>(9,10,11)</sup>.

Compostos contendo as funcionalidades semicarbazona e tiossemicarbazona também são amplamente pesquisados quanto às suas atividades biológicas, e tem apresentado excelentes resultados em atividade antibacteriana e antifúngica <sup>(12)</sup>, assim como as hidrazonas (moléculas contendo o fragmento triatômico N-N=C, podendo o nitrogênio amínico e/ou o carbono estarem em heterociclos não aromático), que em diversos estudos vem se mostrando altamente importantes no incremento da atividade antimicrobiana de diversos compostos <sup>(13,14)</sup>.

Ao longo da história, a humanidade passou por extensos períodos de pandemias de diversas doenças infecciosas. Casos aparentemente simples, como infecções de ouvido, pele ou garganta, resultavam frequentemente em surdez, morte ou sequelas devido a complicações e septicemia. A descoberta da penicilina no início do século XX resultou em uma significativa redução das mortes por infecções, e a partir de então os antimicrobianos passaram a assumir grande importância, não apenas na área de saúde, mas também na economia <sup>(1)</sup>.

No entanto, após a revolução causada por essa descoberta, outro problema surgiu, como a capacidade de adaptação dos micro-organismos em sobreviver à atuação destas drogas <sup>(2)</sup>. Já nos anos 50, após o período da era antimicrobiana,

começaram a surgir cepas de bactérias resistentes, e desde então, a resistência microbiana tem se tornado uma grande preocupação para a saúde pública <sup>(3)</sup>. Tal fato pode ser observado na pesquisa de Demerec em 1948, onde ele avaliou a susceptibilidade de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* sobre a penicilina e a estreptomicina <sup>(4)</sup>.

Ao descobrir a penicilina em 1929, Fleming foi o primeiro observador da resistência natural de micro-organismos aos antibióticos, descrevendo que bactérias do grupo das Enterobactérias e a *Pseudomonas aeruginosa* não eram inibidas pelo antibiótico. A causa desta resistência natural foi, pouco depois, descoberta por Abraham e Chain, que, em 1940, um ano antes da primeira publicação sobre o uso clínico da penicilina, demonstraram em extratos de *E. coli* uma enzima capaz de destruir a ação da penicilina, a qual denominaram penicilinase <sup>(1)</sup>.

Os mecanismos de resistência dos micro-organismos aos quimioterápicos são de origem natural ou intrínseca; e adquirida, esta última se apresenta como a forma mais preocupante, que é resultante de alteração genética, que pode surgir por mutação cromossômica ou por transferência de mecanismos genéticos, mediada por plasmídeos, transposons e integrons <sup>(5,6)</sup>.

São vários os mecanismos responsáveis pela resistência, que os micro-organismos podem desenvolver, dentre os principais podem-se citar os seguintes: impermeabilidade à droga, inativação por enzimas, modificação do sítio de ligação ao fármaco e bombeamento do fármaco para o meio externo <sup>(7)</sup>.

Diante dos relatos de resistência dos micro-organismos aos antimicrobianos, dá-se a urgência da descoberta de novos fármacos com atividade antimicrobiana, que sejam, além de eficazes contra os mecanismos de resistência, seguros ao usuário.

Com isso, a proposta deste trabalho é sintetizar novas semicarbazonas, tiosemicarbazonas e hidrazonas, através do método de hibridação molecular com 2-isoxazolinazabílicas, objetivando a exploração biológica dos novos compostos quanto às atividades antibacteriana e antifúngica.

# REVISÃO DA LITERATURA

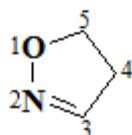
## 2- REVISÃO DA LITERATURA

### 2. 1- ISOXAZOLINAS

#### 2.1.1 – Generalidades

Os compostos heterocíclicos compreendem uma grande fração dos compostos descritos na literatura <sup>(15)</sup>. Em outubro de 2010, das 55 milhões de substâncias químicas registradas na base de dados do *Chemical Abstracts* aproximadamente metade eram heterociclos.

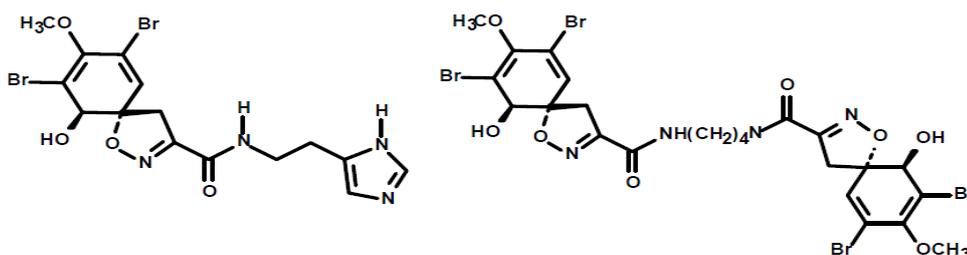
A isoxazolina é um herociclo de cinco membros contendo átomos de oxigênio e nitrogênio ligados entre si além de uma ligação dupla <sup>(16)</sup>. Abaixo a imagem da 2-Isoxazolina (Figura 1), núcleo explorado por nosso grupo de pesquisa devido ao seu excelente potencial biológico e sintético.



**Figura 1.** Anel 2-Isoxazolina

A ocorrência natural de 2-isoxazolininas é bastante restrita, sendo estas basicamente encontradas em algumas espécies de esponjas marinhas, sendo a *Aplysina fistulares* e a *Aplisina aerophaba* exemplos delas.

Os alcaloides isoxazolínicos expostos na Figura 2 são isolados da esponja *Aplisina aerophaba* e estão envolvidos no mecanismo de defesa da esponja contra peixes predadores. Estas isoxazolininas são precursoras de substâncias tóxicas formadas por catálise enzimática <sup>(17)</sup>.

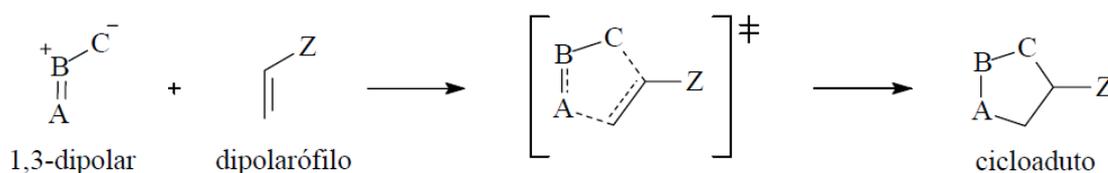


**Figura 2.** Alcalóides Isoxazolínicos naturais

## 2. 1.2 – Química

Alguns métodos podem ser utilizados para obtenção das isoxazolinonas, dentre eles podemos citar a ciclização nitrosativa de 3-cloro-1-nitropropano <sup>(18)</sup>, a partir de nitrato de sódio e nitrito de *n*-propila; reação entre 3-isoxazolin-5onas com olefinas <sup>(19)</sup>; também as reações fotoquímicas de ciclopropanos 1,2-dissubstituídos com NOBF<sub>4</sub> <sup>(20)</sup>; reações envolvendo dipolarófilos envolvendo selênio <sup>(21)</sup>; entre outros. Entretanto o método mais utilizado para a síntese de 2-isoxazolinonas é a reação de cicloadição 1,3- dipolar com vários relatos na literatura.

Nas reações de cicloadição 1,3-dipolar a união de dois sistemas π leva à formação de duas novas ligações σ, como pode ser observado no Esquema 1 abaixo.



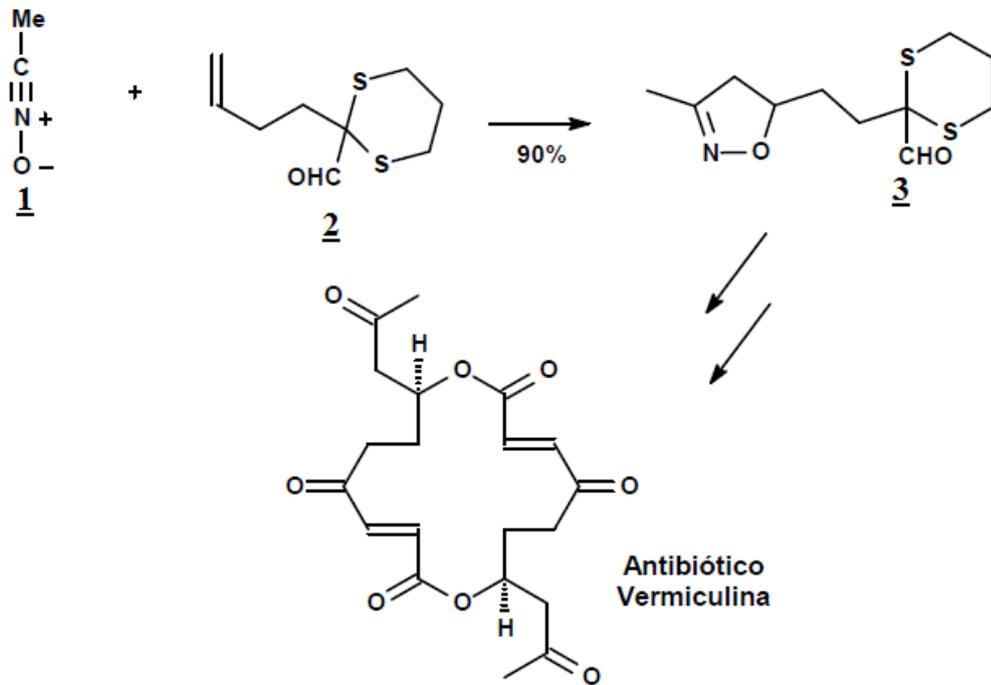
**Esquema 1.** Exemplo geral de uma reação de cicloadição

A principal rota para a obtenção do anel isoxazolinico é a partir da reação de cicloadição 1,3-dipolar entre um óxido de nitrila e um alqueno <sup>(22)</sup>. Nestas adições, uma espécie irá participar com quatro elétrons distribuídos sobre três átomos (chamado 1,3-dipolo) e a outra com dois elétrons distribuídos sobre dois átomos (chamado dipolarófilo), levando ao anel isoxazolinico. Deste modo, estas cicloadições são definidas como reações [2+3], onde os números representam o número de átomos envolvidos na formação do anel.

Alguns exemplos representativos de utilização de 2-isoxazolinonas em síntese orgânica, como material de partida, ou como intermediário sintético, são descritas a seguir.

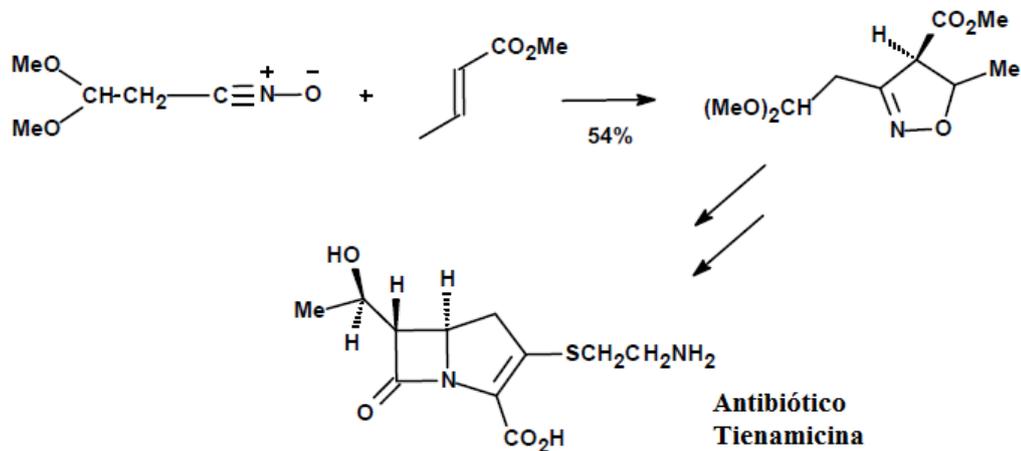
O antibiótico vermiculina, obtido da fermentação do caldo de *Penicillium vermiculatum*, foi sintetizado através de uma reação de cicloadição 1,3-dipolar do óxido de acetonitrila **1** com o alqueno **2**, produzindo a isoxazolinona **3**, com rendimento

de 90%, que após algumas etapas subsequentes levou à formação do antibiótico esperado <sup>(9)</sup>, como se pode observar no Esquema 2.



**Esquema 2.** Síntese do antibiótico Vermiculina

De forma similar, o antibiótico Tienamicina (ativo contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e produtoras de betalactamase), obtido da fermentação do caldo de micro-organismo de solo *Streptomyces cattleya*, foi obtido, sinteticamente, via reação de cicloadição 1,3-dipolar, tendo uma 2-isoxazolina como intermediário sintético, com rendimento de 54% <sup>(24)</sup> conforme exposto no Esquema 3.



**Esquema 3.** Síntese do antibiótico Tienamicina

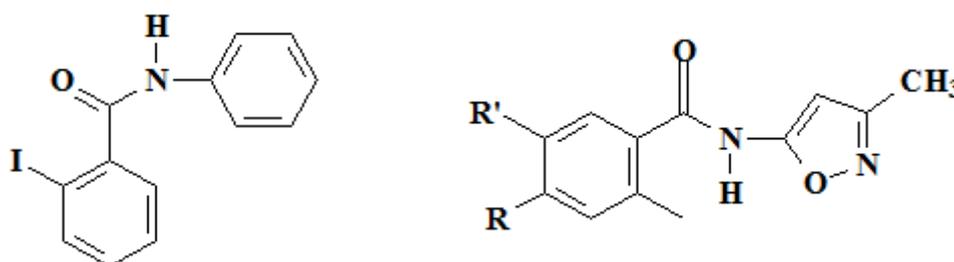
### 2.1.3 – Propriedades biológicas

Existem inúmeros relatos na literatura sobre compostos bioativos contendo o núcleo 2-isoxazolina. Dentre as atividades biológicas descritas podem ser citadas a herbicida, a antimicrobiana <sup>(74)</sup> e a atividade neurotransmissora <sup>(57)</sup>.

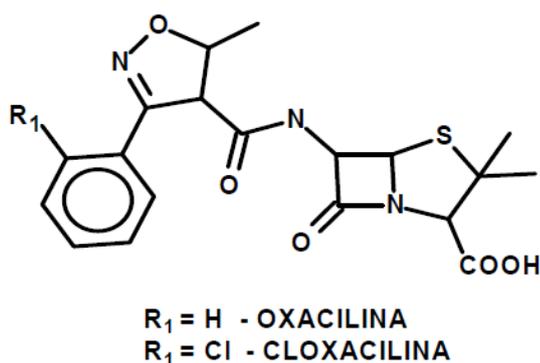
Nos últimos anos alguns estudos foram relatados com moléculas contendo o núcleo isoxazol quanto a sua ação antimicrobiana, demonstrando que apresentou excelente atividade tanto frente a bactérias <sup>(11)</sup> como frente a fungos <sup>(10)</sup>.

Raffa et al. <sup>(10)</sup>, em um trabalho de 1999, sintetizaram e testaram novos *n*-isoxazolil-2-iodobenzamidas (Figura 3) quanto à atividade antifúngica. Esses constituem análogos de fungicidas utilizados na agricultura, e foram testados pelo método de difusão em ágar, utilizando-se benodanil como droga de referência. Dentre os compostos testados os compostos 3b (R=Cl e R'=H) e 9<sup>a</sup> (R, R'=H) apresentaram atividade antifúngica semelhante a do benodanil.

Penicilinas semissintéticas comerciais, tais como oxacilina e cloxacilina (Figura 4) possuem em sua cadeia lateral o radical isoxazolina <sup>(11)</sup>.

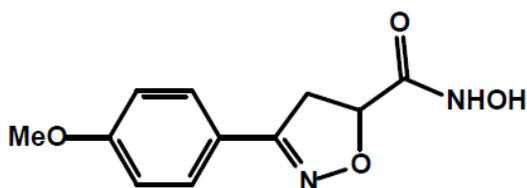


**Figura 3.** Estruturas químicas do benodanil e da *n*-isoxazolil-2-iodobenzamida



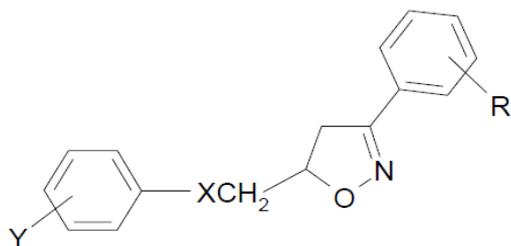
**Figura 4.** Estrutura da oxacilina e cloxacilina

Em 2002 foi relatada uma série de heterociclos inibidores da biossíntese de lipídeos que apresentavam atividade contra bactérias Gram negativas. Estes ciclos têm como base uma 2-isoxazolina (Figura 5) que apresentou excelente atividade contra *Escherichia coli* <sup>(75)</sup>.

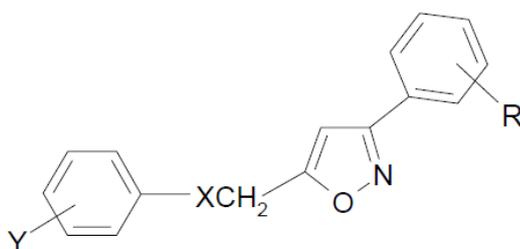
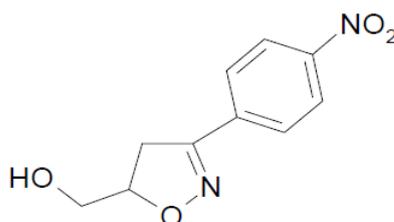


**Figura 5.** Heterociclo contendo núcleo isoxazolina

Em 2003, Velikorodov e colaboradores sintetizaram e avaliaram a atividade antimicrobiana de isoxazolininas e oxazóis 3,5-dissubstituídos com grupos carbamato (Figura 6). A atividade antimicrobiana dos carbamatos, derivados de isoxazolininas e isoxazóis sintetizados foi determinada contra isolados de *S. aureus*, *E. coli* e *Micrococcus ssp.* de isolados clínicos. Muitos dos compostos sintetizados possuíam atividade antimicrobiana, a qual depende da natureza do substituinte e sua posição no núcleo benzênico no átomo C3 do fragmento azólico <sup>(11)</sup>.



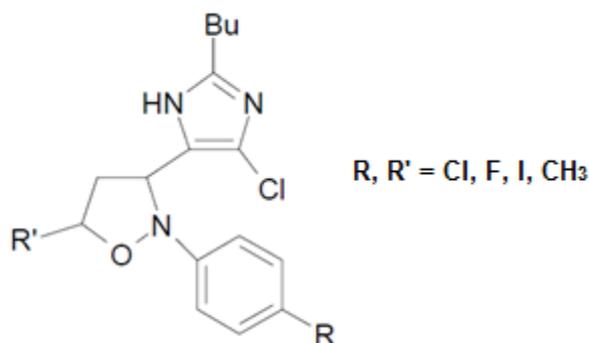
X= NHCO<sub>2</sub>, O; Y= H, NHCO<sub>2</sub>Me;  
 R'= H, 4-OMe, 3,4-OCH<sub>2</sub>O, 4-Cl, 4-Br, 3-NO<sub>2</sub>, 4-NO<sub>2</sub>, 2-OMe, 3-Br, 3,4(OMe)<sub>2</sub>



R= alquila; X= NHCO<sub>2</sub>; Y= H  
 R'= H, 4-OMe, 3,4-OCH<sub>2</sub>O, 4-Cl, 4-Br, 3-NO<sub>2</sub>, 4-NO<sub>2</sub>, 2-OMe, 3-Br, 3,4(OMe)<sub>2</sub>

**Figura 6.** Isoxazolidinas e Isoxazol 3,5-dissubstituídos

Em um estudo realizado em 2004 foram sintetizadas novas isoxazolidinas 5-imidazolil substituídas (Figura 7) e testadas quanto à inibição microbiana. Os novos compostos foram avaliados quanto à sua atividade antibacteriana, apresentando sensibilidade amostras de *S. aureus*, *E. coli* e *Bacillus subtilis*. A atividade antifúngica foi confirmada em isolados de *Fusarium moniliforme*, *Aspergillus niger* e *Acremonium strictum* <sup>(8)</sup>.

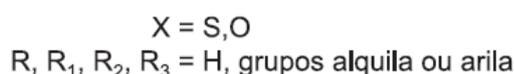
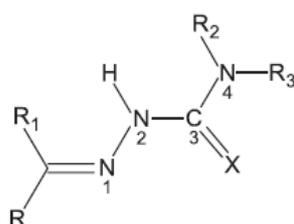


**Figura 7.** Isoxazolidina 5-imidazolil substituídas

## 2 -2 – SEMICARBAZONAS E TIOSSEMICARBAZONAS

### 2.2.1- Generalidades

Semicarbazonas e tiossemicarbazonas são compostos de considerável interesse científico, devido as suas importantes propriedades químicas e biológicas, tais como as atividades antitumoral, antibacteriana, antiviral, antiprotozoária, citotóxica, dentre outras <sup>(25, 26, 27, 28, 29)</sup>. Tais estruturas (Figura 8) apresentam um amplo perfil farmacológico e constituem uma importante classe de compostos, cujas propriedades têm sido extensivamente estudadas na Química Medicinal.



**Figura 8.** Estrutura química genérica das Semicarbazonas e Tiossemicarbazonas

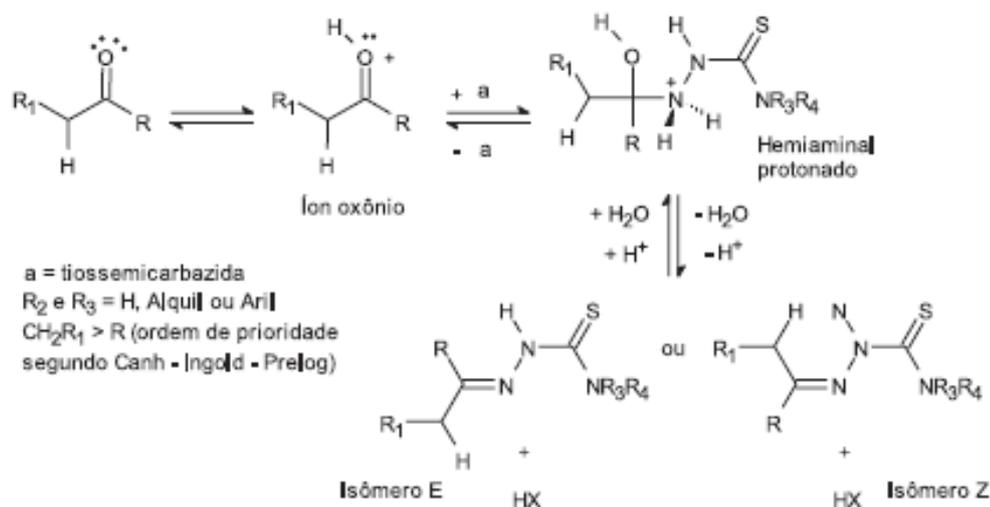
### 2.2.2- Química

As semicarbazonas e tiossemicarbazonas apresentam-se como sistemas com extrema deslocalização eletrônica, principalmente quando há grupos aromáticos

ligados ao carbono da imina. Esta afirmação está baseada nos trabalhos pioneiros de Palenik et al. <sup>(30)</sup>.

As semicarbazidas e tiossemicarbazidas podem ser adquiridas comercialmente. A síntese é descrita pela condensação equimolar de um derivado carbonilado, do tipo aldeído ou cetona, com semi/tiossemicarbazidas em meio alcoólico sob refluxo e quantidades catalíticas de ácido <sup>(31,32,33)</sup>. Esta reação é bastante conhecida por sua alta quimiosseletividade, versatilidade e rapidez, apresentando geralmente altos rendimentos <sup>(34,35,36)</sup>.

O mecanismo reacional é semelhante ao de formação de iminas. Inicia-se com a protonação do oxigênio da carbonila para formar o nitrogênio intermediário íon oxônio, seguida de ataque nucleofílico do nitrogênio N-1 da semi/tiossemicarbazida para formar o intermediário hemiaminal protonado. Este perde uma molécula de água e, após neutralização, forma-se a tiossemicarbazona <sup>(37,38)</sup> (Esquema 4).



**Esquema 4.** Mecanismo de formação de Semi/Tiossemicarbazonas

Apesar da reação ser favorável à formação das semi/tiossemicarbazonas, é fácil notar o caráter reversível de todas as etapas de sua síntese, daí a importância da utilização da catálise ácida, em pH controlado. Em geral, a formação da semi/tiossemicarbazona é mais rápida em pH entre 4 e 5. Em valores de pH menores que 4 há possibilidade de ocorrer protonação do nitrogênio N-1 da semi/tiossemicarbazida e, conseqüentemente, a velocidade de condensação será

mais lenta. Por outro lado, em pH > 5, a velocidade de reação também diminui, visto que a carbonila se encontrará progressivamente menos protonada <sup>(37,38)</sup>.

### 2.2.3- Propriedades biológicas

As atividades biológicas das semicarbazonas e tiossemicarbazonas podem se dar, principalmente, por três mecanismos:

1. Inibição da enzima redutase ribonucleotídeo fosfatase (essencial à síntese de DNA);
2. Criação de lesões no DNA por ruptura oxidativa e
3. Ligações a bases nitrogenadas de DNA e RNA impedindo a replicação das bases <sup>(12,41,42)</sup>.

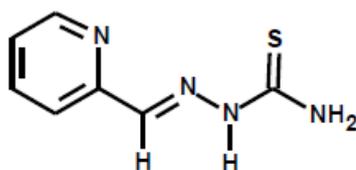
O interesse pelas propriedades farmacológicas das semi/tiossemicarbazonas não é recente. Tal fato pode ser comprovado por um trabalho realizado em 1949 por Hoggarth et al., onde se almejava conseguir compostos com atividade frente *Mycobacterium tuberculosis* <sup>(43)</sup>. No ano seguinte, pesquisa publicada por Hanre et al. visava à formação de derivados de tiossemicarbazonas, quanto à mesma atividade <sup>(44)</sup>.

As semicarbazonas e tiossemicarbazonas possuem um importante papel na Química Medicinal Inorgânica, em razão de sua capacidade quelante e do papel da coordenação no seu mecanismo bioquímico de ação. Apesar da ampla versatilidade farmacológica desses compostos como uma classe, especificidades estruturais podem levar à manifestação de atividades específicas. Para os complexos metálicos, em alguns casos é possível modular a atividade através do desenho do ligante ou através da escolha do metal <sup>(12)</sup>.

Tiossemicarbazonas e seus complexos metálicos apresentam um amplo espectro de atividades antimicrobianas, inibindo o crescimento de bactérias Gram positivas, tais como, *Staphylococcus faecalis*, *Streptococcus faecalis* e *Enterococcus*, mas não são bons inibidores de bactérias Gram negativas tais como *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitides*, *Pseudomonas ssp.*, *Klebsiella ssp.*, *Enterobacter ssp.*, *Shigella ssp.*, *Escherichia coli* e *Proteus ssp.* <sup>(45)</sup>.

A atividade dessa classe de compostos e seus complexos, contra diferentes culturas de fungos, tais como: *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus niger*, *Amathia alternata*, *Paecilomyces variotii* e outras, foi e continua sendo amplamente investigada na literatura <sup>(40,46)</sup>.

Um estudo elaborado por Chandra et al., avaliou a atividade antimicrobiana de tiossemicarbazonas e seus complexos de zinco e mercúrio sobre as bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* e *S. epidermides*, e Gram-negativas *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, além dos fungos *Candida albicans* e *Aspergillus Níger* <sup>(41)</sup>. No resultado antibacteriano o ligante (Figura 9) se apresentou mais ativo que os seus complexos metálicos, entretanto os resultados antifúngicos foram mais promissores quando os ligantes se encontravam complexados aos metais <sup>(41)</sup>.



**Figura 9.** Tiossemicarbazona ligante

Em dois trabalhos de Kasuga et al. <sup>(47,48)</sup> bons resultados foram obtidos contra os micro-organismos *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Aspergillus Níger* e *Penicillium citrinum*. No primeiro foram utilizados complexos de antimônio III dos ligantes semicarbazonas e tiossemicarbazonas apresentadas na Figura 10 abaixo.

Já no segundo estudo, foram sintetizados complexos de zinco II dos ligantes da Figura 11. Em ambos os trabalhos tanto os ligantes quanto os complexos se apresentaram ativos.

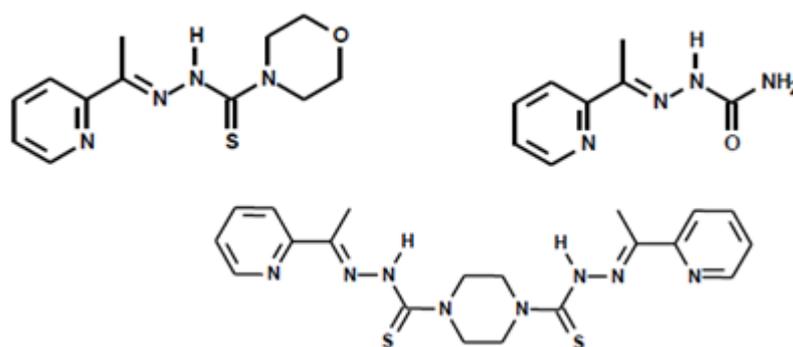


Figura 10. Semicarbazonas e Tiosemicarbazonas

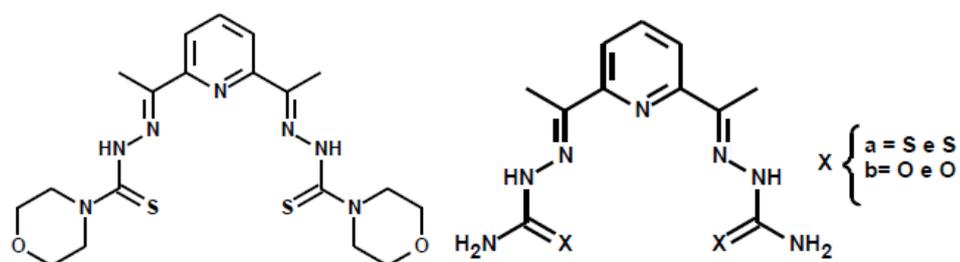
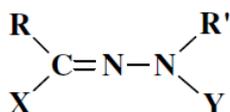


Figura 11. Semi/Tiosemicarbazonas ligantes de complexos metálicos

## 2.3- HIDRAZONAS

### 2.3.1- Generalidades

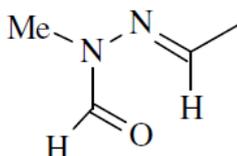
As hidrazonas pertencem à classe dos azometinos, na qual também estão as iminas e oximas, e se diferenciam destas pela presença de dois átomos de nitrogênio. Na literatura, as hidrazonas não são discutidas separadamente, mas citadas como derivados de compostos carbonílicos, ou como identificador de aldeídos e cetonas <sup>(49)</sup>. São consideradas hidrazonas todas as moléculas contendo o fragmento triatômico N-N=C, podendo o nitrogênio amínico e/ou o carbono estarem em heterociclos não aromático, como pode-se visualizar na Figura 12.



R e R' = H, alquila, arila, acila, heterociclo;  
 Y = H, alquila, arila, heterociclo, acila, -P(O)(OR)<sub>2</sub>;  
 X = H, alquila, arila, acila, heterociclo, halogênio, OR'', SR, CN,  
 SO<sub>2</sub>R, NO<sub>2</sub>, NHNR''R''', NHNHR'', N=NR'', COOR'', CONR''R'''

**Figura 12.** Fragmento triatômico mínimo que caracteriza as hidrazonas

A Figura 13 mostra a Gyromitrina, uma hidrazona de ocorrência natural, extraída do falso cogumelo *Gyromitra esculenta* <sup>(50)</sup>.

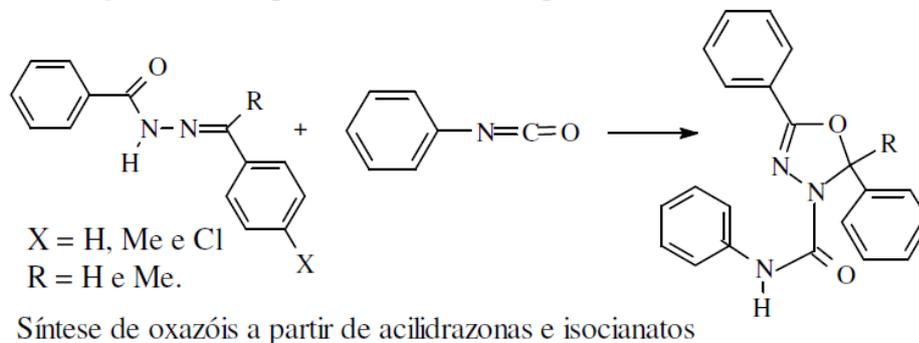
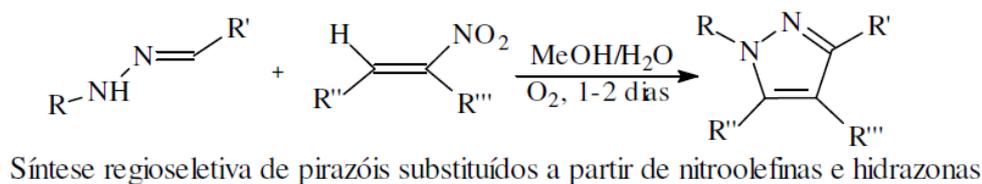


**Figura 13.** Gyromitrina, hidrazona de ocorrência natural

### 2.3.2- Química

As hidrazonas tem uma larga aplicação na síntese de moléculas com as mais variadas estruturas, além de serem ligantes para um grande número de cátions metálicos. São aplicadas como plastificantes e estabilizadores para polímeros, iniciadores de polimerização, antioxidantes, etc <sup>(50)</sup>.

Uma importante aplicação química das hidrazonas é a síntese de heterociclos, como pirazóis, sintetizados a partir de hidrazonas monossubstituídas e nitroolefinas <sup>(52)</sup> e oxazóis a partir de acilhidrazonas e isocianatos <sup>(53)</sup>, como demonstrado no Esquema 5 <sup>(50)</sup>.



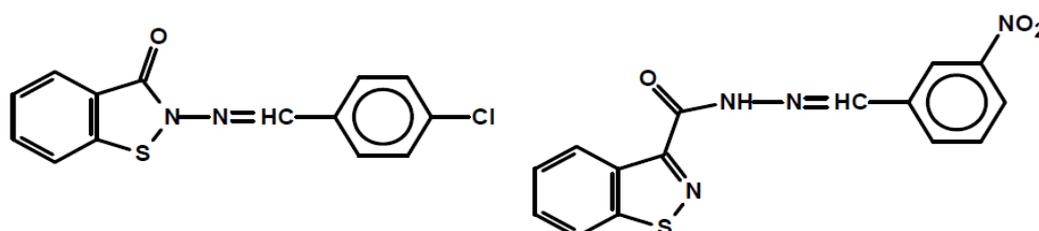
**Esquema 5.** Sínteses de Heterociclos a partir de Hidrazonas

### 2.3.3- Propriedades Biológicas

Hidrazonas têm demonstrado possuir, entre outras atividades farmacológicas, as atividades antimicrobiana, anticonvulsivante, analgésica, anti-inflamatória, antiplaquetária, atividades antituberculose e antitumoral <sup>(54)</sup>. O que gera grande interesse por parte dos pesquisadores em sintetizar derivados destes grupos.

Nas últimas décadas é crescente a prevalência de micro-organismos resistentes a várias drogas tidas como de escolha no combate às infecções microbianas. Na busca de compostos capazes de solucionar este grave problema de saúde, derivados de hidrazonas tem sido uma grande ferramenta <sup>(51)</sup>.

Uma série de compostos hidrazônicos (Figura 14), derivadas da hidrazida 1,2-benzotiazol, foram sintetizadas por Vicine et al e apresentou atividade antibacteriana e antifúngica bastante significativa, o que pode comprovar a importancia do grupo hidrazona para esta atividade <sup>(13)</sup>.



**Figura 14.** Compostos hidrazônicos

Inúmeros outros estudos demonstraram a importância das hidrazonas na atividade antimicrobiana. Um exemplo é o trabalho de Loncle et al em 2004, onde uma série de hidrazonas, sintetizadas a partir de derivados do colesterol, (Figura 15) teve atividade avaliada frente a diversos micro-organismos patógenos. Obtendo os resultados mais satisfatórios resultados contra *Candida albicans*, a uma concentração de 1,5 µg/mL <sup>(14)</sup>.

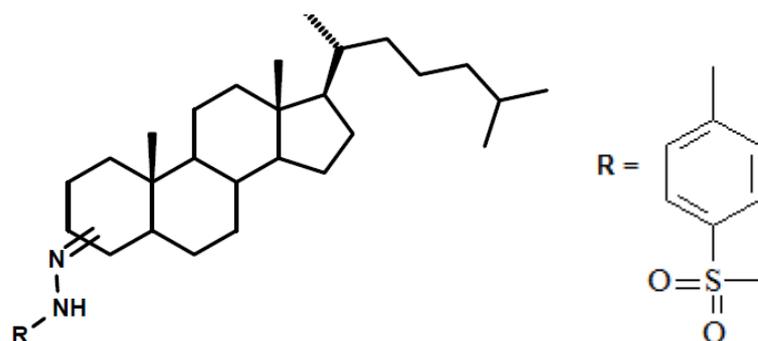


Figura 15. Derivados de hidrazona.

Em 99, Tavares et al sintetizaram seis análogos da Figura 16 através da variação do substituinte na posição *para* do grupamento benzoíla do heteroátomo do anel heterocíclico. Os testes microbiológicos realizados indicaram que os compostos apresentaram excelente atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, na concentração de 0,16-63 µg/mL <sup>(55)</sup>.

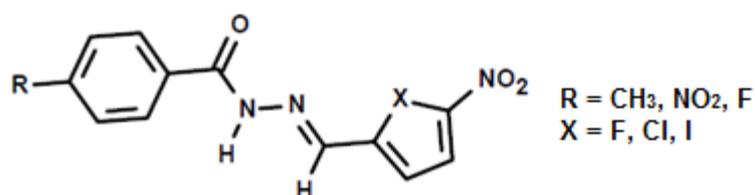


Figura 16. Análogos de hidrazonas.

Em trabalhos anteriores desenvolvidos por nosso grupo de pesquisa, foi desenvolvida uma nova metodologia sintética, baseada nas reações de cicloadição 1,3-dipolar de enecarbamatos de 5 membros com *N*-óxidos de nitrila, como pode-se observar no Esquema 6 abaixo <sup>(56)</sup>.





# OBJETIVOS

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1- OBJETIVO GERAL

Síntetizar novas semicarbazonas, tiossemicarbazonas e hidrazonas isoxazolínicas obtidas por hibridação molecular e avaliar os compostos quanto à atividade antibacteriana e antifúngica.

#### 3.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Reduzir a função éster em C3 das isoxazolininas, ao respectivo aldeído isoxazolínico das isoxazolina[4,4-*b*]pirrolidina;
- Condensar os aldeídos isoxazolínicos com semicarbazidas, tiossemicarbazidas e hidrazidas, para produção das respectivas semicarbazonas, tiossemicarbazonas e hidrazonas;
- Elucidar as estruturas das novas substâncias obtidas por técnicas espectrométricas de RMN de  $^1\text{H}$ , RMN de  $^{13}\text{C}$  (1D e 2D) e Infra-vermelho (IV-FT);
- Avaliar as atividades antibacteriana e antifúngica das semicarbazonas, tiossemicarbazonas e hidrazonas sintetizadas, de acordo com CLSI.

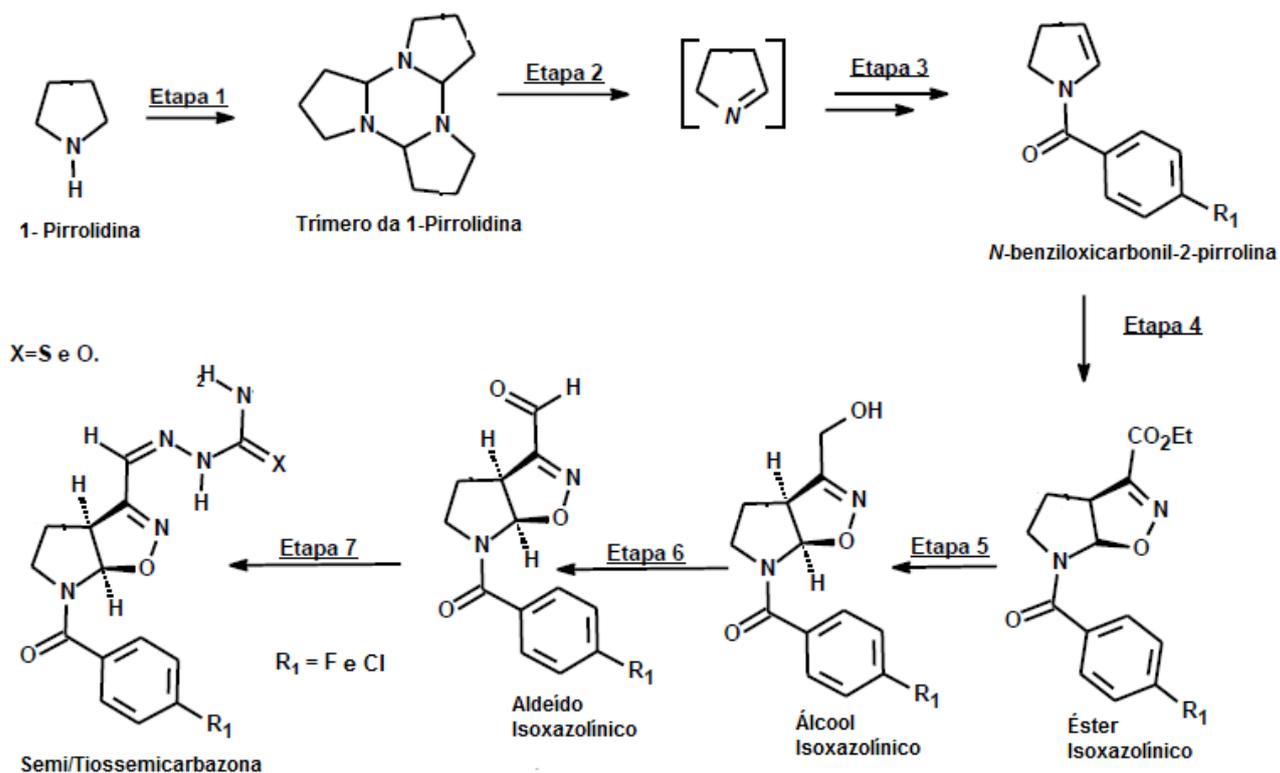
# METODOLOGIA

#### 4. METODOLOGIA

Trata-se de uma reação de hibridação molecular entre os aldeídos isoxazolínicos e as semicarbazidas, tiossemicarbazidas e hidrazidas utilizados como material de partida para os compostos.

##### 4.1- ABORDAGEM I: OBTENÇÃO DAS SEMICARBAZONAS E TIOSSEMICARBAZONAS DOS HETEROCICLOS 2-ISOXAZOLINA[5,4-B]PIRROLIDINA.

Para que pudéssemos obter as semicarbazonas e tiossemicarbazonas (Esquema 7), foi utilizado o cicloaduto isoxazolínicos obtido anteriormente em nosso grupo de pesquisa.



**Esquema 7.** Rota sintética utilizada para obtenção das semicarbazonas e tiossemicarbazonas derivadas do heterociclo 2-isoxazolina[5,4-*b*]pirrolidina

Para a produção das semicarbazonas e tiossemicarbazonas, foram utilizados cicloadutos isoxazolínicos de 5 membros desenvolvidos por De Faria e colaboradores<sup>(56)</sup>.

O Esquema 7 mostra a sequência de reações envolvidas em uma das etapas deste trabalho, visando à obtenção das semicarbazonas e tiossemicarbazonas derivadas dos núcleos isoxazolínicos pirrolidínicos.

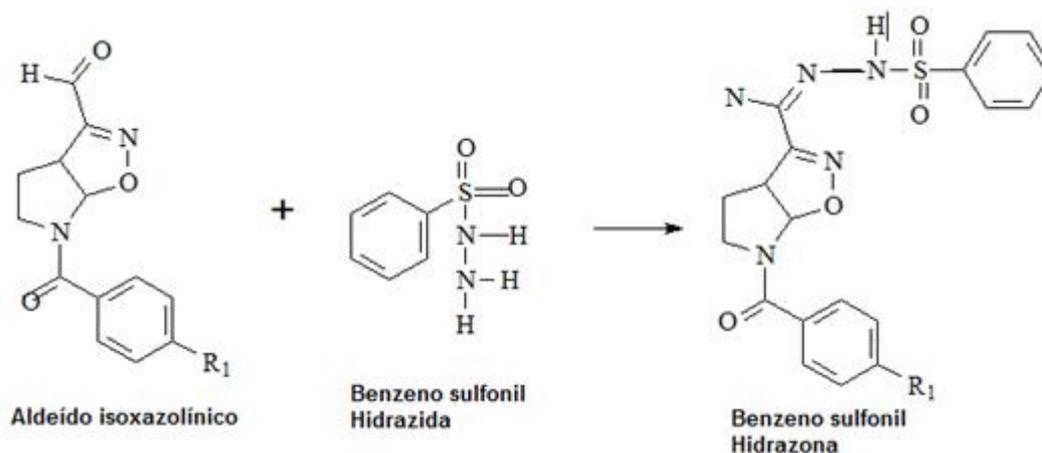
Para se alcançar a síntese dos ésteres isoxazolínicos de 5 de membros, material de partida do trabalho, foi utilizada a 1-pirrolidina, estes heterociclos foram trimerizados, e posteriormente *N*-acilados, com cloretos de acilas desejados, originando o enecarbamato *N*-benziloxicarbonil-2-pirrolina, etapa 3, os quais reagiram com o *N*-óxido de nitrila (etapa 4) formando o respectivo cicloaduto 2-isoxazolina[5,4-*b*]pirrolidina <sup>(56)</sup>.

A escolha dos substituintes “R” em N6, no cicloadutos pirrolidínico, varia desde grupamentos elétron atratores, a elétrons doadores, para se averiguar os possíveis efeitos eletrônicos nas atividades biológicas avaliadas.

A funcionalidade éster em C3 é reduzida ao respectivo álcool, por boroidreto de sódio, etapa 5. Os álcoois sofrem uma posterior oxidação de Swern <sup>(60)</sup>, originando o respectivo aldeído, derivado do biciclo isoxazolínicos de 5 membros. Os derivados de semicarbazonas e tiossemicarbazonas foram obtidos a partir da condensação direta entre aldeídos e uma semicarbazida e tiossemicarbazida, em meio ácido <sup>(61)</sup>.

#### 4.2- ABORDAGEM II- OBTENÇÃO DAS HIDRAZONAS DO HETEROCICLO 2-ISOXAZOLINA[5,4-*B*]PIRROLIDINA.

Conforme verificado na literatura, os compostos hidrazônicos apresentam significativa atividade antibacteriana e antifúngica <sup>(13,51)</sup>, o que nos fez explorar a possibilidade de incremento da atividade biológica ao adicionarmos esta funcionalidade ao nosso biciclo 2-isoxazolina[5,4-*b*]pirrolidina (Esquema 8).



**Esquema 8.** Rota sintética utilizada neste trabalho para obtenção das hidrazonas do heterociclo 2-isoxazolina[5,4-*b*]pirrolidina

Os derivados de hidrazonas foram obtidos a partir da condensação direta entre aldeídos e a benzeno sulfonil hidrazida, em meio ácido.

#### 4.3- ABORDAGEM III- ESTUDO ANTIBACTERIANO E ANTIFÚNGICO.

- 1- *Staphylococcus aureus*
- 2- *Bacillus subtilis*
- 3- *Micrococcus luteus*
- 4- *Enterococcus faecalis*
- 5- *Klebsiella pneumoniae*
- 6- *Candida albicans*
- 7- *Candida krusei*

Todos os micro-organismos testes são procedentes da coleção de micro-organismos do Departamento de Antibióticos da UFPE. E o estudo, de atividade antibacteriana e antifúngica, foi realizado segundo o método de difusão em Agar desenvolvido por Bauer e colaboradores <sup>(72)</sup>. As substâncias obtidas sinteticamente neste trabalho, foram submetidas ao “screening” antimicrobiano, sendo utilizados os seguintes meios de cultura:

Agar-Nutritivo (AN)

Agar Sabouraud (SAB)

Foram pesados 2,0 mg das tiossemicarbazonas *para-F* e *para-Cl* dos produtos a serem testados e solubilizados em 2,0 mL de DMSO, correspondendo a uma concentração de 1.000 µg/mL.

Os meios de cultura Agar Nutritivo e Agar Sabouraud foram preparados segundo as instruções dos seus fabricantes e esterilizados em autoclave à 121° por 15 minutos. O meio Agar-Nutritivo foi utilizado para a avaliação da atividade antibacteriana e o meio Agar Sabouraud, para avaliação da atividade antifúngica.

Em placas de Petri estéreis de 9,0 cm de diâmetro, foram adicionados 10,0 mL do meio de cultura, e colocadas em superfície plana até completa solidificação.

Os inóculos bacterianos foram obtidos a partir de uma cultura de 24 horas de cultivo e os inóculos fúngicos após 48 horas. As suspensões foram preparadas utilizando-se água destilada esterilizada e turbidez para o grau 0,5, da escala de Mac Farland <sup>(73)</sup>, equivalente a  $10^7 - 10^8$  UFC/mL. Desta suspensão, foram retirados 100,0 µL e espalhada com alça de Drigalski em toda superfície da placa.

Discos de papel de filtro com diâmetro de 6 mm foram saturados com 100,0 µL da solução da substância a ser testada, correspondendo a 10,0 µg de cada produto no disco.

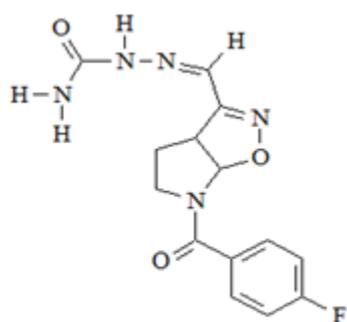
Após completa evaporação do solvente nos discos de papel, estes foram aplicados na superfície dos meios. As placas foram incubadas por 24 horas em estufa à 37° C para as bactérias e 48 horas à 30° C para os fungos. Após incubação, foram efetuadas as leituras dos diâmetros dos halos de inibição em milímetros (mm).

As tiossemicarbazonas foram submetidas, em triplicata, a testes antibacterianos para *Staphilococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae* e para antifúngico para *Candida albicans* e *Candida krusei*.

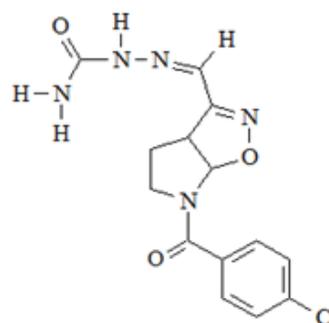
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

## 5- RESULTADOS E DISCUSSÃO

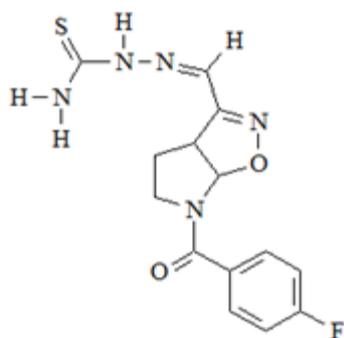
Os derivados foram obtidos através de uma metodologia simples, barata e com pouco tempo reacional. A purificação dos produtos (Figura 18) finais foi feita por recristalização em etanol, os mesmos foram obtidos na forma sólida.



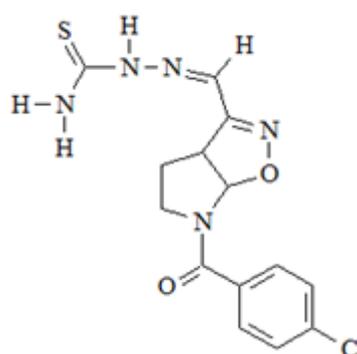
Semicarbazona P-F



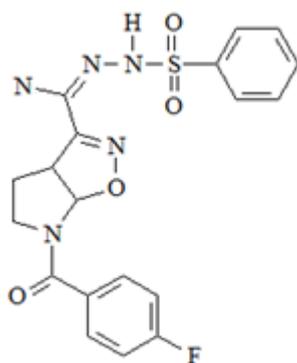
Semicarbazona P-Cl



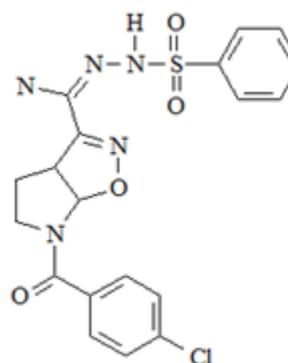
Tiosemicarbazona P-F



Tiosemicarbazona P-Cl



Benzeno sulfonil Hidrazona P-F

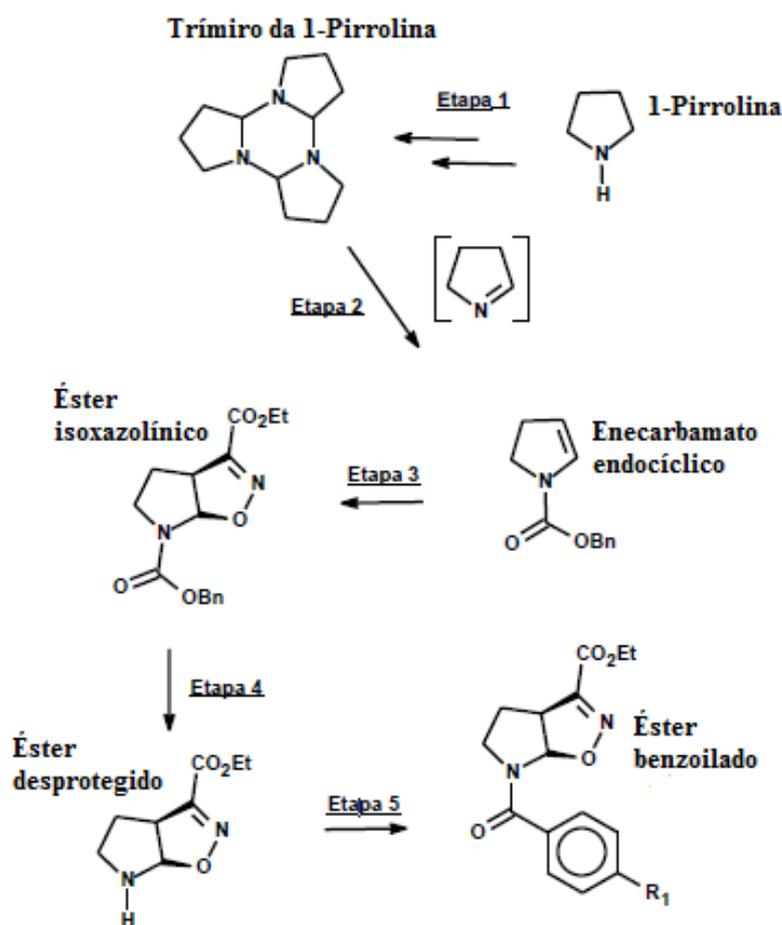


Benzeno sulfonil Hidrazona P-Cl

**Figura 18.** Estrutura dos derivados obtidos

## 5.1- SÍNTESE DO ÉSTER ISOXAZOLÍNICO A PARTIR DO ENECARBAMATO ENDOCÍCLICO N- (BENZOILOXICARBONIL)-2-PIRROLINA <sup>(56)</sup>.

Em 2009, De Faria et al. desenvolveram a via sintética de duas séries de ésteres isoxazolínicos bicíclicos piperidínicos (Esquema 9) e pirrolidínicos, sendo estes materiais de partida para síntese dos nossos novos derivados isoxazolínicos <sup>(56)</sup>.



**Esquema 9.** Rota sintética utilizada para obtenção do éster do heterociclo 2-isoxazolina[5,4-*b*]pirrolidina *N*-benzóilado

De Faria et al., em 2009, também caracterizaram as peculiaridades reacionais da síntese do bicíclico, onde, os enecarbamatos endocíclicos de 5 membros foram obtidos através da *N*-acilação da 1-pirrolina, à  $-78^{\circ}\text{C}$ , segundo o método de Kraus, que é desprotegido por  $\text{Pd}^{\circ}/\text{C}$  em metanol, na posição N6, formando o éster *N*-desprotegido, sendo seguidamente *N*-acylado por  $\text{ET}_3\text{N}$ ,  $\text{CHCl}_3$  anidros e o cloreto de benzoila adequado, formando o cicloaduto *N*-substituído <sup>(56)</sup>.

Apesar de a metodologia ser amplamente dominada, algumas melhorias foram realizadas, em uma dissertação de mestrado do nosso grupo de pesquisa, em algumas etapas da síntese do cicloaduto de 5 membros <sup>(59)</sup>. Por exemplo, na etapa 2, deixou-se de usar gelo seco e etanol (-78°C), e passou-se a recolher o monômero à temperatura ambiente ou à 0°C; de ambos os modos conseguiram-se rendimentos próximos dos que eram encontrados a -78°C. Outra interessante economia foi a retirada de cromatografia em coluna flash, utilizada na purificação dos ésteres, e passando esta a ser realizada por recristalização em etanol.

Os ésteres isoxazolínicos foram então utilizados como material de partida para o presente trabalho e a escolha do substituinte *N*-benzoila se deu graças às suas atividades biológicas, para que pudéssemos aperfeiçoar o resultado dos nossos produtos finais.

## 5.2- SÍNTESE RACÊMICA DAS SEMICARBAZONAS E TIOSSEMICARBAZONAS DERIVADAS DE *N*-(BENZOIL)-2-ISOXAZOLINA[5,4-*b*] PIRROLIDINA.

O mecanismo reacional utilizado para obtenção das semicarbazonas e tiossemicarbazonas foi a reação direta entre nosso aldeído isoxazolínico e as semicarbazidas e tiossemicarbazidas comerciais.

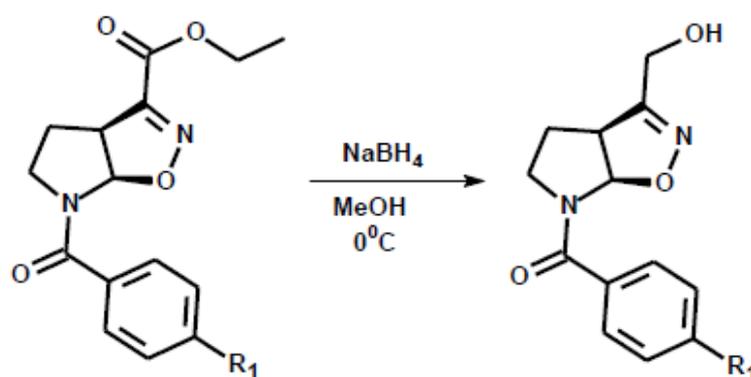
A literatura apresenta uma variedade de vias para a síntese de tiossemicarbazonas e semicarbazonas <sup>(12,62,63,64,65)</sup>. Em um recente estudo publicado por Cunha et al. <sup>(64)</sup>, que relatava a síntese de tiossemicarbazonas por uma reação catalítica one-pot, oferecia uma interessante metodologia, já utilizada em nosso grupo de pesquisa <sup>(59)</sup>, que poderia produzir derivados tiossemicarbazônicos dos núcleos isoxazolínicos de 5 membros.

Os substituintes Cl e F foram escolhidos com o intuito de direcionar aos produtos finais, semicarbazonas, tiossemicarbazonas e hidrazonas, maiores efeitos nas atividades biológicas a serem avaliados, conforme revisão bibliográfica <sup>(66)</sup>.

### 5.2.1- Síntese dos álcoois isoxazolínicos.

Não é possível chegar ao aldeído diretamente, porém, este problema foi contornado através da redução do éster, ao respectivo álcool na posição C3, com NaBH<sub>4</sub>. Reis, S. L. et al., desenvolveram tal método, o qual permitiu uma variedade de alternativas para síntese de novos derivados híbridos isoxazolínicos, inclusive a oxidação ao aldeído <sup>(67)</sup>.

Para tanto, nosso éster foi dissolvido em metanol seco, e adicionou-se, três vezes, um equivalente-mol de boridreto de sódio, e em duas horas o produto bruto foi extraído e purificado por cromatografia em coluna flash, obtendo-se bons rendimentos.



**Esquema 10.** Síntese dos álcoois isoxazolínicos.

SUBSTITUINTES	REDIMENTOS
R1= Cl	81%
R1= F	87%

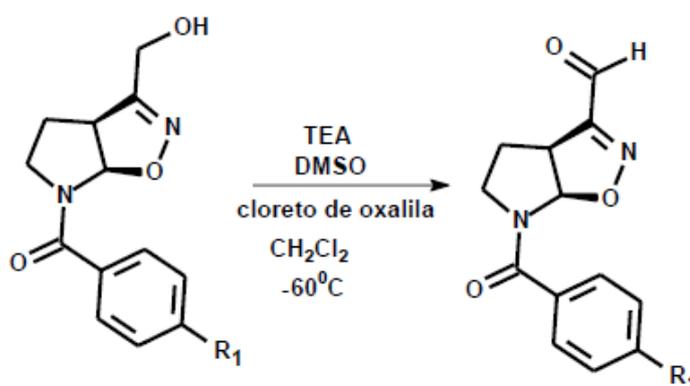
**Quadro 1.** Substituintes e rendimentos dos álcoois isoxazolínicos pirrolidínicos.

Espectros de RMN de <sup>1</sup>H e C<sup>13</sup>, IV-FT foram realizados, os hidrogênios diastereoisotópicos do grupamento hidroximetila dos álcoois apresentaram-se como dubletos em RMN de <sup>1</sup>H, em 4,35 e 4,45 ppm respectivamente, com uma constante de acoplamento de 14 Hz. Os álcoois também apresentaram nos espectros de IV-FT, bandas características em torno de 3505 cm<sup>-1</sup>, relativamente finas e intensas, caracterizando o estiramento da ligação O-H do grupamento hidroximetila em C3.

### 5.2.2- Obtenção Dos Aldeídos Isoxazolínicos Através Da Oxidação De Swern Dos Álcoois Isoxazolínicos.

Como já mencionado anteriormente a melhor maneira de chegarmos ao aldeído isoxazolínico é passando pelo álcool isoxazolínico (produto intermediário) e oxidando-o posteriormente.

O procedimento experimental utilizado foi o padrão da reação de Swern descrito no Esquema 11, por ser esta uma oxidação branda que permite a síntese dos aldeídos isoxazolínicos com ótimos rendimentos.



**Esquema 11.** Síntese dos aldeídos isoxazolínicos.

Foram sintetizados dois aldeídos isoxazolínicos, em C3, com os substituintes cloro e flúor na posição N6. Os aldeídos são sólidos estáveis a temperaturas baixas de coloração branca.

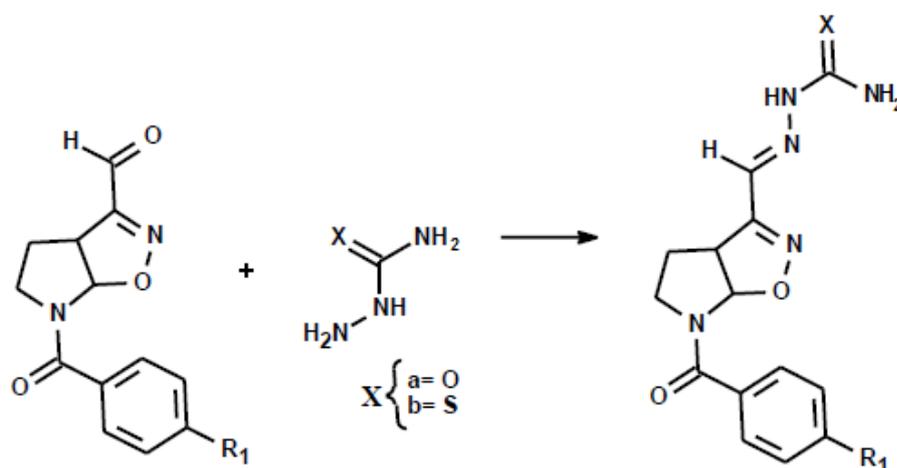
SUBSTITUÍNTES	REDIMENTOS
R1= Cl	78%
R1= F	81%

**Quadro 2.** Substituintes e rendimentos dos aldeídos isoxazolínicos pirrolidínicos.

A oxidação de Swern dos álcoois foi muito bem sucedida e os respectivos aldeídos foram caracterizados, principalmente pelos sinais em 9,8 ppm e 185,0 ppm nos espectros RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ , respectivamente. Em relação aos espectros no IVFT, os aldeídos apresentaram uma banda intensa em  $1710\text{ cm}^{-1}$ , característica do estiramento da carbonila do aldeído.

### 5.2.3- Obtenção De Isoxazolil-Semicarbazonas E Tiossemicarbazonas

Usou-se a metodologia direta (condensação dos aldeídos com as semi/tiossemicarbazidas comerciais) para a síntese das semicarbazonas e tiossemicarbazonas do biciclo pirrolidínico (Esquema 12). Procedeu-se com a solubilização da semicarbazida ou tiossemicarbazida em etanol, aplicando o ácido clorídrico concentrado como catalizador, e por fim adicionando-se os aldeídos. As condensações foram acompanhadas por CCD, e em cerca de uma hora, houve o total consumo dos reagentes limitantes. Após a extração e secagem, as isoxazolil-semicarbazonas e tiossemicarbazonas foram obtidas como sólidos (branco à bege), que foram purificados por meio de recristalização em etanol gelado.



**Esquema 12.** Síntese das semicarbazonas e tiossemicarbazonas do 2-biciclo isoxazolínico pirrolidínico.

SUBSTITUINTES	REDIMENTOS
R1= F; X=O	56%
R1= F; X=S	61%
R1=Cl; X=O	58%
R1=Cl; X=S	59%

**Quadro 3.** Substituintes e rendimentos das isoxazolil-semicarbazonas e tiossemicarbazonas pirrolidínicas.

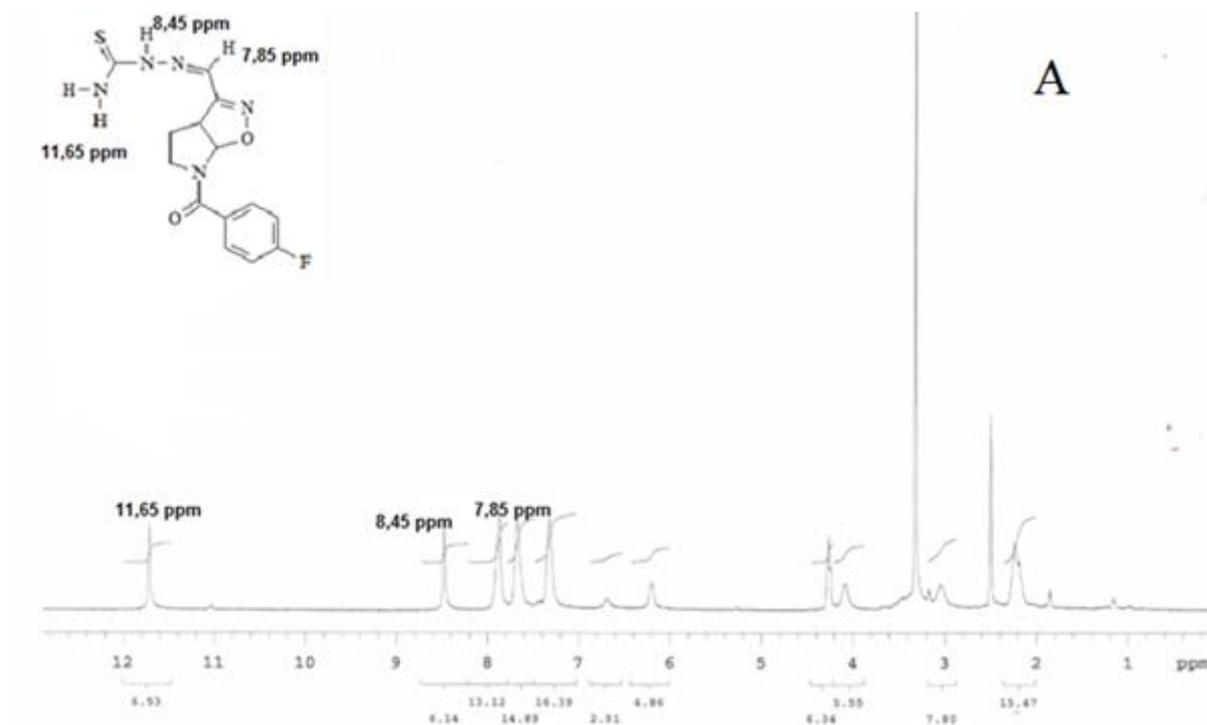
Os rendimentos obtidos se devem provavelmente ao método de purificação dos compostos, o qual pretendemos aperfeiçoar.

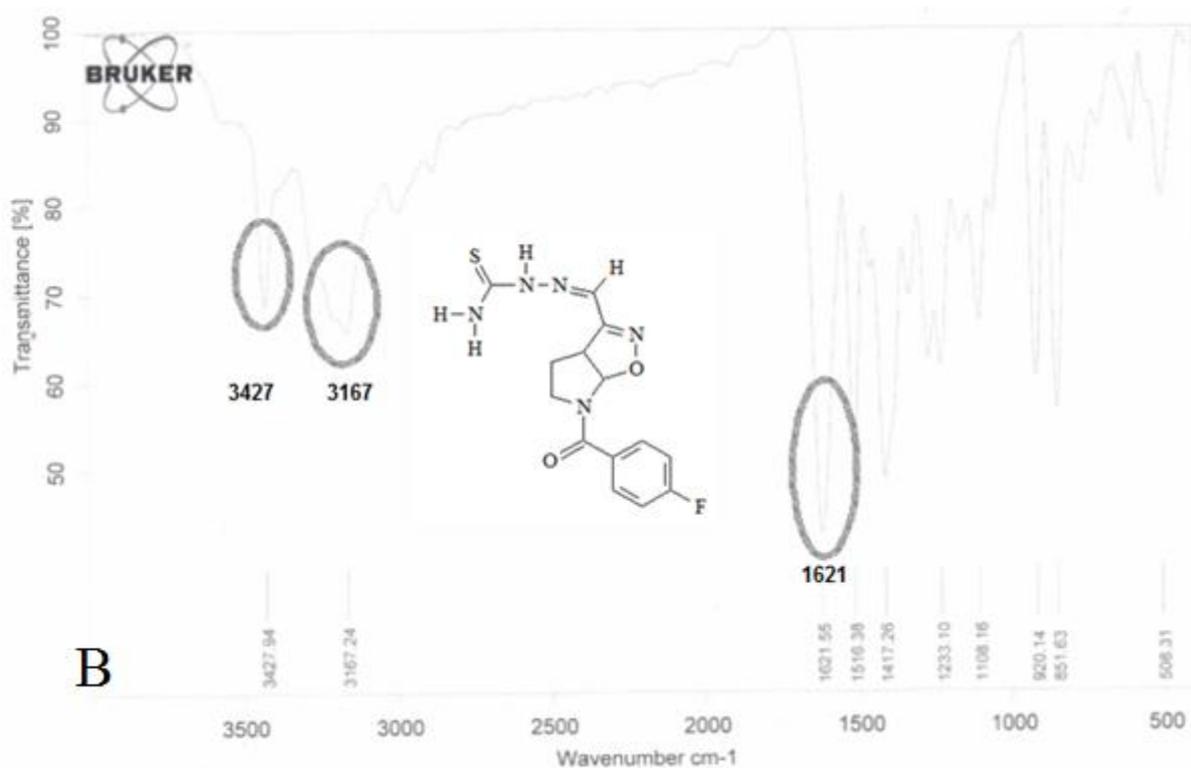
Nos espectros de  $^1\text{H}$  de ambas semicarbazonas (anexos 1 e 2) e tiossemicarbazonas ( FIGURA A) é possível visualizar a ligação NN-H da função, que se apresenta como um dupletos na faixa de 7,0–8,0 ppm, conforme com o que relata a literatura <sup>(75)</sup>.

Outro fato, é que, os hidrogênios das semicarbazonas HC=N têm seus sinais geralmente próximos dos sinais dos hidrogênios aromáticos, 8,45 e 7,85 ppm, sendo detectada a presença dos mesmos pela integração dos sinais.

Com relação aos espectros de IV-FT (anexos 3 e 4), bandas finas e relativamente intensas, correspondentes ao estiramento NN-H, estão presentes entre 3170 e 3430  $\text{cm}^{-1}$ , confirmando assim, a função semi/tiossemicarbazona nas estruturas dos híbridos FIGURA B.

A caracterização do biciclo pirrolidina[3,2-*d*]-2-isoxazolina, presente no cicloaduto se faz facilmente através de espectrometria de RMN, nas quais, sinais diagnósticos da formação do cicloaduto são evidentes, com dubletos ou sinais largos próximos de 6,2 ppm em  $^1\text{H}$  RMN.

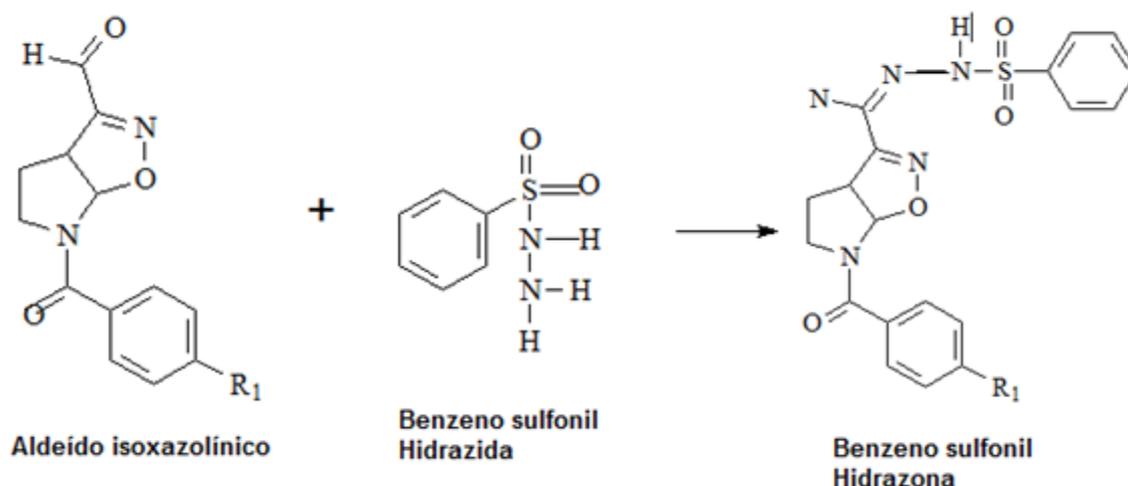




**Figura 19.** A, B – Respectivos espectros de, RMN de <sup>1</sup>H e IV-FT da tiossemicarbazona p-F

### 5.3- SÍNTESE DAS HIDRAZONAS, DERIVADAS DA MISTURA RACÊMICA DO HETEROBICICLO 2-ISOXAZOLINA[5,4-*b*]PIRROLIDINA.

A condensação das hidrazidas é um método frequentemente utilizado quando se deseja sintetizar hidrazonas, e já se tinha experiências bem sucedidas com esta reação, utilizando hidrazidas isoxazolínicas, com vários aldeídos fenil-parasubstituídos (em nosso caso com os substituintes Cl e F) com propriedades eletrônicas diversas na porção arila.



**Esquema 13.** Síntese das hidrazonas isoxazolínicas.

Foram preparadas soluções das hidrazidas em etanol, e realizada uma catalise ácida, à temperatura ambiente, entre as soluções de hidrazidas e o aldeído **isoxazolínico**. A reação se processou instantaneamente, com precipitação da hidrazona em menos de 2 minutos. Entretanto a conclusão da reação demorou aproximadamente 2 horas.

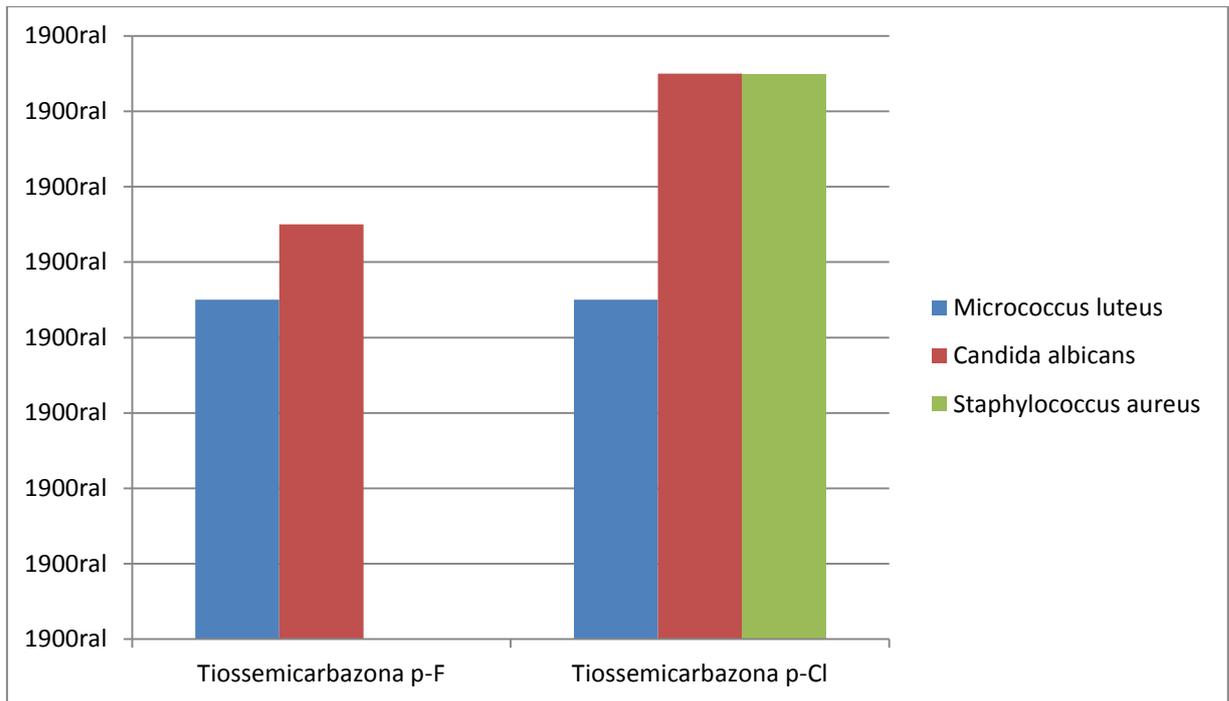
Após o término da reação foi realizada extração e secagem das hidrazonas, que se apresentaram como sólidos brancos cristalinos e bastante estáveis quando puros.

SUBSTITUINTES	REDIMENTOS
R1= Cl	52%
R1= F	81%

**Quadro 4.** Substituintes e rendimentos das isoxazol-hidrazonas.

As estruturas das hidrazonas foram devidamente elucidadas por métodos espectrométricos (RMN de  $^1\text{H}$ , RMN de  $^{13}\text{C}$  e IV-FT) que constam nos anexos. Os sinais característicos do heterociclo, aparecem em torno de 6,0 ppm em RMN de  $^1\text{H}$  e 90,0 ppm em RMN de  $^{13}\text{C}$ , respectivamente do hidrogênio e do carbono do metino ( $\alpha$  ao átomo de nitrogênio) da junção dos anéis, que confirmam a presença da 2- isoxazolina azabicíclica. Com deslocamento químico em 8,41 ppm aparece respectivamente o hidrogênio da ligação  $\text{CH}=\text{N}$ .

#### V. 4 – Estudo biológico



**Figura 20.** Halos de Inibição contra *Micrococcus luteus*, *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus*

As tiossemicarbazonas não apresentaram o desempenho esperado sobre os procariontes analisados, contrariando o que era apresentado na literatura <sup>(26,41)</sup>, onde trabalhos de Chandra e colaboradores e Kasuga e colaboradores desenvolveram complexos de semicarbazonas, que também na forma de ligantes, demonstraram-se ativos sobre os microrganismos *S. aureus*, *E. coli*, e *P. aeruginosa* em baixas concentrações.

Outro resultado inesperado foi a atividade fungicida das tiossemicarbazonas, que apresentaram halos considerados pequenos contra os fungos testados. Pois, apesar de a literatura <sup>(26,41)</sup> revelar uma atividade moderada dos derivados tiossemicarbazônicos sobre os fungos testados, era esperado uma melhor atividade inibitória das substâncias sintetizadas, principalmente sobre a *C. albicans*, o qual se tem relatos de sofrerem grande ação fungicida de semicarbazonas, como pode ser visto no estudo de Kasuga e colaboradores <sup>(41)</sup>.

# PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

## 6- PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

As reações de síntese de enecarbamatos endocíclicos de 5 membros, as reações de cicloadição 1,3-dipolar a as reações de formação do álcool e do aldeído são sensíveis à umidade e foram realizadas sob atmosfera de argônio, em aparato previamente seco em estufa por quatro horas (120°C).

As reações de hidrogenólise foram realizadas sob pressão positiva de hidrogênio, borbulhando-se o gás no meio reacional.

O clorofórmio foi seco com cloreto de cálcio anidro. O metanol foi tratado com  $Mg^0/I_2$  e destilado antes do uso. Tetraidrofurano (THF), benzeno e tolueno foram tratados com sódio/benzofenona e destilados imediatamente antes do uso; e o DMSO foi tratado em peneira molecular, previamente seca em estufa por 4h (120°C). Acetato de etila e *N*-hexano, utilizados em colunas cromatográficas, foram destilados. Quando não mencionado, reagentes e solventes foram utilizados sem prévio tratamento.

A análise por cromatografia em camada delgada (CCD) foi efetuada em cromatofolhas de alumínio (gel de sílica 60), com espessura de 0,2 mm, contendo indicador para 254 nm. A visualização das manchas foi efetuada com lâmpada de U.V. ENF – 2400 C/F, ácido fosfomolibdico 7% em etanol (neste caso seguido de aquecimento e sem exposição à lâmpada) ou por absorção de iodo.

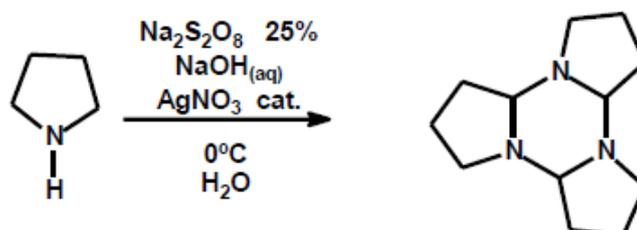
As colunas cromatográficas foram empacotadas com gel de sílica 60 (230 – 400 mesh) e eluidas sob pressão (Flash).

Os espectros no infravermelho (I.V-FT) foram obtidos em aparelhos Bruker IFS 66 (transformada de Fourier), com as frequências de absorção sendo expressas em  $cm^{-1}$ , utilizando-se pastilhas ou janelas de KBr.

Os espectros RMN de  $^1H$ , e RMN  $^{13}C$  foram obtidos em aparelhos Varian Unity 300 MHz. Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) são expressos em ppm, tendo como padrão interno o tetrametilsilano para RMN  $^1H$  e o solvente da análise (DMSO- $d_6$  ou  $CDCl_3$ ) para RMN de  $^{13}C$ . Os sinais dos espectros de RMN  $^1H$  são designados da seguinte forma: deslocamento químico (ppm), multiplicidade (s = singleto, d = dubleto, dl = dubleto largo, t = tripleto, tl = tripleto largo, q = quarteto, dd = duplo dubleto, dt = duplo tripleto, ddl = duplo dubleto largo, m = multipletto, ml = multipletto largo, sl = sinal largo), constante de acoplamento (Hz) e números de hidrogênios.

## 6.1- SÍNTESE RACÊMICA DOS DERIVADOS SEMICARBAZONAS E TIOSEMICARBAZONAS DE 2-ISOXAZOLINAS PIRROLIDÍNICAS.

### 6.1.1- Trímero da 1-pirrolina (isômero $\alpha$ )



**Esquema 14.** Síntese do trímero da 1-Pirrolina

Uma solução aquosa de hidróxido de sódio (8,61g; 215 mmols) foi preparada, e a uma temperatura de 0°C, sob vigorosa agitação, aplicaram-se a pirrolidina (8,7 mL; 108 mmols), e nitrato de prata (88 mg; 0,48 mmol), em um total de 90,0 mL de água. Por fim, uma solução 25% de persulfato de sódio (33,82 g; 107,9 mmol; 90 mL) foi adicionada, lentamente, ao sistema pré-reacional, o qual permaneceu em agitação por uma hora a 0°C e mais três horas à temperatura ambiente.

A solução escura resultante foi extraída com diclorometano (4 x 30,0 mL). Secou-se a fase orgânica com sulfato de sódio anidro e após remoção do solvente obteve-se 4,6 g de um líquido amarelado viscoso, correspondendo a um rendimento de 65,0 % do trímero.

O trímero é utilizado, o mais rápido possível, sem qualquer purificação adicional, na preparação do enecarbamato *N*-(benziloxycarbonil)-2-pirrolina, devido a sua instabilidade.

#### Propriedades Físicas do Trímero

- Óleo amarelo viscoso;
- Sensível a solventes próticos.

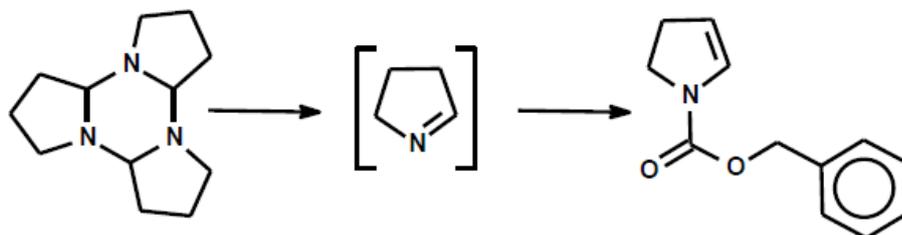
#### DADOS ESPECTROMÉTRICOS

RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , 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).

### 6-1.2- *N*-(Benziloxicarbonil)-2-Pirrolina



**Esquema 15.** Síntese do *N*-(benziloxicarbonil)-2-pirrolina.

Foi realizada a co-destilação da solução de trímero da 1-pirrolina (4,6 g; 217 mL de THF seco) a 80°C, em atmosfera anidra, recolhendo-se a solução límpida incolor em um balão a 0°C. Ao término da destilação, juntaram-se a solução destilada, em refluxo, a trietilamina (20 mL; 43,2 mmols) e a solução 50% de cloroformato de benzila (50 mL; 44,4 mmols), em tolueno, esta adicionada lentamente, mantendo-se o refluxo durante quatro horas.

A suspensão resultante foi filtrada em funil sinterizado e após remoção do solvente, obteve-se um óleo amarelado. O cloreto de benzila, presente como subproduto, foi removido por filtração simples em coluna cromatográfica “flash”, utilizando-se apenas hexano e AcOEt/n-hexano 1:9. Obteve-se 3 g de um líquido incolor correspondendo a um rendimento de 65,5% do enecarbamato.

#### PROPRIEDADES FÍSICAS

- Óleo incolor
- R<sub>f</sub> = 0,26 (AcOEt/hexano 1: 9)

#### DADOS ESPECTROMÉTRICOS

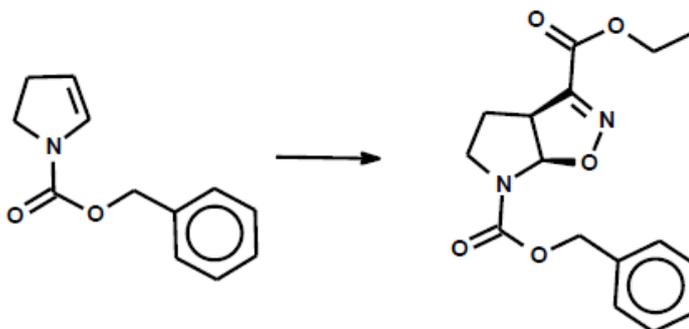
##### **RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, δ, ppm, 300 MHz, t.a.), presença de rotâmeros.**

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

##### **I.V. (filme, cm<sup>-1</sup>), principais sinais.**

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

### 6.1.3- Éster 6-benzil-3-etil do ácido 3a,4,5,6a-tetrahidropirrólo [3,2-d]isoxazol-3,6-dicarboxílico



**Esquema 16.** Síntese do éster 6-benzil-3-etil do ácido 3a,4,5,6a-tetrahidropirrólo [3,2-d]isoxazol-3,6-dicarboxílico.

Em um balão acoplado a um funil de adição com equalizador de pressão e contendo um agitador magnético, foi adicionado o enecarbamato (3 g; 14,78 mmol), clorofórmio (60,0 mL) para dissolver o enecarbamato. Em seguida, aplicou-se a trietilamina (26 ml; 44,34 mmols, excesso de dois equivalentes-mol em relação ao enecarbamato, aplicada em duas partes alternadas a solução do precursor do CEFNO). A este sistema, sob forte agitação, deixou-se gotejar calmamente, a solução de clorooximidoacetato de etila, precursor do dipolo, (4,4 g; 37,73 mmol, excesso de um equivalente-mol em relação enecarbamato). A reação foi acompanhada através de CCD, onde se percebeu a formação do produto, cicloaduto, desde o início da adição do precursor do *N*-óxido de nitrila.

Após 2 horas de reação e total consumo do material de partida, removeu-se o solvente. O sal formado, cloreto de trietilamônio, foi filtrado em funil sinterizado, utilizando-se uma mistura de acetato de etila. Após remoção do solvente, obteve-se um óleo amarelo escuro e bastante viscoso. O produto bruto foi submetido à cromatografia em coluna “flash” (gel de sílica, AcOEt/n-Hexano 2:3), obtendo-se 3,5 g do cicloaduto, correspondendo a um rendimento de 80%.

#### Propriedades Físicas

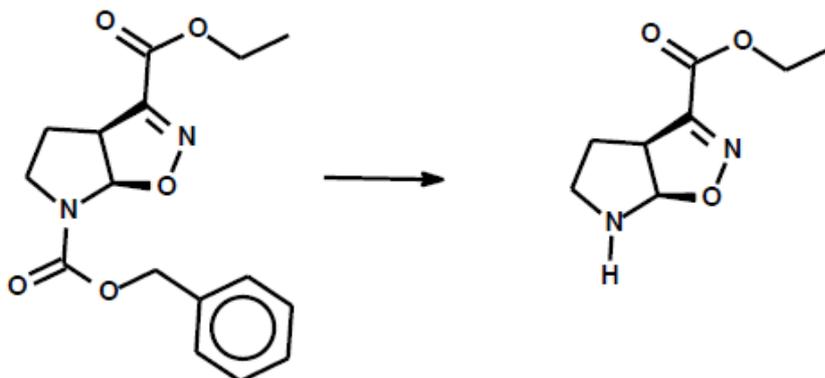
- Óleo amarelo claro viscoso.
- R<sub>f</sub> = 0,47 (AcOEt/hexano 1:1)

#### DADOS ESPECTROMÉTRICOS

**RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, δ, ppm, 300 MHz, t.a.), presença de rotâmeros.**

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

#### 6.1.4- Éster etílico do ácido 3a,4,5,6,6a-tetrahidropirrolo[3,2- d]isoxazol-3-carboxílico



**Esquema 17.** Síntese do éster etílico do ácido 3a,4,5,6,6a-tetrahidropirrolo[3,2- d]isoxazol-3-carboxílico.

Dissolveu o cicloaduto (3,5 g; 19,25 mmol) em metanol P.A. (185,0 mL). Em seguida, adicionou-se o paládio/carbono 10% (150 mg) e à mistura reacional, sob agitação vigorosa, borbulhou-se o gás hidrogênio durante uma hora, quando por CCD se pode confirmar o fim da reação.

Promoveu-se uma filtração à vácuo, sob uma camada de celite, após a remoção do solvente, e pôde-se obter 1,8 g da isoxazolina *N*-desprotegida pura, correspondendo a um rendimento quantitativo. O produto desprotegido foi utilizado nas reações subsequentes sem necessidade de submetimento a qualquer procedimento de purificação.

#### Propriedades Físicas

- Óleo incolor
- $R_f = 0,25$  (AcOEt/n-hexano 1:1).

#### DADOS ESPECTROMÉTRICOS

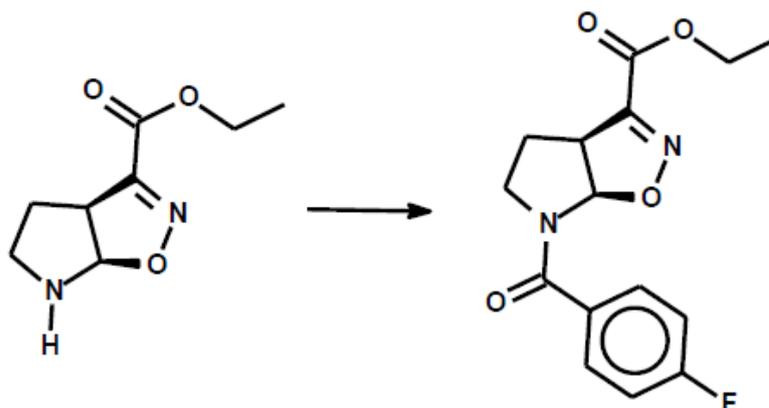
##### **RMN de $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ , ppm, 300 MHz, t.a.), presença de rotâmeros.**

6,07 (d;  $J= 6,9\text{Hz}$ ; 1H); 4,32 (m; 2H); 3,87 (m; 1H); 3,12 (m; 1H); 2,81 (m; 2H); 2,07 (m; 2H); 1,35 (t;  $J=6\text{Hz}$ ; 3H).

RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , ppm, 75 MHz, t.a.).

160,5 (C); 152,3 (C); 100,8 (CH); 61,9 ( $\text{CH}_2$ ); 49,1 ( $\text{CH}_2$ ); 42,8 (CH); 29,9 ( $\text{CH}_2$ ); 14,0 ( $\text{CH}_3$ ).

#### 6.1.5- Éster etílico do ácido 6-(4-flúor-benzoil)-4,5,6a tetrahidro-3ah-pirrolo[3,2-d]isoxazol-3-carboxílico



**Figura 18.** Síntese do éster etílico do ácido 6-(4-flúor-benzoil)-4,5,6a tetrahidro-3ah-pirrolo[3,2-d]isoxazol-3-carboxílico.

Em um balão de 250 mL foram solubilizados a isoxazolina *N*-desprotegida (1,8 g; 9,78 mmols) e trietilamina seca (1,3 mL; 10,8 mmol), em clorofórmio seco (125,0 mL). Sob vigorosa agitação, adicionou-se cloreto de 4-flúor-benzoíla (1,5 mL; 9,78 mmol), que foi adicionado lentamente durante 10 minutos e sob atmosfera de argônio. A reação foi deixada sob agitação, à temperatura ambiente, por mais uma hora adicional.

Após remoção do solvente, promoveu-se uma extração com 30,0 mL de acetato de etila para dissolver o produto reacional, seguida de 15,0 mL de água destilada e mais 4 x 20,0 mL de acetato de etila, os resquícios de água foram removidos com sulfato de sódio anidro, seguida de uma filtração simples, onde por fim removeu-se o solvente no evaporador rotatório.

O produto foi purificado através de cromatografia em coluna utilizando-se acetato de etila/n-hexano 3 : 7, obtendo-se 1,5g do N-(4-clorobenzoil)-isoxazolina puro. Essa reação possuiu um rendimento de 51%.

### Propriedades Físicas

- Precipitado branco cristalino.
- Rf = 0,39 (AcOEt/n-hexano 1:1)
- Ponto de fusão: 74°C.

### DADOS ESPECTROMÉTRICOS

#### **RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, δ, ppm, 300 MHz, t.a.), presença de rotâmeros.**

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

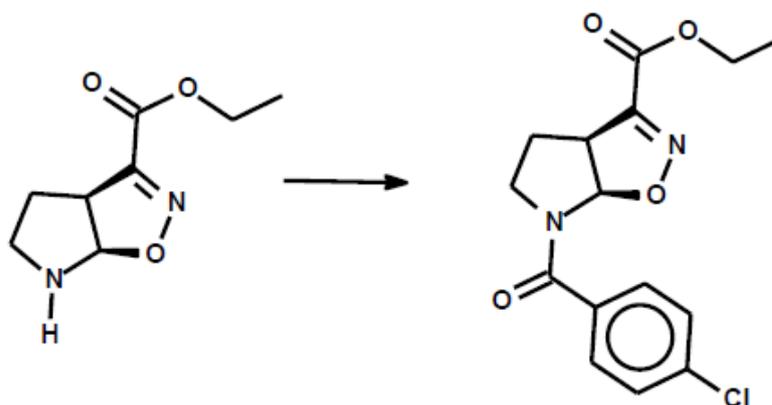
#### **RMN de <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, δ, ppm, 75 MHz, t.a.)**

14,08 (CH<sub>3</sub>); 27,95 (CH<sub>2</sub>); 43,53 (CH<sub>2</sub>); 51,19 (CH); 62,4 (CH<sub>2</sub>); 96,17(CH); 115,6(d; *J* = 21,5Hz; CH); 130,4(CH); 164,1(d; *J* = 250,0Hz; C-F); 131,0(C); 152,4(C); 159,8(C=O); 168,7(C=O).

#### **I.V. - FT (janela de KBr, cm<sup>-1</sup>), principais sinais.**

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

### **6.1.6- Éster etílico do ácido 6-(4-clorobenzoil)-4,5,6,6a-tetrahidro-3ah-pirrolo[3,2-d]isoxazol-3-carboxílico**



**Esquema 19.** Síntese do éster etílico do ácido 6-(4-clorobenzoil)-4,5,6,6a-tetrahidro-3ah-pirrolo[3,2-d]isoxazol-3-carboxílico.

Procedimento experimental idêntico ao item VI.1.5.

Isoxazolina *N*-desprotegida (1,8 g; 9,78 mmol), trietilamina seca (1,3 mL; 10,8 mmols), clorofórmio seco (125,0 mL) e cloreto de 4-clorobenzoila (1,7 mL; 9,78 mmoles).

Uma extração com acetato de etila, seguida de uma cromatografia em coluna “flash” (gel de sílica AcOEt/n-hexano 3:7), forneceu 2 g do cicloaduto, correspondendo a um rendimento de 62,0 %.

#### Propriedades Físicas

- Precipitado branco cristalino.
- Rf = 0,38 (AcOEt/n-hexano 1:1).
- Ponto de Fusão: 63-65°C

#### DADOS ESPECTROMÉTRICOS

##### **RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, δ, ppm, 300 MHz, t.a.) presença de rotâmeros.**

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

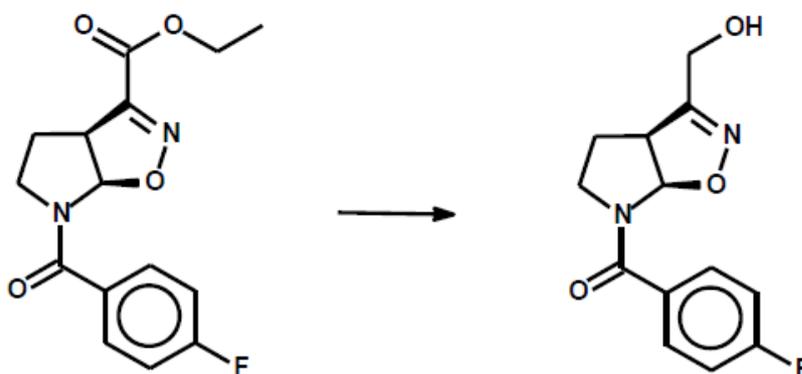
##### **RMN de <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, δ, ppm, 75 MHz, t.a.)**

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

##### **I.V. - FT (janela de KBr, cm<sup>-1</sup>), principais sinais.**

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

#### **6.1.7- Obtenção do álcool (4-flúor-fenil)-(3-hidroxi-metil- 3a,4,5,6a-tetrahidro-pirrolo[3,2-d]isoxazol-6-il-metanona**



**Esquema 20.** Obtenção do álcool (4-flúor-fenil)-(3-hidroxi-metil- 3a,4,5,6a-tetrahidro-pirrolo[3,2-d]isoxazol-6-il-metanona.

A uma solução de éster (1g; 3,35 mmol) e metanol seco (90,0 mL), a 0°C e sob vigorosa agitação, adicionou-se NaBH<sub>4</sub> (0,38 g; 10,02 mmol; 3 equivalentes-mol do éster isoxazolinico) em três partes iguais. Ao término da adição, deixou-se sob

agitação por cerca de uma hora à 0o C e uma hora à t.a. A reação foi acompanhada através de CCD, onde se visualizou a formação do álcool desde o início da adição do NaBH<sub>4</sub>.

Após remoção do metanol, realizou-se uma extração solubilizando o produto em 30,0 mL de acetato de etila, seguida da adição de 20,0 mL de água destilada e acetato de etila (3 x 20,0 mL). Retirou-se a água com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro, o solvente foi filtrado e removido. Conseguindo-se um óleo incolor bastante viscoso, no qual, após cromatografia em coluna "flash" (gel de sílica, AcOEt/n-Hexano 4:3 no início, e 7:3 após saída do produto), pode-se obter 0,8 g do respectivo álcool puro, com um rendimento de 87 %.

#### Propriedades Físicas

- Óleo incolor viscoso.
- R<sub>f</sub> = 0,10 (AcOEt/hexano 1:1)

#### DADOS ESPECTROMÉTRICOS

##### **RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, δ, ppm, 300 MHz, t.a.), presença de rotâmeros.**

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

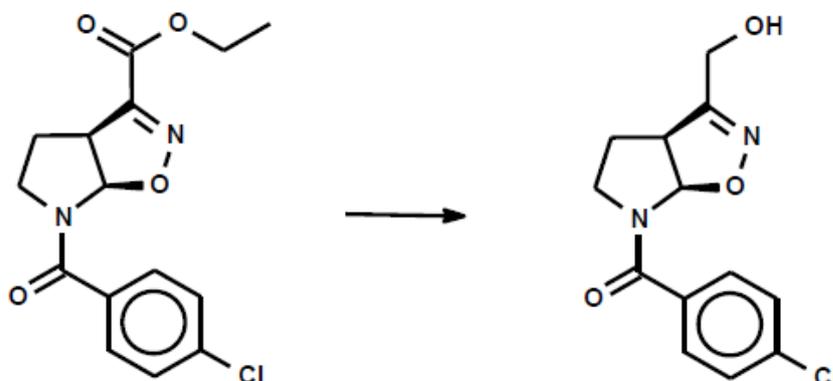
##### **RMN de <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, δ, ppm, 75 MHz, t.a.), presença de rotâmeros.**

25,9 (CH<sub>2</sub>) rotâmero 27,3; 43,5 (CH<sub>2</sub>) rotâmero 47,4; 52,8 (CH) rotâmero 50,8; 55,2 (CH<sub>2</sub>); 92,7 (CH) rotâmero 90,1; 115,3 (d; *J* = 21,0 Hz; CH); 130,3 (CH); 132,1 (C); 159,9 (C=N); 164,7 e 161,5 (d; *J* = 240 Hz, C); 167,9 (C=O);

##### **I.V. - FT (janela de KBr, cm<sup>-1</sup>), principais sinais.**

3506, 3052, 2970, 2884, 1639, 1597, 1500, 1415, 1210, 1153, 845

### 6.1.8- Obtenção do álcool (4-clorofenil)-(3-hidroximetil-3a,4,5,6a- tetrahidro-pirrolo[3,2-d]isoxazol-6-il-metanona



**Esquema 21.** Obtenção do álcool (4-clorofenil)-(3-hidroximetil-3a,4,5,6a- tetrahidro-pirrolo[3,2-d]isoxazol-6-il-metanona.

Procedimento experimental idêntico ao item VI.1.7.

Éster isoxazolínico (1 g; 3,25 mmol), metanol (100,0 mL), NaBH<sub>4</sub> (0,37 g; 9,88 mmols).

Foi obtido um óleo incolor bastante viscoso, no qual, após cromatografia em coluna “flash” (gel de sílica, AcOEt/n-Hexano 7:3), obteve-se 0,81 g do respectivo álcool puro, com um rendimento de 81 %.

#### Propriedades Físicas

- Óleo incolor viscoso
- R<sub>f</sub> = 0,11 (AcOEt/hexano 1:1)

#### DADOS ESPECTROMÉTRICOS

##### **RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, δ, ppm, 300 MHz, t.a.), presença de rotâmeros.**

2,00 – 2,20 (m, 1H); 2,30 (dd, *J* = 13 Hz; *J* = 5,7 Hz; 1H); 2,90 – 3,65 (m, 2H); 4,00 (m, 1H); 4,35 (d; *J* = 14,1 Hz; 1H); 4,44 (d; *J* = 14,1; 1H); 5,97 (d; *J* = 7,0 Hz; 1H) rotâmero em 6,72; 7,40 (d; *J* = 8,1 Hz, 2H); 7,64 (dl; *J* = 8,0 Hz, 2H).

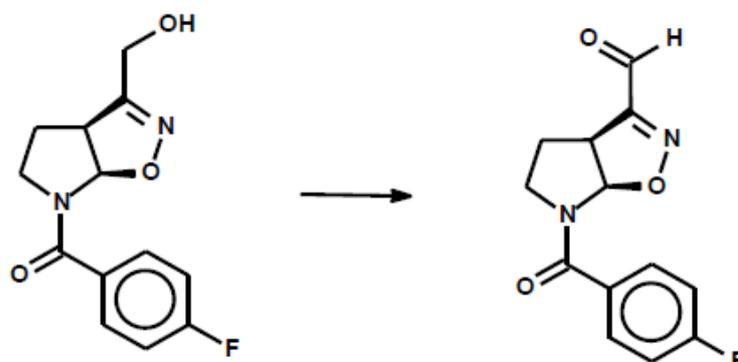
##### **RMN de <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, δ, ppm, 75 MHz, t.a.)**

26,7 (CH<sub>2</sub>); 43,4 (CH<sub>2</sub>) rotâmero em 47; 52,6 (CH); 56,8 (CH<sub>2</sub>); 93,3 (CH) rotâmero em 91; 128,6 (CH); 129,6 (CH); 133,3 (C); 136,9 (C); 158,9 (C=N); 169,1 (C=O).

##### **I.V. - FT (janela de KBr, cm<sup>-1</sup>), principais sinais.**

3508, 3080, 2970, 2888, 1632, 159, 1505, 1420, 1215, 848.

### 6.1.9- Obtenção do 6-(4-flúor-benzoil)-4,5,6,6a-tetrahidro- 3a $\pi$ pirrolo[3,2-d]isoxazol-3-carbaldeído



**Esquema 22.** Obtenção do 6-(4-flúor-benzoil)-4,5,6,6a-tetrahidro- 3a $\pi$ pirrolo[3,2-d]isoxazol-3-carbaldeído.

Adicionou-se a um balão, 0,32 mL de cloreto de oxalila (3,75 mmol) e 6,9 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco e deixou-se sob agitação à temperatura de -72°C, sob atmosfera de argônio. Concomitantemente, são elaboradas mais outras duas soluções a t.a.; a primeira (solução 1) contendo 0,54 mL de DMSO seco (7,53 mmol) em 2,5 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e a segunda (solução 2) contendo o álcool (0,51g: 1,93 mmols) em 2,5 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Estabilizaram-se a agitação e a temperatura, a -72 °C, e adicionou-se a solução 1, ao balão reacional, deixou-os em agitação por 2 minutos. Em seguida, a solução 2 foi aplicada lentamente durante 5 minutos, deixando-se em agitação por mais 15 minutos. Por fim, adicionou-se a trietilamina (2,15 mL; 15,28 mmols), deixando-se a reação em agitação por 5 minutos. Através de CCD verificou-se que todo o álcool havia sido consumido, evidenciando-se a formação do aldeído, parando a reação com a aplicação direta de água destilada no meio reacional.

Realizou-se uma extração com diclorometano P.A. (3 x 20,0 mL), retirando-se a água com sulfato de sódio anidro. Após remoção do solvente, o produto bruto foi submetido à cromatografia em coluna “flash” (gel de sílica AcOEt/n-Hexano 1:4), permitindo a obtenção de 0,65 g do aldeído puro, correspondendo a um rendimento de 80,1%.

#### Propriedades Físicas

- Sólido amorfo amarelo claro
- R<sub>f</sub> =0,45 (AcOEt/n-hexano 2:3)
- Ponto de fusão: 129 °C.

### DADOS ESPECTROMÉTRICOS

**RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , ppm, 300 MHz, t.a.), presença de rotâmeros.**

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

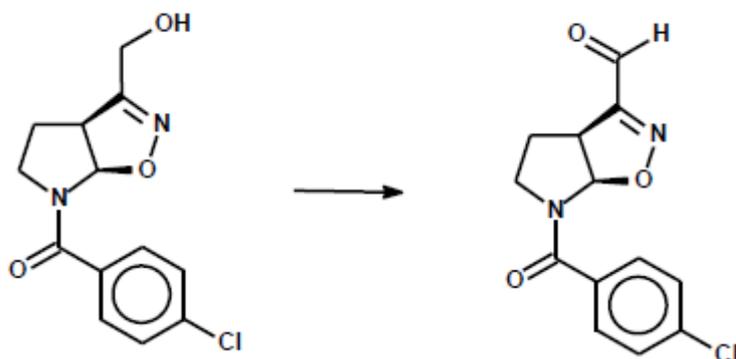
**RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , ppm, 75 MHz, t.a.), presença de rotâmeros.**

27,3 ( $\text{CH}_2$ ); 43,4 ( $\text{CH}_2$ ); 48,4 (CH); 97,1 rotâmero em 94,3; 115,6 (d;  $J = 21$  Hz; CH); 130,5 (CH); 132,0 (C); 159,1 (C=N); 162,5 e 165,8 (d;  $J = 250$  Hz, C); 168,6 (C=O); 185,2 (C=O).

**IV- FT (pastilha de KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ), principais sinais.**

3048, 2960, 2857, 1700, 1626, 1590, 1388, 1230, 854.

#### 6.1.10- Obtenção do 6-(4-clorobenzoil)-4,5,6,6a-tetrahidro-3a*h*-pirrolo[3,2-d]isoxazol-3-carbaldeído



**Esquema 23.** Obtenção do 6-(4-clorobenzoil)-4,5,6,6a-tetrahidro-3a*h*-pirrolo[3,2-d]isoxazol-3-carbaldeído.

Procedimento experimental idêntico ao item VI.1.9.

Cloreto de oxalila 0,32 mL (3,58 mmols), 7,1 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  seco, solução 1; 0,5 mL de DMSO seco (7,2 mmols) em 1,8 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (seco), solução 2: contendo o álcool (0,81 g; 2,89 mmols) em 2 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  e (5,3 mL; 37,6 mmol) de trietilamina.

Finalizou-se a reação executa-se uma extração, removeu-se o solvente e obteve-se 0,53 g do aldeído puro, após cromatografia em coluna “flash” (gel de sílica AcOET/*n*-Hexano 1:4), o correspondente a um rendimento de 81 %.

#### Propriedades Físicas

- Sólido amorfo amarelo claro
- R<sub>f</sub> = 0,43 (AcOEt/n-hexano 2:3)
- Ponto de fusão: 124 °C

#### DADOS ESPECTROMÉTRICOS

**RMN de <sup>1</sup>H (DMSO-D<sup>6</sup>, δ, ppm, 300 MHz, t.a.), presença de rotâmeros.**

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

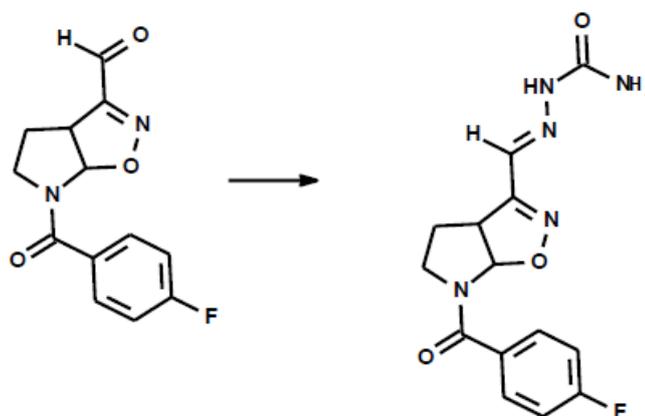
**RMN de <sup>13</sup>C (DMSO-D<sup>6</sup>, δ, ppm, 75 MHz, t.a.), presença de rotâmeros.**

26,2 (CH<sub>2</sub>; rotâmeros em 27,6); 43,6 (CH<sub>2</sub>; rotâmero em 46,7); 48,6 (CH; rotâmero em 47,3); 96,9 (CH; rotâmero em 94,0); 128,6 (CH); 129,6; (CH);

**IV - FT (pastilha de KBr, cm<sup>-1</sup>), principais sinais.**

3030, 2980, 2861, 1650, 1626, 1580, 1398, 1250, 1090, 915, 843.

#### **6.1.11- Obtenção da tetrahydro-pirroló[3,2-d]isoxazolo-6-il-metanona-hidrazina-carboxiamida**

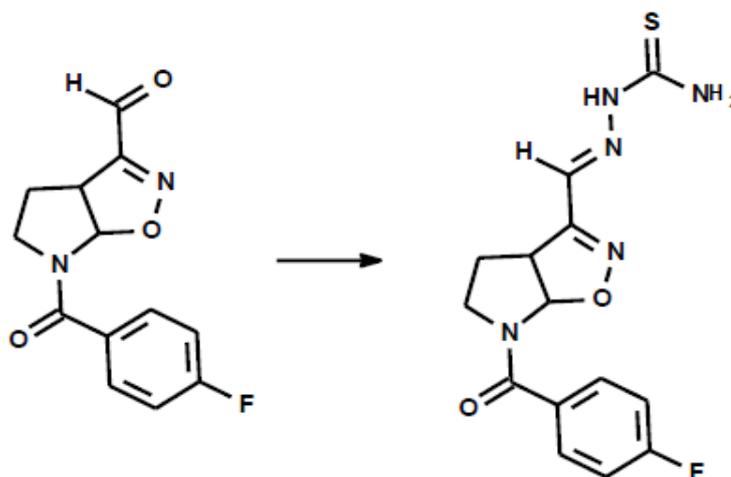


**Esquema 24.** Obtenção da tetrahydro-pirroló[3,2-d]isoxazolo-6-il-metanona-hidrazina-carboxiamida.

Em um balão de 25 mL, foram adicionados a temperatura ambiente, a semicarbazida (87 mg; 0,58 mmol), etanol P.A. (11 mL), e ácido clorídrico concentrado P.A (2 gotas). Ao mesmo instante que se aplica a solução o aldeído isoxazolinico *p* -F (150,0 mg; 0,58 mmol), nota-se a formação de um precipitado branco, e em 50 minutos uma CCD demonstra o final da reação.

Após remoção do solvente, foi feita a extração e recristalização da semicarbazona isoxazolinica em etanol P.A., obtendo-se 126 mg do produto puro, com 56% de rendimento.

### 6.1.12- Obtenção da tetrahydro-pirrolo[3,2-d]isoxazolo-6-il-metanona-hidrazina-carbotioamida.

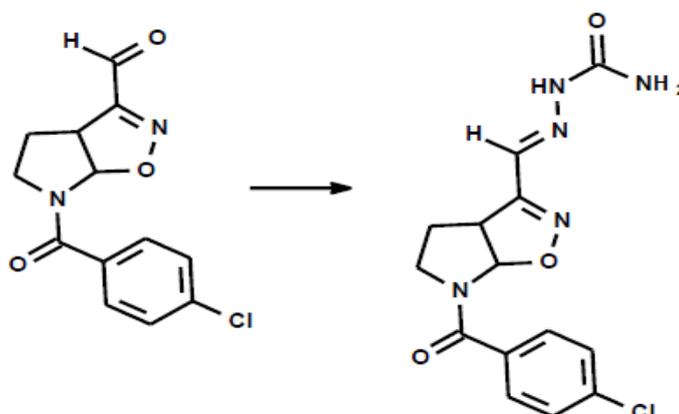


**Esquema 25.** Obtenção da tetrahydro-pirrolo[3,2-d]isoxazolo-6-il-metanona-hidrazina-carbotioamida.

Sob temperatura ambiente, preparou-se uma solução contendo tiossemicarbazida (95,6 mg; 0,57 mmol) em 6 mL de etanol P.A., em seguida, acidificou-se o meio com duas gotas de ácido clorídrico concentrado P.A. Sob agitação vigorosa, adicionou-se lentamente ao sistema o aldeído isoxazolinico *p*-F (150 mg; 0,58 mmol). Uma suspensão amarelo-clara de precipitado branco foi se formando com decorrer da aplicação do aldeído, e em 45 minutos uma CCD revelou o final da reação.

Removeu-se o solvente em evaporador rotatório, realizou-se uma extração com acetato de etila e posterior purificação por recristalização em etanol P.A., obtendo-se 143 mg da tiossemicarbazona isoxazolinica, oferecendo rendimento 61 %.

### 6.1.13- Obtenção da tetrahydro-pirrolo[3,2-d]isoxazolo-6-il-metanona-hidrazina-carboxiamida.

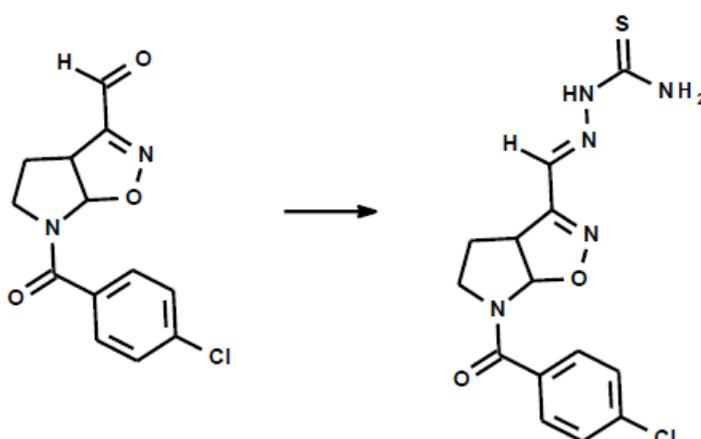


**Esquema 26.** Obtenção da tetrahydro-pirrolo[3,2-d]isoxazolo-6-il-metanona-hidrazina-carboxiamida.

A semicarbazida (135,4 mg; 0,57 mmol) e o etanol P.A. (7 mL) são adicionados em um balão de 25 mL, formando uma suspensão, a qual logo após a aplicação do ácido clorídrico concentrado P.A (2 gotas), é desfeita. Notou-se que minutos seguintes à adição do aldeído isoxazolinico *p*-F (150 mg; 0.85 mmol), formou-se um precipitado, e em 50 minutos uma CCD revelou o desfecho da reação.

Seguidamente a remoção do solvente, realizou-se uma extração com acetato de etila, e purificou-se o precipitado por meio de recristalização em etanol. Foram obtidos 127 mg do produto puro, que representa 58 % de rendimento.

### 6.1.14- Obtenção da tetrahydro-pirrolo[3,2-d]isoxazolo-6-il-metanona-hidrazina-carbotioamida



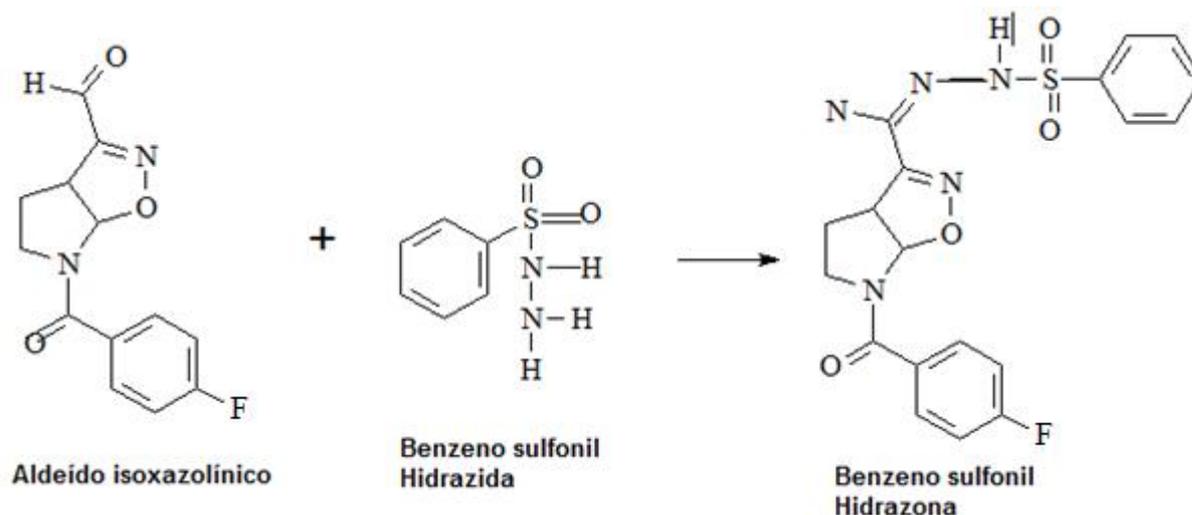
**Esquema 27.** Obtenção da tetrahydro-pirrolo[3,2-d]isoxazolo-6-il-metanona-hidrazina-carbotioamida.

Em um balão de 25 mL, pesou-se a tiossemicarbazida (90 mg; 0,54 mmol). Em seguida, uma parte do solvente reacional é adicionada (etanol P.A., 2 mL), iniciou-se a agitação a t.a., onde se pôde observar uma pequena solubilização do reagente. Na sequência, acrescentaram-se duas gotas de ácido clorídrico conc. P.A, e rapidamente se pôde verificar a completa solubilização do reagente. Por fim, acrescentou-se, gota-a-gota, uma solução de aldeído isoxazolinico *p*-Cl (150 mg; 0,54 mmol; 3,5 mL de etanol P.A.). Durante a adição, notou-se a mudança de coloração, do incolor a amarelo escuro, e em 55 minutos foi realizada uma CCD que confirmou o final da reação.

Com a retirada do solvente formou-se um precipitado amarelo, que quando recristalizado em etanol, deu origem a 135 mg de tiossemicarbazona isoxazolinica *p*-Cl pura, cujo rendimento corresponde a 59%.

## 6.2- SÍNTESE RACÊMICA DOS DERIVADOS BENZENO-SULFONIL-HIDRAZONAS 2- ISOXAZOLINAS PIRROLIDÍNICAS.

### 6.2.1- Obtenção da benzeno sulfonil hidrazida do ácido-6-(4-fluoro-benzoil)-4,5,6,6a-tetrahidro-3ah-pirrolo[3,2-d]isoxazol-3-carboxílico



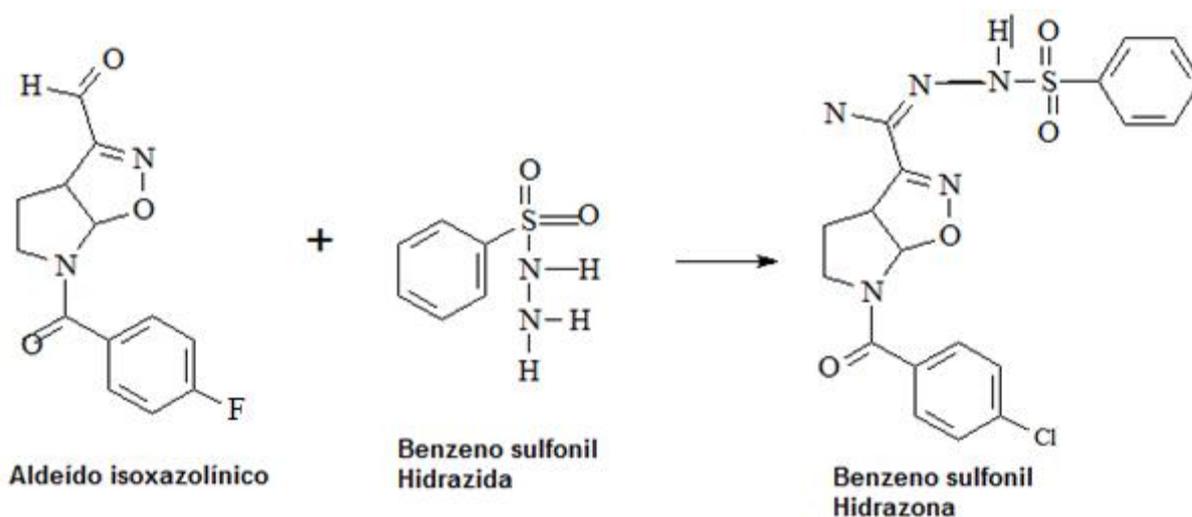
**Esquema 28.** Síntese da hidrazida do ácido-6-(4-fluoro-benzoil)- 4,5,6,6a-tetrahidro-3ah-pirrolo[3,2-d]isoxazol-3-carboxílico.

A uma solução de benzeno sulfonil hidrazida (250 mg; 1,43 mmol) em etanol absoluto (8 mL), contendo duas gotas de ácido clorídrico 37%, foi adicionado, gota-

a-gota (150 mg, 1,43 mmol) do nosso aldeído *p*-F. A mistura reacional ficou sob agitação a temperatura ambiente durante 2 horas, onde se pode evidenciar uma coloração amarela.

O solvente foi removido e a extração com acetato de etila foi realizada e depois de recristalizado em etanol, obtivemos 280 mg da hidrazona pura, correspondendo a um rendimento de 68 %.

### 6.2.2- Obtenção da benzeno sulfonil hidrazida do ácido-6-(4-cloro-benzoil)-4,5,6,6a-tetrahidro-3ah-pirrolo[3,2-d]isoxazol-3-carboxílico



**Esquema 29.** Síntese da benzeno sulfonil hidrazida do ácido-6-(4-cloro-benzoil)-4,5,6,6a-tetrahidro-3ah-pirrolo[3,2-d]isoxazol-3-carboxílico.

A uma solução da benzeno sulfonil hidrazida (250 mg; 1,43 mmol) em etanol absoluto (8 mL), contendo duas gotas de ácido clorídrico 37%, foi adicionado, gota-a-gota (150 mg, 1,43 mmol) do nosso aldeído *p*-Cl. A mistura reacional ficou sob agitação a temperatura ambiente durante 2 horas, onde se pode evidenciar uma coloração amarela.

O solvente foi removido e a extração com acetato de etila foi realizada e depois de recristalizado em etanol, obtivemos 210 mg da hidrazona pura, correspondendo a um rendimento de 52 %.

## CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

## 7. CONCLUSÕES

- Os derivados isoxazolínicos foram obtidos partindo de uma metodologia simples e econômica, onde os compostos foram sintetizados em curto tempo reacional.
- Neste estudo, foi comprovada a versatilidade química e biológica dos heterociclos pirrolidina[3,2-*d*]-2-isoxazolina, otimizando a síntese dos ésteres e desenvolvendo com sucesso as sínteses dos álcoois e dos aldeídos isoxazolínicos, e em seguida, formando híbridos ativos dos aza-biciclos.
- Para se obter os novos derivados de semicarbazonas e tiosemicarbazonas, foram sintetizados dois derivados álcoois com seus respectivos aldeídos isoxazolínicos de 5 membros.
- Os derivados de tiosemicarbazonas não apresentaram o desempenho esperado, conforme relatado em literatura, sobre os procariontes analisados assim como também apresentaram a atividade fungicida pequena a moderada.

## 8. PERSPECTIVAS

- Diante da versatilidade relatada na literatura, com a formação de inúmeros complexos de semicarbazonas, tiossemicarbazonas e hidrazonas, pretende-se, então, desenvolver séries de complexos metálicos: rutênio, cobre, platina. E averiguar a atividade antineoplásica, antichagásica e antimicrobiana entre ligantes e complexos.
- Conclusão dos testes biológicos;
- Melhorar a metodologia de purificação, garantindo resultados melhores quanto ao rendimento.
- Melhorar a solubilidade dos produtos, garantindo assim maior facilidade na obtenção dos resultados biológicos;
- Avaliação dos novos compostos quanto à atividade antichagásica.

## REFERÊNCIAS

1. Tavares, W.; **Bactérias Gram-positivas problema: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos.** *Revista da sociedade brasileira de medicina tropical*, **2000**, 33, 281-301.
2. Livermore, D. M.; **Bacterial resistance: origins, epidemiology and impact;** *Clinical Infectious Diseases*, **2003**, 36, 11-23.
3. Rosa, M. B. A.; A farmácia e o controle das infecções hospitalares. In.: Gomes, M. J. V. M.; *Ciências Farmacêuticas: Uma abordagem Hospitalar.* Atheneu, **2000**, 407-425.
4. Demerec, M.; **Production of Staphylococcus strains resistant to various concentrations of penicillin.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*; **1945**, 31, 16-24.
5. Leclerq, R.; Courvalin, P.; *Antimicrobial Agents and chemotherapy*, **1991**, 35, 1267-1272.
6. Walsh, C T.; S. L.; Park, I. S.; Prahalad, M.; Wu, Z.; **Bacterial Resistance to vancomycin: five genes and one missing hydrogen bond tell the history,** *Chemistry & Biology*, **1996**, 3, 21-28.
7. Souza, M. V. Et all. **Revisão sobre aquisição gradual de resistência ao Staphylococcus aureus aos antimicrobianos.** *Revista da sociedade brasileira de medicina tropical*, **2005**, 34, 27-36.
8. Tavares, A. **Isoxazolinás. Uma Classe de Materiais avançados Revisitada.** Rio Gande do Sul, 2010 [Tese de Doutorado, Instituto de Química – Universidade Federal do Rio Gande do Sul].
9. Pirrung, M. C.; Tuney, L. N.; Raetz, C. R. H.; Rusche, K. M. J. **Potent, novel in vitro inhibitors of the Pseudomonas aeruginosa deacetylase.** *Med. Chem*, **2002**, 45, 4359-4370.
10. Raffa, D.; Daidone, C.; Maggio, B.; Schillaci, D.; Plescia, F.; Torta, L.; **Microwave-assisted synthesis and antimicrobial activity of 5-trihalomethyl-3-arylisoaxazoles.** *Farmaco*, **1999**, 55, 499.
11. Velikorodov, A. V.; Sukhenko, L. T.; **Synthesis and Antimicrobial Activity of 3,5-Disubstituted Isoxazolines and Isoxazoles with Carbamate Groups.** *Pharm. Chem. J.* **2003**, 37, 22.
12. Beraldo, H.; **Semicarbazonas e tiossemicarbazonas: o amplo perfil farmacológico e usos clínicos.** *Quim. Nova*, Vol. 27, No. 3, **2004**, 461-471.

13. Vicini, P.; Zani, F.; Cozzoni, P.; Doytchinova, I.; **Hydrazones of 1,2-benzisothiazole hydrazides: synthesis, antimicrobial activity and QSAR investigations.** *Eur. J. Med. Chem.*; **2002**, 37, 553-564.
14. Loncle, C.; Brunel, J.; Vidal, N.; Dherbomez, M.; Letourneux, Y.; **Synthesis and antifungal activity of cholesterol-hydrazone derivatives.** *Eur. J. Med. Chem.* **2004**, 39, 1067-1071.
15. Saito, S.; Yamamoto, H. **Enantioselective Construction of Quaternary Stereocenters.** *Chem. Eur. J.* **1999**, 5.
16. Reis, S. L. G. B. **Sítese e Avaliação Preliminar da Atividade Atioceptiva e Toxicidade de novas Isoxazolil-aril-hidrazoas.** Recife, 2008. [Dissertação de Mestrado, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco].
17. Ebel, R.; Proksch P. **Organ-specific distribution of dietary alkaloids in the marine opisthobranch *Tylodina perversa*.** *Biochemical Systematics and Ecology* **1999**, 27, 769-777.
18. Wade, P.A.; Price, D.T. **Diastereocontrol in the asymmetric dihydroxylation of chiral 3-alkenyl-4,5-dihydroisoxazoles.** *Tetrahedron Lett.* **1989**, 30, 1185.
19. Higashida, S. et al. **Improved generation method for functionalized nitrile oxide.** *Heterocycles* **1992**, 34, 1511.
20. Mizuno, K et al. **Insertion of nitrogen oxide and nitrosonium ion into the cyclopropane ring: a new route to 2-isoxazolines and its mechanistic studies.** *J. Org. Chem.* **1992**, 57, 4669.
21. Segi, M. Et al. **An efficient 1,3-dipolar cycloaddition between aromatic selenoaldehydes and nitrile oxides or nitrile imines: an easy access to selenium-containing five-membered heterocyclic ring system.** *Tetrahedron Lett*, 2007, **48**, 2303.
22. Carey, F. A.; Sundberg, R. J. **Tandem Ruthenium-Catalyzed Redox Isomerization–O-Conjugate Addition: An Atom-Economic Synthesis of Cyclic Ethers.** *Advanced Organic Chemistry, Part B: Reactions and Synthesis* . Plenum Press, **2008**.
23. Burri, K. F.; Cardone, R.A.; Chen, W.Y.; Rosem, P.J. **Stereodivergence in an intramolecular Horner-Emmons macrocyclization. Effect of reaction conditions on product distribution.** *Am Chem. Soc.* **1978**, 100, 7069-7071.

24. Kametani, T. et al. **Studies on the syntheses of heterocyclic compounds. 800. A formal total synthesis of (+-)-thienamycin and a (+-)-decysteaminythienamycin derivative.** *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, 102, 2060-2065.
25. Feun, L.; Modiano, M.; Lee, K.; Mao, J.; Marini, A.; Savaraj, N.; Plezia, P.; Almassian, B.; Colacino, E.; Fischer, J.; Macdonald, S.; **Phase I and pharmacokinetic study of 3-aminopyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone (3-AP) using a single intravenous dose schedule** *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2002**, 50, 223.
26. Kasuga, N. C.; Sekino, K.; Ishikawa, M.; Honda, A.; Yokoyama, M.; Nakano, S.; Shimada, N.; Koumo, C.; Nomiya, K.; *J. Inorg. Biochem* **2003**, 96, 298.
27. Teitz, Y.; Ronen, D.; Vansover, A.; Stematsky, T.; Riggs, J. L.; *Antiviral Res.* **1994**, 24, 305.
28. Bharti, N.; Husain, K.; Garza, M. T. G.; Vega, D. E. C.; Garza, J. C.; Cardenas, B. D. M.; Naqvi, F.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, 12, 3475.
29. Karah, N.; *Eur. J. Med. Chem.* **2002**, 37, 909.
30. Palenik, G. J.; Rendle, D. F.; Carter, W. S.; *Acta Crystallogr., Sect. B: Struct. Sci.* **1974**, 30, 2390.
31. Holla, B. S.; Malini, K. V.; Rao, B. S.; Sarojini, B. K.; Kumari, N. S.; *Eur. J. Med. Chem.* **2003**, 38, 313.
32. Gupta, R. P.; Narayana, N. L.; *Pharmaceutica Acta Helvetiae* **1997**, 72, 43.
33. Sarodnick, G.; Heydenreich, M.; Linker, T.; Kleinpeter, E.; *Tetrahedron* **2003**, 59, 6311.
34. Hang, H. C.; Bertozzi, C. R.; *Acc. Chem. Res.* **2001**, 34, 727.
35. Benbrook, D. M.; Madler, M. M.; Spruce, L. W.; Birckbichler, P. J.; Nelson, E. C.; Subramanian, S.; Weerasekare, G. M.; Gale, J. B.; Patterson, M. K.; Wang, B.; Wang, W.; Lu, S.; Rowland, T. C.; Disevestro, P.; Lindamood, C.; Hill, D. L.; Berlin, D.; *J. Med. Chem.* **1997**, 40, 3567.
36. Rodriguez, E. C.; Marcaurelle, L. A.; Bertozzi, C. R.; *J. Org. Chem.* **1998**, 63, 7134.
37. Costa, P.; Pilli, R.; Pinheiro, S.; Vasconcellos, M.; *Substâncias carboniladas e seus derivados*, 1ª ed., Bookman: Porto Alegre/MG, 2003.
38. Solomons, G.; Fryhle, C.; *Química orgânica*, 7ª ed., LTC – Livros técnicos científicos Ed. S. A: Rio de Janeiro/RJ, 2002, vol. 2.

39. West, D. X.; Liberta, A.; Padhye, S. B.; Chikate, R. C.; Sonawane, P. B.; Kumbhar, A. S.; Yerande, R. G.; *Coord. Chem. Rev.* **1993**, 123, 49.
40. Beraldo, H.; Gambino, D.; *Mini-Rev. Med. Chem.* **2004**, 4, 31.
41. Chandra, S.; Parmar, S.; Kumar, Y.; *Bioinorganic Chemistry and Applications*, **2009**, doi: 10.1155/2009/851316.
42. Tenório, R. P.; Góes, A. J. S.; Lima, J. G.; De Faria, A. R.; Alves, A. J.; Aquino, T. M.; *Química Nova*, **2005**, 28, 1030-1037.
43. Hoggarth, E.; Martin, A. R.; Storey, N. E.; Young, E. H. P.; *Brit. J. Pharmacol.*; **1949**, 4, 248-253.
44. Hamre, D.; Bernstein, J.; Donovan, R.; The chemotherapy of experimental tuberculosis. II. Thiosemicarbazones and analogues in experimental tuberculosis in the mouse, *Journal Bacteriologic*, **1950**, 59, 675-680.
45. Dobek, A. S.; Klayman, D. L.; Dickson Jr., E. T.; Scovil, J. P.; Tramont, E. C.; *Antimicrob. Agents Chemother.* **1980**, 18, 27.
46. Singh, D.; Singh, R. V.; *J. Inorg. Biochem.* **1993**, 15, 2; Ali, M. A.; Mirza, A. H.; Hossain, M. S.; Nazimudin, M.; *Polyhedron* **2001**, 20, 1045.
47. Kasuga, N. C.; Onodera, K.; Nakano, S.; Hayashi, K.; Nomiya, K.; *Journal of Inorganic Biochemistry*, **2006**, 100, 1176-1186.
48. Kasuga, N. C.; Sekino, K.; Ishikawa, M.; Honda, A.; Yokoyama, M.; Nakano, S.; Shimada, N.; Koumo, C.; Nomiya, K.; *Journal of Inorganic Biochemistry*, **2003**, 96, 298-310.
49. Kitaev, Y. P.; Buzikim, B. I.; Troppol' Skaya, T. V.; Russian Chemical Reviewm, 1970, 6, 39, 441-456.
50. Peres, G. L. **Síntese e caracterização de ligantes oximas e tiossemicarbazonas e seus complexos**. Rio Grande, **2009**. [Dissertação de mestrado. Programa de pós-graduação em química tecnológica ambiental, Universidade Federal do Rio Grande].
51. Siemann, S.; Evanoff, D. P.; Marrone, L.; Clarke, A. J.; Viswanatha, T.; Dmitrienko, G. I.; *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **2002**, 46, 2450-2457.
52. Deng, X.; Mani, N. S.; *Org. Lett.*; **2006**, 8, 3505-3508.
53. Awadalla, A. M.; *The Islamic University Journal*, **2006**, 14, 129-133.
54. Nogueira, A. J. M. **Novas dietoxifosfonil-N-acilarilhidrazonas e dialquilfosforilhidrazonas com potencial atividade biológica**. Rio de

- Janeiro, **2007**. [Dissertação de Mestrado, Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro].
55. Tavares, L. C.; Chiste, J. J.; Santos, M. G. B.; Penna, T. C. V. *Boll. Chim. Farm.*; **1999**, 138, 432-436.
56. Almeida, V. M.; Santos, R. J.; Góes, A. J. S.; Lima, J. G.; Correia, C. R. D.; De Faria, A. R.; *Tetrahedron Lett.*, **2009**, 50, 684-687.
57. Almeida, V. M. **Reações de cicloadição 1,3-dipolar de enecarbamatos e enamidas endocíclicas de 6 membros com *n*-óxidos de nitrila. Síntese e avaliação das atividades anti-inflamatórias e antimicrobiana de derivados isoxazolínicos bicíclicos piperidínicos**. Recife, 2003. [Dissertação de Mestrado, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco].
58. Santos, R. J. **Reações de cicloadição 1,3-dipolar de enecarbamatos e enamidas endocíclicas de 5 membros com *n*-óxidos de nitrila. Síntese e avaliação das atividades anti-inflamatórias e antimicrobiana de derivados isoxazolínicos bicíclicos 5 membros**. Recife, 2003. [Dissertação de Mestrado, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco].
59. De Almeida, G. C. **Síntese e avaliação preliminar da atividade antimicrobiana e antichagásica de novas isoxazolil-aril-semicarbazonas e tiossemicarbazonas e isoxazolil-nitro-furfuril hidrazonas**. Recife, **2009**. [Dissertação de Mestrado, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco].
60. Mancuso, A. J.; Swern, D. *Synthesis*, **1981**, 165-185.
61. Gligorijević, N.; Todorović, T.; Radulović, S.; Sladić, D.; Filipović, N.; Godevac, D.; Jeremić, D.; Anđelković, K. Synthesis and characterization of new Pt (II) and Pd (II) complexes with 2-quinolinecarb oxaldehyde selesemicarbazone : Cytotoxic activity evaluation of Cd(II), Zn (II), Ni (II), Pt (II) and Pd (II) complexes with heteroaromatic selesemicarbazones. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, p. 1623-629, 2009.
62. Chandra, S.; Parmar, S.; Kumar, Y. Synthesis, Spectroscopic, and Antimicrobial Studies on Bivalent Zinc and Mercury Complexes of 2-Formylpyridine Thiosemicarbazone. **Bioinorganic Chemistry and Applications**, doi:10.1155/2009/851316, 2009.

63. Alomar, K.; Khan, M. A.; Allain, M.; Bouet, G. Synthesis, crystal structure and characterization of 3-thiophene aldehyde thiosemicarbazone and its complexes with cobalt(II), nickel(II) and copper(II). **Polyhedron**, v. 28, p. 1273-1280, 2009.
64. Cunha, S.; da Silva, T. L. One-pot and catalyst-free synthesis of thiosemicarbazones via multicomponent coupling reactions. **Tetrahedron Letters**, v. 50, p. 2090-2093, 2009.
65. Gligorijević, N.; Todorović, T.; Radulović, S.; Sladić, D.; Filipović, N.; Godevac, D.; Jeremić, D.; Andelković, K. Synthesis and characterization of new Pt (II) and Pd (II) complexes with 2-quinolinecarb oxaldehyde selesemicarbazone : Cytotoxic activity evaluation of Cd(II), Zn (II), Ni (II), Pt (II) and Pd (II) complexes with heteroaromatic selesemicarbazones. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, p. 1623-629, 2009.
66. Aguirre, G.; Boiani, L.; Boiani, M.; Cerecetto, H.; di Maio, R.; González, M.; Porcal, W.; Denicola, A.; Piro, O. E.; Castellano, E. E.; Sant'anna, C. M. R.; barreiro E. J. New potent 5-substituted benzofuroxans as inhibitors of Trypanosoma cruzi growth: Quantitative structure–activity relationship studies. **Bioorg. Méd. Chem**, v. 13, p. 6336-6346, 2005.
67. Reis, S. L. G. B. **Sítese e Avaliação Preliminar da Atividade Atioceptiva e Toxicidade de novas Isoxazolil-aril-hidrazoas**. Recife, 2008. [Dissertação de Mestrado, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco].
68. Jones, R. N.; Pfaller, M. A. Bacterial Resistance: A Worldwide Problem; **Diagn. Microbiol. Infect. Dis**, v. 31, p. 379-388, 1998.
69. Lima, M. M.; Belluomini, M.; Almeida, M. M. M. B.; Arantes, G. R. Co-infecção HIV/tuberculose: necessidade de uma vigilância mais efetiva. **Revista de Saúde Pública**, v. 31, p. 217-20, 1997.
70. Rakesh, S. D.; Lee, R. B.; Tangallapally, R. P.; Lee, R. E. Synthesis, optimization and structure e activity relationships of 3, 5-disubstituted isoxazolines as new anti-tuberculosis agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, p. 460-472, 2009.
71. Varshney, V.; Mishra, N. N.; Shukla, P. K.; Sahu, D. P. Synthesis and antibacterial evaluation of isoxazolinyloxazolidinones: Search for potent

- antibacterial. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, p. 3573–3576, 2009.
72. Bauer, A. W.; Kirby, W. M. M.; Sherris, J. C.; Turck, M.; *Am. J. Clin. Pathol.*, **1966**, 45, 493-496.
73. P. R. Murray, E. J. Barou, M. A. Faller, F. C. Tenover, R. H. Yolken; In: *Manual of Clinical Microbiology*; 6a ed. Washington, DC, American Society of Microbiology, **1995**.
74. Tangallapally, R. P.; Sun, D.; Rakesh; Budha, N.; Lee, R. E. B.; Lenaerts, A. J. M.; Meibohm, B.; Lee, R. E. **Discovery of novel isoxazolines as anti-tuberculosis agents. Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 14, p. 3818-3824, 2006.
75. Chung, m.; güido, r. V. C.; martinelli, t. F.; gonçalves, m. F.; polli, m. C.; botelho, k. C. A.; Varanda, E. A.; Colli, W.; Miranda; M. T. M.; Ferreira, E. I. **Synthesis and in Vitro Evaluation of Potential Antichagasic Hydroxymethylnitrofurazone (NFOH-121): A New Nitrofurazone Prodrug. Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 11, p. 4779–4783, 2003.
76. De Almeida, V. M. **Síntese assimétrica de 3-carboxamidas enantiomericamente puras e de hidrazidas e aril-hidrazonas, derivadas do novo heterociclo 7-(benzoil)-2-isoxazolina[5,4-b]pirrolidina. Avaliação das atividades biológicas.** Recife, 2008. [Tese de Doutorado de - Departamento de Ciências Farmacêuticas- Universidade Federal de Pernambuco].

ANEXOS  
Espectros de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e IV

