

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

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DE 3-
CARBOXAMIDAS-2-ISOXAZOLINAS AZABICÍCLICAS**



**RECIFE - PE
2013**

HELLEN RAYANNA TÔRRES DE SOUSA

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DE 3-CARBOXAMIDAS-
2-ISOXAZOLINAS AZABICÍCLICAS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde da UFPE, como requisito parcial para obtenção do grau de MESTRE em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Rodolfo de Faria

RECIFE – PE

2013

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

S725s Sousa, Hellen Rayanna Tôres de.
Síntese e avaliação da atividade citotóxica de 3-carboxamidas-2-
isoxazolininas azabíciclicas / Hellen Rayanna Tôres de Sousa. – 2013.
87 f.; il.; 30 cm.

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

1. Cicloadição. 2. Anti-inflamatórios. 3. Isoxazóis. 4. cicloadição 1,3-dipolar. 5. 2- isoxazolinas. I. Faria, Antônio Rodolfo de (Orientador). II. Título.

615.3 CDD (23.ed.)

UFPE (CCS2016-132)

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

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DE 3-CARBOXAMIDAS-
2-ISOXAZOLINAS AZABICÍCLICAS**

APROVADA EM: 30/08/2013

BANCA EXAMINADORA

Presidente:

Prof. Dr. Antônio Rodolfo de Faria-DCFar/UFPE

Membro Interno Titular

Prof^a.Dra.Terezinha Gonçalves da Silva-DA/UFPE

Membro Externo Titular:

Prof^a. Dra. Ivani Malvestiti – DQF/UFPE

Membros Suplentes:

Prof. Dr. Jefferson Luíz– DQF/UFPE

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR

Prof. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Prof. Sílvio Romero de Barros Marques

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Francisco de Sousa Ramos

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Prof. Dr. Antônio Rodolfo de Faria

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

Prof. Dr. Almir Gonçalves Wanderley

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

Profª. Dra. Ana Cristina Lima Leite

Dedico este trabalho ao meu esposo, Paulo, e aos meus pais Ademir e Sônia. Sou grata por tudo o que eles representam na minha vida.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus, pois a cada dia sinto sua mão me sustentando e me dando forças para continuar a caminhada. A Ele toda honra e glória.

Ao meu amado esposo Paulinho, por tantos conselhos e pelo ombro amigo quando eu mais precisei se não fosse por ele eu não teria conseguido chegar até aqui.

Aos meus pais pelos mais importantes ensinamentos que me serão úteis pelo resto da minha vida, pelo carinho, incentivo e infinita doação.

Ao meu orientador, professor Antônio Rodolfo, pela orientação e ensinamentos durante esses anos.

Aos amigos do laboratório: Ronmilson, Charles, Marlene, Lucas e Adriano, pelo convívio durante esses anos e pelos momentos de aprendizagem juntos.

Aos estudantes de Iniciação Científica: Eduarda, Renata e em especial a Natanael pelo apoio e grande ajuda na concretização deste trabalho.

À professora Teresinha, pela realização dos testes biológicos e orientação.

À professora Gardênia, pela realização dos testes de citotoxicidade.

A Lourenço, pelos testes de Infravermelho.

Aos técnicos da Central Analítica, pela presteza oferecida nos últimos e corridos momentos para a finalização deste trabalho.

A CAPES e CNPQ pelo auxílio financeiro.

Não tenho palavras pra agradecer tua bondade.
Dia após dia me cercas com fidelidade, nunca me
deixes esquecer que tudo o que tenho, tudo o que
sou, o que vier a ser vem de Ti Senhor.

(Música Vem de ti, Senhor - Diante do Trono)

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 - Núcleo 2 - isoxazolina

Figura 02 - Núcleos isoxazolínicos obtidos no LASOF

Figura 03 - Reação de cetonas α,β -insaturadas com hidroxilamina

Figura 04 - Classificação dos 1,3-dipolos

Figura 05 - Exemplos de 1,3-dipolos

Figura 06 - Classificação da cicloadição 1,3-dipolar com base nos FMOs.

Figura 07 - Mecanismo de reação de cicloadição 1,3-dipolar entre o *N*-óxido de nitrila e uma enamida endocíclica

Figura 08 - Funções orgânicas obtidas pela redução de isoxazolininas

Figura 09 - Obtenção de isoxazóis e anéis β -lactâmicos a partir de isoxazolininas.

Figura 10 - Reações para obtenção da tienamicina.

Figura 11 - Nomenclatura dos núcleos isoxazolínicos

Figura 12 - Amidas isoxazolínicas racêmicas

Figura 13 - Fármacos anti-inflamatório de referência

Figura 14 - Par de enantiômeros formados na reação de ciclo 1,3-dipolar

Figura 15 - Dados espectroscópicos de 41a. Deslocamento químico em ppm.

Figura 16 - Espectro RMN ^1H da amida 41a

Figura 17 - Espectro RMN ^{13}C da amida 41a

Figura 18 - confôrmeros rotacionais de 41a

Figura 19 - Espectro de infravermelho da amida 41a

Figura 20 - Dados espectroscópicos de 41b. Deslocamento químico em ppm.

Figura 21 - Espectro RMN ^1H da amida 41b

Figura 22 - Espectro RMN ^{13}C da amida 41b

Figura 23 - Espectro de infravermelho da amida 41b

Figura 24 - Dados espectroscópicos de 41c. Deslocamento químico em ppm.

Figura 25 - Espectro RMN ^1H da amida 41c

Figura 26 - Espectro de infravermelho da amida 41c

Figura 27 - Espectro de infra-vermelho das amidas 41a-c

Figura 28 - Dados espectroscópicos de 42. Deslocamento químico em ppm.

Figura 29 - Espectro RMN ^1H de 42

Figura 30 - Espectro RMN ^{13}C da amida 42

Figura 31 - Espectro de infravermelho da amida 42

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 01 - Exemplo geral de uma reação de cicloadição, mostrando o estado de transição cíclico.

Esquema 02 - Métodos de formação do *N*-óxido de nitrila

Esquema 03 - Cicloadição [3+2] entre enecarbamatos e enamidas com *N*-óxidos de nitrila.

Esquema 04 - Rota sintética para obtenção das 3-carboxamidas-2-isoxazolinazabícclicas

Esquema 05 - Síntese do trímero da 1-pirrolina 36

Esquema 06 - Síntese do enecarbamato *N*-(benziloxycarbonil)-2-pirrolina 37

Esquema 07 - Síntese do cloroóxidoimidoacetato de etila 27, do precursor do *N*-óxido de nitrila – CEFNO 28

Esquema 08 - Formação dos dois isômeros na cicloadição 1,3-dipolar entre o enecarbamato endocíclico de 5 membros com o *N*-óxido de nitrila

Esquema 09 - Reação de cicloadição 1,3-dipolar entre o enecarbamato endocíclico de 5 membros 37 com o *N*-óxido de nitrila – CEFNO 28

Esquema 10 - reação secundária de dimerização do *N*-óxido de nitrila

Esquema 11 - Reação de síntese do 1,3-dipolo, óxido de carboetoxiformonitrila, a partir do cloroóxidoimidoacetato de etila

Esquema 12 - Reação de desproteção do nitrogênio pirrolidínico N6

Esquema 13 - Reação de acilação do nitrogênio pirrolidínico com cloretos de benzoila *p*-substituídos

Esquema 14 - Reação de amonólise do éster isoxazolínico de 40a-c

Esquema 15 - Reação de amonólise do éster isoxazolínico de 38

Esquema 16 - Reação de desproteção do nitrogênio pirrolidínico de 42

Esquema 17 - Degradação do produto 43 possivelmente devido à abertura do anel isoxazolínico.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5 – HT	5 – Hidroxitriptamina
Cbz	Carboxibenzil
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CEFNO	<i>Carboethoxyformonitrile oxide</i> – Óxido de carboetoxiformonitrila
CMI	Concentração Mínima Inibitória
DMSO	Dimetilsulfóxido
FMO	Orbital Molecular de Fronteira
HOMO	<i>Highest Occupied Molecular Orbital</i> - Orbital ocupado de maior energia
HSV-1	Herpes simples tipo 1
IV	Infravermelho
LASOF	Laboratório de Síntese Orgânica Aplicada a Fármacos
LBPF	Laboratório de Bioensaios para Pesquisa de Fármacos
LUMO	<i>Lowest Unoccupied Molecular Orbital</i> - Orbital não-ocupado de menor energia
MIF	Fator de Inibição de Migração de Macrófagos
NCI	<i>National Cancer Institute</i> – Instituto Nacional do câncer
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
TEA	Trietilamina
THF	Tetraidrofurano
THF	Tetraidrofurano

RESUMO

O método mais usado para síntese de novos fármacos é a modificação molecular. Esse método consiste em tomar uma substância conhecida, como modelo ou protótipo e a partir dela sintetizar novos compostos. As 2-isoxazolininas fazem parte de uma interessante classe de compostos heteropentaciclos. O núcleo 2-isoxazolina está presente em uma série de compostos que apresentam inúmeras atividades biológicas, tais como: antidepressiva, antinociceptiva, anti-HIV, antituberculose e anti-inflamatória. Deste modo, vislumbra-se neste trabalho a utilização da 2-isoxazolina aza-bicíclica de 5 membros, na obtenção de derivados que apresentem uma função amida no carbono C3 e *N*-benzoilados (R= F, Cl, Br), para a averiguação da toxicidade e atividade anti-inflamatória. O enecarbamato **37**, material de partida de nosso trabalho, foi obtido a partir da 1-pirrolina **35**, esta sofre trimerização obtendo-se posteriormente o enecarbamato com o nitrogênio protegido com o grupamento benziloxycarbonila (Cbz) **37**. Após a cicloadição 1,3-dipolar do enecarbamato **37** com *N*-óxido de nitrila, o cicloaduto isoxazolíneo **38** foi obtido. Nesta etapa chave dois centros assimétricos são formados, com configuração relativa *syn*, sem seletividade de face, portanto dois enantiômeros foram formados. Para a introdução dos grupamentos benzoila em N6, foi primeiramente realizada, uma reação de hidrogenólise, para remoção do grupamento Cbz, formando o produto **39**, seguida de *N*-acilação do nitrogênio pirrolidínico com cloretos de benzoila *p*-substituídos formando as isoxazolininas *N*-benzoiladas **40**. Nesta etapa obteve-se rendimentos de 86% a 95%. A última etapa propiciou a formação das amidas **41a-c** através da reação de amonólise do éster etílico. Foi realizada ainda a síntese da 3-carboxamida-2-isoxazolina azabíclica com o nitrogênio livre sem o grupamento benzoila *p*-substituído **43**. Após a síntese do cicloaduto isoxazolíneo **38**, foi realizada uma reação de amonólise, seguida de uma reação de hidrogenólise, o qual propiciou a formação da isoxazolina azabíclica desprotegida em N6 **43**. O teste para avaliação da atividade citotóxica em células tumorais, feito pelo método MTT, evidenciou que a maior parte dos compostos não apresentou atividade e apenas o composto **41a** apresentou moderada atividade para a linhagem HL60. Os objetivos propostos inicialmente no projeto, quanto à parte química, foram plenamente executados, apresentando resultados bastante promissores que incentiva a ampliação da série dos novos heterociclos isoxazolínicos.

Palavras-chave: cicloadição 1,3-dipolar, 2- isoxazolininas, atividade anti-inflamatória, enecarbamatos.

ABSTRACT

The most widely used method for the synthesis of new drugs is the molecular modification. This method involves taking a substance known as prototype model and from it synthesize new compounds. The 2-isoxazolines part of an interesting class of compounds heteropentacilos. The 2-isoxazoline core is present in a range of compounds which exhibit numerous biological activities such as antidepressant antinociceptive, anti-HIV, anti-tuberculosis and anti-inflammatory. Thus, we aim in this project the use of 2-isoxazoline azabicyclic 5-membered to obtain derivatives that have an amide function at the C3 carbon and N-benzoylated (R = F, Cl, Br) for the ascertainment toxicity and anti-inflammatory activity. The enecarbamate **37**, starting material of our project was obtained from the 1-pyrroline **35**, it undergoes trimerization obtaining subsequently enecarbamate with nitrogen protected with the grouping benzyloxycarbonyl (Cbz) **37**. After the 1,3-dipolar cycloaddition of enecarbamate **37** with nitrile *N*-oxide of the cycloadducts isoxazoline **38** was obtained. In this key stage two asymmetric centers are formed with *syn* relative configuration without selectivity face, so two enantiomers were formed. For the introduction of benzoyl groups in N6 was first carried out a hydrogenolysis reaction for removal of the Cbz grouping, forming the product **39**, followed by *N*-acylation of the nitrogen pyrroline with benzoyl chloride *p*-substituted forming isoxazolines *N*-benzoyl **40**. In this step gave yields of 86% to 95%. The last step enabled the formation of the amides **41a-c** by ammonolysis reaction of the ethyl ester grouping. Was further performed the synthesis of 3-carboxamide-2-isoxazoline azabicyclic with free nitrogen without the benzoyl *p*-substituted grouping **43**. After synthesis of cycloadducts isoxazoline **38**, a reaction was carried out for ammonolysis, followed by a hydrogenolysis reaction, which favored the formation of the isoxazoline azabicyclic deprotected in N6 **43**. The test for evaluation of cytotoxic activity on tumor cells made by the MTT method, has shown that most compounds showed no activity and only the compound **41a** had moderate activity for HL60. The objectives in the project, as the chemical part, have been fully executed, showing very promising results that encourage the expansion of the number of new isoxazoline heterocycles.

Keywords: 1,3-dipolar cycloaddition, 2-isoxazolines, anti-inflammatory, enecarbamates

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1 Isoxazolinas.....	19
2.1.1 Atividade Biológica e Aplicação Terapêutica.....	19
2.1.2 Métodos de Obtenção de 2-isoxazolinas	25
2.1.2.1 Reações de Cicloadição 1,3-dipolar.....	26
2.1.2.2 Cicloadição 1,3-dipolar com N-óxidos de nitrila.....	30
2.2 Importância na síntese orgânica da 2-isoxazolina.....	32
3 OBJETIVOS	34
3.1 Objetivos Gerais.....	34
3.2 Objetivos Específicos.....	34
4 METODOLOGIA.....	35
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5.1 Preparação do trímero da 1-pirrolina 36.....	40
5.2 Síntese do enecarbamato <i>N</i> -(benziloxicarbonil)-2-pirrolina 37	40
5.3 Síntese do clorooximidoacetato de etila 27, precursor do <i>N</i> -óxido de nitrila – CEFNO 28	41
5.4 Reação de cicloadição 1,3-dipolar entre o enecarbamato endocíclico de 5 membros 37 com o <i>N</i> -óxido de nitrila – CEFNO 28	42
5.5 Reação de desproteção do nitrogênio pirrolidínico de 38	45
5.6 Reação de acilação do nitrogênio pirrolidínico de 39 com cloretos de benzoila <i>p</i> -substituídos.....	46
5.7 Reação de amonólise do éster isoxazolínico de 40a-c.....	46
5.8 Reação de amonólise do éster isoxazolínico de 38	56
5.9 Reação de desproteção do nitrogênio pirrolidínico de 42	59
6 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	60
6.1 Materiais e Métodos:.....	60
6.2 Síntese do trímero da 1-pirrolina 36.....	61
6.3 <i>N</i> -(benziloxicarbonil)-2-pirrolina 37.....	62
6.4 Clorooximidoacetato de etila 27	63
6.5 Éster 6-benzil-3-etil do ácido 3a,4,5,6a-tetrahidropirrolo [3,2-d]isoxazol-3,6-dicarboxílico 38	64
6.6 Éster etílico do ácido 3a,4,5,6,6a-tetrahidropirrolo[3,2-d]isoxazol-3-carboxílico 39.....	65
6.7 Éster etílico do ácido 6-(4-fluorobenzoil)-4,5,6a tetrahydro-3ah-pirrolo[3,2-d]isoxazol-3-carboxílico 40a.....	66

6.8 Éster etílico do ácido 6-(4-clorobenzoil)-4,5,6,6a-tetrahidro-3ah-pirrolol[3,2-d]isoxazol-3-carboxílico 40b.....	67
6.9 Éster etílico do ácido 6-(4-bromobenzoil)-4,5,6a tetrahidro-3ah-pirrolol[3,2-d]isoxazol-3-carboxílico 40c.....	68
6.10 Amida do ácido 6-(4-fluorobenzoil)-4,5,6a tetrahidro-3ah-pirrolol[3,2-d]isoxazol-3-carboxílico 41a.....	69
6.11 Amida do ácido 6-(4-clorobenzoil)-4,5,6,6a-tetrahidro-3ah-pirrolol[3,2-d]isoxazol-3-carboxílico 41b.....	70
6.12 Amida do ácido 6-(4-bromobenzoil)-4,5,6a tetrahidro-3ah-pirrolol[3,2-d]isoxazol-3-carboxílico 41c.....	71
6.13 Amida do ácido 3a,4,5,6a-tetrahidropirrolol [3,2-d]isoxazol-3,6-dicarboxílico 42.....	72
6.14 Amida do (3a, 6a)-4,5,6,6a-tetrahidro-3aH-pirrolol[3,2- <i>d</i>]isoxazol-e-carboxamida 43.....	73
7 ESTUDO BIOLÓGICO.....	75
7.1 Análise de Citotoxicidade.....	75
7.1.1 Avaliação da atividade biológica.....	75
7.1.2 Linhagens celulares.....	75
7.1.3 Metodologia.....	76
7.1.4 Resultados e discussão.....	76
8 CONCLUSÃO E PESPECTIVAS.....	78
REFERÊNCIAS.....	81

1 INTRODUÇÃO

A Química Medicinal também chamada de Química Farmacêutica, Química Terapêutica, e antigamente conhecida como Farmácia Química, tem sido conceituada de vários modos, por diversos autores.

Atualmente, pode-se denominar que a Química Medicinal engloba o planejamento racional de novas substâncias bioativas, envolvendo a síntese ou a modificação molecular de substâncias; o isolamento de princípios ativos naturais; a identificação ou elucidação da estrutura; a descrição das moléculas desde a sua constituição atômica (passando por relações entre a estrutura e propriedades), até suas características estruturais quando da(s) interação(ões) com os diferentes sistemas biofases/biológicos; a compreensão em nível molecular de processos bioquímicos/farmacológicos, toxicológicos e farmacocinéticos e finalmente, a proposição e validação de modelos matemáticos através dos estudos de relações entre a estrutura química e a atividade farmacológica e/ou toxicológica, permitindo então a proposição de novas moléculas de interesse para o planejamento de fármacos.¹

Na aplicação de estratégias de planejamento de fármacos, os estudos dos processos evolutivos de reconhecimento molecular em sistemas biológicos assumem grande importância, pois constituem as bases fundamentais para o entendimento de propriedades como potência, afinidade e seletividade. Diante desse complexo paradigma, as ferramentas biotecnológicas associadas aos métodos de química medicinal ganham papel destacado no desenvolvimento de novas moléculas com atividade biológica.²

O método mais usado para síntese de novos fármacos é a modificação molecular. Esse método consiste em tomar uma substância conhecida, como modelo ou protótipo e a partir dela sintetizar e ensaiar novos compostos que sejam congêneres, homólogos ou análogos estruturais do fármaco matriz. Dessa forma, através da modificação molecular é possível descobrir o grupamento farmacofórico essencial e obter fármacos que apresentem propriedades mais desejáveis que o protótipo, em potência, especificidade, duração de ação, menor toxicidade e maior estabilidade.^{3,4}

As 2-isoxazolininas fazem parte de uma interessante classe de compostos heteropentaciclos (Figura1). A síntese de novas moléculas contendo este heterociclo constitui uma importante área de investigação devido ao seu potencial aplicativo em diversas áreas do conhecimento científico e também devido ao seu elevado potencial farmacológico.

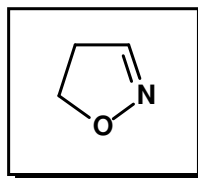


Figura 01: Núcleo 2-isoxazolina

Por exemplo, o núcleo 2-isoxazolina está presente em uma série de compostos que apresentam inúmeras atividades biológicas, tais como: antidepressiva^{5,6}, antinociceptiva⁷, anti-HIV^{8,9}, antituberculose¹⁰ e anti-inflamatória^{11,12}. Também há estudos que relatam que compostos contendo o núcleo 2-isoxazolina possuem atividades inseticidas¹³ e antifúngicas¹⁴. Diante de tais constatações, o núcleo 2-isoxazolina apresenta-se como um interessante ponto de partida para a síntese de novos compostos com grandes potenciais farmacológicos.

Recentemente foi desenvolvido no LASOF (Laboratório de Síntese Orgânica Aplicada a Fármacos) uma nova metodologia sintética, no qual dois novos núcleos isoxazolínicos foram obtidos: 4,5-diidroisoxazol[5,4-*b*]pirrolidina **1** e 4,5-diidroisoxazol[5,4-*b*]piperidina **4**¹⁵. Várias aplicações sintéticas destes novos núcleos foram levadas em consideração, onde inúmeros derivados, como **2** e **3**, foram obtidos, tendo apresentado pronunciadas atividades analgésica e anti-inflamatória (Figura 02). Estes derivados foram obtidos por hibridação molecular, no qual apresentavam em suas estruturas, o novo aza-biciclo 4,5-diidroisoxazol[5,4-*b*]pirrolidina **1**, como núcleo base, assim como a funcionalidade hidrazona¹⁶.

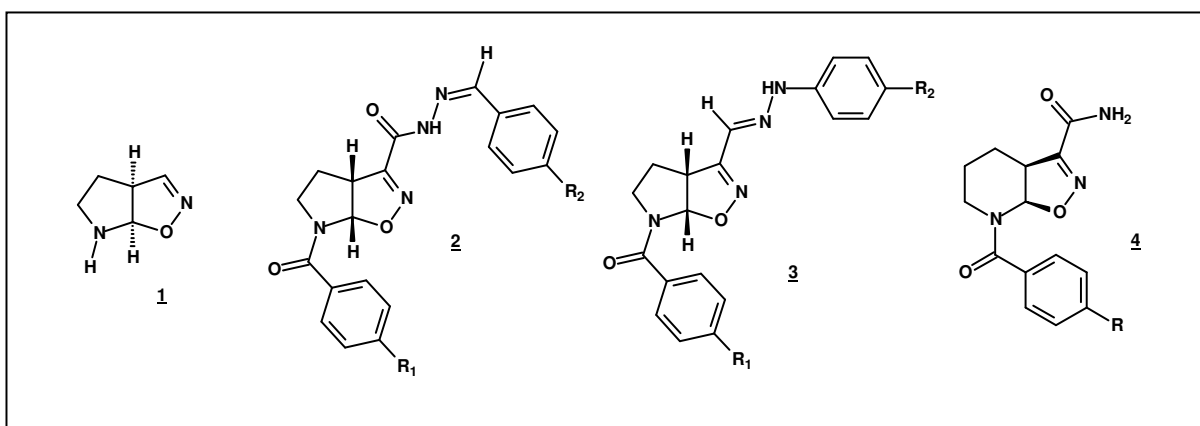


Figura 02: Núcleos isoxazolínicos obtidos no LASOF

Derivados 3-carboxamidas **4** também apresentaram intensa atividade *in vivo*, com indícios de atividade no Sistema Nervoso Central e possível atividade analgésica.¹⁷ Testes

específicos de atividade anti-inflamatória¹⁸ dessas carboxamidas isoxazolínicas foram realizados, apresentando resultados bastante promissores.

De fato, percebe-se que várias substâncias descritas, que possuem o núcleo 2-isoxazolina, apresentam variadas atividades biológicas já descritas anteriormente. Deste modo diante dos resultados apresentados, vislumbra-se neste trabalho a utilização da 2-isoxazolina aza-bicíclica de 5 membros, na obtenção de derivados que apresentem uma função amida no carbono C3 e *N*-benzoilados (R= F, Cl, Br), para a averiguação da toxicidade. Teremos então mais uma aplicação da metodologia e ampliada a utilização da isoxazolina aza-bicíclica desenvolvida anteriormente, na busca de novas substâncias com potencial farmacológico.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Isoxazolinas

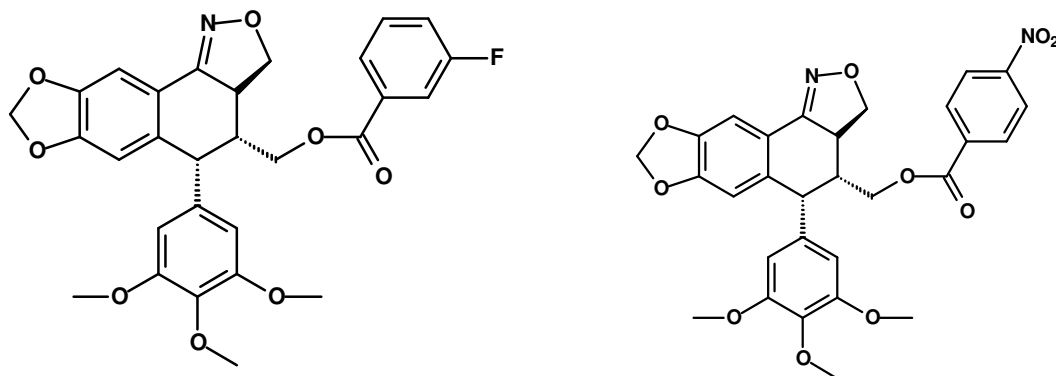
Utilizada em síntese orgânica como material de partida, intermediário sintético ou até mesmo fazendo parte da molécula final, o anel isoxazolínico é um representante importante do grupo dos ciclos 1,2-oxazóis. Este anel caracteriza-se por possuir dois heteroátomos: um átomo de oxigênio na posição 1 e um átomo de nitrogênio na posição 2 do anel, hibridizado em sp^2 .

As isoxazolinas vêm despertando grande interesse na química medicinal, uma vez que compostos que contém esse núcleo apresentam relevantes atividades biológicas como as que serão descritas a seguir.

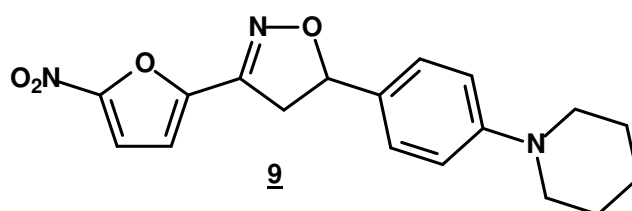
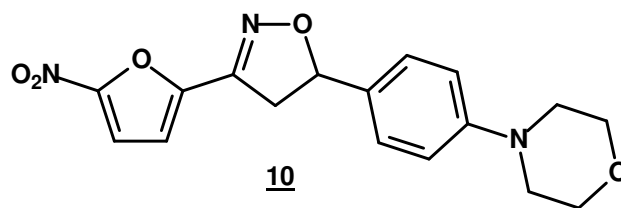
2.1.1 Atividade Biológica e Aplicação Terapêutica

Na literatura podem-se encontrar os mais diversos relatos de atividades de substâncias que contém o núcleo 2-isoxazolina, compreendendo desde atividade herbicida até atividades antiviral e antidepressiva.

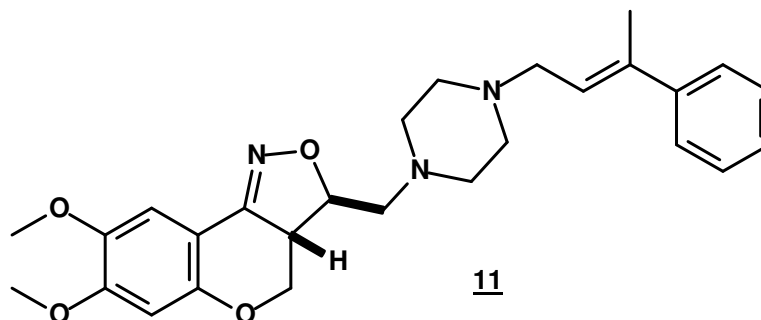
Os compostos **7** e **8** apresentaram maior atividade inseticida do que o protótipo toosendanin, já bastante utilizado na agricultura. A taxa de mortalidade das Larvas *M. separata* foi de 44,8% com o protótipo, já com os compostos **7** e **8** as taxas de mortalidade das larvas foram de 55,2% e 58,6%, respectivamente.¹⁹

78

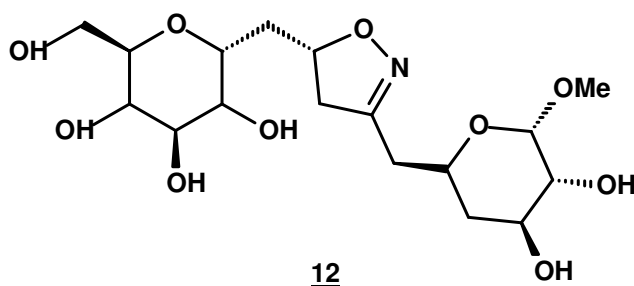
Uma nova série de isoxazolinas tetracíclicas foi sintetizada para melhorar as propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas do composto protótipo 9, antibacteriano utilizado no tratamento da tuberculose, seu núcleo 2-isoxazolina foi mantido uma vez que é fundamental para a sua atividade. O composto 10 foi o que apresentou um tempo de meia-vida significativo, maior volume de distribuição e boa tolerabilidade.²⁰

910

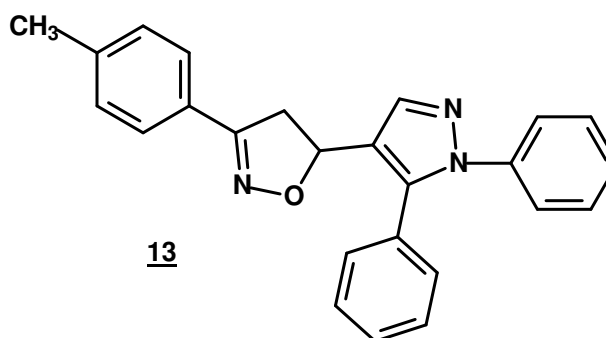
Foi sintetizada uma nova série de compostos enantioméricos que possuíam atividades de inibição da captação de 5-Hidroxitriptamina (5-HT) e antagonista de α_2 -adrenoreceptores²¹, a atividade combinada residia em principalmente um dos enantiômeros 11, que possui em sua estrutura a 2-isoxazolina. A avaliação biológica dos mais promissores compostos pode revelar novos potenciais antidepressivos.



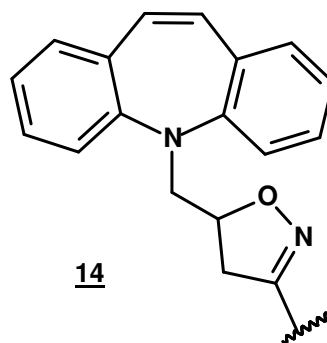
Novas isoxazolininas análogas de pseudodissacarídeo foram sintetizadas de forma regioespecífica.²² Suas atividades biológicas foram avaliadas preliminarmente e alguns compostos, como o **12**, exibiam potente atividade anti-HIV.



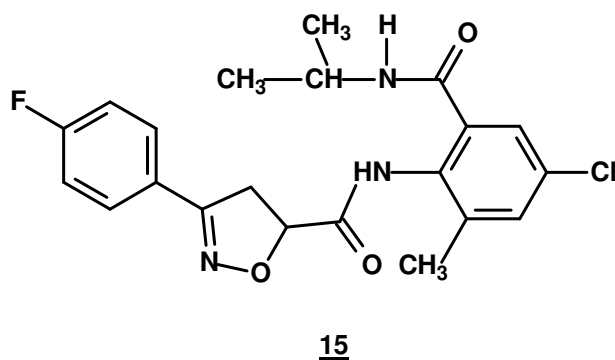
Em estudo recente²³ moléculas contendo o núcleo 2-isoxazolina apresentaram forte atividade antiviral contra o HSV-1 (Herpes simples tipo 1). Estes compostos atuam através da inibição da enzima Transcriptase Reversa e desta forma, inibem a replicação viral.



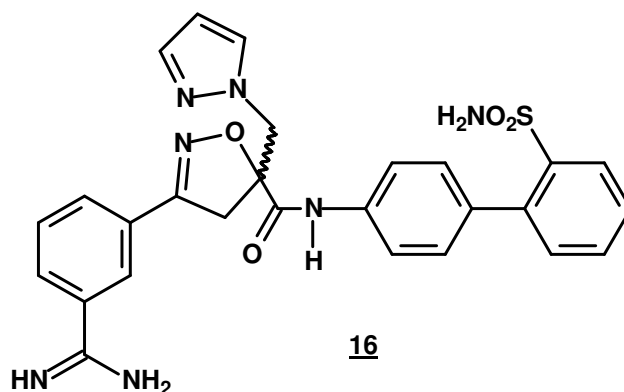
Isoxazolininas 5-substituídas foram incorporadas à molécula de dibenzoazepina **14**. As moléculas foram testadas e apresentaram excelentes resultados como a inibição da migração e da proliferação de células tumorais. Tais efeitos foram comparados ao efeito das cisplatinas.²⁴



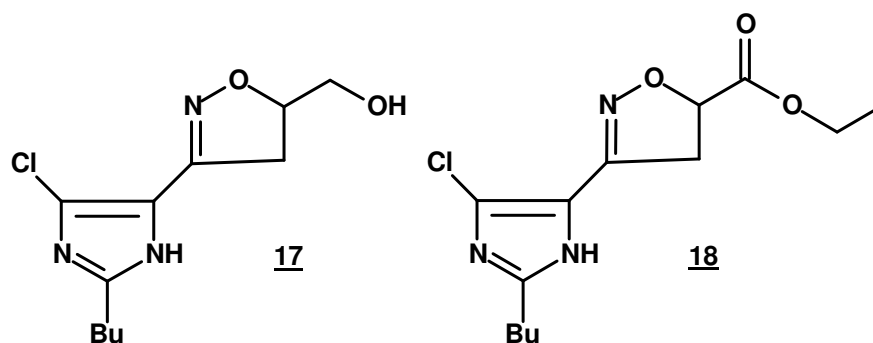
Uma série de novos derivados antranílicos diamidas, contendo uma porção aril-isoxazolina, foram sintetizados e os resultados preliminares indicaram que alguns dos compostos, como o **15**, apresentavam atividade anticâncer moderada, contra o câncer de pulmão, carcinoma de fígado e câncer gástrico.²⁵



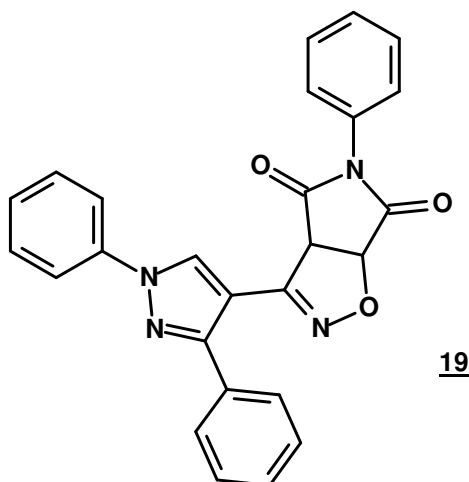
O Fator Xa é uma protease de serina importante na cascata de coagulação do sangue. A Inibição do Fator Xa tem sido um atrante alvo para aplicações terapêuticas potenciais no tratamento de trombose arterial e venosa. Foi descrita uma série de derivados de 2-isoxazolininas como inibidores de Fator Xa, a isoxazolina mais potente da série está exemplificada pela estrutura **16**.²⁶



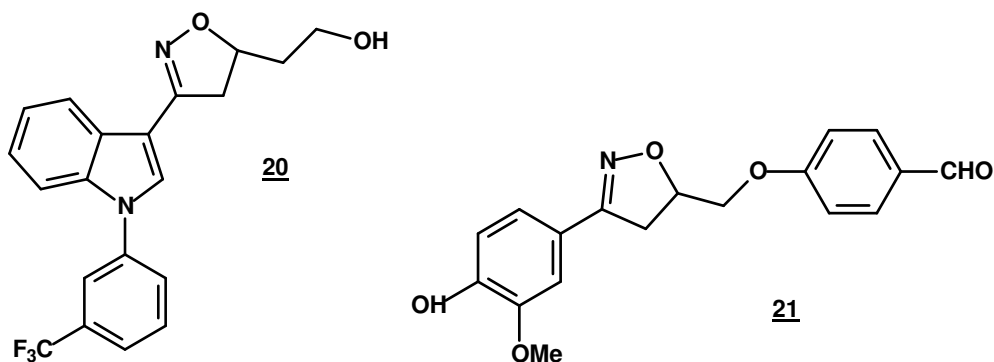
Isoxazolinas **17** e **18**, contendo o anel de imidazol na posição 3 do núcleo isoxazolínico, apresentaram Concentração Mínima Inibitória – CMI contra *Aspergillus flavus* e *Fusarium moniliforme* bem inferior ao fármaco nistatina, muito utilizado atualmente como antifúngico.²⁷



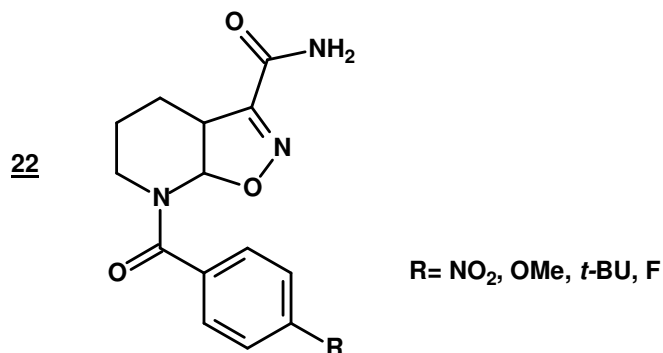
Moléculas contendo o núcleo 2-isoxazolina, como a representada pela estrutura **19**, apresentaram moderada atividade antinociceptiva. A molécula **19** Apresentou inibição de 47,4% do número de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético²⁸



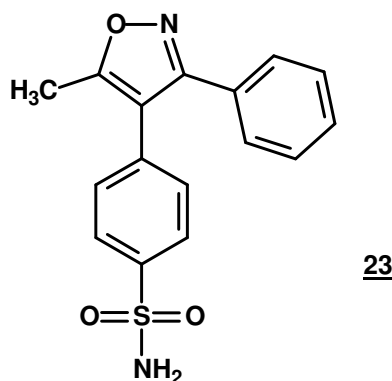
Os compostos 20 e 21 inibiram de forma acentuada, a produção do fator de inibição da migração de macrófagos (MIF). O MIF é uma citocina pró-inflamatória que desempenha um papel crítico na patogênese de várias doenças inflamatórias e autoimunes.^{29, 30}



2-isoxazolinas piperidínicas 22 obtidas por cicloadição 1,3-dipolar, entre enamidas endocíclicas e *N*-óxido de nitrila, foram analisadas quanto à atividade anti-inflamatória, através do teste de edema de pata induzido por carragenina em ratos. As isoxazolinas apresentaram redução do edema com a mesma eficácia que a indometacina, medicamento anti-inflamatório padrão utilizado nos testes.³¹



O fármaco Valdecóxib 23 é derivado da 2-isoxazolina e atualmente é amplamente utilizado como anti-inflamatório.³²



2.1.2 Métodos de Obtenção de 2-isoxazolinas

A primeira 2-isoxazolina sintetizada foi obtida em 1895 pela reação de cetonas α,β -insaturadas com hidroxilamina (Figura 03), que em geral apresenta resultados deficientes, principalmente devido aos processos de adição de Michael. A reação de oximação de enonas conjugadas é muito mais complexa do que se poderia esperar, produzindo isoxazolinas junto com β -hidroxilamino oximas e outros produtos. Sérias limitações na purificação e rendimento são desvantagens habituais deste procedimento, uma vez que, o seu resultado final não é facilmente controlável, dado que isso depende de diversas variáveis experimentais, tais como pH, natureza do solvente e proporção do reagente. No entanto, este método sintético foi o mais praticado até a cicloadição 1,3-dipolar entre óxidos de nitrila e alquenos, ser descoberta como uma alternativa melhor na obtenção de 2-isoxazolinas.³³ A cicloadição 1,3-dipolar foi

introduzida por Huisgen no início de 1960,³⁴ e mostrou ser um método eficiente para a obtenção de heterociclos de 5 membros.

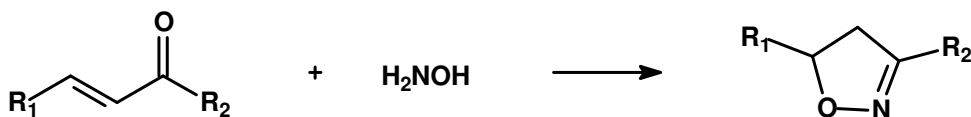
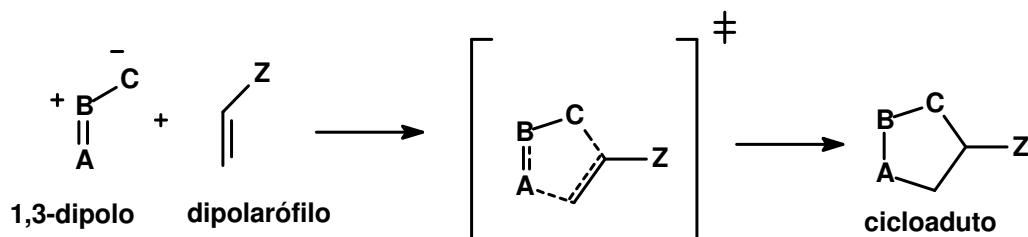


FIGURA 03: Reação de cetonas α,β -insaturadas com hidroxilamina

A reação de cicloadição 1,3-dipolar é o método mais utilizado para a obtenção de heterociclos de cinco membros e para importantes variações na estrutura de produtos naturais.³⁵ Na maioria dos casos a cicloadição 1,3-dipolar entre óxidos de nitrila e alquenos produz com alta regiosseletividade e com configuração relativa os átomos de carbono 4 e 5 da isoxazolina, que depende da geometria do alqueno.³⁶

2.1.2.1 Reações de Cicloadição 1,3-dipolar

Nas reações de cicloadição, a união de dois sistemas π leva à formação de duas novas ligações σ . As reações de cicloadição 1,3-dipolar são um tipo de reação pericíclica, as quais são caracterizadas por um processo de reorganização contínua e concertada de elétrons. Isto significa que, quando concertadas, um único estado de transição cíclico está envolvido, embora não necessariamente no mesmo grau; sem a formação de intermediários no processo, como pode ser visto no esquema 01.³⁷ Com relação à estereoquímica, a reação de cicloadição é estereoespecífica do tipo *syn*, em relação ao dipolarófilo.³⁸ O que significa que a estereoquímica da ligação dupla é preservada no produto.



Esquema 01: Exemplo geral de uma reação de cicloadição, mostrando o estado de transição cíclico.

A cicloadição procede entre um dipolarófilo (alqueno, alquino ou nitrila) e um agente 1,3-dipolar. O 1,3-dipolo é uma espécie que contém 3 átomos e 4 elétrons π deslocalizados entre eles.³⁹ Já o dipolarófilo apresenta 2 elétrons π distribuídos sobre 2 átomos. Deste modo, estas cicloadições são definidas como reações [3+2], onde os números representam o número de átomos envolvidos na formação do anel.

O 1,3-dipolo pode ser classificado em dois diferentes tipos: tipo ânion alila e tipo ânion alenila/propargila. O 1,3-dipolo do tipo ânion alila é caracterizado pela presença de 4 elétrons em 3 orbitais p , paralelos e perpendiculares ao plano do 1,3-dipolo, que é angular. O 1,3-dipolo do tipo alenila tem um orbital π extra, localizado no plano ortogonal, sendo desta forma linear.⁴⁰

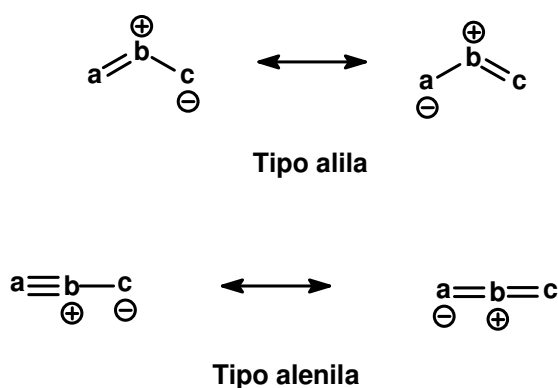
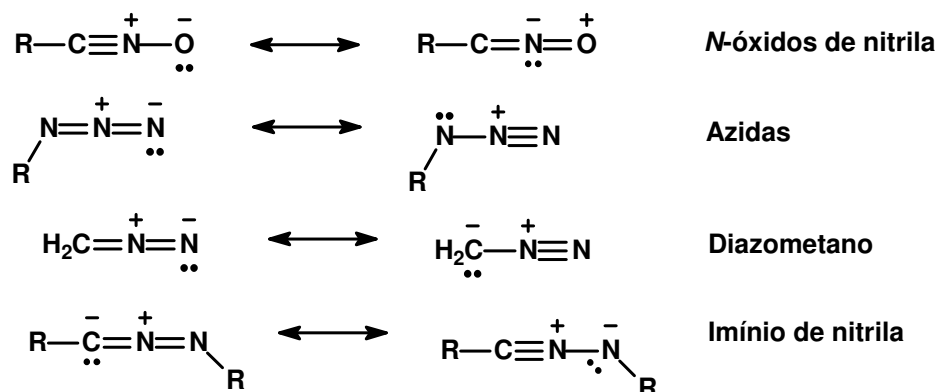


Figura 04: Classificação dos 1,3-dipolo

O dipolarófilo pode ser praticamente qualquer composto que contenha uma ligação dupla ou tripla, como $C\equiv C$, $C=C$, $C\equiv N$, $C=N$, $C=O$, ou $C=S$.⁴¹

Dentre os diversos compostos 1,3-dipolar que podem ser utilizados nas reações de cicloadição, destacam-se os exemplos mostrados na Figura 05. Estes compostos variam bastante em estabilidade, sendo que alguns podem ser isolados e armazenados, enquanto outros são instáveis e devem ser gerados *in situ*, como no caso dos óxidos de nitrila.

1,3-dipolos do tipo propargila



1,3-dipolos do tipo alila

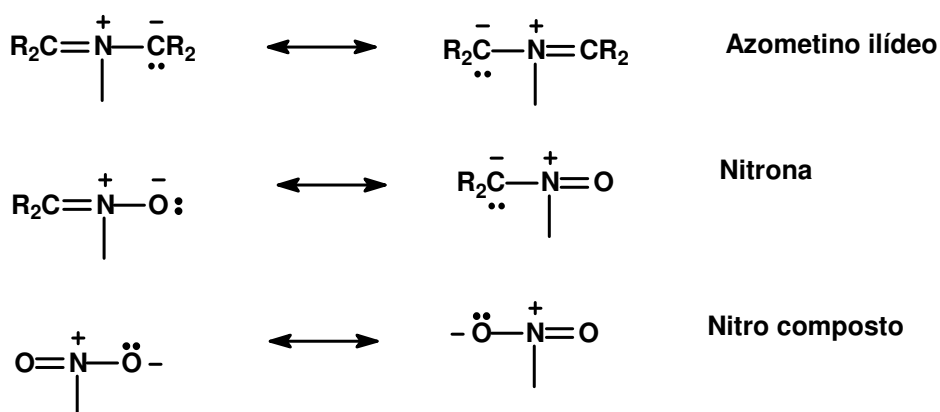


Figura 05: Exemplos de 1,3-dipolo

As reações de cicloadição 1,3-dipolar são controladas pelos Orbitais Moleculares de Fronteira (FMO) HOMO e LUMO do 1,3-dipolo e do dipolarófilo. A teoria dos Orbitais Moleculares de Fronteira é utilizada para explicar a regioseletividade da cicloadição.⁴²

Segundo Fleming, HOMO é o Orbital Molecular ocupado de maior energia e LUMO é o Orbital Molecular não-ocupado de menor energia.⁴²

Sustman, classificou as reações de cicloadição em três tipos, com base nas energias relativas dos FMO entre o dipolo e o alqueno. Na reação de cicloadição do tipo I a interação dos OMF ocorre entre o HOMO do dipolo com o LUMO do alqueno. Já na cicloadição do tipo II, a similaridade entre a energia dos OMF do dipolo e do alqueno, implica que ambas as

interações HOMO-LUMO são importantes. Reações de cicloadição do tipo III são interações entre o LUMO do dipolo e o HOMO do alqueno⁴³ (Figura 06). O tipo de interação dominante dependerá da diferença de energia dos orbitais moleculares. As interações entre o HOMO e o LUMO que tiverem as menores diferenças de energia serão predominantes. Quando a energia dos orbitais é muito próxima, a reação pode ser controlada simultaneamente por ambos o HOMO e LUMO do 1,3-dipolo e dipolarófilo. Isto pode ser manipulado eletronicamente através da adição de grupos retiradores ou doadores de elétrons. Também, os reagentes serão preferencialmente orientados, ou seja, a interação mais forte vai acontecer, entre os carbonos que tem os maiores coeficientes dos dois orbitais alinhados.

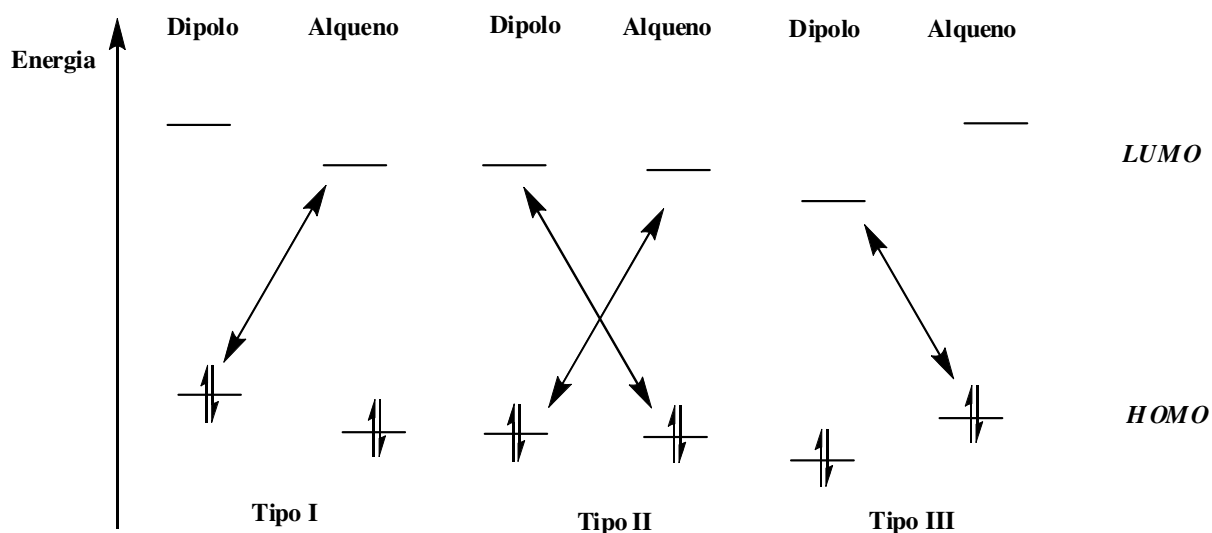
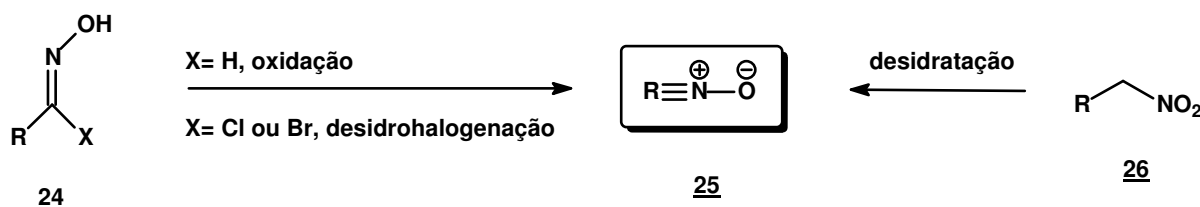


Figura 06: Classificação da cicloadição 1,3-dipolar com base nos FMOs.

Reações do tipo I são típicas de azometino ilídeo, enquanto que as reações de cicloadição das nitronas são classificadas como tipo II. Já os óxidos de nitrila e óxido nitroso são do tipo III.⁴³

2.1.2.2 Cicloadição 1,3-dipolar com N-óxidos de nitrila

Devido à sua tendência em formar dímeros de furoxanos (1,2,5-oxadiazol 2-óxido), óxidos de nitrila **25** são usualmente gerados *in situ*, isto é, na presença de dipolarófilos como alquenos, alquinos, etc, a partir de precursores estáveis como aldoximas **24** (X = H) ou de nitroalcanos primários **26** (Esquema 02). A formação de N-óxidos de nitrila **25** através de aldoximas **24** envolve ou a oxidação direta ou a halogenação das aldoximas **24** em haletos de hidroximinoila (X= Cl ou Br), seguida por desidrohalogenação. Alternativamente **25** é formado através da desidratação preliminar de **26**.⁴⁴



Esquema 02: Métodos de formação do N-óxido de nitrila

Todos os métodos conhecidos para a síntese de **25** começam com uma estrutura orgânica que já contém a sequência C-N-O, necessário para conversão em **25**. Muitos métodos são relatados na literatura para a formação de **25**, porém os mais comuns são os métodos citados acima.⁴⁵

Desde os anos 1960, a regio- e estereoquímica, bem como o mecanismo global das reações de cicloadição 1,3-dipolar com N-óxidos de nitrila tem intrigado os químicos orgânicos.⁴⁴

Uma proposta de mecanismo para as reações de cicloadição 1,3-dipolar, entre o dipolo N-óxido de nitrila e uma enamida endocíclica como dipolarófilo é apresentado na figura 07.

Neste mecanismo foi considerada a linearidade de **25** e a grande diferença dos valores de coeficiente de orbital HOMO do enecarbamato/enamida, que dificultam a formação simultânea das duas ligações na reação de cicloadição. A ligação do carbono β ao átomo de hidrogênio com o carbono do N-óxido de nitrila é concluída primeiro, formando um intermediário N-acil-imínio dipolar.

No intermediário *N*-acil-imínio, tem-se agora uma estrutura angular *N*-óxido-imina, que devido à maior proximidade espacial, possibilita a adição do oxigênio ao carbono do acil-imínio, ocorrendo a interação frontal entre o orbital preenchido do oxigênio com o orbital LUMO do imínio.⁴⁶ Desta forma, a reação de cicloadição do enecarbamato com o *N*-óxido de nitrila é do tipo não-concertada, pois devido à diferença entre os coeficientes orbitais as ligações não ocorrem simultaneamente.

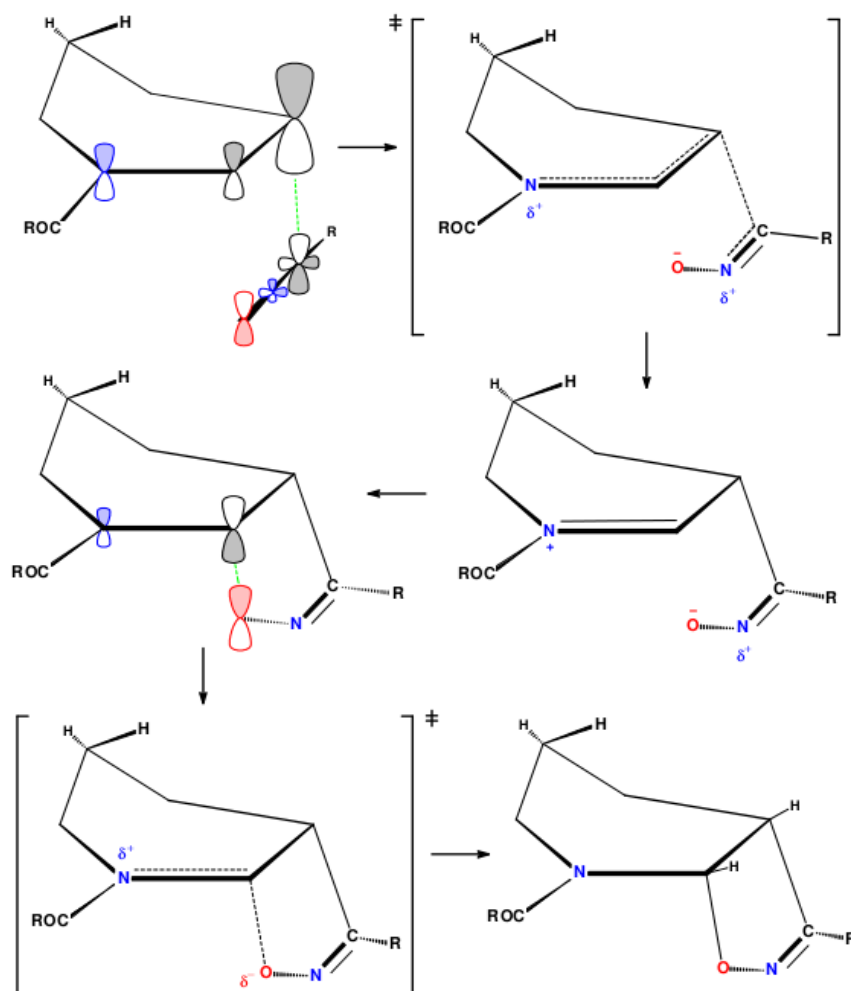


Figura 07: Sugestão de mecanismo para reação de cicloadição 1,3-dipolar entre o *N*-óxido de nitrila e uma enamida endocíclica.

2.2 Importância na síntese orgânica da 2-isoxazolina

As isoxazolininas são consideradas de grande importância na síntese química, uma vez que elas são precursoras de várias funções orgânicas bastante utilizadas, por exemplo, quando sofrem redução como demonstrado na figura 08.

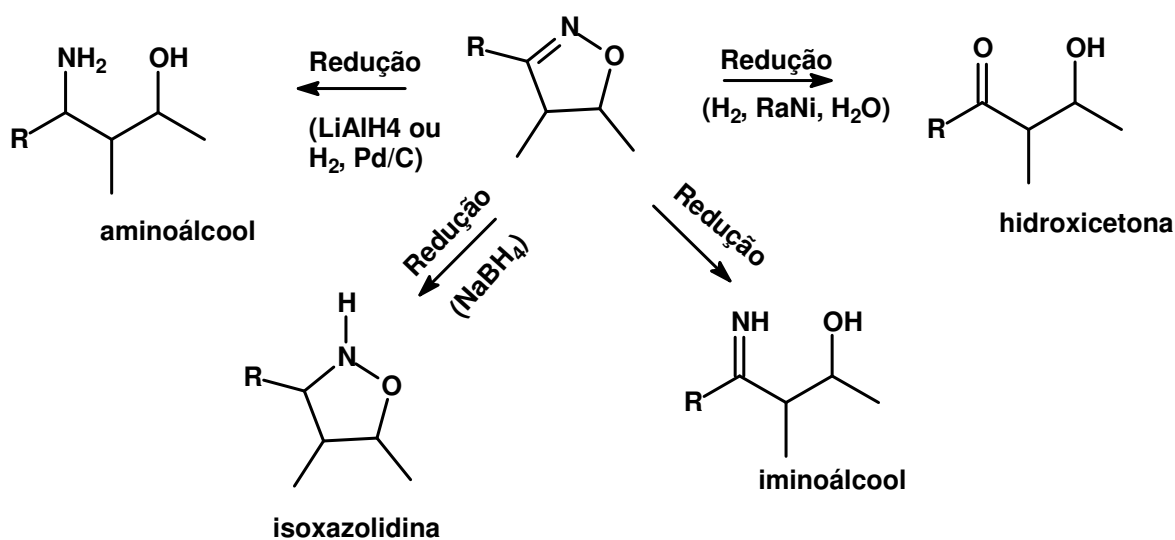


Figura 08: Funções orgânicas obtidas pela redução de isoxazolininas.

A partir das isoxazolininas também podem ser obtidos isoxazóis e anéis β -lactâmicos.⁴⁷

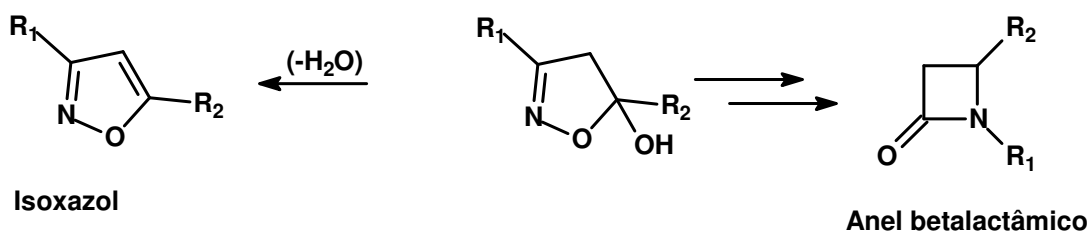


Figura 09: Obtenção de isoxazóis e anéis β -lactâmicos a partir de isoxazolininas.

O antibiótico Tienamicina foi obtido via reação de cicloadição 1,3-dipolar, tendo uma 2-isoxazolina como intermediário sintético.⁴⁸

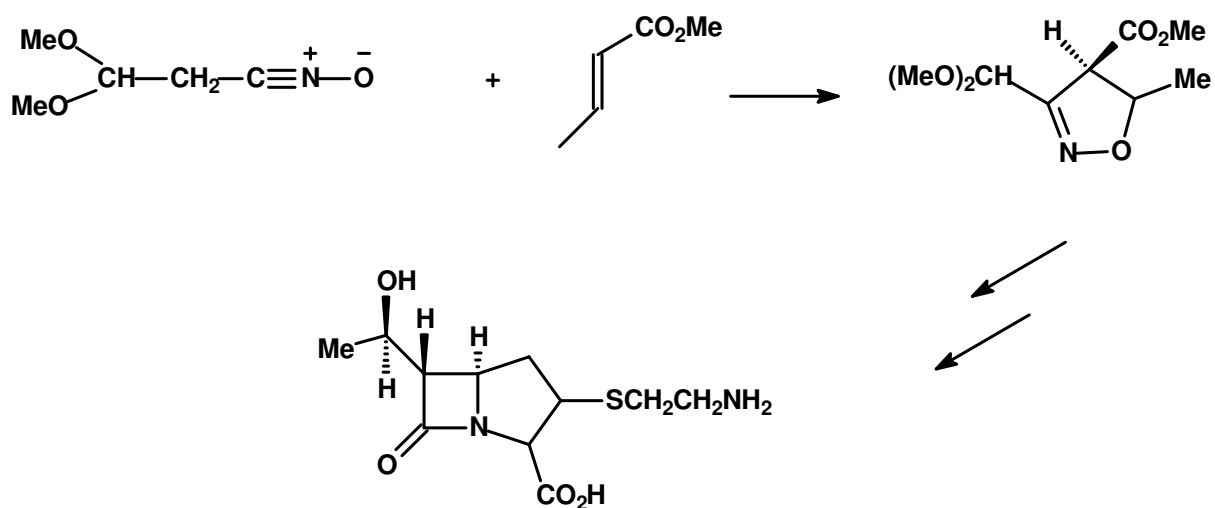


Figura 10: Reações para obtenção da tienamicina.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos Gerais

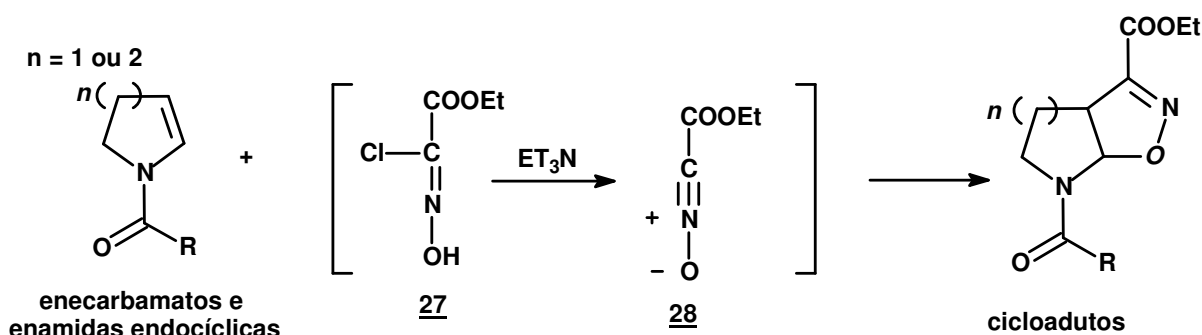
Síntese e avaliação da atividade citotóxica de 3-carboxamidas-2-isoxazolinazabíclicas.

3.2 Objetivos Específicos

- Síntese das novas 3-carboxamidas-2-isoxazolinazabíclicas, a partir da reação de cicloadição 1,3-dipolar do enecarbamato;
- Purificação e determinação de propriedades físico-químicas das novas moléculas, tais como: R_f e ponto de fusão;
- Elucidação estrutural das novas moléculas através de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C e do Infravermelho (IV-FT);
- Avaliação da citotoxicidade.

4 METODOLOGIA

Em trabalhos anteriores, foi desenvolvida uma nova metodologia sintética, baseada nas reações de cicloadição 1,3-dipolar de enecarbamatos (R= OEt, OBn) e enamidas endocíclicas (R= Arila) de 5 e de 6 membros, $n = 1$ ou 2, respectivamente, com *N*-óxidos de nitrila **28** (Esquema 03).¹⁵



Esquema 03: Cicloadição [3+2] entre enecarbamatos e enamidas com *N*-óxidos de nitrila.

Os cicloadutos obtidos, contendo os novos heterobícclicos: 2-isoxazolina[5,4-*b*]piperidina e 2-isoxazolina[5,4-*b*]pirrolidina foram aplicados na obtenção de derivados potencialmente bioativos.^{49, 50}

As 2-isoxazolinazabícclicas (Figura 09) possuem dois anéis fundidos: uma 2-isoxazolina e uma piperidina **29** e uma 2-isoxazolina e uma pirrolidina **30**, constituindo em dois novos heterociclos, de acordo com pesquisas na literatura.

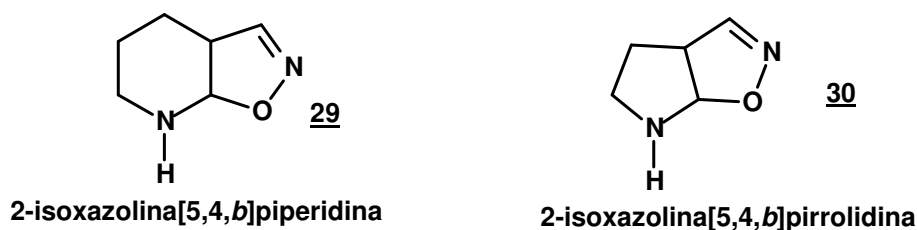


Figura 11: Nomenclatura dos núcleos isoxazolinícos

Dentre os vários derivados do novo heterociclo, aqueles substituídos com grupamentos benzoila no nitrogênio N7 e N6, e carboxamida na posição C3, dos respectivos núcleos **31** e **32**, apresentaram excelentes atividades biológicas, como: antinociceptiva (teste de nocicepção induzida por ácido acético) e anti-inflamatória (teste de peritonite por carragenina em camundongos).^{17, 49}

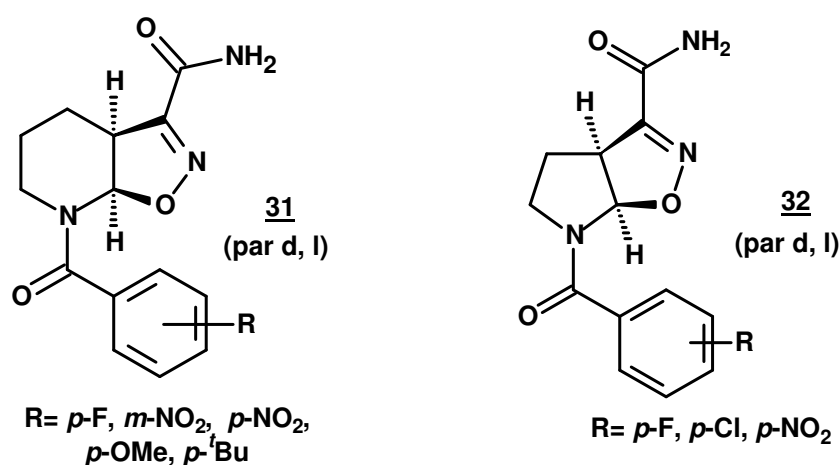


Figura 12: Amidas isoxazolínicas racêmicas

A escolha dos substituintes *N*-benzoila e carboxamida dos derivados **31** e **32** se deveu a tentativa de induzir a atividade anti-inflamatória dos mesmos, fazendo certa analogia estrutural ao anti-inflamatório de referência *indometacina* **33** e *salicilamida* **34** (Figura 11).

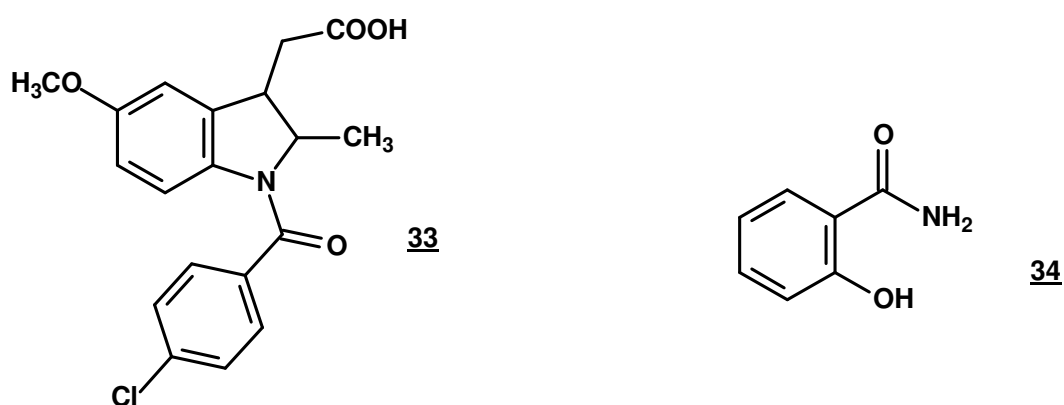


Figura 13: Fármacos anti-inflamatórios de referência

Diante dos excelentes resultados apresentados pelas substâncias **31** e **32**, com relação à atividade anti-inflamatória e a toxicidade aguda, realizamos neste trabalho uma ampliação e continuação na busca pelo desenvolvimento de novos fármacos anti-inflamatórios, utilizando a nova metodologia sintética desenvolvida anteriormente.

Estudo químico: Síntese Orgânica

O enecarbamato **37**, material de partida de nosso trabalho, foi obtido a partir da 1-pirrolina **35**, esta sofre trimerização obtendo-se posteriormente o enecarbamato com o nitrogênio protegido com o grupamento benziloxycarbonila (Cbz) **37**. Após a cicloadição 1,3-dipolar do enecarbamato **37** com *N*-óxido de nitrila, o cicloaduto isoxazolínico **38** foi obtido. Nesta etapa chave dois centros assimétricos são formados, com configuração relativa *syn*, sem seletividade de face, portanto dois enantiômeros foram formados, caracterizando uma síntese racêmica, proporção 1:1, como demonstrado na figura 12.

Para a introdução dos grupamentos benzoila em N6, foi primeiramente realizada, uma reação de hidrogenólise, para remoção do grupamento Cbz, formando o produto **39**, seguida de *N*-acilação do nitrogênio pirrolidínico com cloretos de benzoila *p*-substituídos formando as isoxazolininas *N*-benzoiladas **40**.

A última etapa propiciou a formação das amidas **41** através da reação de amonólise do éster etílico. (Esquema 04)

Foi realizada ainda a síntese da 3-carboxamida-2-isoxazolina azabicíclica com o nitrogênio livre sem o grupamento benzoila *p*-substituído **43**. Após a síntese do cicloaduto isoxazolínico **38**, foi realizada uma reação de amonólise, seguida de uma reação de hidrogenólise, o qual propiciou a formação da isoxazolina azabicíclica desprotegida em N6 **43**.

O esquema 04 mostra a sequência de reações envolvidas no trabalho, visando à obtenção das 3-carboxamidas-2-isoxazolininas azabicíclicas, derivadas do núcleo 2-isoxazolina pirrolidínico.

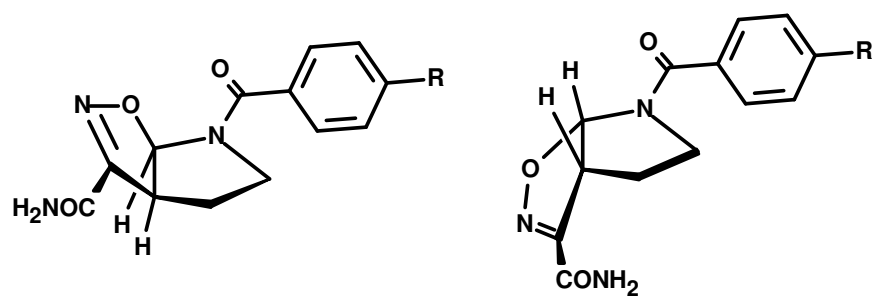
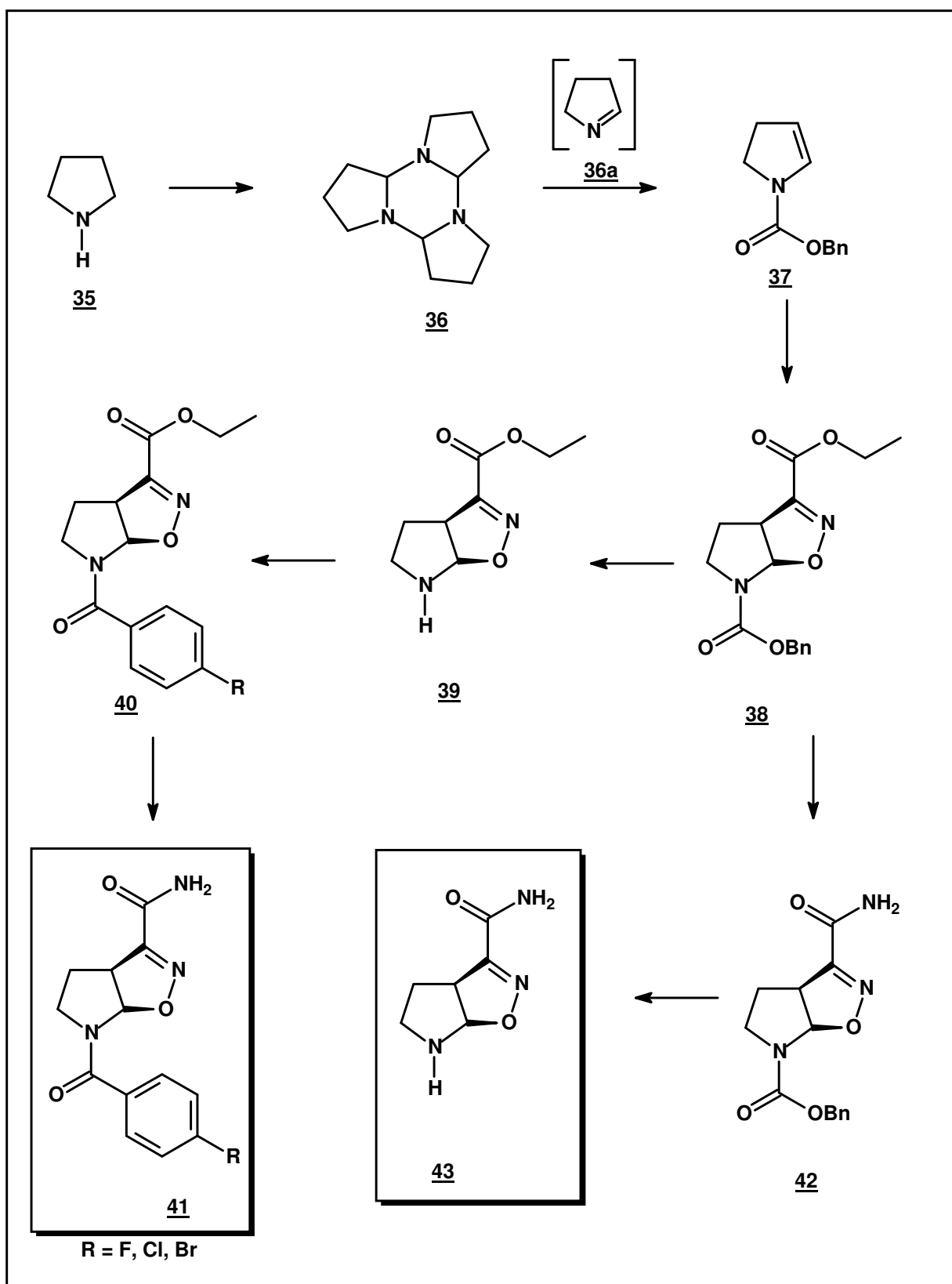


Figura 14: Par de enantiômeros formados na cicloadição 1,3-dipolar



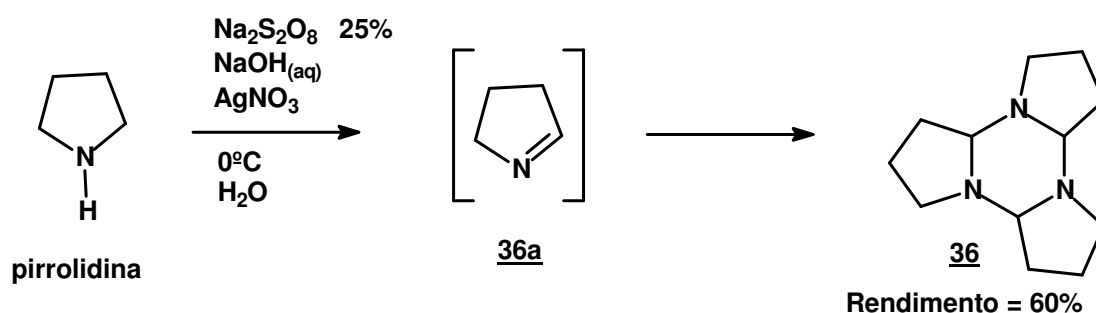
Esquema 04: Rota sintética para obtenção das 3-carboxamidas-2-isoxazolinazabíclicas

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Preparação do trímero da 1-pirrolina **36**

A 1-pirrolina **36a**, intermediário chave na síntese do enecarbamato, foi obtida através da oxidação catalítica da pirrolidina, pelo persulfato de sódio, em meio básico e AgNO_3 como catalizador.

Devido à sua grande reatividade e instabilidade, o monômero **36a** trimeriza no meio reacional, formando o respectivo trímero **36**, que é isolado convenientemente.⁵¹ (esquema 05)

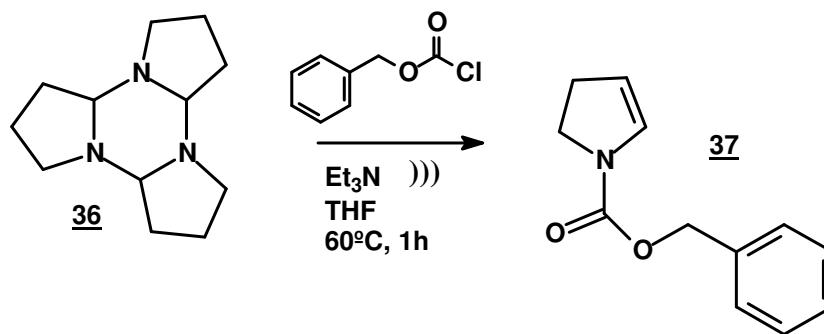


Esquema 05: Síntese do trímero da 1-pirrolina **36**

5.2 Síntese do enecarbamato *N*-(benziloxicarbonil)-2-pirrolina **37**

O enecarbamato *N*-(benziloxicarbonil)-2-pirrolina **37** foi preparado, visando sua aplicação na obtenção das *N*-benzoil-isoxazolinazabibiclicas, visto que a remoção posterior do grupamento benziloxicarbonila, via hidrogenólise catalítica, é de fácil execução e tem rendimento quantitativo.

Nesta etapa, o trímero da 1-pirrolina **36** foi utilizado sem prévia purificação, na presença de trietilamina (TEA) à 60°C e sob ultra-som, ocorre a destrimerização de **36**, produzindo 3 mol de monômero para cada mol de trímero **36**. O agente acilante, cloroformato de benzila, foi adicionado lentamente, obtendo-se o respectivo enecarbamato *N*-(benziloxicarbonil)-2-pirrolina **37**, com 40% de rendimento (esquema 06).



Esquema 06: Síntese do enecarbamato *N*-(benziloxicarbonil)-2-pirrolina 37

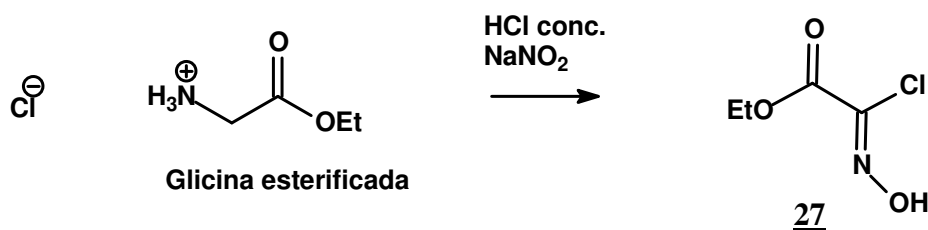
5.3 Síntese do clorooximidoacetato de etila 27, precursor do *N*-óxido de nitrila – CEFNO 28

O *N*-óxido de nitrila – carboetoxiformonitrila (CEFNO), utilizado na reação de cicloadição 1,3-dipolar, foi obtido *in situ*, através do precursor clorooximidoacetato de etila 27.

O precursor do *N*-óxido de nitrila 28, clorooximidoacetato de etila 27, foi preparado através de oxidação da glicina esterificada por NaNO_2 , em meio ácido, HCl concentrado (esquema 07).

Vale salientar que, ao manipular o precursor do *N*-óxido de nitrila 27, deve-se ter o máximo de cuidado, pois o mesmo é altamente irritante para a pele e mucosas.

Devido à sua grande estabilidade, ele pode ser armazenado em grandes quantidades por longo período e utilizado conforme necessidade. O precursor 27 do dipolo foi obtido como cristais brancos por cristalização em hexano, com um rendimento de 45%.



Esquema 07: Síntese do clorooximidoacetato de etila 27, do precursor do *N*-óxido de nitrila – CEFNO 28

5.4 Reação de cicloadição 1,3-dipolar entre o enecarbamato endocíclico de 5 membros 37 com o *N*-óxido de nitrila – CEFNO 28

A reação de cicloadição 1,3-dipolar do enecarbamato *N*-(benziloxicarbonil)-2-pirrolina 37 com *N*-óxido de nitrila foi bem sucedida. Isto se deve provavelmente à grande reatividade e propriedades eletrônicas do dipolo *N*-óxido de nitrila, bem como a alta reatividade da ligação dupla do enecarbamato.

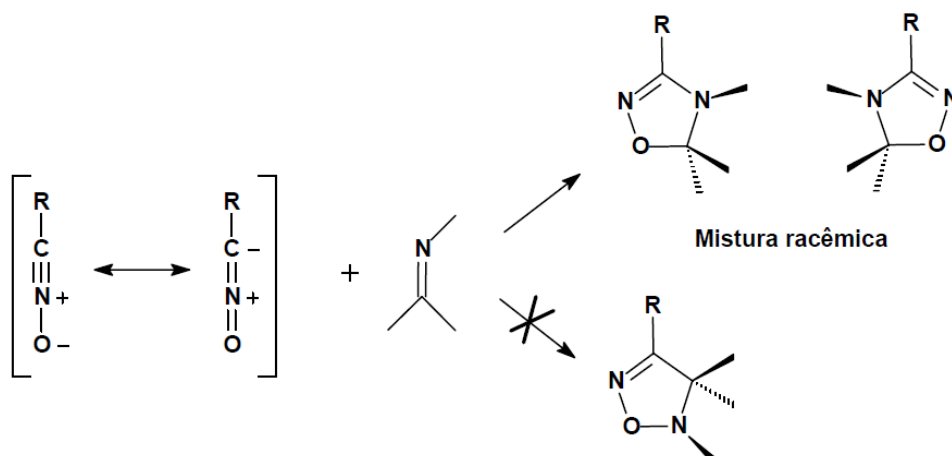
Os *N*-óxido de nitrila, especialmente o óxido de carboetoxiformonitrila 28, que possui grupamento elétron retirador (carbonila), o orbital LUMO está mais estabilizado, possuindo baixa energia relativa, fazendo com que a diferença de energia (ΔE_1) entre esses orbitais seja menor do que o que aconteceria no inverso (HOMO dipolo/LUMO dipolarófilo) (ΔE_2). Dessa maneira, a demanda eletrônica normal provavelmente será HOMO do dipolarófilo com o LUMO do dipolo.

Na reação é provável que ocorra inicialmente a interação frontal do orbital atômico do carbono β ao átomo de hidrogênio do dipolarófilo (HOMO) com o orbital atômico do carbono do dipolo (LUMO), formando a ligação sigma carbono-carbono, após rápida passagem pelo estado de transição.

Neste mecanismo, existem dois fatores que desfavorecem a formação simultânea das duas ligações sigma desta cicloadição 1,3-dipolar. A assimetria dos coeficientes orbitales tanto do dipolo como do dipolarófilo, priorizam a formação da ligação carbono-carbono, e assim, a superposição é facilitada. A linearidade do dipolo é outro fator determinante, já que no posicionamento para a realização da primeira ligação, os orbitais atômicos dos participantes da segunda ligação ficam afastados, impossibilitando assim a formação simultânea das duas ligações sigmas.

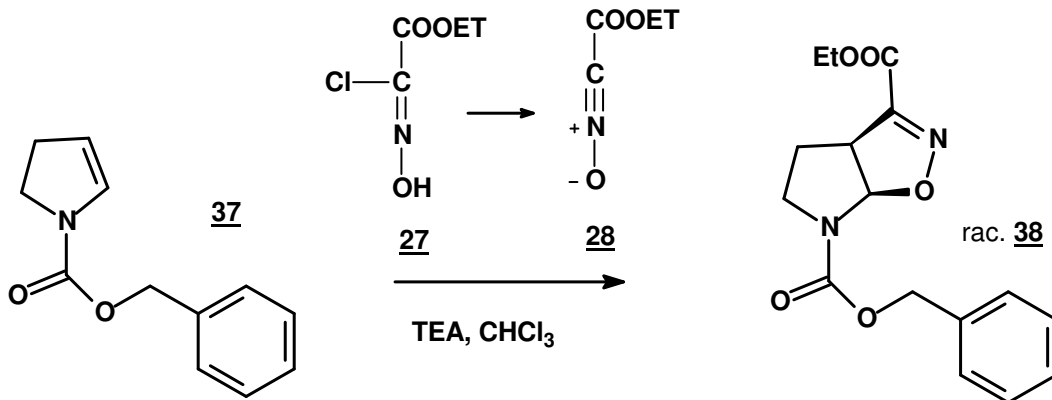
Após a formação da primeira ligação, e origem de um intermediário imínio dipolar, ocorre a mudança da hibridização do nitrogênio do dipolo, de sp para sp^2 , favorecendo desta forma, a aproximação do oxigênio do dipolo, rico em elétrons, com o carbono do dipolarófilo, deficiente em elétrons. Neste momento, a segunda ligação sigma do cicloaduto é formada.

Estes fatos são determinantes para a existência da regioseletividade desta reação, já que, apenas dois enantiômeros (uma mistura racêmica) são formados, e não quatro, caso houvesse a formação de regioisômeros (Esquema 08).



Esquema 08: Formação dos dois isômeros na cicloadição 1,3-dipolar entre o enecarbamato endocíclico de 5 membros com o *N*-óxido de nitrila

A reação de cicloadição 1,3-dipolar entre enecarbamatos endocíclicos de 5 membros e o *N*-óxido de nitrila, constitui a etapa chave do processo (esquema 09).

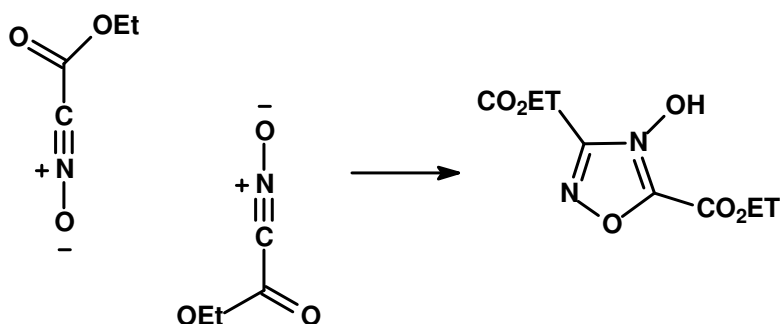


Esquema 09: Reação de cicloadição 1,3-dipolar entre o enecarbamato endocíclico de 5 membros 37 com o *N*-óxido de nitrila – CEFNO 28

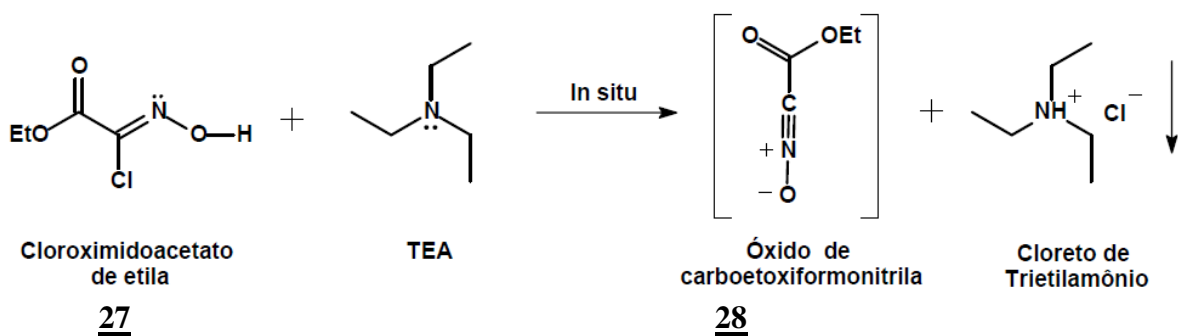
O rendimento desta reação de cicloadição é drasticamente sensível ao tempo de adição do clorooximidoacetato de etila 27. A adição da solução clorofórmica de 27, sobre o meio reacional, é feita gota a gota. Essa adição deve ser lenta, pois à medida que o dipolo é formado, ocorre uma reação secundária de dimerização do *N*-óxido de nitrila 28⁵² (Esquema 10). A adição rápida do precursor leva à formação de uma grande quantidade do dímero,

havendo perdas na concentração do dipolo no meio reacional, acarretando em diminuição no rendimento da reação.

O dipolo *N*-óxido de nitrila **28** é formado *in situ*, paulatinamente, assim que seu precursor o cloroóximidoacetato de etila **27** entra em contato com a trietilamina (Esquema 11). A partir deste momento, inicia-se a cicloadição entre o dipolo e o dipolarófilo.



Esquema 10: reação secundária de dimerização do *N*-óxido de nitrila



Esquema 11: Reação de síntese do 1,3-dipolo, óxido de carboetoxiformonitrila, a partir do cloroóximidoacetato de etila

Este esquema mostra a reação, largamente utilizada, de formação do *N*-óxido de nitrila, *in situ*, partindo-se da desprotonação do OH do cloroóximidoacetato de etila **27**, havendo, ao final, a precipitação do sal cloridrato de trietilamônio no meio reacional.

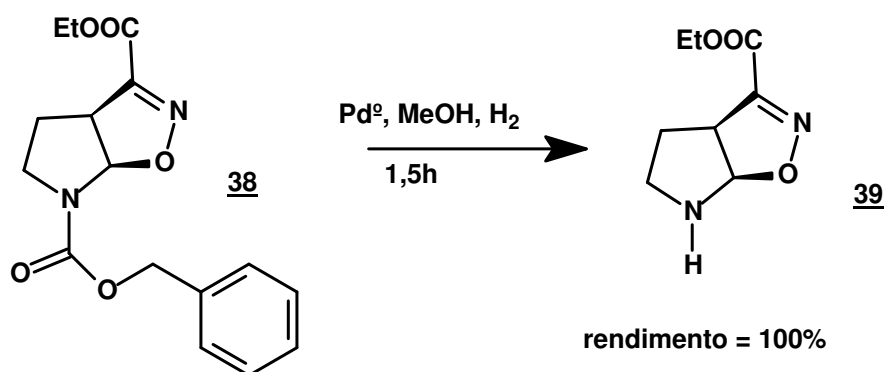
A isoxazolina pirrolidínica bicíclica **38** foi obtida com 70% de rendimento.

A análise de cromatografia em camada delgada, em vários sistemas de eluentes, indica a formação de um único produto na reação de cicloadição, confirmando a diastereo e

regiosseletividade esperadas, segundo o estudo teórico da reação, havendo a formação, de um único par *d,l* de configuração relativa *cis*.

5.5 Reação de desproteção do nitrogênio pirrolidínico de **38**

A reação de hidrogenólise do grupamento CBz do heterobicyclo **38**, catalisada por Pd⁰ (esquema 12), é bem conhecida e dominada pelo grupo de pesquisa, apresentando rendimentos quantitativos.



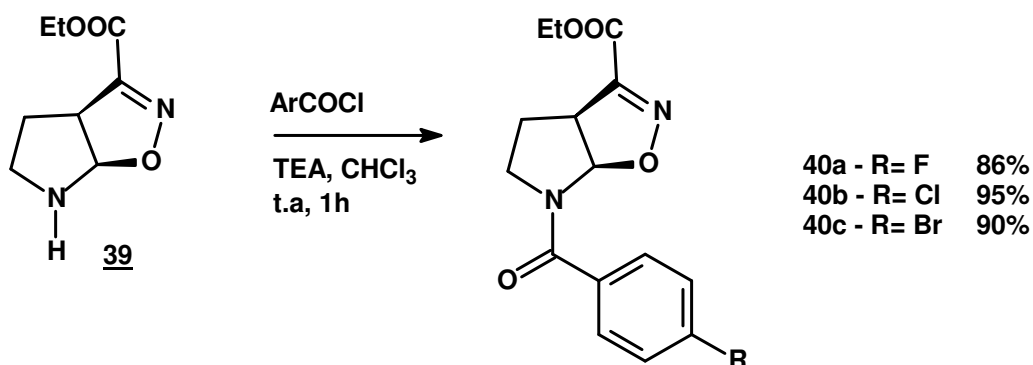
Esquema 12: Reação de desproteção do nitrogênio pirrolidínico N6.

A formação da amina livre propiciou a introdução dos substituintes benzoila *para*-substituídos em N6 na etapa subsequente. A 2-isoxazolina pirrolidínica **39**, agora sem o grupamento protetor CBz, foi utilizada diretamente, sem prévia purificação, na reação de *N*-benzoilação.

Esta desproteção foi realizada com o intuito de não termos a necessidade de realizarmos várias cicloadições, com diversas *N*-benzoil-enamidas. Desta forma as *N*-benzoil-isoxazolininas poderiam ser obtidas através da *N*-benzoilação da amina secundária desprotegida **39** com os respectivos cloretos *para*-substituídos. As reações de *N*-benzoilação são menos dispendiosas e menos trabalhosas do que as reações de síntese de diferentes enamidas.

5.6 Reação de acilação do nitrogênio pirrolidínico de **39** com cloretos de benzoila *p*-substituídos

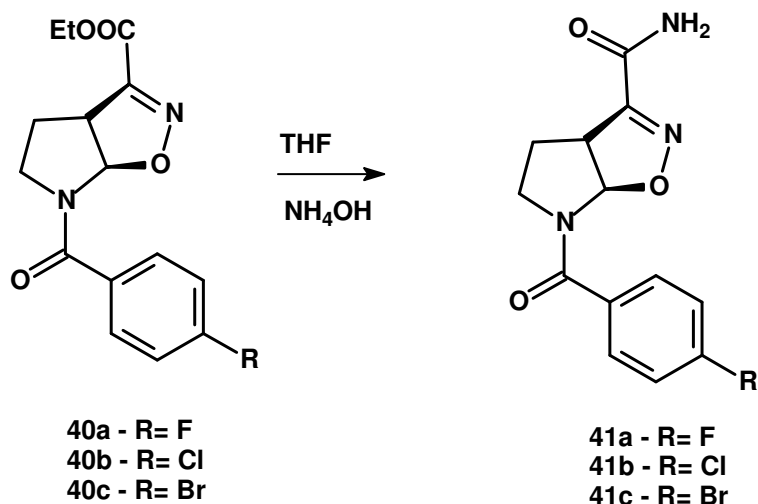
A 2-isoxazolina pirrolidínica **39** foi submetida à *N*-acilação com os respectivos cloretos de benzoila *p*-substituídos (esquema 13). A reação foi realizada em clorofórmio seco, na presença de trietilamina, à temperatura ambiente, atmosfera de argônio e agitação vigorosa. Nesta etapa obteve-se rendimentos de 86% a 95%, com formação de 3 isoxazolininas pirrolidínicas *N*-aciladas **40a-c** com variação dos substituintes em R (esquema 13).



Esquema 13: Reação de acilação do nitrogênio pirrolidínico com cloretos de benzoila *p*-substituídos

5.7 Reação de amonólise do éster isoxazolínico de **40a-c**

As isoxazolininas pirrolidínicas *N*-aciladas **40a-c** foram submetidas à reação de amonólise do éster isoxazolínico em C3. A reação foi realizada com THF como solvente e NH₄OH, com agitação vigorosa e após 18h o produto final **41** foi obtido, com rendimento quantitativo, após precipitação no meio reacional. (esquema 14)



Esquema 14: Reação de amonólise do éster isoxazolínico de **40a-c**

Todas as 3-carboxamidas-2-isoxazolininas azabíclicas **41a-c** foram devidamente identificadas por métodos espectrométricos de RMN ^{13}C , RMN de ^1H e IV.

A figura 13 apresenta representativamente a estrutura da amida **41a** com todos os sinais de RMN ^1H e RMN ^{13}C . Os sinais característicos do heterobícclo, aparecem em torno de 6 ppm em RMN de ^1H e 90 ppm em RMN de ^{13}C , respectivamente do hidrogênio e do carbono do metino (α ao átomo de nitrogênio) da junção dos anéis, que confirmam a presença de 2-isoxazolina azabíclica.

Nas figuras 14 e 15 são apresentados os espectros de RMN ^1H e RMN ^{13}C da molécula **41a**.

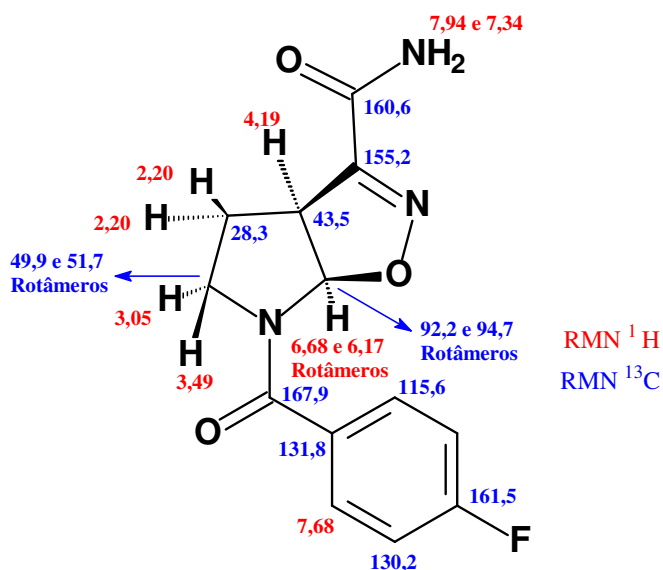


Figura 15: Dados espectroscópicos de **41a**. Deslocamento químico em ppm.

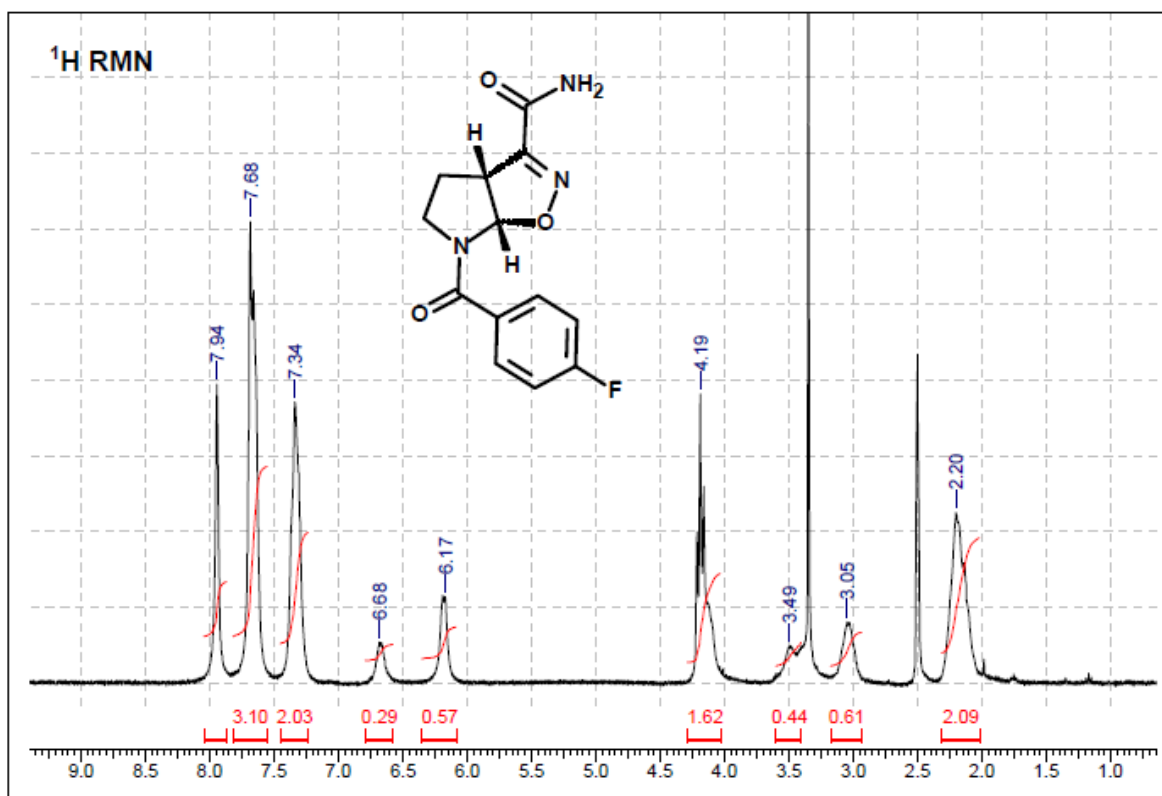


Figura 16: Espectro RMN ¹H da amida **41a**. 300 MHz. Solvente CDCl₃.

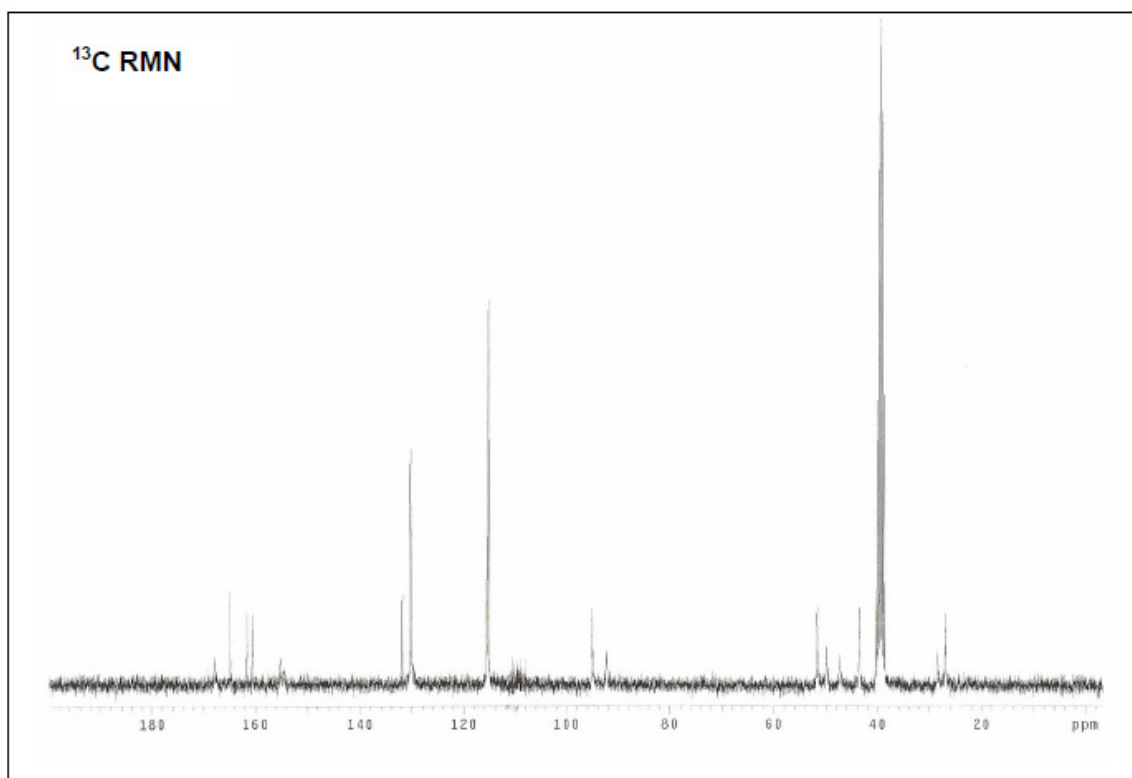


Figura 17: Espectro RMN ¹³C da amida **41a**. 75MHz. Solvente DMSO

Uma peculiaridade apresentada pelos cicloadutos derivados de enecarbamatos foi a presença de sinais de rotâmeros nos espectros de RMN ^1H e RMN ^{13}C .

Rotâmeros, ou confôrmeros rotacionais, são detectados em espectrometria de ressonância magnética nuclear, quando a velocidade da interconversão entre eles é baixa, devido à alta barreira energética rotacional. Este fenômeno é verificado quando se tem a presença de ligações amídicas ou carbamídicas, como nos nossos cicloadutos.

A rotação da ligação amídica/carbamídica passa necessariamente por um confôrmero planar, onde os orbitais “n” do átomo de nitrogênio e “ π ” da carbonila ficam coplanares e entram em ressonância, formando uma estrutura canônica, que confere um caráter de ligação dupla para o híbrido de ressonância, fazendo com que a barreira energética rotacional seja elevada (Figura 16). Tendo a frequência de giro baixa, a espectrometria de RMN detecta, portanto a presença de dois hidrogênios ou carbonos ^{13}C em ambientes químicos e magnéticos diferentes, aparecendo então dois sinais.

Pode-se observar ainda um dubleto em 165 ppm no espectro de RMN ^{13}C , referente ao acoplamento entre o ^{13}C e o F (J^1).

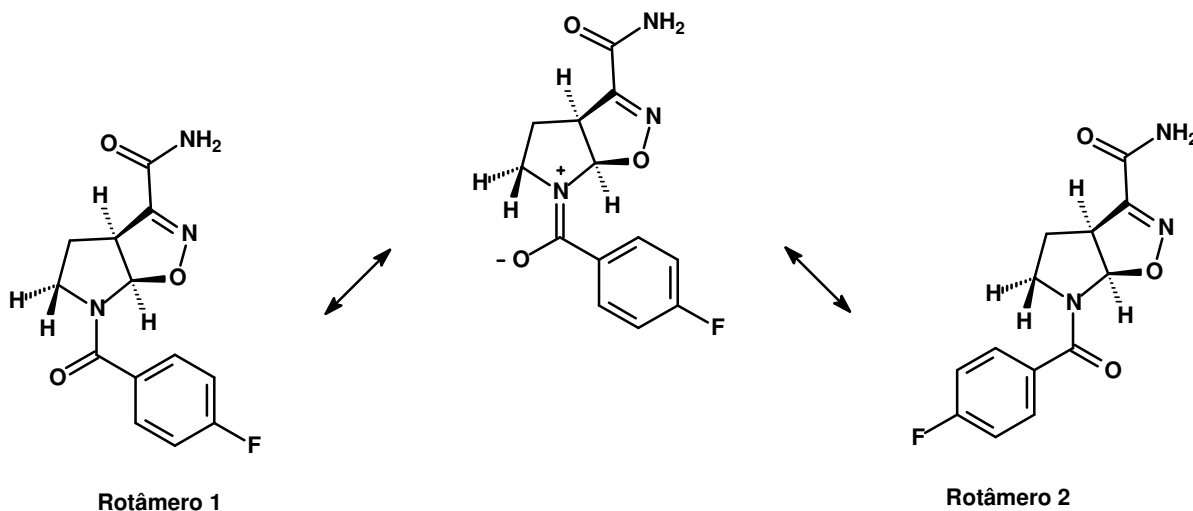


Figura 18: confôrmeros rotacionais de **41a**

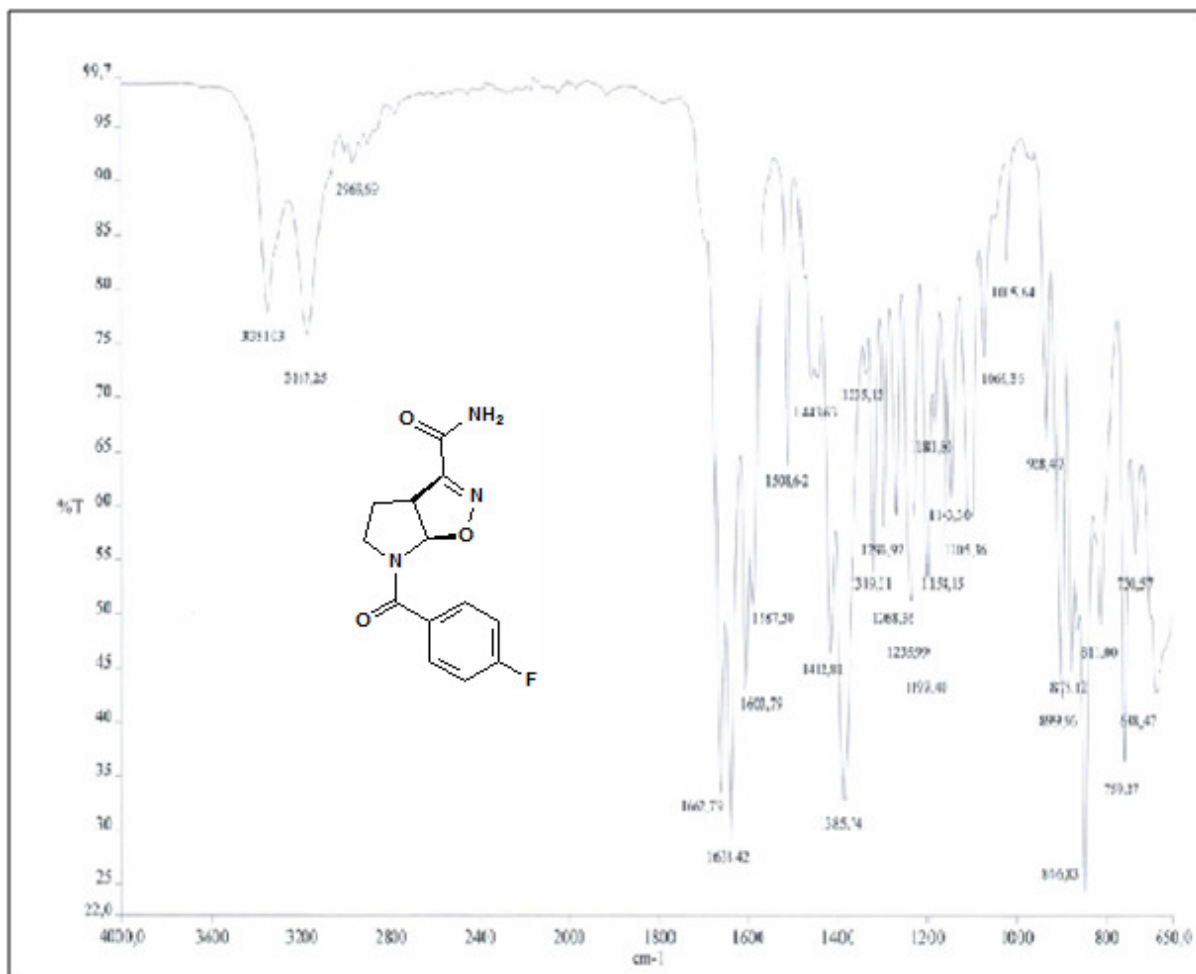


Figura 19: Espectro de infravermelho da amida **41a**

Pode-se observar no espectro de infravermelho de **41a** (Figura 17) a presença de bandas em 3351 cm^{-1} referente à deformação axial assimétrica de N-H, acoplado, amida primária, em ligação de hidrogênio. Já em 3167 cm^{-1} observa-se a banda referente à deformação axial simétrica.

Em moléculas que contem a função amida, encontram-se duas bandas características dessa função: banda de amida I e banda de amida II.⁵³ No espectro de IV de **41a** pode-se observar a presença de bandas em superposição: deformação axial de C=O (banda de amida I) 1662 cm^{-1} e deformação angular de N-H, (banda de amida II) em 1638 cm^{-1} .

Observa-se em 1385 cm^{-1} uma banda referente à deformação axial C-F de alta intensidade.

Deformação axial de C=N é observada na banda em 1587 cm^{-1} . Em 846 cm^{-1} podem-se observar vibrações de deformação angular fora do plano de C-H de aromáticos. Observa-se em 759 cm^{-1} banda referente à deformação angular simétrica fora do plano do grupo N-H. Por

fim, pode-se atribuir a banda larga em 688 cm^{-1} como sendo da deformação angular fora do plano de N-H.

A figura 18 apresenta a estrutura da amida **41b** com todos os sinais de RMN ^1H e RMN ^{13}C . Nas figuras 19 e 20 são apresentados os espectros de RMN ^1H e RMN ^{13}C da molécula **41b**. Podemos observar a existência dos rotâmeros que são característicos do biciclo.

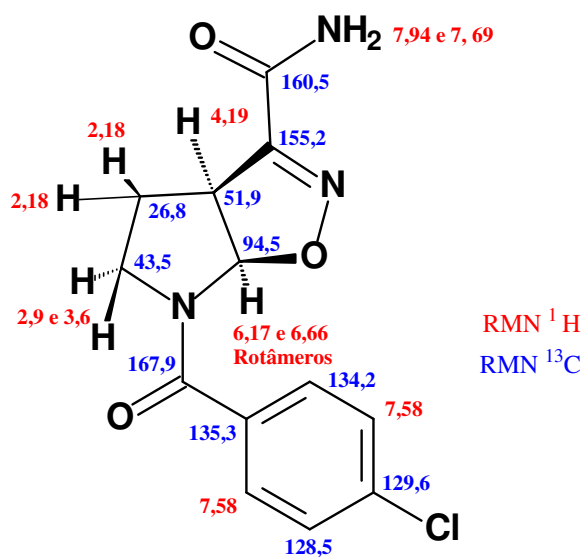
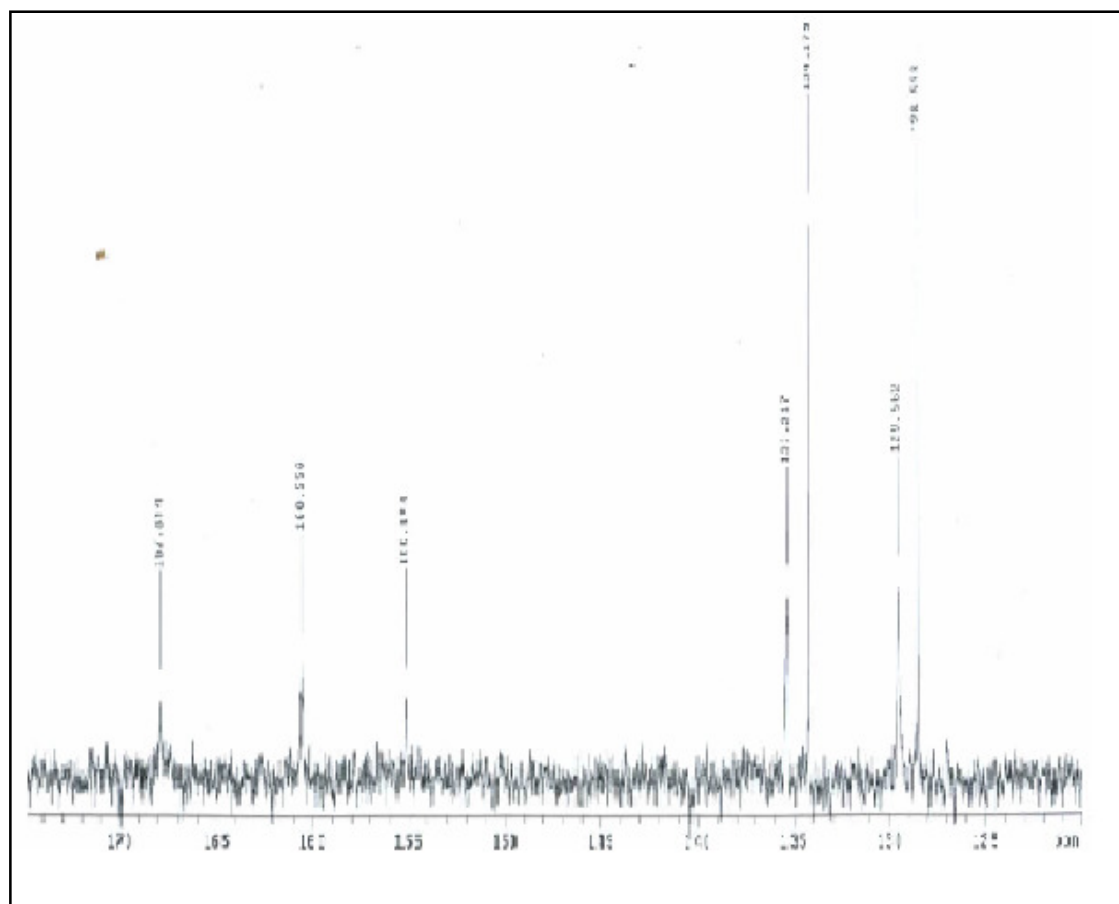


Figura 20: Dados espectroscópicos de **41b**. Deslocamento químico em ppm.



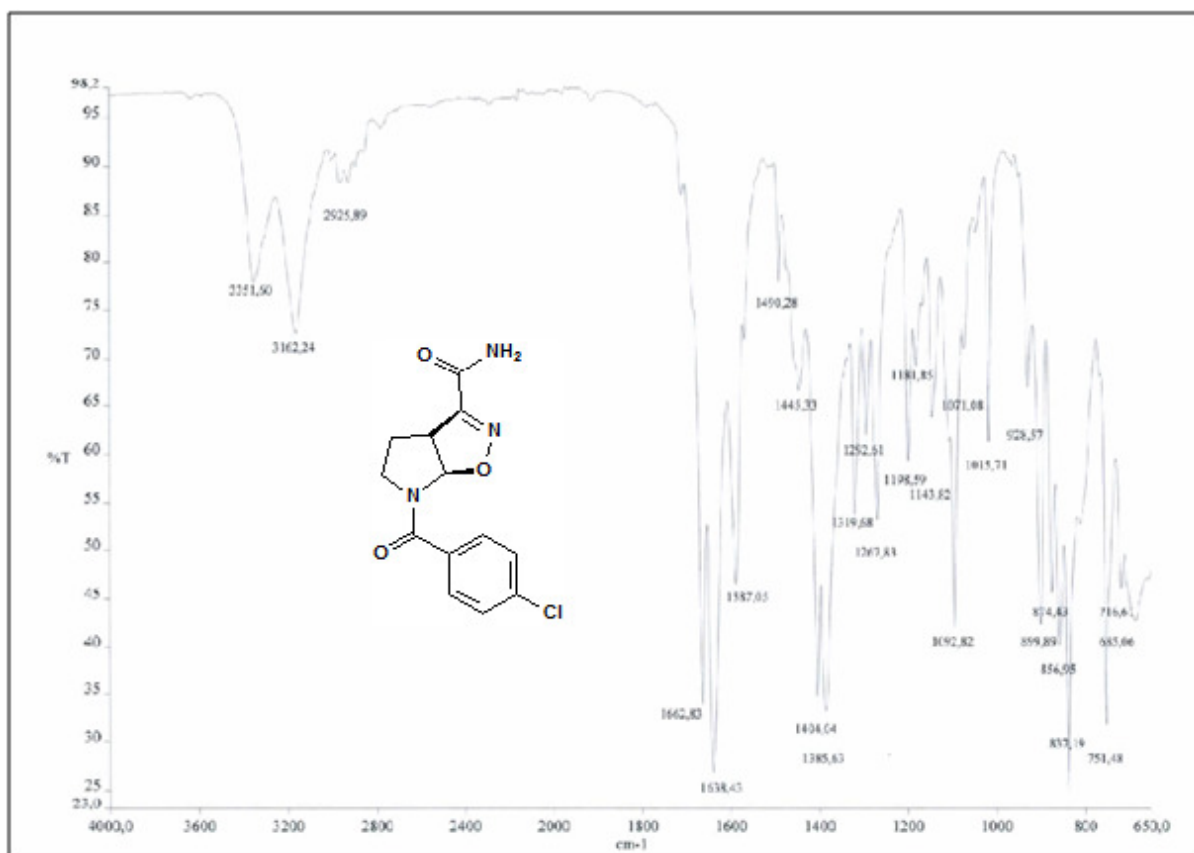


Figura 23: Espectro de infravermelho da amida **41b**

A figura 22 apresenta a estrutura da amida **41c** com todos os sinais de RMN ^1H . Nas figuras 23 e 24 são apresentados os espectros de RMN ^1H e IV da molécula **41c**.

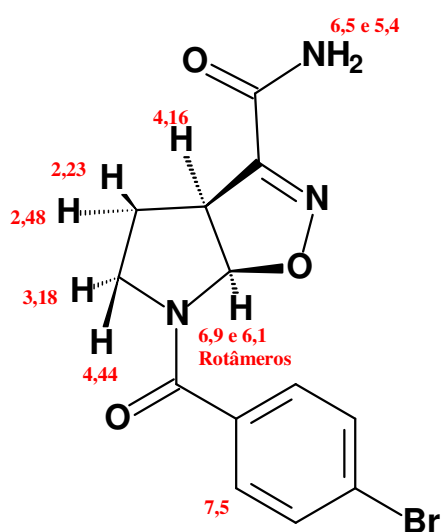


Figura 24: Dados espectroscópicos de **41c**. Deslocamento químico em ppm.

Chemical structure of 4-bromo-N-(4-oxo-4,5-dihydroisoxazol-2-yl)benzamide is shown as an inset in the IR spectrum.

Key IR peaks (cm⁻¹):

- 3379.91
- 3168.38
- 2889.52
- 1685.03
- 1637.70
- 1586.88
- 1507.71
- 1460.56
- 1409.97
- 1392.99
- 1327.75
- 1322.15
- 1312.34
- 1286.29
- 1268.24
- 1222.15
- 1192.69
- 1183.80
- 1165.00
- 1105.00
- 1068.06
- 1042.87
- 1015.23
- 983.15
- 951.23
- 924.35
- 916.12
- 897.28
- 881.58
- 850.97
- 815.84
- 749.84
- 731.50

Figura 26: Espectro de infravermelho da amida **41c**

Pode-se notar observando a figura 25, a correlação nos espectros de infravermelho das amidas isoxazolínicas **41a-c** uma vez que, a única mudança na estrutura dos 3 compostos é o halogênio em *para* no anel benzênico.

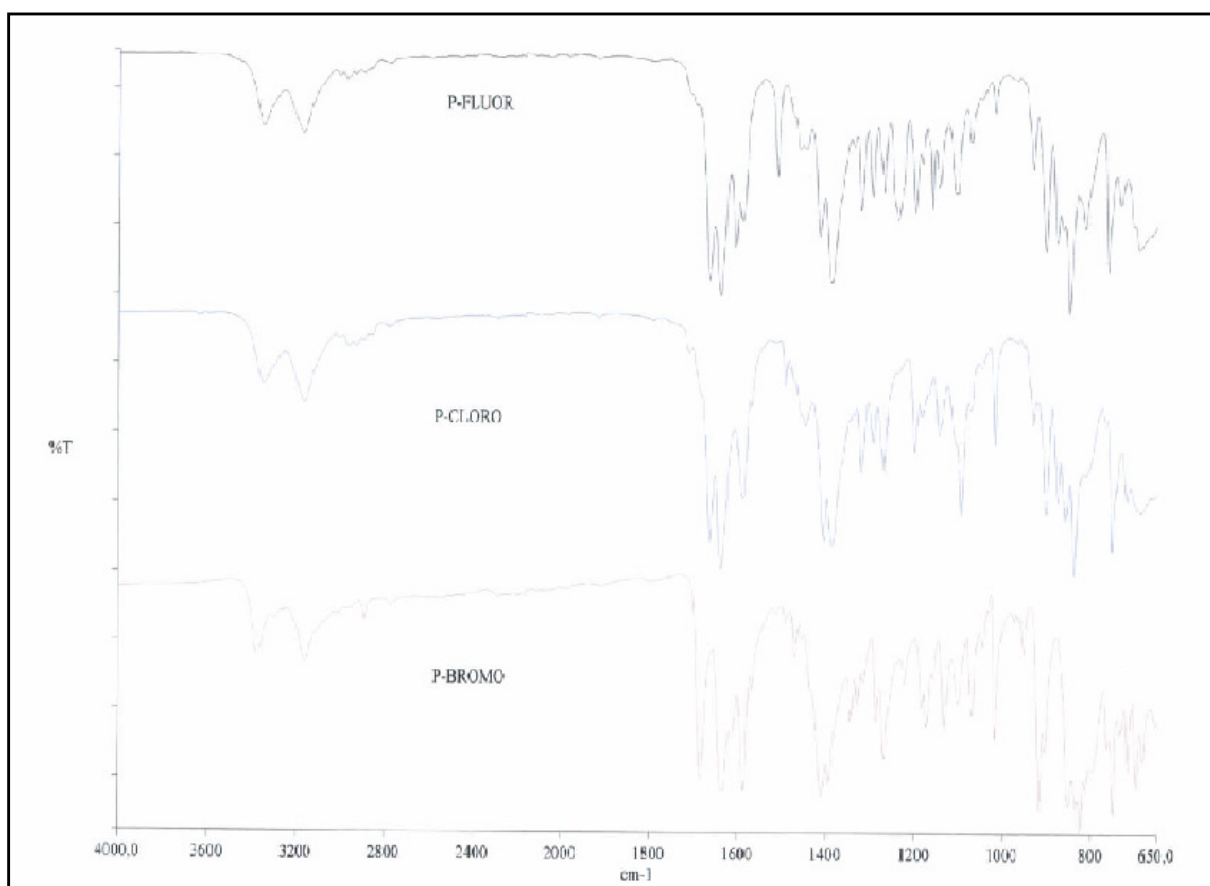
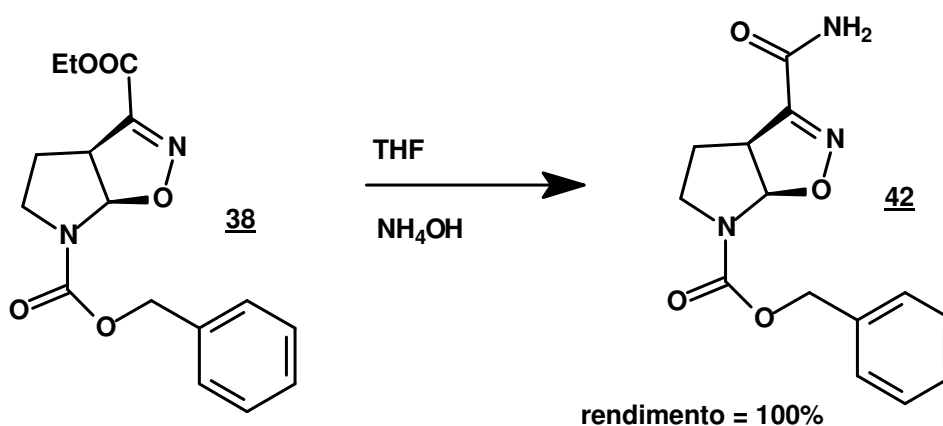


Figura 27: Espectro de infravermelho das amidas **41a-c**

5.8 Reação de amonólise do éster isoxazolínico de 38

O cicloaduto isoxazolínico 38, foi submetido à reação de amonólise do éster isoxazolínico em C3. A reação foi realizada tendo THF como solvente e NH_4OH aquoso concentrado como base, sob agitação. Após 18 horas, o produto 42 foi obtido com rendimento quantitativo (esquema 15).



Esquema 15: Reação de amonólise do éster isoxazolínico de 38

A amostra foi enviada para análise biológica para ser feita uma comparação com os grupos substituintes inseridos, cloretos de benzoila *para* substituídos, no biciclo isoxazolínico com o grupo protetor utilizado Cbz.

A molécula foi devidamente identificada por RMN ^1H , RMN ^{13}C e IV, como mostram os espectros das figuras 27, 28 e 29, respectivamente. Os seus deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C em ppm, estão representados na figura 26.

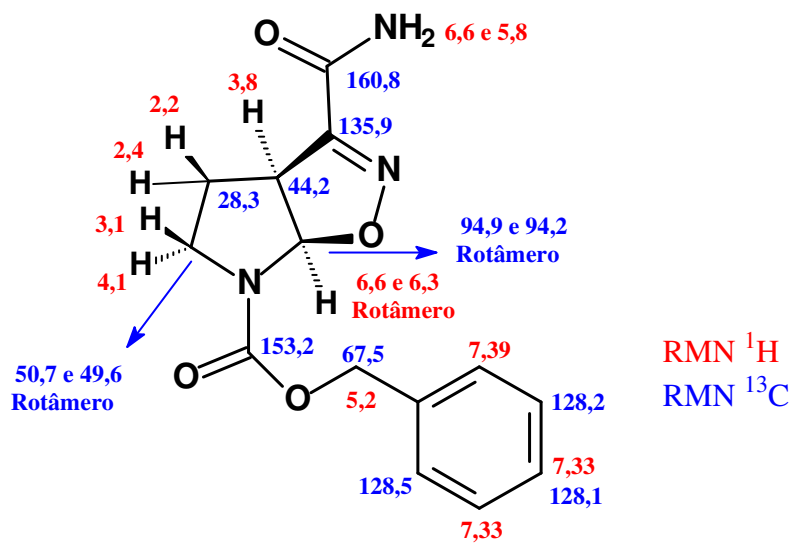


Figura 28: Dados espectroscópicos de **42**. Deslocamento químico em ppm.

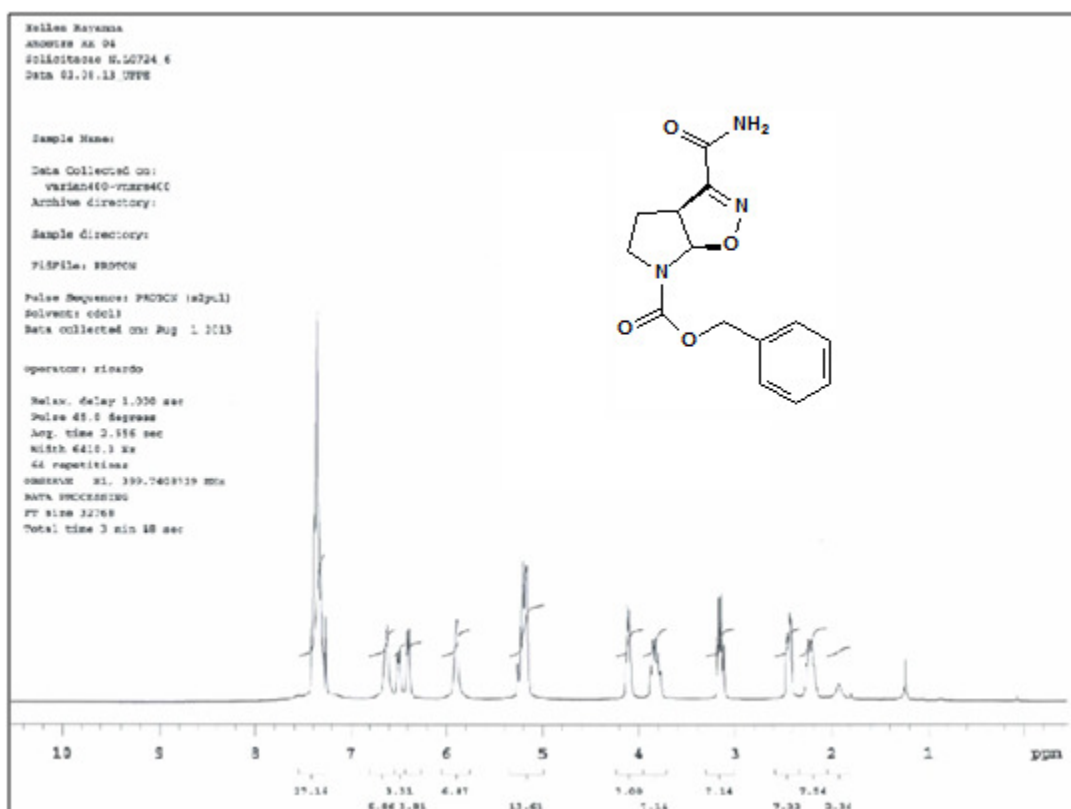


Figura 29: Espectro RMN ^1H de **42**. 300 MHz. Solvente CDCl_3 .

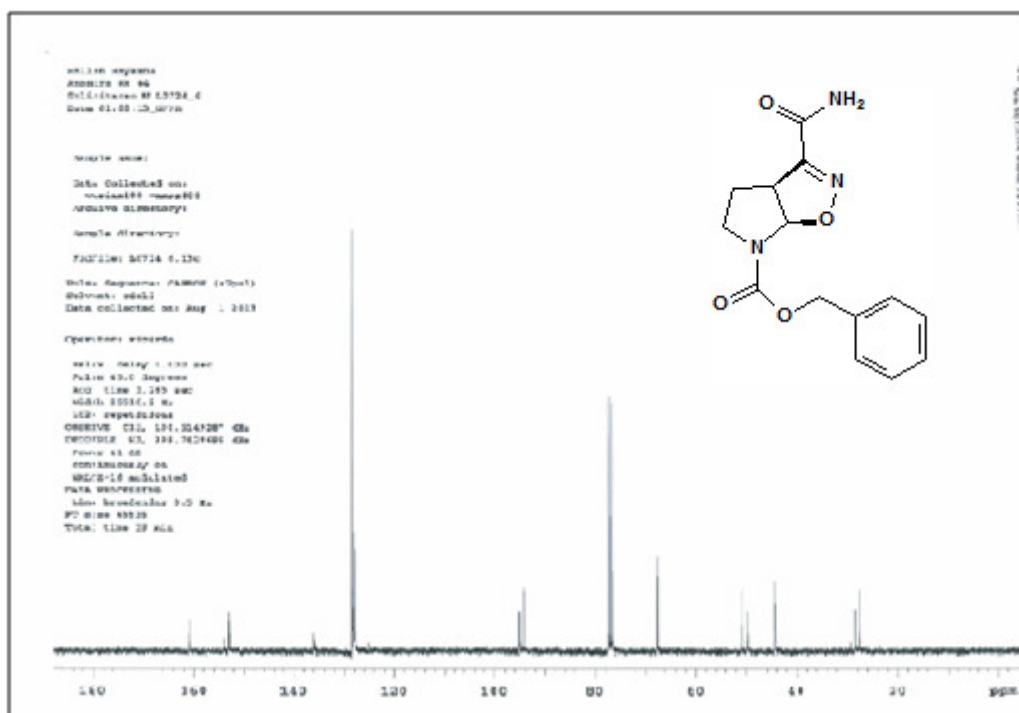


Figura 30: Espectro RMN ¹³C da amida 42. 75 MHZ. Solvente CDCl₃.

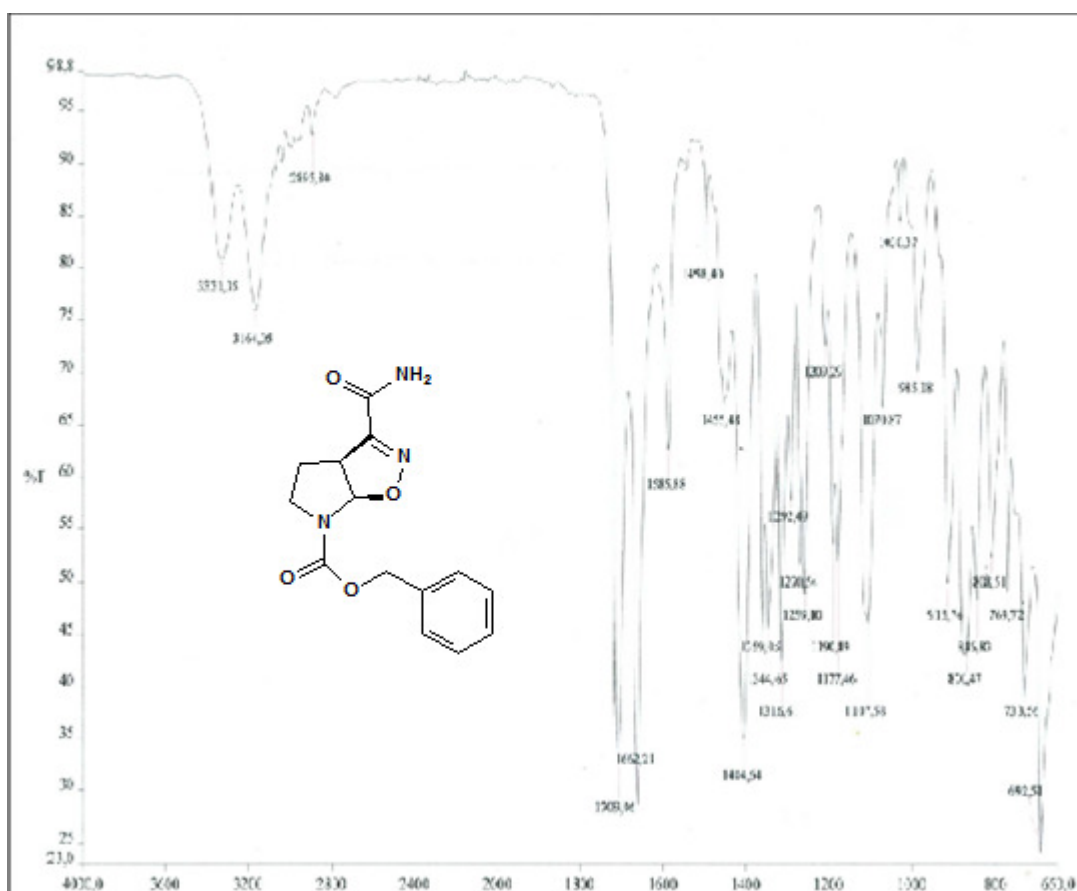
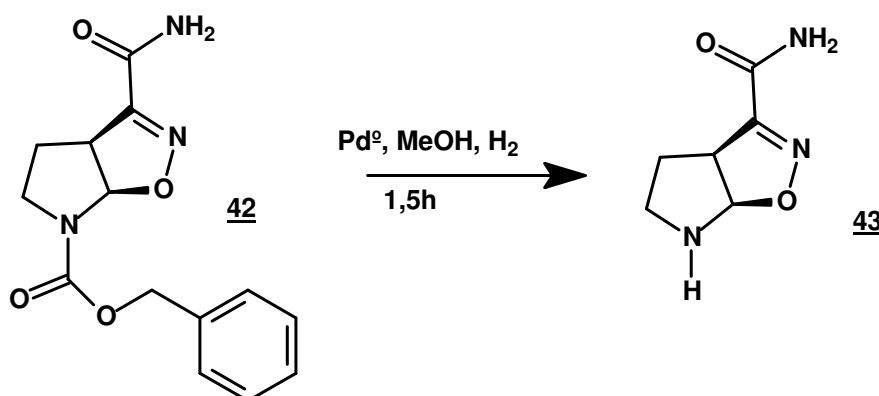


Figura 31: Espectro de infravermelho da amida 42

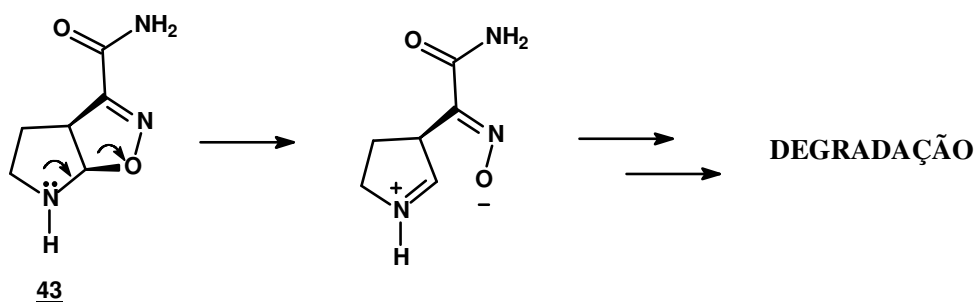
5.9 Reação de desproteção do nitrogênio pirrolidínico de 42

A reação de hidrogenólise do grupamento CBz do heterobícclo 42, catalisada por Pd⁰/C (esquema 16), apresenta rendimento quantitativo. A formação da amina livre propiciou a obtenção do produto 3-carboxamida-2-isoxazolina azabícclica com o nitrogênio livre, sem o grupamento benzoila *p*-substituído 43.



Esquema 16: Reação de desproteção do nitrogênio pirrolidínico de 42

Não foi possível obter os dados espectrométricos do produto 3-carboxamida-2-isoxazolina azabícclica com o nitrogênio livre 43. Provavelmente o produto, como já aconteceu com o núcleo isoxazoliníco de 6 membros ⁴⁶, não é estável quando solubilizado, devido a uma possível degradação (Esquema 17). Porém, quando na forma de pó, a CCD acusa apenas um único produto, sem degradação. Dessa forma, uma alternativa seria obter o sal, cloridrato, do produto 43. Contudo, não foi possível a síntese do sal a tempo de ser discutida neste trabalho.



Esquema 17: Degradação do produto 43 possivelmente devido à abertura do anel isoxazoliníco.

6 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

6.1 Materiais e Métodos:

As reações de síntese de enecarbamatos endocíclicos de 5 membros e também as reações de cicloadição 1,3-dipolar 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.

Clorofórmio foi seco sobre cloreto de cálcio anidro. Tetraidrofurano (THF) foi tratado com sódio/benzofenona e destilado imediatamente antes do uso. Acetato de etila e 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, seguido de aquecimento ou por absorção de iodo.

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

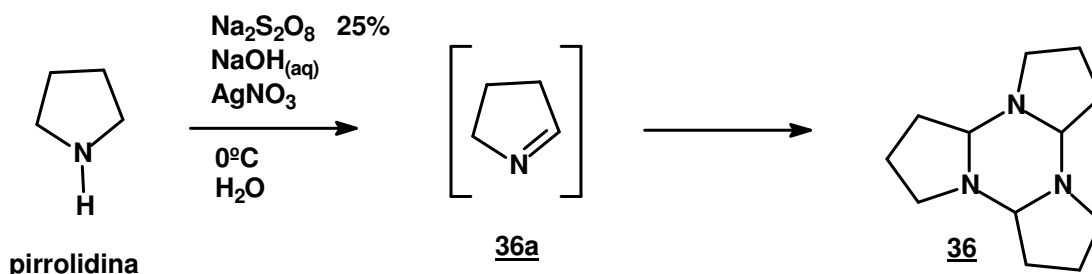
Os produtos sólidos tiveram seu ponto de fusão aferidos em aparelho FISATOM 431D, e não foram corrigidos.

O aparelho de ultra-som utilizado foi Unique® modelo USC 1400A com frequência de 40 KHz.

Os espectros no infravermelho (IV-FT) foram obtidos em aparelhos PerkinElmer® (Spectrum 400), com dispositivo de reflectância total atenuada (ATR) com cristal de selênio.

Os espectros RMN de ^1H , e RMN ^{13}C foram obtidos em aparelhos Varian Unity 300 MHz. Os deslocamentos químicos (δ) 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 = triplete, tl = triplete largo, q = quarteto, dd = duplo dubleto, dt = duplo triplete, ddl = duplo dubleto largo, m = multiplete, ml = multiplete largo, sl = sinal largo), constante de acoplamento (Hz) e números de hidrogênios.

6.2 Síntese do trímero da 1-pirrolina **36**



Uma solução aquosa de hidróxido de sódio (5,74 g; 144,0 mmol) foi preparada, e à temperatura de 0°C, sob vigorosa agitação, adicionou-se a pirrolidina (5,8 mL; 72,0 mmol), e nitrato de prata (59,0 mg; 0,33 mmol), em um total de 70,0 mL de água. Por fim, uma solução 25% de persulfato de sódio (6,91 g; 72,0 mmol; 67,0 mL) foi adicionada lentamente ao sistema pré-reacional, o qual permaneceu em agitação por uma hora a 0°C e por mais três horas à temperatura ambiente.

A solução escura resultante foi extraída com diclorometano (4 x 30,0 mL). Secou-se a fase orgânica sobre sulfato de sódio anidro e após remoção do solvente obteve-se 4,13 g de um líquido amarelado viscoso, correspondendo a um rendimento de 60 % do trímero **36**.

O trímero **36** é utilizado, o mais rápido possível, sem qualquer purificação adicional, na preparação do enecarbamato *N*-(benziloxicarbonil)-2-pirrolina, devido a sua instabilidade.

Propriedades Físicas de **36**

- Óleo amarelo viscoso;
- Sensível a solventes próticos.

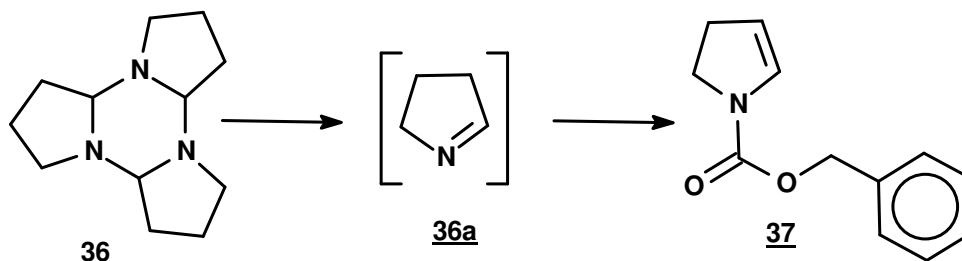
DADOS ESPECTROMÉTRICOS

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

(parte do monômero está presente, devido ao equilíbrio).

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

6.3 *N*-(benziloxycarbonil)-2-pirrolina 37



No aparelho de ultra-som deixou-se o trímico 36 (1,5g; 7,26 mmol) com 70 mL de THF durante 30 minutos à 60° C, depois adicionou-se TEA (2 mL; 14,34 mmol) e foi deixado no ultra-som por mais 30 minutos a 60° C. Foi adicionado lentamente (aproximadamente 30 minutos), com o auxílio de uma seringa, o cloroformato de benzila (2,5 mL; 7,42 mmol). Desligou-se o aquecimento e a reação foi deixada por mais 1 hora no ultra-som.

A suspensão 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 hexano e acetato, AcOEt/hexano 1:9. Obteve-se 0,56g de um líquido incolor correspondendo a um rendimento de 40% do enecarbamato 37.

Propriedades Físicas de 37

- Óleo incolor
- R_f = 0,26 (AcOEt/hexano 1: 9)

DADOS ESPECTROMÉTRICOS

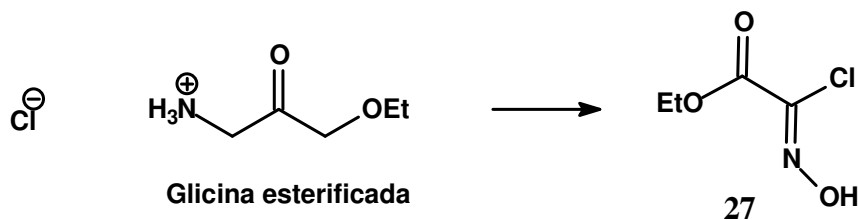
RMN de ¹H (CDCl₃, δ, ppm, 300 MHz, t.a.), presença de rotâmeros.

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

I.V. (cm⁻¹), principais sinais.

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

6.4 Clorooximidoacetato de etila 27



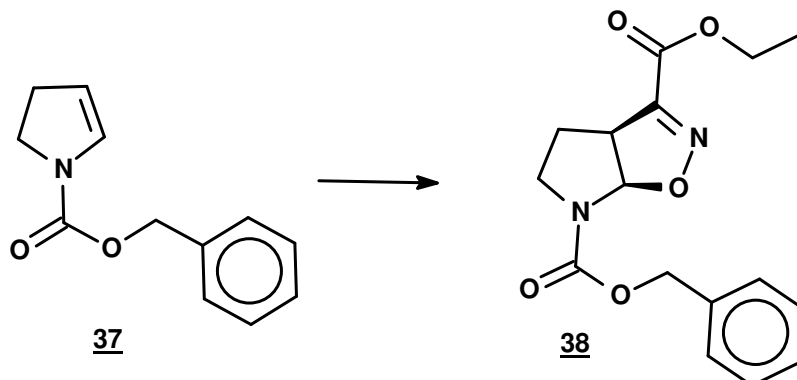
Em um balão de 250 mL foi adicionado o cloridrato do éster etílico da glicina (10,20 g; 73,0 mmol), água destilada (15,0 mL); e ácido clorídrico concentrado (6,3 mL; 73,0 mmol). Em seguida resfriou-se essa solução em banho de gelo/ NH_4Cl . Sob forte agitação e mantendo-se a temperatura do banho nunca acima de 0°C , adicionou-se lentamente, via funil de adição, a solução de nitrito de sódio (5,1 g; 73,0 mmol; 9,0 mL de água). Ao término desta adição repetiu-se o processo, adicionando-se mais um equivalente de HCl concentrado e de nitrito de sódio. Deixou-se a solução resultante em agitação por mais 15 min à mesma temperatura. Em seguida o produto foi extraído com clorofórmio (4 x 40,0 mL) e seco sob sulfato de sódio anidro.

Após remoção do solvente, seguido de adição de hexano, ocorreu intensa precipitação de cristais brancos, onde esses foram lavados com hexano e secos sob vácuo. Obteve-se 5,0 g do produto identificado como 27, correspondendo a um rendimento de 45 %.

Propriedades Físicas de 27

- Ponto de Fusão 80°C , conforme literatura.

6.5 Éster 6-benzil-3-etil do ácido 3a,4,5,6a-tetrahidropirrólo [3,2-d]isoxazol-3,6-dicarboxílico **38**



Em um balão, acoplado a um funil de adição com equalizador de pressão e contendo um agitador magnético, foi adicionado o enecarbamato **37** (0,56g ; 2,75 mmol) e clorofórmio seco (9 mL). Em seguida, adicionou-se a trietilamina (1,3 mL; 9,32 mmol). A este sistema, sob forte agitação, adicionou-se lentamente gota a gota, a solução clorofórmica de clorooximidoacetato de etila **27**, precursor do dipolo **28**, (1 g; 6,62 mmol) em 12 ml de clorofórmio seco. A reação foi acompanhada através de CCD, onde se percebeu a formação do produto, cicloaduto **38**, desde o início da adição do precursor **27** do *N*-óxido de nitrila.

Após 30 minutos do término da adição do precursor, observou-se através de CCD o total consumo do material de partida; removeu-se o solvente. O sal formado, cloreto de trietilamônio, foi filtrado em funil sinterizado, utilizando-se 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/Hexano 2:3), obtendo-se 0,6 g do cicloaduto **38**, correspondendo a um rendimento de 70%.

Propriedades Físicas de **38**

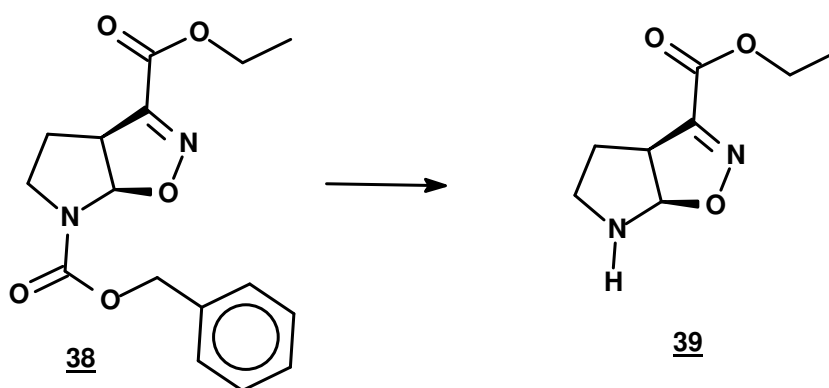
- Óleo amarelo claro viscoso.
- R_f = 0,47 (AcOEt/hexano 1:1)

DADOS ESPECTROMÉTRICOS

RMN de ^1H (CDCl_3 , 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).

6.6 Éster etílico do ácido 3a,4,5,6,6a-tetrahidropirroló[3,2-d]isoxazol-3-carboxílico 39



Dissolveu-se o cicloaduto 38 (0,6 g; 3,26 mmol) em metanol P.A. (80 mL). Em seguida, adicionou-se o paládio/carbono 10% (50 mg) à mistura reacional e sob agitação vigorosa, borbulhou-se o gás hidrogênio durante uma hora e meia, quando por CCD acusou o fim da reação.

Promoveu-se uma filtração a vácuo, sobre camada de celite e após remoção do solvente, obteve-se a isoxazolina *N*-desprotegida 39 pura, correspondendo a um rendimento quantitativo. O composto 39 foi utilizado nas reações subseqüentes sem necessidade de submetê-lo a qualquer procedimento de purificação.

Propriedades Físicas de 39

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

DADOS ESPECTROMÉTRICOS

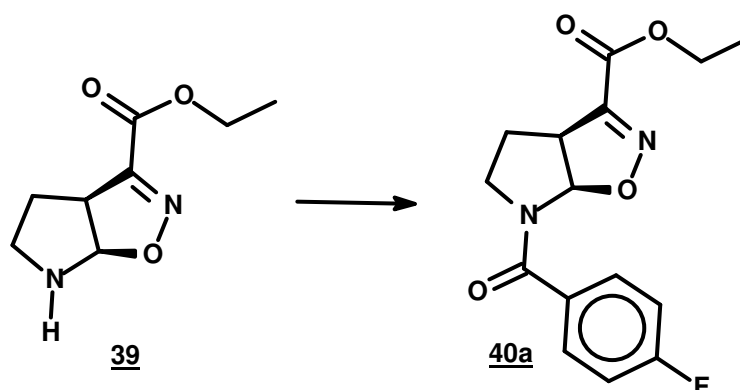
RMN de ^1H (CDCl_3 , δ , ppm, 300 MHz, t.a.).

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

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

160,5 (C); 152,3 (C); 100,8 (CH); 61,9 (CH_2); 49,1 (CH_2); 42,8 (CH); 29,9 (CH_2); 14,0 (CH_3).

6.7 Éster etílico do ácido 6-(4-fluorobenzoil)-4,5,6a tetrahidro-3ah-pirrólo[3,2-d]isoxazol-3-carboxílico 40a



Em um balão foram solubilizados em clorofórmio (60 mL) a isoxazolina *N*-desprotegida 39 (0,55 g; 2,98 mmol) e trietilamina seca (0,7 mL; 5,7 mmol). Sob vigorosa agitação, adicionou-se cloreto de 4-fluorobenzoíla (0,7 mL; 5,9 mmol), solubilizado em 3 mL de clorofórmio, lentamente durante 30 minutos, sob atmosfera de argônio. A reação foi deixada sob agitação, à temperatura ambiente, por mais uma hora adicional, quando a CCD acusou total consumo de 39.

Após remoção do solvente, promoveu-se uma extração com 10 mL de acetato de etila para dissolver o produto reacional, seguida de 5 mL de água destilada e mais 4 x 10 mL de acetato de etila. A solução foi seca sobre sulfato de sódio anidro e após remoção do solvente obteve-se o produto bruto.

O produto foi purificado através de cromatografia em coluna “flash” (gel de sílica, AcOEt/Hexano 3:7), obtendo-se 0,78 g do cicloaduto **40a**, correspondendo a um rendimento de 86%.

Propriedades Físicas de **44a**

- Óleo pouco viscoso amarelado
- R_f = 0,39 (AcOEt/hexano 1:1)

DADOS ESPECTROMÉTRICOS

RMN de ¹H (CDCl₃, 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).

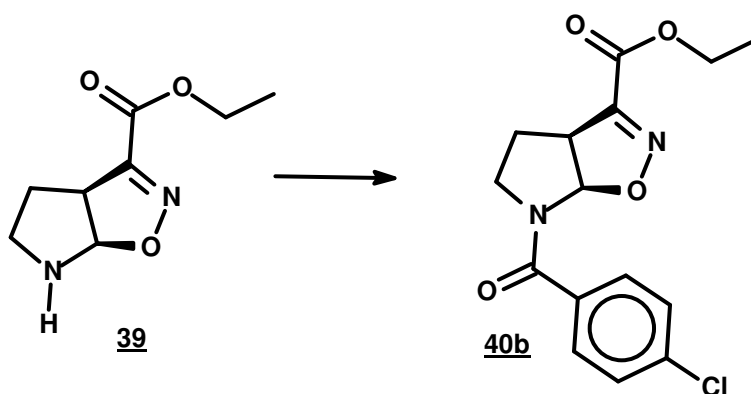
RMN de ¹³C (CDCl₃, δ, ppm, 75 MHz, t.a.)

14,08 (CH₃); 27,95 (CH₂); 43,53 (CH₂); 51,19 (CH); 62,4 (CH₂); 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 (cm⁻¹), principais sinais.

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

6.8 Éster etílico do ácido 6-(4-clorobenzoil)-4,5,6,6a-tetrahidro-3ah-pirrolo[3,2-d]isoxazol-3-carboxílico **40b**



Procedimento experimental idêntico ao item 6.7.

Isoxazolina *N*-desprotegida **39** (0,3 g; 1,62 mmol), trietilamina seca (0,4 mL; 2,94 mmol), clorofórmio seco (35 mL) e cloreto de 4-clorobenzoila (0,2 mL; 1,62 mmoles).

Uma extração com acetato de etila, seguida de uma cromatografia em coluna “flash” (gel de sílica AcOEt/hexano 3:7), forneceu 0,47 g do cicloaduto **40b**, correspondendo a um rendimento de 95 %.

Propriedades Físicas de **40b**

- Óleo pouco viscoso amarelado.
- $R_f = 0,38$ (AcOEt/hexano 1:1).

DADOS ESPECTROMÉTRICOS

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

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

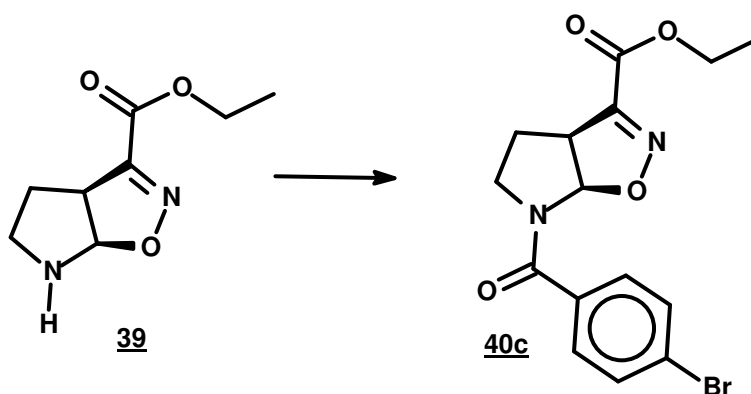
RMN de ^{13}C (CDCl_3 , δ , ppm, 75 MHz, t.a.)

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

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

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

6.9 Éster etílico do ácido 6-(4-bromobenzoil)-4,5,6a tetrahidro-3ah-pirrolo[3,2-d]isoxazol-3-carboxílico **40c**



Procedimento experimental idêntico ao item 6.7.

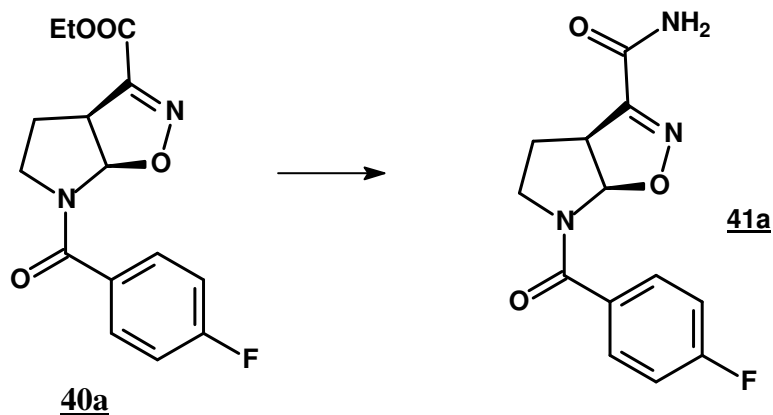
Isoxazolina *N*-desprotegida **39** (0,5 g; 2,71 mmol), trietilamina seca (0,5 mL; 3 mmol), clorofórmio seco (40 mL) e cloreto de 4-clorobenzoila (0,6 mL; 2,71 mmoles).

Uma extração com acetato de etila, seguida de uma cromatografia em coluna “flash” (gel de sílica AcOEt/hexano 3:7), forneceu 0,89 g do cicloaduto **40c**, correspondendo a um rendimento de 90 %.

Propriedades Físicas de 40c

- Óleo pouco viscoso amarelado.
- R_f = 0,38 (AcOEt/hexano 1:1).

6.10 Amida do ácido 6-(4-fluorobenzoil)-4,5,6a tetrahidro-3ah-pirrolo[3,2-d]isoxazol-3-carboxílico 41a



1,48g (0,45 mmol) do éster **40a** foram solubilizados em 210 mL de THF e 71 mL de NH₄OH concentrado (25%). A reação permaneceu sob forte agitação durante 18h, quando o consumo total de **40a** foi evidenciado por CCD.

Após remoção do THF, ocorreu precipitação da amida, que é insolúvel em água. Filtrou-se o produto sob vácuo. O sólido retido no funil sinterizado foi solubilizado em

clorofórmio e seco com sulfato de sódio anidro. Removeu-se o solvente e obteve-se 0,87g da amida **41a** correspondendo a um rendimento de 66%.

Propriedades Físicas de 41a

- Pó amorfo branco.
- $R_f = 0,26$ (AcOEt/hexano 6:4).
- Faixa de fusão: 222 - 224° C

DADOS ESPECTROMÉTRICOS

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

2,2(ml;2H); 3,05 - 3,49(m; 2H;); 4,19(tl,1H); 6,17 e 6,68 (sl; 1H; rotâmeros); 7,34(sl; H); 7,68(s; 4H); 7,94(s,1H).

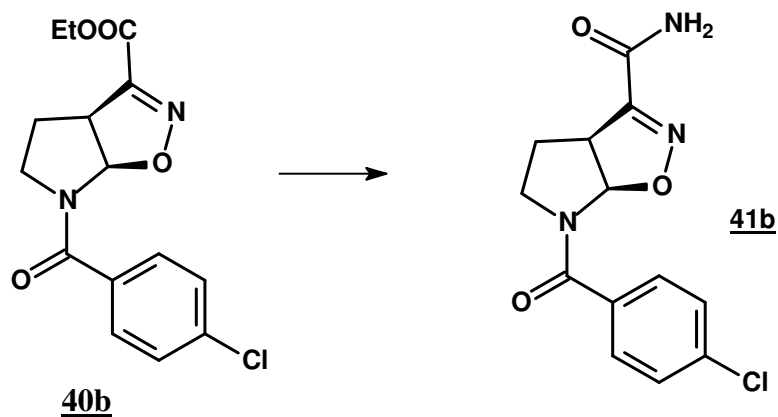
RMN de ^{13}C (CDCl_3 , δ , ppm, 75 MHz, t.a.)

26,9 e 28,3 (CH_2); 43,5 e 47,5 (CH , rotâmeros); 49,9 e 51,7 (CH ; rotâmeros); 92,2 e 94,7 (CH ; rotâmeros); 115,3 e 115,6 (CH , $d, {}^2J = 21,5$ HZ); 130,2 (CH); 131,8 (C); 155,2($\text{C}=\text{N}$); 160,6 ($\text{C}=\text{O}$); 161,5 e 164,8 (C, d, $1J = 246$ HZ); 167,9 ($\text{C}=\text{O}$).

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

3351, 3167, 2969, 1662, 1638, 1412 1385, 846, 759, 688.

6.11 Amida do ácido 6-(4-clorobenzoil)-4,5,6,6a-tetrahidro-3ah-pirrólo[3,2-d]isoxazol-3-carboxílico 41b



Procedimento experimental idêntico ao item 6.10

Cicloaduto *p*-cloro **40b** (0,56g; 0,18 mmol), 80 mL de THF e 27 mL de NH₄OH concentrado .

Removeu-se o solvente o obteve-se 0,42g da amida **41b** correspondendo a um rendimento de 85%.

Propriedades Físicas de 41b

- Pó amorfo branco.
- R_f = 0,26 (AcOEt/hexano 6:4).
- Faixa de fusão: 234 - 236° C

DADOS ESPECTROMÉTRICOS

RMN de ¹H (CDCl₃, δ, ppm, 300 MHz, t.a.) presença de rotâmeros.

2,18 (ml; 2H); 2,9 – 3,6 (m; 2H); 4,19 (tl, 1H); 6,17 (d; J= 7,2 Hz; 1H; rotâmero em 6,66); 7.58 (sl; 4H); 7,69 (s, 1H); 7.94 (s, 1H).

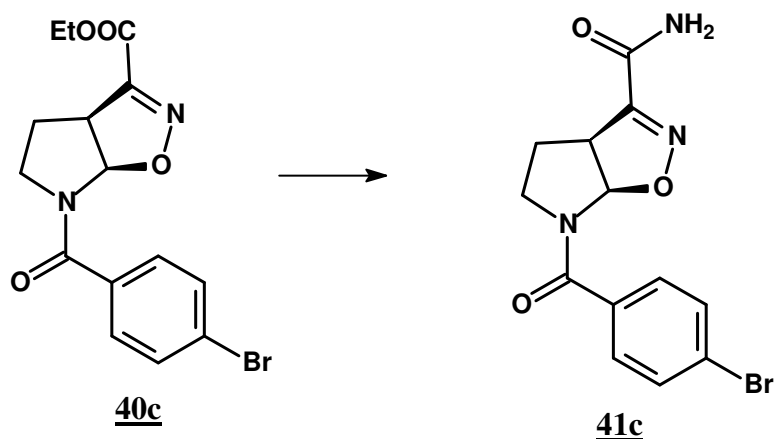
RMN de ¹³C (CDCl₃, δ, ppm, 75 MHz, t.a.)

26,8 (CH₂); 43,5 (CH₂); 51,9 (CH); 94,5 (CH); 128,5 (CH); 129,6 (CH); 134,2 (CH); 135,3 (C); 152,2 (C); 160,5 (C=O); 167,9 (C=O).

I.V. - FT (cm⁻¹), principais sinais.

3351, 3162, 2925, 1662, 1638, 1404, 1385, 837, 751, 685.

6.12 Amida do ácido 6-(4-bromobenzoil)-4,5,6a tetrahidro-3ah-pirrólo[3,2-d]isoxazol-3-carboxílico **41c**



Procedimento experimental idêntico ao item 6.10

Cicloaduto *p*-bromo **40c** (0,89g; 0,27 mmol), 126 mL de THF e 43 mL de NH₄OH concentrado .

Removeu-se o solvente o obteve-se 0,364g da amida **41c** correspondendo a um rendimento de 45,5%.

Propriedades Físicas de **41c**

- Pó amorfo branco.
- R_f = 0,26 (AcOEt/hexano 6:4).
- Faixa de fusão: 239 - 241° C

DADOS ESPECTROMÉTRICOS

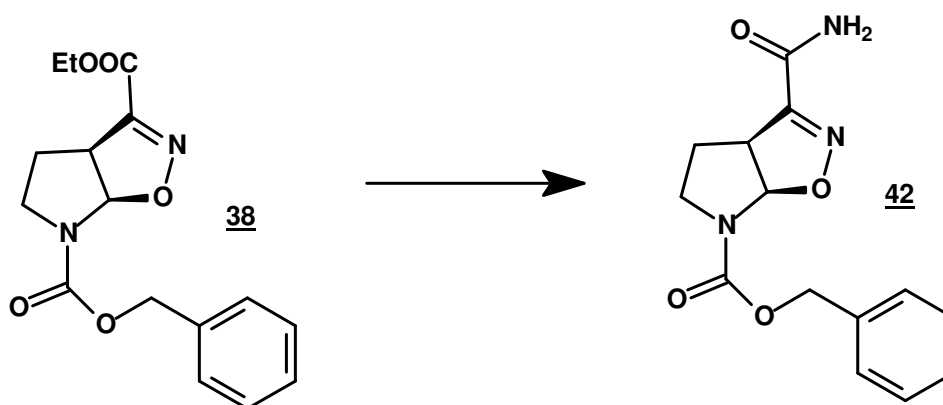
RMN de ¹H (CDCl₃, δ, ppm, 300 MHz, t.a.) presença de rotâmeros.

2,23 (ml; 1H); 2,48 (ml; 1H); 3,18 (ml; 1H); 4,44 (ml; 1H); 4,16 (tl, 1H) 5,46 - 6,5 (sl; 2H); 6,16 e 6,9 (sl; 1H; rotâmeros); 7,59 (sl; 4H).

I.V. - FT (cm⁻¹), principais sinais.

3379, 3161, 2889, 1685, 1637, 1409, 1392, 824, 749.

6.13 Amida do ácido 3a,4,5,6a-tetrahidropirrólo [3,2-d]isoxazol-3,6-dicarboxílico **42**



Procedimento experimental idêntico ao item 6.10

Cicloaduto-Cbz **38c** (1,58g; 0,502 mmol), 220 mL de THF e 77 mL de NH_4OH concentrado.

Removeu-se o solvente e obteve-se 0,705g da amida **42** correspondendo a um rendimento de 50%.

Propriedades Físicas de **42**

- Pó amorfo branco.
- $R_f = 0,25$ (AcOEt/hexano 7:3).
- Faixa de fusão: 160 - 163° C

DADOS ESPECTROMÉTRICOS

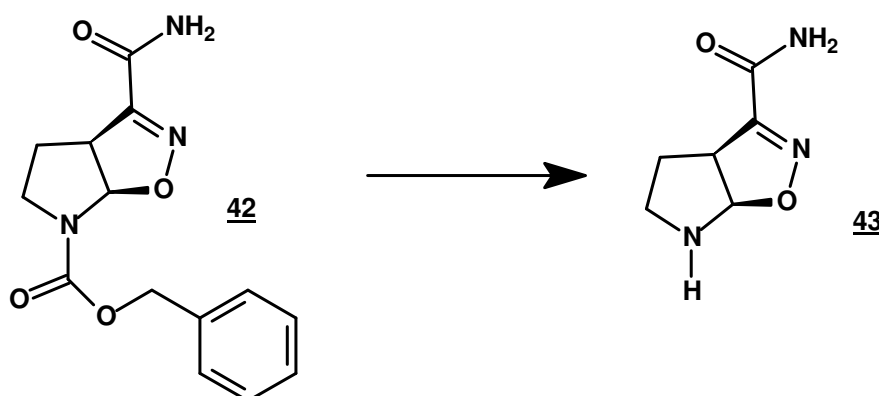
RMN de ^1H (CDCl_3 , δ , ppm, 300 MHz, t.a.) presença de rotâmeros.

7,39 (sl; 2H); 7,33 (sl; 3H); 6,6 e 6,3 (sl, 1H; rotâmeros); 6,6 - 5,8 (sl, 2H); 5,2 (ml, 2H); 4,1 (m; 1H); 3,8 (tl; 1H); 3,1 (m; 1H); 2,4 (m; 1H); 2,2 (m; 1H).

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

160,8 (C=O); 153,2 (C=O); 135,9 (C); 128,5 (CH); 128,2 (CH); 128,1 (CH); 94,9 e 94,2 (CH, rotâmeros); 67,5 (CH_2); 50,7 e 49,6 (CH_2 , rotâmeros); 44,2 (CH); 28,3 (CH_2)

6.14 Amida do (3a, 6a)-4,5,6,6a-tetrahidro-3aH-pirrólo[3,2-d]isoxazol-e-carboxamida **43**



Procedimento experimental idêntico ao item 6.6.

Amida-Cbz **42** (0,61g, 0,176 mmol), 50 mL de metanol e 0,03g de paládio/carbono 10%.

Removeu-se o solvente o obteve-se 0,3g da amida **43** correspondendo a um rendimento quantitativo.

Propriedades Físicas de **43**

- Pó amorfo levemente amarelado.
- Rf = 0,22 (AcOEt puro).
- Faixa de fusão: 170 - 172° C

7 ESTUDO BIOLÓGICO

7.1 Análise de Citotoxicidade

Citotoxicidade é a propriedade de uma substância de ser tóxica para as células. Os ensaios para a avaliação da citotoxicidade são interessantes por serem rápidos, envolverem baixo custo e permitirem a avaliação de diversos alvos celulares. Estes estudos fornecem informações sobre diferentes funções ou compartimentos celulares, possibilitando a ampliação do conhecimento sobre os efeitos citotóxicos causados por agentes químicos e a estimativa destes efeitos em humanos.

Os métodos *in vitro* apresentam vantagens em relação aos *in vivo* tais como poder limitar o número de variáveis experimentais, obter dados significativos mais facilmente além do período de teste ser, em muitos casos, mais curto.⁵⁴

7.1.1 Avaliação da atividade biológica

Os ensaios biológicos foram realizados no Laboratório de Bioensaios para Pesquisa de Fármacos (LBPF) do Departamento de Antibióticos, da Universidade Federal de Pernambuco, sob a responsabilidade da Professora Dra. Teresinha Gonçalves da Silva.

Os experimentos não necessitaram de aprovação pela Comissão de Ética para Experimentação com animais, da Universidade Federal de Pernambuco, uma vez que os testes realizados foram todos *in vitro*.

7.1.2 Linhagens celulares

As linhagens tumorais utilizadas, HL60 (leucemia promielocítica), HEP-2 (carcinoma de laringe humano) e MCF-7 (câncer de mama) foram obtidas do Banco de células do Rio de

Janeiro, tendo sido cultivadas em meio RPMI 1640, suplementados com 10 % de soro fetal bovino e 1 % de antibiótico, mantidas em estufa a 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO₂.

7.1.3 Metodologia

Análise de citotoxicidade pelo método do MTT vem sendo utilizada no programa de *screening* do *National Cancer Institute* dos Estados Unidos (NCI), que testa mais de 10.000 amostras a cada ano.⁵⁵ É um método rápido, sensível e barato. Foi descrito primeiramente por Mosman (1983), tendo a capacidade de analisar a viabilidade e o estado metabólico da célula. É uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT) em azul de formazan, a partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas. O estudo citotóxico pelo método do MTT permite definir facilmente a citotoxicidade, mas não o mecanismo de ação.⁵⁶

As células foram plaqueadas na concentração de 1×10^5 células/mL. As substâncias previamente dissolvidas em DMSO foram diluídas em série no meio RPMI para obtenção da concentração final de 25 µg/mL e adicionadas em placa de 96 poços (100µL/ poço). As placas foram incubadas por 72 horas em estufa a 5% de CO₂ a 37°C. Em seguida, foram adicionados 25 µL da solução de MTT (sal de tetrazolium), e as placas foram incubadas por 3h. A absorbância foi lida após dissolução do precipitado com DMSO puro em espectrofotômetro de placa a 595nm. Os experimentos foram analisados segundo suas médias e respectivos desvio no programa *GraphPad Prism*. Cada amostra foi testada em duplicata.

7.1.4 Resultados e discussão

Uma escala de intensidade foi utilizada para avaliar o potencial citotóxico das amostras testadas. Amostras sem atividade (1 a 20% de inibição), com pouca atividade (inibição de crescimento celular variando de 20 a 50%), com atividade moderada (inibição de crescimento celular variando de 50 a 70%) e com muita atividade (inibição de crescimento variando de 70 a 100%).

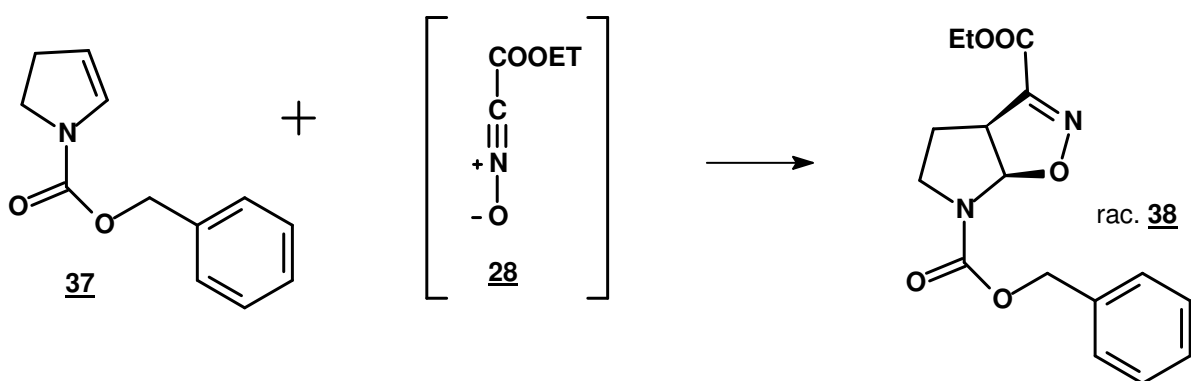
Pode-se observar na Tabela 01, que as percentagens de inibição das células tumorais, variaram entre 7,78% a 53,4%, dessa forma a maior parte dos compostos não apresentaram atividade e apenas um composto **41a** apresentou moderada atividade para a linhagem HL60. Pode-se pressupor que os compostos não serão tóxicos para as células normais, uma vez que, eles não apresentaram toxicidade para as células tumorais. Contudo, não se pode afirmar sem antes serem realizados os testes *in vivo*, pois as células tumorais possuem metabolismo e características peculiares a uma célula anormal, diferindo das células humanas normais. Pode-se dizer apenas que esses dados são um indício de que os compostos sintetizados neste trabalho, não apresentarão efeitos citotóxicos para as células humanas normais.

Tabela 01 – Percentual de inibição celular (IC%) das amostras em três linhagens tumorais testadas na dose de 25 µg/mL.

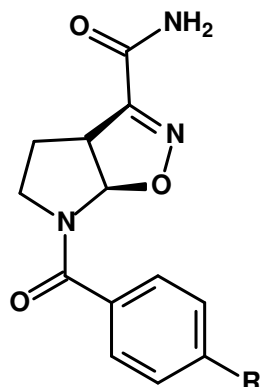
Amostra	MCF-7		HEP		HL60	
	Média IC %	SD	Média IC %	SD	Média IC %	SD
41a	18,14	7,8	10,42	4	53,45	2,8
41b	8,58	1,8	16,75	0,7	32,68	25,1
41c	16,45	2,9	29,4	5,2	45,41	4,07
42	13,47	8,2	12,22	1,9	7,78	2,3
43	11,63	4,2	14,27	1,4	9,52	5,2

8 CONCLUSÃO E PESPECTIVAS

Neste trabalho, foram desenvolvidas novas moléculas 3-carboxamidas-2-isoxazolinazabíclicas por meio de cicloadição 1,3-dipolar entre um óxido de nitrila, o óxido de carboetoxiformonitrila **28** e o enecarbamato endocíclico de 5 membros **37**.

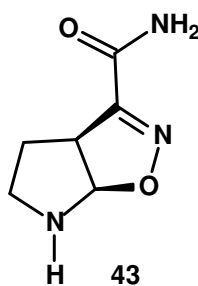


O racemato **38** foi submetido à reação de hidrogenólise para a remoção do grupamento protetor CBz, em seguida foi *N*-benzoilado com os respectivos cloretos de benzoila *p*-substituídos. Obtiveram-se rendimentos satisfatórios de 86% a 96%. Em seguida os produtos foram submetidos a uma reação de amonólise para obtenção dos produtos finais **41a-c**.



41a - R= F
 41b - R= Cl
 41c - R= Br

Todas as 3-carboxamidas-2-isoxazolininas azabíciclicas **41a-c** foram devidamente purificadas e identificadas por métodos espectrométricos de RMN ^{13}C , RMN de ^1H e IV. Contudo, o composto **43** possivelmente sofreu degradação ao ser solubilizado no solvente deuterado, impossibilitando a sua identificação por métodos espectrométricos.



O teste para avaliação da atividade citotóxica em células tumorais, feito pelo método MTT, evidenciou que a maior parte dos compostos não apresentou atividade. Contudo, esses resultados demonstram indícios que os compostos sintetizados não apresentarão efeitos tóxicos para as células normais, para confirmação deste indício são necessários testes *in vivo*.

Os objetivos propostos inicialmente no projeto, quanto à parte química, foram plenamente executados, apresentando resultados bastante promissores que incentiva a ampliação da série dos novos heterociclos isoxazolinínicos.

Diante dos bons resultados quanto à parte química, pretende-se aumentar a série dos compostos 3-carboxamidas-2-isoxazolininas azabíciclicas, inserindo em sua estrutura cloretos de benzoila para, meta e orto substituídos com grupos ativantes e desativantes do anel, para

verificar possíveis diferenças reacionais, assim como possíveis diferenças nas atividades biológicas. Síntese do sal cloridrato da amida 43 para a sua elucidação estrutural através de RMN ^1H , RMN ^{13}C e IV. Inserção da função ácido no carbono 5 do anel pirrolidínico para averiguação da atividade anti-inflamatória, uma vez que tal função está presente em muitos anti-inflamatórios concomitante com a função amida. Sintetizar e avaliar a atividade antinociceptiva e anti-inflamatória de ácidos 3-carboxamidas-isoxazolínicos aza-bicíclicos quirais.

REFERÊNCIAS

- 1 – NOGUEIRA, L. J.; MONTANARI, C. A.; DONNICI, C. L. Histórico da evolução da química medicinal e a importância da lipofilia: de Hipócrates e Galeno a Paracelsus e as contribuições de Overton e de Hansch. **Revista Virtual de Química**. v. 1, n. 3. p. 227-240, 2009.

- 2 - GUIDO, R. V. C.; ANDRICOPULO, A. D.; OLIVA, G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. *Estud. av.*, São Paulo, v.24, n.70, 2010. Disponível em http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010340142010000300006&lng=en&nrm=iso. Acesso em: 29 Jan.2013. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-40142010000300006>.

- 3 – KOROLKOVAS, A.; BURCKHALTER, J. H.; Química Farmacêutica, **Guanabara Koogan**: Rio de Janeiro, 1988, p. 48-49.

- 4 – BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. As Bases Moleculares da Ação dos Fármacos. 2ª Ed. **Editora Artmed**, 2008. p. 63.

- 5 – DALLANOCE, C.; CANOCI, M.; MATERA, C.; MENNINI, T.; AMICI, M.; GOBBI, M.; MICHELI, C. A novel spirocyclic tropanyl- Δ^2 -isoxazoline derivative enhances citalopram and paroxetine binding to serotonin transporters as well as serotonin uptake. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v. 20, p. 6344-6355, 2012.

- 6 – ANDRÉS, J. I.; ALCÁZAR, J.; ALONSO, J. M.; ALVAREZ, R. M.; CID, J. M.; LUCAS, A. I.; FERNANDEZ, J.; MARTÍNEZ, S.; NIETO, C.; PASTOR, J.; BAKKER, M. M.; BIESMANS, I.; HEYLEN, L.I.; MEGENS, A. A. Synthesis of 3a,4-Dihydro-3H-[1]benzopyrano[4,3-c]isoxazoles, Displaying Combined 5-HTUptake Inhibiting and 2-Adrenoceptor Antagonistic Activities: A Novel Series of Potential Antidepressants. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v. 13, p. 2719-2725, 2003.

- 7 – KARTHIKEYAN, K.; SEELAN, T. V.; LALITHA, K. G.; PERUMAL, P. T. Synthesis and antinociceptive activity of pyrazolyl isoxazolines and pyrazolyl isoxazoles. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v. 19, p. 3370-3373, 2009.

- 8 – ZHANG, P.; WEI, C.; WANG, E.; WANG, W.; LIU, M.; YIN, Q.; CHEN, H.; WANG, K.; LI, X.; ZHANG, J. Synthesis and biological activities of novel isoxazoline-linked pseudodisaccharide derivatives. **Carbohydrate Research**. v. 351, p. 7-16, 2012.

- 9 – ARGYROPOULOU, E. C.; LIANIS, P.; MITAKOU, M.; GIANNOULIS, A.; NOWAK, J. 1,3-Dipolar cycloaddition approach to isoxazole, isoxazoline and isoxazolidine analogues of C-nucleosides related to pseudouridine. **Tetrahedron**. v. 62, p. 1494–1501, 2006.

- 10 – RAKESH, BRUHN, D.; MADHURA, D. B.; MADDOX, M.; LEE, R. B.; TRIVEDI, A.; YANG, L.; SCHERMAN, M. S.; GILLILAND, J. C.; GRUPPO, V.; MENEIL, M. R.; LENAERTS, A. J.; MEIBOHM, B.; LEE, R. E. Antitubercular nitrofuranyl isoxazoles with improved pharmacokinetic properties. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v. 20, p. 6063–6072, 2012.
- 11 – BALACHANDRAN, S.; GADEKAR, P. K.; PARKALE, S.; YADAV, V. N.; KAMATH, D.; RAMASWAMY, S.; SHARMA, S.; VISHWAKARMA, R. A.; DAGIA, N. M. Synthesis and biological activity of novel MIF antagonists. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. v.21, p. 1508–1511, 2011.
- 12 – ALAM, A.; PAL, C.; GOYAL, M.; KUNDU, M. K.; KUMAR, R.; IQBAL, M. S.; DEY, S.; BINDU, S.; SARKAR, S.; PAL, U.; MAITI, N. C.; ADHIKARI, S.; BANDYOPADHYAY, U. Synthesis and bio-evaluation of human macrophage migration inhibitory factor inhibitor to develop anti-inflammatory agent. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v.19, p. 7365–7373, 2011.
- 13 – OZOE, Y.; ASAH, M.; OZOE, F.; NAKAHARA, K.; MITA, T. The antiparasitic isoxazoline A1443 is a potent blocker of insect ligand-gated chloride channels. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 391, p. 744–749, 2010.
- 14 – BASAPPA, M. P.; SADASHIVA, K.; MANTELINGU, S.; NANJUNDA S. RANGAPPA, K. S. Solution-Phase Synthesis of Novel D2-Isoxazoline Libraries via 1,3-Dipolar Cycloaddition and Their Antifungal Properties. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v.11, p. 4539–4544, 2003.
- 15 – ALMEIDA, V. M.; SANTOS, R. J.; GÓES, A. J. S.; LIMA, J. G.; CORREIA, C. R. D.; FARIA, A. R. Synthesis of new aza-bicyclic 2-isoxazoles by 1,3-dipolar cycloaddition of endocyclic enecarbamates and enamides with nitriles oxides. **Tetrahedron Letters**. v. 50, p.684-687, 2009.
- 16 – REIS, S. L. G. B.; ALMEIDA, V. M.; ALMEIDA, G. C.; BOAVIAGEM, K. M.; MENDES, C. C. B.; GÓES, A. J. S., MAGALHÃES L. R.; SILVA, T. G.; FARIA, A. R. Síntese e avaliação preliminar da atividade antinociceptiva de novas isoxazolil-aril-hidrazonas. **Química Nova**. v. 24, n. 1, p. 76-81, 2011.
- 17 – ALMEIDA, V. M.; SANTOS, R. J.; GÓES, A. J. S.; SOUZA, I. A.; FARIA, A. R.; Ensaios de toxicidade aguda de amidas derivadas de novas isoxazolinhas bicíclicas piperidínicas. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**. v.9, n. 3, p. 275, 2005.
- 18 – ALMEIDA, V. M.; SOUZA, I. A.; GÓES, A. J. S.; LIMA, J. G.; SANTANA, M. L. S.; FARIA, A. R. Synthesis, LD50 and Anti-inflammatory Activity of 7-Benzoyl-3-Carboxamides from Novel Heterobicycle 2-Isoxazoline[5,4-b]piperidine. In: The 4th Brazilian Symposium on Medicinal Chemistry, 2008, Porto de Galinhas -PE. **Livro de**

Resumos Brazmedchem 2008. São Paulo-SP : Sociedade Brasileira de Química - Divisão Química Medicinal, 2008.

19 – WANG, Y.; SHAO, Y.; WANG, Y.; FAN, L.; YU, X.; ZHI, X.; YANG, C.; QU, H.; YAO, X.; XU, H. Synthesis and Quantitative Structure–Activity Relationship (QSAR) Study of Novel Isoxazoline and Oxime Derivatives of Podophyllotoxin as Insecticidal Agents. **Journal of Agricultural and Food Chemistry.** v.60, p. 8435–8443, 2012.

20 – RAKESH; BRUHN, D.; MADHURA, D. B.; MADDOX, M.; LEE, R. B.; TRIVEDI, A.; YANG, L.; SCHERMAN, M. S.; GILLILAND, J. C.; GRUPPO, V.; MCNEIL, M. R.; LENAERTS, A.; MEIBOHM, B.; LEE, R. E. Antitubercular nitrofurane isoxazolines with improved pharmacokinetic properties. **Bioorganic & Medicinal Chemistry.** v. 20, p. 6063–6072, 2012.

21 – ANDRÉS, J. I.; ALCÁZAR, J.; ALONSO, J. M.; ALVAREZ, R. M.; CID, J. M.; DE LUCAS, A. I.; FERNÁNDEZ, J.; MARTÍNEZ, S.; NIETO, C.; PASTOR, J.; BAKKER, M. H.; BIESMANS, I.; HEYLEN, L. I.; MEGENS, A. A. Synthesis of 3a,4-Dihydro-3H-[1]benzopyrano[4,3-c]isoxazoles, Displaying Combined 5-HTUptake Inhibiting and α 2-Adrenoceptor Antagonistic Activities: A Novel Series of Potential Antidepressants. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.** v. 13, p. 2719-2725, 2003.

22 - ZHANG, P.; WEI, C.; WANG, E.; WANG, W.; LIU, M.; YIN, Q.; CHEN, H.; WANG, K.; LI, X.; ZHANG, J. Synthesis and biological activities of novel isoxazoline-linked pseudodisaccharide derivatives. **Carbohydrate Research.** v. 351, p. 7-16, 2012.

23 – TANTAWY, A. S.; NASR, M. N. A.; EL-SAYED, M. A. A.; TAWFIK, S. S. Synthesis and antiviral activity of new 3-methyl-1,5-diphenyl-1Hpyrazole derivatives. **Medicinal Chemistry research.** v. 21, p. 4139-4149, 2012.

24 – SADASHIVA, M. P.; BASAPPA; NANJUNDASWAMY, S.; LI, F.; MANU, K. A.; SENGOTTUVELAN, M.; PRASANNA, D. S.; ANILKUMAR, N. C.; SETHI, G.; SUGAHARA, K.; RANGAPPA, K. S. Anti-cancer activity of novel dibenzo[b,f]azepine tethered isoxazoline derivatives. **BMC Chemical Biology.** v. 12, p. 1472-6769, 2012.

25 – SHI, L.; HU, P.; WEI, Y.; LIANG, Y.; YANG, Z.; KE, S. Anthranilic acid-based diamides derivatives incorporating aryl-isoxazoline pharmacophore as potential anticancer agents: Design, synthesis and biological evaluation. **European Journal of Medicinal Chemistry.** v. 54, p. 549-556, 2012.

26 – QUAN, M. L.; ELLIS, C. D.; HE, M. Y.; LIAUW, A. Y.; LAM, P. Y. S.; ROSSI, K. A.; KNABB, R. M.; LUETTGEN, J. M.; WRIGHT, M. R.; WONG, P. C.; WEXLER, R. R. Nonbenzamidine Isoxazoline Derivatives as Factor Xa Inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.** v. 13, p. 1023 – 1028, 2003.

- 27 – BASAPPA, M. P.; SADASHIVA, K.; MANTELINGU, S.; RANGAPPA, K. S. Solution-Phase Synthesis of Novel D2-Isoxazoline Libraries via 1,3-Dipolar Cycloaddition and Their Antifungal Properties. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v. 11, p. 4539 – 4544, 2003.
- 28 – KARTHIKEYAN, K.; VEENUS, S. T.; LALITHA, K. G.; PERUMAL, P. T. Synthesis and antinociceptive activity of pyrazolyl isoxazolines and pyrazolyl isoxazoles. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. v. 19, p. 3370 – 3373, 2009.
- 29 – BALACHANDRAN, S.; GADEKAR, P. K.; PARKALES, S.; YADAV, V. N.; KAMATH, D.; RAMASWAMY, S.; SHARMA, S.; VISHWAKARMA, R. A.; DAGIA, N. M. Synthesis and biological activity of novel MIF antagonists. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. v. 21, p. 1508 – 1511, 2011.
- 30 – ALAM, A.; PAL, C.; GOYAL, M.; KUNDU, M. K.; KUMAR, R.; IQBAL, M. S.; DEY, S.; BINDU, S.; SARKAR, S.; PAL, U.; MAITI, N. C.; ADHIKARI, S.; BANDYOPADHYAY, U. Synthesis and bio-evaluation of human macrophage migration inhibitory factor inhibitor to develop anti-inflammatory agent. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v. 19, p. 7365 - 7373, 2011.
- 31 - ALMEIDA, V. M.; SANTOS, R. J.; GÓES, A. J. S.; SOUZA, I. A.; FARIA, A. R.; Ensaios de toxicidade aguda de amidas derivadas de novas isoxazolinias bicíclicas piperidínicas. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**. v.9, n. 3, p. 275, 2005.
- 32 – MAHESWARI, S. V.; PERUMAL, S. A facile sequential three-component regio- and stereoselective synthesis of novel spiro-isoxazoline/acridinone hybrids. **Tetrahedron Letters**. v. 53, p. 6885-6888, 2012.
- 33- GUIRADO, A.; MARTIZ, B.; ANDREU, R.; BAUTISTA, D. A new and efficient approach to isoxazolines. First synthesis of 3-aryl-5-dichloromethyl-2-isoxazolines. **Tetrahedron**. v. 67, p. 5811-5815, 2011.
- 34 – ENDERS, D.; LEY, S. V.; MEHTA, G.; NICOLAOU, K. C.; NOYORI, R.; OVERMAN, L. E.; PADWA, A. 12 Topics in Heterocyclic Chemistry. Springer, Berlin. 2008, p.3
- 35 – CHAKRABORTY, B.; LUITEL, G. P. An efficient ecofriendly protocol for the synthesis of novel fluoro isoxazoline and isoxazolidines using N-benzyl fluoro nitrene via cycloaddition reactions. **Tetrahedron Letters**. v. 54, p. 765–770, 2013.
- 36 - KARTHIKEYAN, K.; SEELAN, T. V.; LALITHA, K. G.; PERUMAL, P. T. Synthesis and antinociceptive activity of pyrazolyl isoxazolines and pyrazolyl isoxazoles. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v. 19, p. 3370-3373, 2009.

37 – HOUK, K. N.; SIMS, J.; DUKE, R. E.; STROZIER, R. W.; GEORGE, J. K. Frontier Molecular Orbitals of 1,3 Dipoles and Dipolarophiles. **Journal of the American Chemical Society**. v. 95, n. 22, 7287-7301, 1973.

38 - ENDERS, D.; LEY, S. V.; MEHTA, G.; NICOLAOU, K. C.; NOYORI, R.; OVERMAN, L. E.; PADWA, A. 13 Topics in Heterocyclic Chemistry. Springer, Berlin. 2008, p.2.

39 – KISS, L.; NONN, M.; FULOP, F. Syntheses of Isoxazoline-Based Amino Acids by Cycloaddition of Nitrile Oxides and Their Conversion into Highly Functionalized Bioactive Amino Acid Derivatives. **Synthesis**. v. 44, p. 1951-1963, 2012.

40 – FLEMING, I. Frontier Orbitals and Organic Chemical Reactions. John Wiley and Sons, New York, p.93, 1976.

41 - KISS, L.; NONN, M.; FULOP, F. Syntheses of Isoxazoline-Based Amino Acids by Cycloaddition of Nitrile Oxides and Their Conversion into Highly Functionalized Bioactive Amino Acid Derivatives. **Synthesis**. v. 44, p. 1951-1963, 2012.

42 – FLEMING, I. Frontier Orbitals and Organic Chemical Reactions. John Wiley and Sons, New York, p.93, 1976.

43 – GOTHEIF, K. V.; JORGENSEN, K. A. Asymmetric 1,3-dipolar cycloadditions reactions. **Chemical Reviews**. v. 98, p. 863-909, 1998.

44 - ENDERS, D.; LEY, S. V.; MEHTA, G.; NICOLAOU, K. C.; NOYORI, R.; OVERMAN, L. E.; PADWA, A. 12 Topics in Heterocyclic Chemistry. Springer, Berlin. 2008, p.15

45 - ENDERS, D.; LEY, S. V.; MEHTA, G.; NICOLAOU, K. C.; NOYORI, R.; OVERMAN, L. E.; PADWA, A. 13 Topics in Heterocyclic Chemistry. Springer, Berlin. 2008, p.14.

46 - ALMEIDA, V. M. Síntese assimétrica de 3-carboxamidas enantiomericamente puras e de hidrazidas e aril-hidrazonas, derivas do novo heterociclo 7-(benzoil)-2-isoxazolina[5,4b]pirrolidina. Avaliação das atividades biológicas. Recife. Tese de Doutorado, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, 2008.

47 - TANG, S.; HE, J.; SUN, Y.; HE, L.; SHE, Y. Efficient and Regioselective Synthesis of 5-Hydroxy-2-isoxazolines: Versatile Synthons for Isoxazoles, β -Lactams, and γ -Amino Alcohols. **The Journal of Organic Chemistry**. v. 75, n. 6, p. 1961-1966, 2010.

48 – KAMETANI, T.; HUANG, S. P.; YOKOHAMA, S.; SUZUKI, Y.; IHARA, M. Studies on the Syntheses of Heterocyclic Compounds. 800. A Formal Total Synthesis of (+/-)-

Thienamycin and a (+/-)-Decysteaminyllthienamycin Derivative. **Journal of the American Chemical Society**. v.102, n. 6, p. 2060-2065, 1980.

49 - 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. Dissertação de Mestrado, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, 2003.

50 - 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. Dissertação de Mestrado, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, 2003.

51 – KRAUS, G. A.; NEUENSCHAWANDER, K.; A facile synthesis of N-acyl-2-pyrrolines. **The Journal of Organic Chemistry**. v. 46, p. 4791-4792, 1981.

52 – CECCHI, L.; SARLO, F.; MACHETTI, F. Isoxazoline derivatives from activated primary nitrocompounds and tertiary diamines. **Tetrahedron Letters**. v. 46 p. 7877-7879, 2005.

53 – SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos. 7ª Edição; editora LTC. Rio de Janeiro, p. 97, 2006.

54 – ROGERO, S. O.; LUGÃO, A. B.; IKEDA, T. I.; CRUZ, A. S. Teste *in vitro* de Citotoxicidade: Estudo Comparativo entre Duas Metodologias. **Materials Research**. v. 6, n. 3, p. 317-320, 2003.

55 – SKEMAN, P.; STORENG, R.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; MCMAHON, J.; VISTICA, D.; WARREN, J. T.; BOKESCH, H.; KENNEY, S.; BOYD, M. R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **Journal of the National Cancer Institute**. v. 82, n. 13, p. 1107-1112, 1990.

- 56 - BERRIDGE, MV.; TAN, AS.; MCCOY, KD.; KANSARA, M.; RUDERT, F. CD95 (Fas/Apo-1)-induced apoptosis results in loss of glucose transporter function. **Journal of immunology**. v. 156, n. 11, p. 4092-4099, 1996.
- 57 – MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**. v. 454, p. 428-435, 2008.
- 58 – CRAIG, C. R.; STITZEL, R. E.; Farmacologia moderna com aplicações clínicas. Guanabara Koogan. 6ª edição. Rio de Janeiro. p. 399-402, 2005
- 59 – CATRAN, S. R.; KUMAR, V.; ROBINS, S. L. Inflamação: patologia estrutural e funcional. Guanabara Koogan. 3ª edição. p. 33-37, 1991.
- 60 – BRODY, T. M.; LARNER, J.; MINERMAN, K. P.; NEU, C. H. Farmacologia Humana – da Molécula à Clínica. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro. p. 71-73, 1997.
- 61 – PHILIPS, J.; MURRAY, P. The biology of disease. **Blackwell science**. v. 25. p. 22-43, 1995.
- 62 - REIS, S. L. G. B.; ALMEIDA, V. M.; ALMEIDA, G. C.; BOAVIAGEM, K. M.; MENDES, C. C. B.; GOÉS, A. J. S., MAGALHÃES L. R.; SILVA, T. G.; FARIA, A. R. Síntese e avaliação preliminar da atividade antinociceptiva de novas isoxazolil-aril-hidrazonas. **Química Nova**. v. 24, n. 1, p. 76-81, 2011.
- 63 – KO, H. J.; SONG, A.; LAI, M. N.; NG, L. T. Immunomodulatory properties of *Xylarianigripes* in peritoneal macrophage cells of Balb/c mice. **Journal of Ethnopharmacology**. v.138 , n. 3, p. 762– 768, 2011.