

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

HUGO MARCELO NASCIMENTO CARVALHO

**OBTENÇÃO E AVALIAÇÃO PRELIMINAR DO POTENCIAL ANTIBACTERIANO DE
NOVAS HIDRAZONAS ISOXAZOLÍNICAS, OBTIDOS POR HIBRIDAÇÃO
MOLECULAR.**

RECIFE
2012

Hugo Marcelo Nascimento Carvalho

HUGO MARCELO NASCIMENTO CARVALHO

**OBTENÇÃO E AVALIAÇÃO PRELIMINAR DO POTENCIAL ANTIBACTERIANO DE
NOVAS HIDRAZONAS ISOXAZOLÍNICAS, OBTIDOS POR HIBRIDAÇÃO
MOLECULAR.**

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas do Centro de
Ciências da Saúde da UFPE, como
requisito para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Rodolfo de
Faria

RECIFE

2012

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

C331o Carvalho, Hugo Marcelo Nascimento.
Obtenção e avaliação preliminar do potencial antibacteriano de novas hidrazonas isoxazolinicas, obtidos por hibridação molecular/ Hugo Marcelo Nascimento Carvalho. – Recife: o autor, 2012.
91 f.: il.; tab.; 30 cm.

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

1. Hidrazonas. 2. Antimicrobianos. 3. Staphylococcus. 4. Bacillus. I. Faria, Antônio Rodolfo de (Orientador). II. Título.

615.3 CDD (23.ed.) UFPE (CCS 2017-285)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Recife, 28 de setembro de 2012.

Defesa de Dissertação de Mestrado de Hugo Marcelo Nascimento Carvalho defendido e APROVADO, por decisão unânime, em 28 de setembro de 2012 e cuja Banca Examinadora foi constituída pelos seguintes professores:

PRESIDENTE E PRIMEIRO EXAMINADOR INTERNO: Prof. Dr. Antônio Rodolfo de Faria
(Depto. de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE).

Assinatura: _____

SEGUNDO EXAMINADOR INTERNO: Prof. Dr. Dalci José Brondani
(Depto. de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE).

Assinatura: _____

PRIMEIRA EXAMINADORA EXTERNA: Prof.^a Dr.^a Ana Beatriz Sotero Siqueira
(Depto. de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE).

Assinatura: _____

Prédio das Pós-Graduações em Ciências Farmacêuticas
Av. da Engenharia, s/n - 2.º andar - Cidade Universitária - Recife/PE - CEP 52740-600

AGRADECIMENTOS

- A deus, por estar sempre guiando meu caminho para o melhor possível.
- Aos meus pais e irmão que sempre me incentivaram e apoiaram durante todo o meu percurso da minha vida, em destaque na graduação e pós graduação.
- Agradeço a toda a minha família, por me apoiarem sempre em todos os momentos da minha vida.
- Ao orientador desse trabalho, Professor Antonio Rodolfo de Faria, por dar a oportunidade de participar do LASOF durante esses 4 anos, de iniciação científica e mestrado, e pela chance da realização desse projeto.
- Aos amigos e companheiros de trabalho do LASOF, Rafaela Passos, Juliana Cordeiro, Ronmilson Marques, Hellen Rayanna, Marlene Saraiva, Lucas Silva, Adriano, Charles Mendes e Gleybson Correa pela ajuda e momentos vividos no laboratório;
- A professora Magaly e o seu grupo de pesquisa pela aceitação e empenho na realização do testes antimicrobianos;
- Aos meus amigos de faculdade que sempre estiveram me acompanhando e compreenderem a situação, apoiando nos momentos difíceis
- A Central Analítica do departamento de química fundamental por realizarem as análises espectrométricas;
- A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse objetivo.

**... Os ideais que iluminaram o meu
caminho são a bondade, a beleza e
a verdade.**

Albert Einstein

RESUMO

O surgimento de cepas bacterianas cada vez mais resistentes vem ganhando força através do uso indiscriminado de antimicrobianos para a prevenção ou tratamento de infecções. Diversas drogas já disponíveis no mercado não são suficientemente eficazes contra os microrganismos resistentes, aumentando a necessidade do estudo e desenvolvimento de novos fármacos para atuação na terapêutica. Fármacos semi-sintéticos e sintéticos já são a maioria dos utilizados, estando em torno de 75% dos disponíveis para terapêutica. Nosso objetivo com esse trabalho foi explorar a atividade biológica dessas estruturas, sintetizando através de uma hibridação molecular, derivados de hidrazona, que na literatura há vários estudos que mostram que esses compostos possuem diversas atividades biológicas como atividade antimicrobiana, antichagásica, antiepiléptica dentre outras. Através de metodologias já dominadas em nosso laboratório, obtivemos o cicloaduto isoxazolinico em quantidade multi-gramas, conforme descrito em trabalhos anteriores, a partir do enecarbamatoendocíclico N(carbobenziloxicarbonil)-2-óxido de pirrolina e carboetoxiformonitrila (CEFNO), através de uma reação de cicloadição 1,3-dipolar. Após reação de uma hidrogenólise, para remoção do grupamento protetor, fizemos uma reação de N-benzoilação, utilizando o cloreto 4-clorobenzoila e o cloreto 4-fluorobenzoila. Em seguida, Através de uma condensação com o 5-nitro-2-tiofeno benzaldeído, 2-tiofeno benzaldeído e 2-Piridina benzaldeído foram formadas as 06 novas hidrazonas isoxazolinicas. Esses compostos foram avaliados preliminarmente quanto a sua atividade antimicrobiana através do método de difusão em disco contra os microrganismos de *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Micrococcus luteus*, e *Bacillus subtilis*, apresentando atividade apenas para *staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e *micrococcus luteus* com halos inferiores a 15mm, não sendo considerados bons agentes antibacterianos contra esses microrganismos, ficando a perspectiva da avaliação biológica quanto as outras atividades relatadas.

Palavras-chave: Hidrazonas. Antimicrobianos. *Staphylococcus*. *Bacillus*.

ABSTRACT

The emergence of bacterial strains resistant increasingly been gaining strength through the indiscriminate use of antibiotics for prevention or treatment of infections. Several drugs already on the market are not sufficiently effective against resistant microorganisms, increasing the need for the study and development of new drugs for the therapeutic action. Drugs semi-synthetic and synthetic already are most used, with about 75% of available for therapy. Our intention with this study was to explore the biological activity of these structures, synthesizing through a molecular hybridization, hydrazones derivatives, in the literature there are several studies that show that compounds have diverse biological activities such as antimicrobial activity, Chagas, among other antiepileptic. Through methodologies have dominated In our laboratory, we obtained the isoxazoline cycloadduct in multi-gram quantity, as described in previous works, from enecarbamate N-(carbobenzyloxycarbonyl)-2-pyrroline oxide and carboethoxycarbonyl nitrile through a reaction of 1,3-dipolar cycloaddition. After a hydrogenolysis reaction, to remove the grouping protector, made a reaction of N-benzoylation, using the 4-chlorobenzoyl chloride and 4-fluorobenzoyl chloride. Then through condensation with a 5-nitro-2-thiophene benzaldehyde, 2-thiophene benzaldehyde and 2-pyridine benzaldehyde were formed six new hydrazones isoxazolines. These compounds were preliminarily evaluated as to their antimicrobial activity by disc diffusion method against the microorganisms *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Micrococcus luteus*, and *Bacillus subtilis*, showing activity only for *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus* and *Bacillus subtilis* halos with less than 15mm, not being considered good antibacterial agents against these microorganisms, leaving the prospect of biological evaluation as other activities reported

Key-words: Hydrazones. Antimicrobials. *Staphylococcus*. *Bacillus*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01-	2-isoxazolina[5-4- <i>b</i>]pirrolidina	15
Figura 02	Isoxazóis, Isoxazolinas e isoxazolidinas	18
Figura 03	Primeira reação de cicloadição entre fenilazida e alcino substituído	19
Figura 04	Obtenção de 2-Isoxazolinas através da cicloadição 1,3-dipolar	19
Figura 05	Penicilina	26
Figura 06	Estrutura química da Meticilina e Ampicilina	27
Figura 07	Estrutura química do ciprofloxacino	28
Figura 08	Espectros de ^1H RMN da hidrazida <u>31</u>	44
Figura 09	IVFT da hidrazida <u>31</u>	45
Figura 10	Aldeídos aromáticos	46
Figura 11	Hidrazona <u>35</u> com seus deslocamentos no ^1H RMN	48
Figura 12	Espectros de ^1H RMN da hidrazona <u>35</u>	49
Figura 13	IVFT da hidrazona <u>35</u>	50
Figura 14	Hidrazona e os aldeídos utilizados	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 01	Rendimentos das hidrazonas sintetizadas	47
Tabela 02	Halos de inibição produzidas pelas hidrazonas nos microorganismos avaliados	52

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 01	Rendimentos das hidrazonas sintetizadas	33
Esquema 02	Rota sintética para obtenção das hidrazonas derivadas do heterociclo 2-isoxazolina[5,4- <i>b</i>]pirrolidina	35
Esquema 03	Obtenção do trímero da pirrolina <u>22</u>	39
Esquema 04	Obtenção do enecarbamato endocíclico de 5 membros protegido	40
Esquema 05	Obtenção do clorooximidoacetato de etila	40
Esquema 06	Obtenção da isoxazolina desprotegida <u>25</u>	41
Esquema 07	Obtenção do cicloaduto de ester isoxazolinico <u>24</u>	41
Esquema 08	Reação de n-benzoilação da isoxazolina desprotegida com cloretos de benzoila	42
Esquema 09	Síntese da hidrazida derivada do heterociclo 2-isoxazolina[5,4- <i>b</i>]pirrolidina	43
Esquema 10	Síntese das hidrazonas derivadas do heterobícclo 2-isoxazolina [5,4- <i>b</i>] pirrolidina	46

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1	ISOXAZOLINAS	18
2.2	MÉTODO DE OBTENÇÃO DE 2-ISOXAZOLINAS	18
2.2.1	Reação de cicloadição 1,3-dipolar	18
2.3	HIDRAZONAS	21
2.3.1	Obtenção de Hidrazonas	22
2.4	ATIVIDADE BIOLÓGICA E APLICAÇÃO TERAPEUTICA	22
2.5	ATIVIDADE ANTIBACTERIANA	26
3	OBJETIVOS	31
3.1	OBJETIVOS GERAIS	31
3.2	OBJETIVOS ESPECIFICOS	31
4	METODOLOGIA	33
4.1	PARTE QUÍMICA	33
4.2	PARTE BIOLÓGICA	37
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO (PARTE QUÍMICA)	39
5.1	SÍNTESE DAS HIDRAZONAS DERIVADAS DO N-(BENZOIL)-2-ISOXAZOLINA[5,4- <i>b</i>]PIRROLIDINA	39
5.1.1	Preparação do trimero da 1-pirrolina <u>22</u>	39
5.1.2	Síntese do enecarbamato endocíclico N-(BENZILOXICARBONIL)-2-PIRROLINA <u>23</u>	40
5.1.3	Síntese do clorooximidoacetato de etila, precursor do N-óxido de nitrila – CEFNO <u>29</u>	40
5.1.4	Síntese do ester isoxazolinico <u>24</u> , através da reação de cicloadição 1,3 dipolar	41
5.1.5	Reação de desproteção do <u>41</u> nitrogenio pirrolidinico de <u>24</u>	41
5.1.6	Reação de N-benzoilação da isoxazolina desprotegida <u>25</u> com cloretos de benzoila para substituídos <u>27</u> .	42

5.1.7	Síntese da hidrazida <u>1</u> derivada do heterociclo 2-isoxazolina[5,4- <i>b</i>]pirrolidina <u>26</u> .	42
5.1.8	Síntese das hidrazonas <u>20</u> derivadas do heterobiciclo 2-isoxazolina [5,4- <i>b</i>]pirrolidina	45
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO (PARTE BIOLÓGICA)	52
7	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	56
7.1	MATERIAL E MÉTODOS	56
7.2	SÍNTESE RACÊMICA DE DERIVADOS DE 2-ISOXAZOLINAS PIRROLIDÍNICAS	57
7.2.1	Síntese do trímero da Δ^1 -Pirrolina <u>22</u>	57
7.2.2	Síntese do <i>n</i> -(benzoiloxicarbonil)-2-pirrolina <u>23</u>	58
7.2.3	Síntese do ester 6-benzil-3-etil do ácido 3a,4,5,6a-tetrahidropirrolo [3,2- <i>d</i>]isoxazol-3,6-dicarboxílico	59
7.2.4	Síntese do ester 3-etil do ácido 3a,4,5,6 ^a -tetrahidropirrolo [3,2- <i>d</i>]isoxazol-3-carboxílico <u>25</u>	60
7.2.5	Síntese do ester 3-etil do ácido 6-(4-clorobenzoil)-4,5,6a-tetrahidro-3aH-pirrolo [3,2- <i>d</i>]isoxazol-3-carboxílico <u>37</u>	61
7.2.6	Síntese do ester 3-etil do ácido 6-(4-fluorobenzoil)-4,5,6a-tetrahidro-3aH-pirrolo [3,2- <i>d</i>]isoxazol-3-carboxílico <u>39</u>	62
7.2.7	Síntese da hidrazida do ácido 6-(4-clorobenzoil)-4,5,6a-tetrahidro-3aH-pirrolo [3,2- <i>d</i>]isoxazol-3-carboxílico <u>31</u>	63
7.2.8	Síntese da hidrazida do ácido 6-(4-fluorobenzoil)-4,5,6a-tetrahidro-3aH-pirrolo [3,2- <i>d</i>]isoxazol-3-carboxílico <u>40</u>	64
7.2.9	Síntese da (5-nitro-2-tiofeno) hidrazona do ácido 6-(4-clorobenzoil)-4,5,6a-tetrahidro-3aH-pirrolo [3,2- <i>d</i>]isoxazol-3-carboxílico <u>41</u>	65
7.2.10	Síntese da (2-tiofeno) hidrazona do ácido 6-(4-clorobenzoil)-4,5,6a-tetrahidro-3aH-pirrolo [3,2- <i>d</i>]isoxazol-3-carboxílico <u>42</u>	66
7.2.11	Síntese da (2-piridina) hidrazona do ácido 6-(4-clorobenzoil)-4,5,6a-tetrahidro-3aH-pirrolo [3,2- <i>d</i>]isoxazol-3-carboxílico <u>43</u>	67
7.2.12	Síntese da (5-nitro-2-tiofeno)hidrazona do ácido 6-(4-fluorobenzoil)4,5,6a-tetrahidro-3aH-pirrolo [3,2- <i>d</i>]isoxazol-3-carboxílico <u>44</u>	68

7.2.13	Síntese da (2-tiofeno) hidrazona do ácido 6-(4-fluorobenzoil)-4,5,6a-tetrahidro-3aH-pirrólo [3,2-d]isoxazol-3-carboxílico <u>45</u>	69
7.2.14	Síntese da (2-piridina) hidrazona do ácido 6-(4-fluorobenzoil)-4,5,6a-tetrahidro-3aH-pirrólo [3,2-d]isoxazol-3-carboxílico <u>46</u>	70
8	CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	72
8.1	CONCLUSÃO	72
8.2	PERSPECTIVAS	73
	REFERÊNCIAS	74
	ANEXOS	80
Anexo A	Estrutura e IV cm^{-1} da hidrazona <u>41</u>	80
Anexo B	RMN H^{-1} da estrutura da hidrazona <u>41</u>	81
Anexo C	Estrutura e IV cm^{-1} da hidrazona <u>42</u>	82
Anexo D	RMN H^{-1} da hidrazona <u>42</u>	83
Anexo E	Estrutura e IV cm^{-1} da hidrazona <u>43</u>	84
Anexo F	RMN H^{-1} da hidrazona <u>43</u>	85
Anexo G	Estrutura e IV cm^{-1} da hidrazona <u>44</u>	86
Anexo H	RMN H^{-1} da hidrazona <u>44</u>	87
Anexo I	Estrutura e IV cm^{-1} da hidrazona <u>45</u>	88
Anexo J	RMN H^{-1} da hidrazona <u>45</u>	89
Anexo K	Estrutura e IV cm^{-1} da hidrazona <u>46</u>	90
Anexo L	RMN H^{-1} da hidrazona <u>46</u>	91

INTRODUÇÃO

1.INTRODUÇÃO

Os heterociclos são compostos bastante estudados e utilizados devido às suas atividades farmacológicas, por isso estão presentes nas estruturas de muitos fármacos mundialmente consumidos. As atividades farmacológicas desses compostos são diversificadas, como anti-hipertensiva, antiviral, antitumoral, antifúngica, anti-inflamatória e analgésica⁽¹⁾.

Dentre essas estruturas temos as isoxazolininas, que são heterociclos de 5 membros contendo nitrogênio e oxigênio em sua estrutura e que apresentam um grande potencial biológico⁽²⁾.

Em alguns estudos prévios em nosso grupo de pesquisa, a estrutura da 2-isoxazolinina quando condensada com um heterociclo como a pirrolidina, da origem ao bicyclo biologicamente ativo 2-isoxazolinina[5-4-*b*]pirrolidina (Figura 01). As atividades biológicas dessas estruturas estão diretamente relacionadas com os núcleos utilizados e já relatados na literatura com atividade anti-inflamatória e analgésica, antibacteriana e antifúngica.⁽³⁾

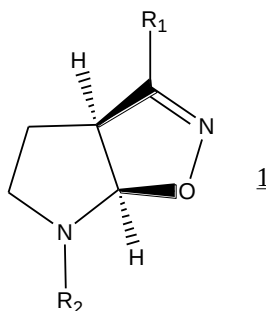


Figura 01 – 2-isoxazolinina[5-4-*b*]pirrolidina

Essa correlação entre a estrutura química e a atividade biológica é o objetivo de estudo da química medicinal, desenvolvendo e elucidando o modo de ação dos compostos biologicamente ativos a nível molecular. Dentre os métodos aplicados na química medicinal temos o da hibridação molecular, que é um método eficaz no desenvolvimento de novas estruturas, possibilitando a obtenção de moléculas

bioativas mais específicas e menos tóxicas, aprimorando suas propriedades farmacocinéticas e/ou farmacodinâmicas⁽⁴⁾.

Sua estratégia consiste em tomar uma substância química bem determinada e de ação biológica conhecida como modelo ou protótipo e daí sintetizar e ensaiar novos compostos que sejam congêneres, homólogos ou análogos estruturais do fármaco matriz, com a finalidade de potencializar os efeitos farmacológicos das estruturas sintetizadas⁽⁵⁾.

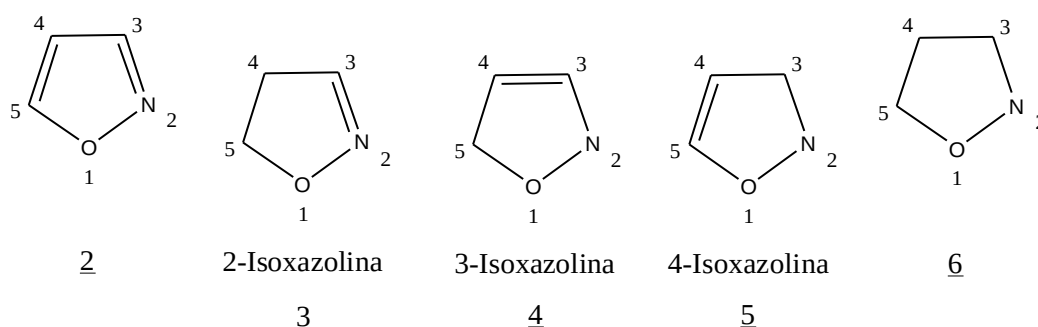
REVISÃO DA LITERATURA

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ISOXAZOLINAS

As isoxazolininas são heterociclos de 5 membros que são classificados conforme o seu grau de oxidação (Figura 02). A partir dessas estruturas podem ser obtidos sinteticamente substâncias com promissoras atividades biológicas.

Figura 02. Isoxazol, Isoxazolininas e isoxazolidina

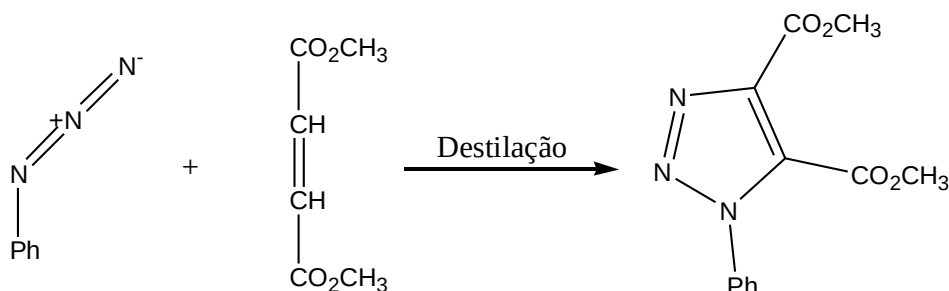


Dentre as isoxazolininas, temos a 2-Isoxazolininas que apresentam várias atividades biológicas, como anti-inflamatória e antiparasitária, e são sintetizadas através de reações envolvendo a cicloadição 1,3-dipolar⁽³⁾. Abaixo serão citados, através do que temos na literatura, as atividades biológicas e aplicações terapêuticas das isoxazolininas.

2.2 MÉTODO DE OBTENÇÃO DE 2-ISOXAZOLINAS

2.2.1 Reação de cicloadição 1,3-dipolar

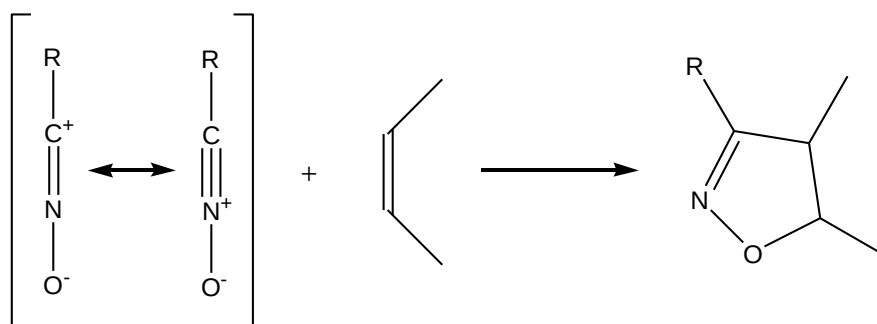
As reações de cicloadição 1,3-dipolares entre substâncias contendo ligações duplas ou triplas são conhecidas e têm sido estudadas desde 1893. Arthur Michael foi o responsável pela realização da primeira reação deste tipo, entre a fenil-azida e o acetilenodicarboxilato de etila (Figura 03)⁽¹⁾.

Figura 03. Primeira reação de cicloadição entre fenilazida e alcino substituído

Essas reações são utilizadas para obtenção de heterociclos de 5 membros em síntese orgânica. A 2-Isoxazolina é uma molécula de fundamental importância obtida através desse método e utilizada em pesquisas acadêmicas.

Nessas reações de cicloadição 1,3-dipolar estão envolvidos seis elétrons, nos quais quatro elétrons π do 1,3-dipolo e dois elétrons π do dipolarófilo, reagindo em um processo formando um cicloaduto⁽¹⁴⁾.

Para obtenção da 2-Isoxazolina utiliza-se óxidos de nitrila como o 1,3-dipolo com alquenos como dipolarófilos (Figura 04)⁽³⁾.

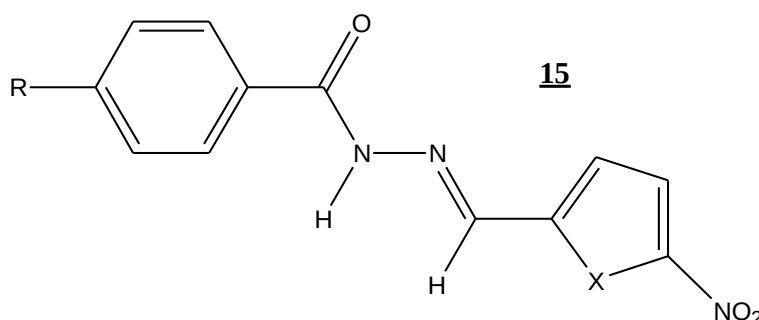
Figura 04 – Obtenção de 2-Isoxazolinias através da cicloadição 1,3-dipolar

As ligações para formação da 2-Isoxazolina não acontecem simultaneamente devido a linearidade da molécula do *N*-óxido de nitrila, havendo a formação de um intermediário durante a reação, possuindo um rendimento em torno de 70%, conforme dados da literatura.

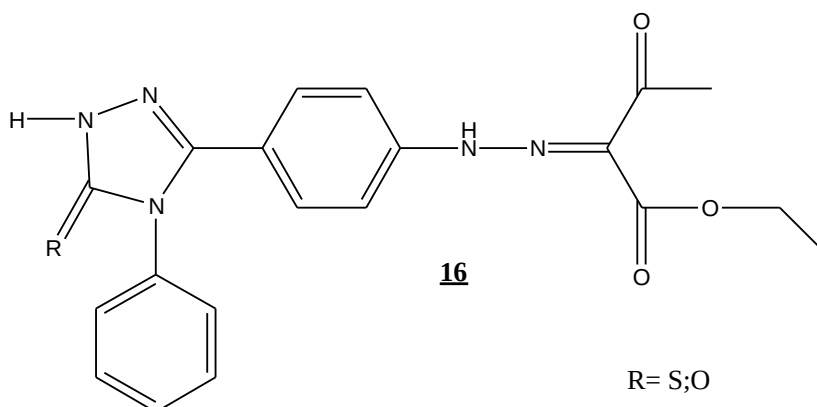
2.3 HIDRAZONAS

Hidrazona é um composto orgânico que possui em sua estrutura semelhante a $R_1CH=NNR_2$. São estruturas relatadas na literatura como responsáveis por propriedades farmacológicas importantes, como antimicrobiana, analgésica, anti-inflamatória e anticonvulsivante. A seguir serão relatadas alguns estudos que demonstram as propriedades farmacológicas das hidrazonas.

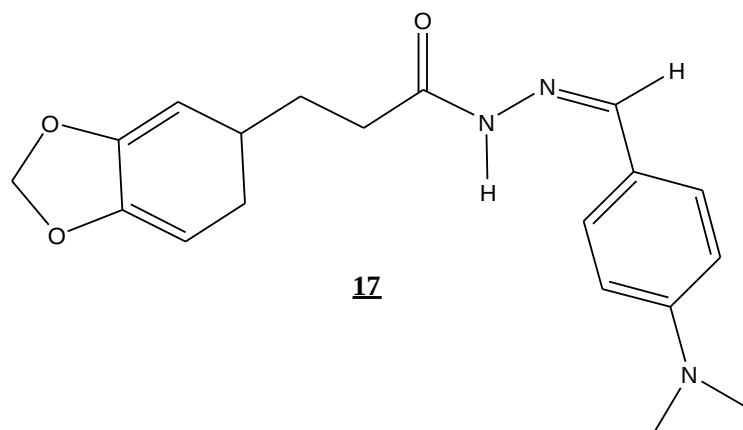
Alguns compostos hidrazônicos **15** foram estudados e testados sua atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, variando um heteroátomo no anel heterocíclico e um substituinte do anel benzenico, apresentando uma atividade na concentração de 0.16-63.00 $\mu\text{g/mL}$ ⁽¹⁵⁾⁽¹⁶⁾.



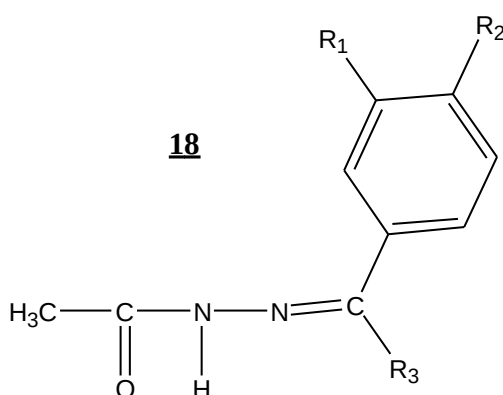
Derivados de hidrazonas **16** foram sintetizados a fim de determinar suas atividades antimicrobianas, demonstrando que os compostos com o enxofre como substituinte apresentaram uma atividade significativa contra o *Staphylococcus aureus*, enquanto que os compostos com o oxigênio como substituinte apresentaram uma maior atividade comparados as outras hidrazonas contra *Mycobacterium fortuitum*, em uma concentração de 32 $\mu\text{g/mL}$ ⁽¹⁷⁾⁽¹⁸⁾.



Uma série de compostos de hidrazonas **17** foram sintetizados e avaliados quanto a sua atividade analgésica e antiinflamatória. A hidrazona sintetizada foi comparada com a indometacina e a dipirona, drogas utilizadas na terapêutica com atividade anti-inflamatória e analgésica, mostrando uma maior potência quanto essas atividades⁽¹⁹⁾.

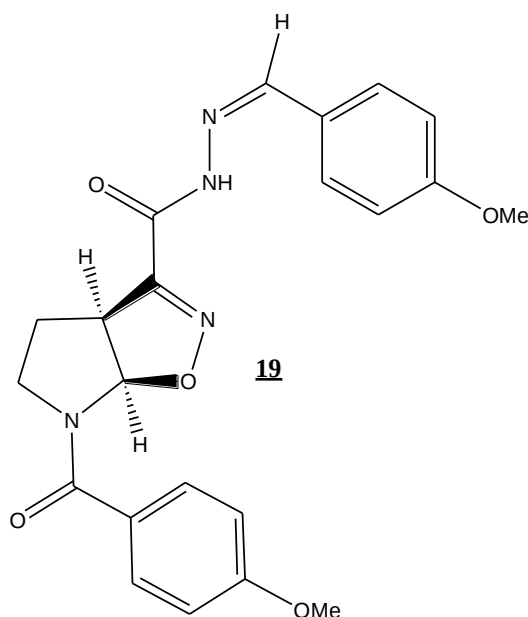


Derivados de hidrazonas **18** foram caracterizados quanto a sua atividade anticonvulsivante. O modelo animal utilizado o ensaio com pentilenotetrazol foi utilizado e revelou que esses derivados hidrazônicos proporcionaram uma boa proteção contra convulsões⁽²⁰⁾.



2.3.1 Obtenção de Hidrazonas

As hidrazonas são obtidas através de reações de condensação de hidrazidas com os aldeídos. As reações de condensação entre as hidrazidas e aldeídos, já realizadas em estudos do nosso grupo de pesquisa, nos proporcionou a síntese de hidrazonas **19** com bons rendimentos⁽³⁾⁽⁶⁾.

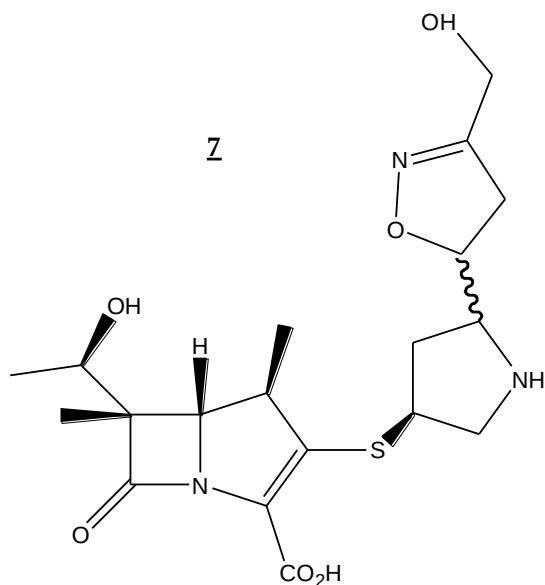


A hidrazona **19** foi obtida pela condensação do *p*-metoxibenzaldeído com a hidrazida contendo o núcleo 2-isoxazolina. Os reagentes foram solubilizados em etanol e colocados em agitação durante 30 minutos com 2 gotas do ácido clorídrico 37% como catalizador, nos fornecendo a hidrazona **19** com o rendimento de 90%⁽³⁾.

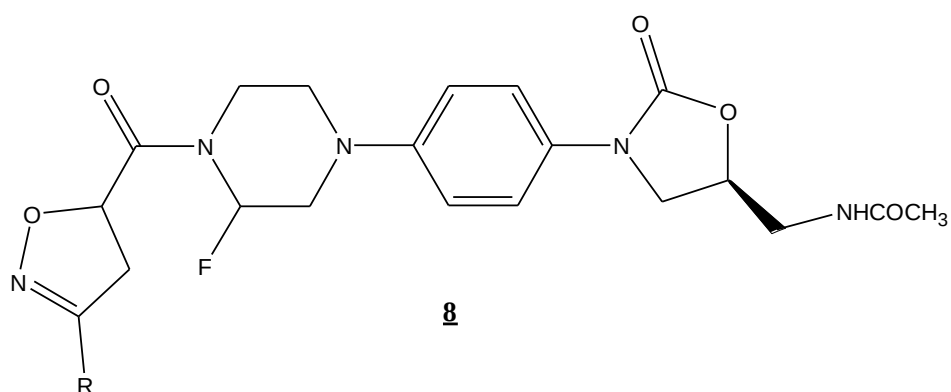
2.4 ATIVIDADE BIOLÓGICA E APLICAÇÃO TERAPÊUTICA

O núcleo 2-Isoxazolina é encontrado em relatos na literatura em estruturas responsáveis por diversas atividades biológicas importantes, como atividade antimicrobiana, antifúngica, antiviral e anti-inflamatória⁽⁶⁾.

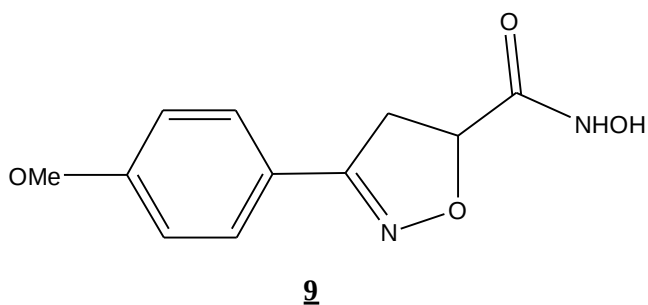
Em um estudo, utilizando o núcleo da isoxazolina houve a sua introdução, através da reação de cicloadição 1,3-dipolar, em antibióticos β -lactâmicos carbapenêmicos **7**, sendo observado que essas estruturas possuem uma importante atividade no combate aos microorganismos Gram-positivos e Gram-negativos⁽⁷⁾.



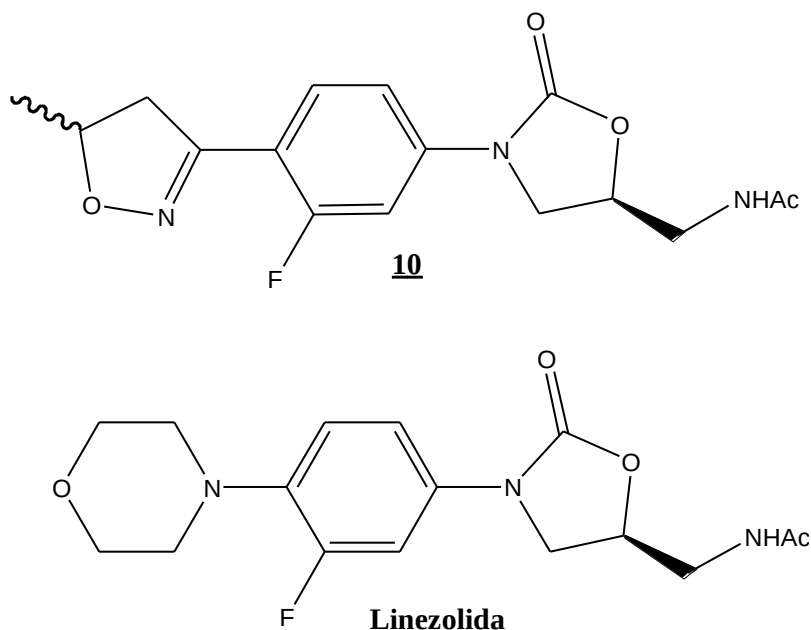
As atividades antibacterianas de derivados sintetizados de isoxazolinil oxazolidinonas foram avaliados e comprovados que os compostos testados **8** com *p*-Cl como substituinte, apresentaram uma ótima atividade contra Gram-negativos como *Klebsiella pneumoniae*⁽⁸⁾.



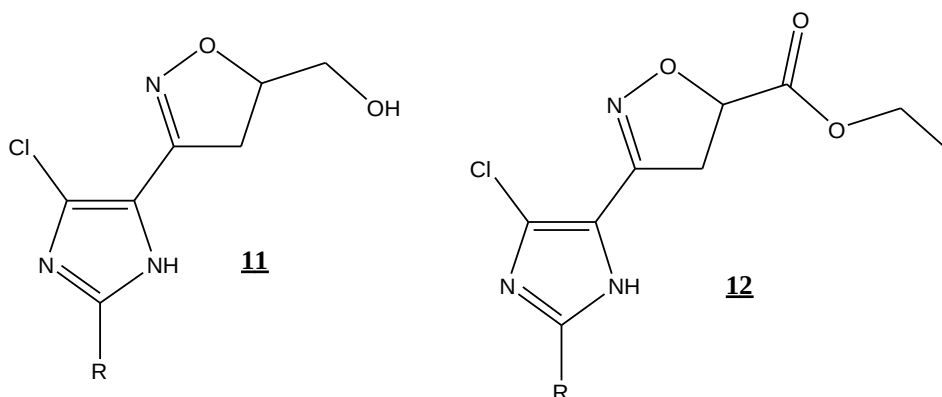
Heterociclos contendo o núcleo 2-Isoxazolina é relatado na literatura em uma série de heterociclos que apresentam atividade contra bactérias Gram negativas, sendo o mais potente da série a 2-Isoxazolina **9**, possuindo uma excelente atividade contra *Escherichia coli*⁽⁹⁾.



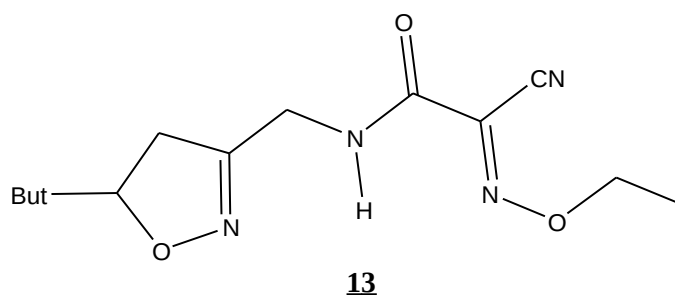
Uma nova estrutura semelhante a estrutura da Linezolida, que é um antibiótico sintético de amplo espectro da classe das oxazolidinonas, contendo o núcleo 2-Isoxazolina **10** foi sintetizada e avaliada contra os microorganismos *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium*, apresentando uma ótima atividade antimicrobiana⁽¹⁰⁾.



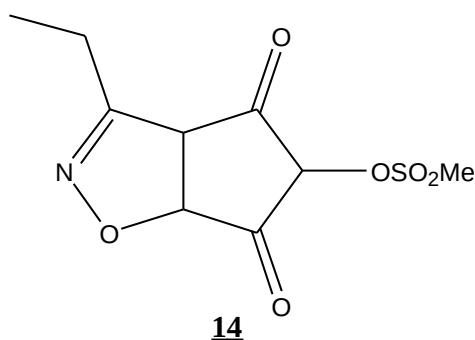
Alguns derivados de 2-Isoxazolinás **11** e **12** com variações na posição 5 e contendo o anel imidazol na posição 3 do núcleo isoxazolinico, apresentaram uma Concentração Mínima Inibitória (CMI) superior ao antifúngico Nistatina, já utilizados na terapeutica, contra *Aspergillus flavus* e *Fusarium moniliforme*⁽¹¹⁾.



Para o vírus da Influenza humana, infecção do sistema respiratório responsável por um grande número de internações hospitalares no Brasil cuja principal complicação são as pneumonias, foi apresentado uma série de derivados de 2-Isoxazolininas com potente atividade antiviral. A estrutura **13** apresentou uma menor citotoxicidade e uma maior atividade antiviral⁽¹²⁾.



Derivados 2-Isoxazolininas **14**, também são relatados envolvidos na inibição das atividades de enzimas proteolíticas envolvidas nos processos inflamatórios crônicos, como enfisema pulmonar e a artrite reumática⁽¹³⁾.

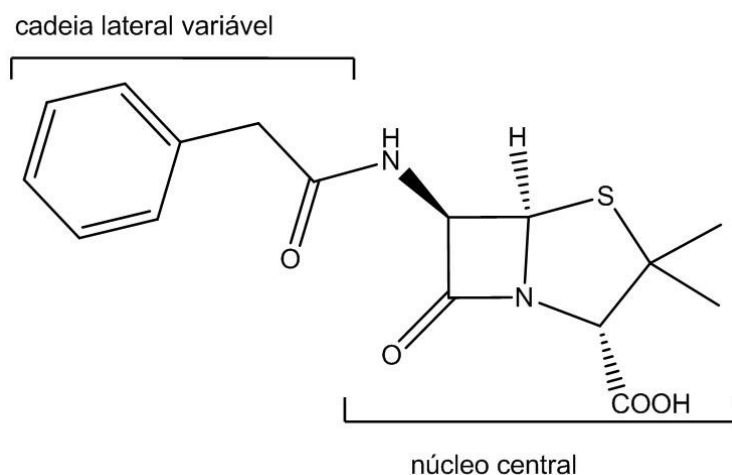


2.5 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

As primeiras experiências conduzidas sobre substâncias antimicrobianas foram voltadas a um pigmento produzido por *Pseudomonas aeruginosa* (até então a bactéria era desconhecida) presente no solo, sendo este uma importante fonte de microorganismos produtores de antibióticos⁽¹⁵⁾. Esses estudos demonstraram que essas substâncias foram eficazes na inibição do crescimento de outras bactérias e no tratamento de algumas patologias da época como febre tifóide e peste. Porém uma desvantagem no seu uso era sua toxicidade, da mesma forma, outras substâncias foram descartadas por conta dos seus efeitos secundários fazendo com que as descobertas de novos antibióticos diminuíssem⁽²¹⁾.

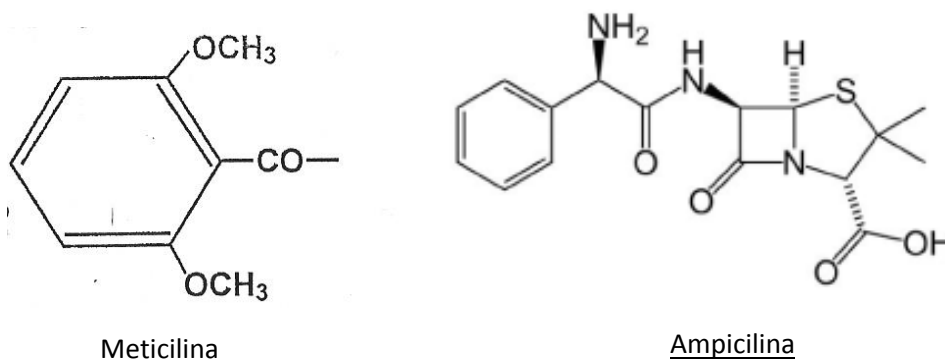
A penicilina foi descoberta por Fleming em torno de 1929 (Figura 05), ocasionalmente ao observar o crescimento de *Penicillium notatum* ocorrendo concomitantemente com a inibição das bactérias presentes (*Staphylococcus*) em uma placa de petri, sendo somente introduzida na terapia contra algumas patologias em 1942⁽²²⁾.

Figura 05 - Penicilina



Após a sua descoberta e introdução como alternativa terapêutica, começou-se a idealizar na síntese de novas substâncias com propriedades semelhantes a da penicilina através da modificação de algumas cadeias laterais, iniciando os estudos de antibióticos semi-sintéticos como a meticilina sintetizada em 1960 e a ampicilina em 1961⁽²³⁾(Figura 06).

Figura 06 – Estrutura química da Metilicina e Ampicilina



As primeiras substâncias denominadas de “Sulfas” foram identificadas em 1932 na Alemanha, onde algumas substâncias presentes em corantes químicos demonstraram atividade antibacteriana em estreptococos ao serem administrados em alguns animais infectados⁽²⁴⁾.

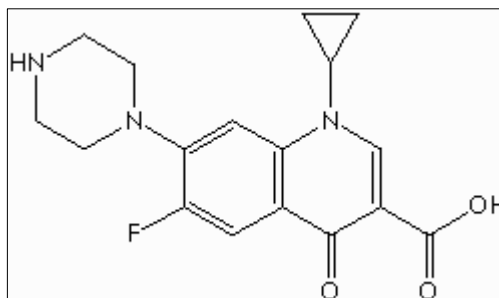
Bacillus brevis foi o primeiro microorganismo isolado do solo, pelo microbiologista Rene Dubos, produzia uma substância, posteriormente chamada de Gramicidina, capaz de inibir o crescimento de bactérias Gram-positivas, possuindo alta toxicidade quando administrada sistematicamente, sendo utilizada mais comumente por via tópica⁽²⁴⁾.

Posteriormente foi descoberto o cloranfenicol, dando inicio a utilização dos antibióticos de amplo espectro, pois essas substâncias inibiam o crescimento tanto das bactérias Gram positivas como das bactérias Gram negativas, sendo utilizadas na época para tratamento de riquetsioses⁽²¹⁾.

Outro antibiótico sintético foi o Trimetoprima em 1970, sendo combinado posteriormente com o sulfametoxazol permitindo que os tratamentos de infecções profundas fossem mais eficazes⁽²²⁾.

As fluoroquinolonas são outros agentes sintetizados a partir do ácido nalidixico e foram introduzidos na terapêutica em 1980, possuindo ação contra um grande número de agentes patógenos⁽²¹⁾⁽³⁴⁾(Figura 07).

Figura 07 – Estrutura química do Ciprofloxacino



Dentro de um hospital, os medicamentos, em especial os antibióticos, representam uma enorme parcela dos gastos de um internamento. Quando comparados a outras classes terapêuticas (analgésicos, anti-hipertensivos, e outros), representam um gasto muito maior, principalmente quando o paciente encontra-se em uma unidade de terapia intensiva (UTI), representando, em percentual, em torno de 20% a 50% dos gastos⁽²⁵⁾.

Estima-se que 30% dos pacientes internados fazem uso de antibióticos e que desse percentual 60% são julgados inadequados para o diagnóstico do paciente. Em alguns estudos realizados foram demonstrados que as altas doses dos antibióticos administrados estão relacionadas com o surgimento da resistência⁽²⁶⁾.

Normalmente o organismo humano possui uma microbiota que chamamos de residente (que habitam pele, estômago, trato geniturinário, colon) e transitória (que habitam a pele e/ou mucosas e são provenientes do meio ambiente)⁽²⁷⁾. O uso de um antibiótico pode ocasionar uma alteração da nossa flora, eliminando ou desenvolvendo microrganismos resistentes. Como consequência disso temos o aumento no internamento e gastos com os pacientes e aumento da sua morbidade. Com a finalidade de evitar o surgimento de microrganismos resistentes promove-se o uso racional de medicamentos, em especial o de antimicrobianos⁽²⁷⁾.

Alguns fatores contribuem para o uso inadequado e surgimento de microrganismos resistentes como:

- 1- Facilidade na aquisição de antimicrobianos
- 2- Uso indiscriminado e automedicação, comprometendo o tratamento na utilização de uma posologia errada e/ou para o diagnóstico errado.
- 3- Falta de protocolos para o uso de antimicrobianos dentro de um hospital;
- 4- Utilização de antimicrobianos de amplo espectro, , aumentando as chances para seleção de bactérias resistentes;
- 5- Erros de posologia;
- 6- Erros de diagnóstico, sintomas do paciente pode demonstrar ser uma infecção bacteriana quando na verdade é viral ou não é uma infecção.

O tratamento empírico é uma pratica muito utilizada em hospitais antes de se fazer o antibiograma⁽²⁸⁾, principalmente em pacientes imunossuprimidos com patologia que necessita o início imediato do antimicrobiano. Esse tratamento é feito conforme a característica da infecção, sintomas apresentados pelo paciente⁽²⁹⁾.

Para a utilização correta dos antimicrobianos deve-se fazer a cultura do microrganismo e analisar os antimicrobianos eficazes através de um antibiograma, evitando o tratamento empírico. Com o antibiograma pode-se escolher o antimicrobiano mais adequado para o tratamento do paciente, avaliando sua via de administração, atuação no sítio de infecção, toxicidade, posologia e custo⁽³⁰⁾.

Alguns centros de acompanhamento nos EUA reduziram em torno de 31% do uso de antibióticos apenas com campanhas educativas. Na Finlândia foi adotada uma política nacional de restrição ao uso de Eritromicina, e percebeu-se que houve uma enorme redução da resistência de *Staphylococcus pneumoniae*⁽³¹⁾.

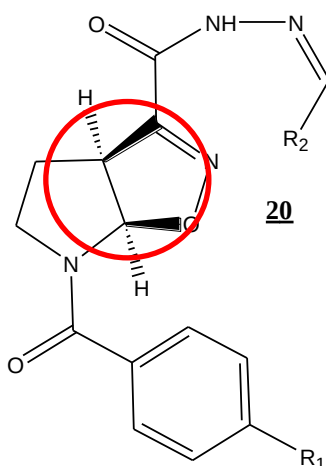
Com o surgimento das resistências além dos cuidados relacionados a utilização de antimicrobianos, cada vez mais é observado a importância na pesquisa para introdução de novos antimicrobianos na terapêutica.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

Obtenção de novos derivados hidrazônicos **20** contendo o núcleo 2-Isoxazolina e avaliação da sua potencial atividade antibacteriana e antifúngica como relatado na literatura⁽³²⁾.



3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Síntese de *N*-(*p*-clorobenzoil)-2-isoxazolina[5,4-*b*]pirrolidina e *N*-(*p*-clorobenzoil)-2-isoxazolina[5,4-*b*]pirrolidina.
- Síntese de hidrazonas derivadas do *N*-benzoil-2-isoxazolina[5,4-*b*]pirrolidina
- Purificação das etapas reacionais da síntese das hidrazonas.
- Avaliação das atividades antimicrobianas das novas hidrazonas isoxazolínicas.
- Elucidação dos compostos obtidos.

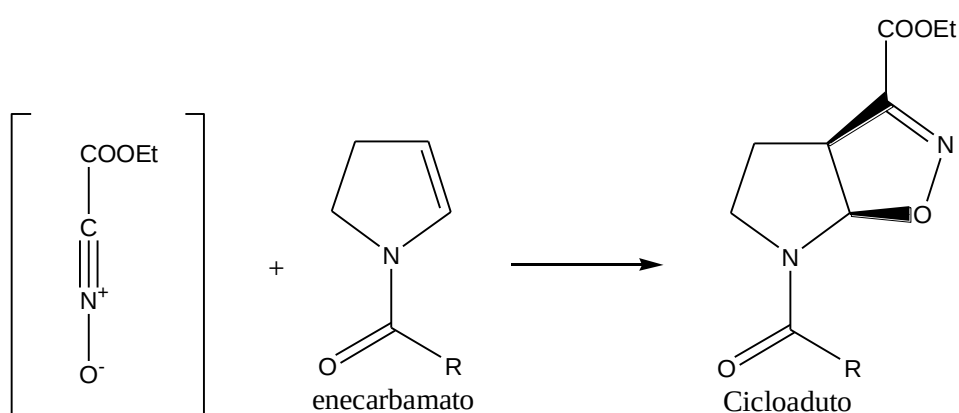
METODOLOGIA

4. METODOLOGIA

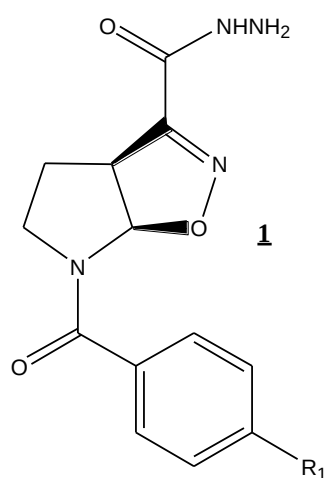
4.1 PARTE QUÍMICA

Em nosso grupo de pesquisa foi desenvolvido uma metodologia sintética envolvendo reações de cicloadição 1,3-dipolar de enecarbamatos de 5 membros com *N*-óxido de nitrila (esquema 01). Dessa forma, foram obtidos cicloadutos contendo heterociclos 2-isoxazolina[5,4-b]pirrolidina com a finalidade de avaliarmos suas potenciais atividades biológicas.

Esquema 01 – Reação de cicloadição 1,3-dipolar



A escolha dos grupamentos benzoila para substituição no nitrogenio N6 e dos aldeídos para formação das hidrazonas a partir de hidrazidas **1**, foi devido a possibilidade da ocorrência da inibição do crescimento microbiano, relatado com bons resultados em estudos do nosso grupo de pesquisa.



$R_1 = (p\text{-F}), (p\text{-Cl})$

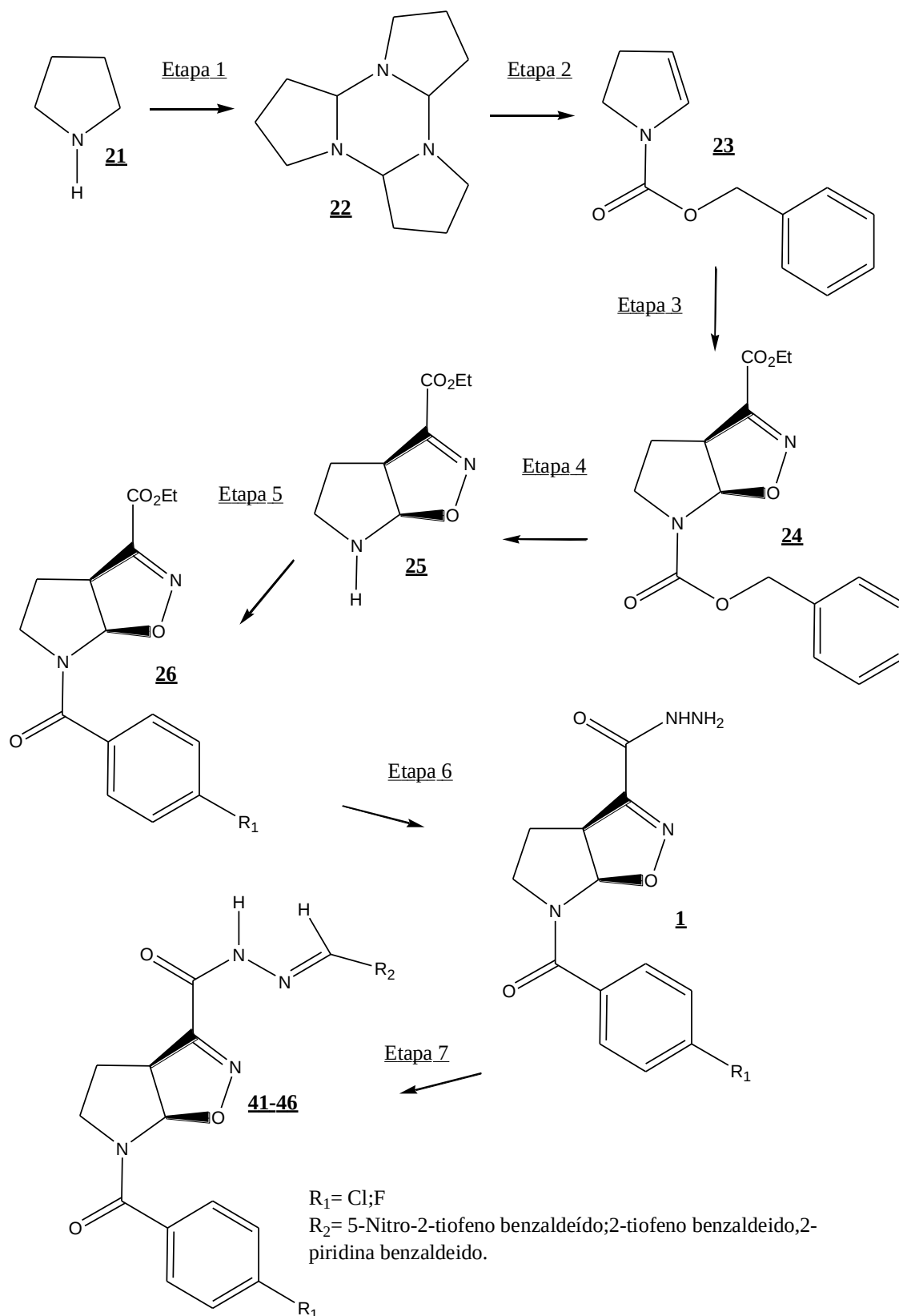
Diante dos resultados apresentados, ampliamos e continuamos o estudo desses derivados hidrazônicos para desenvolvermos novos potenciais antimicrobianos através da nossa metodologia sintética. A metodologia para obtenção dessas estruturas serão descritas em seguida.

I – Estudo Químico: Síntese Orgânica.

I-A Obtenção de hidrazonas derivadas do heterociclo 2-Isoxazolina[5,4-*b*]pirrolidina.

O núcleo 2-isoxazolina[5,4-*b*]pirrolidina, utilizado como núcleo base, tornou possível a obtenção dos novos derivados hidrazônicos. A rota sintética para sua obtenção está descrita no esquema 02 a seguir.

Esquema 02 – Rota sintética para obtenção das hidrazonas derivadas do heterociclo 2-isoxazolina[5,4-*b*]pirrolidina.



- A partir do trímero da 1-pirrolina **22**, obtivemos o enecarbamato *N*-benziloxicarbonil-2-pirrolina **23** através de uma *N*-acilação da pirrolina
- Utilizando a metodologia da reação de cicloadição 1,3-dipolar, as isoxazolinás bíclicas pirrolidínicas esterificadas **24** foram sintetizadas a partir do enecarbamato **23** com o *N*-óxido de nitrila.
- Uma hidrogenólise foi realizada no cicloaduto **24** para remoção do grupamento protetor benziloxicarbonila, formando o cicloaduto desprotegido no nitrogênio N6 da estrutura **25**.
- Em seguida, submetemos o cicloaduto **25** a uma *N*-acilação do nitrogênio N6 com cloretos de benzoila *p*-substituídos.
- Partimos então para a formação das hidrazidas **1** em uma reação entre o cicloaduto **26** com a hidrazina, etapa importante para formação das hidrazonas.
- A hidrazida sintetizada **1** foi submetida a uma condensação com aldeídos para a formação das novas hidrazonas **41-46**.

4.2 PARTE BIOLOGICA

Todos os microorganismos testes são procedentes do Departamento de Antibióticos da UFPE. O estudo de atividade antibacteriana e antifúngica foi realizado segundo o método de difusão em Agar⁽⁶⁾, As hidrazonas, obtidas sinteticamente neste trabalho, foram submetidas aos testes antimicrobianos, em meios de cultura para avaliação das hidrazonas derivados dos bíciclos isoxazolínicos sobre os microorganismos citados abaixo:

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

Foram pesados 5,0 mg de cada uma das hidrazonas 41,42,43,44,45 e 46 a serem testadas e solubilizados em 2,0 mL de uma solução CHCl₃, correspondendo a uma concentração de 2.500 µg/mL. O clorofórmio foi utilizado devido a boa solubilidade das hidrazonas nesse solvente além de evitar a utilização do DMSO, que possui comprovada atividade antimicrobiana.

Discos de papel de filtro com diâmetro de 6 mm foram saturados com 40,0 µL da solução da substância a ser testada, correspondendo a 100,0 µg de cada produto no disco.

Os discos de papel foram deixados dentro da capela para evaporação do solvente. Após completa evaporação do solvente, estes foram aplicados na superfície dos meios de cultura. As placas foram incubadas por 24 horas em estufa à 37° C para as bactérias e 48 horas à 25° C para os fungos. Após incubação, foram efetuadas as leituras dos diâmetros dos halos de inibição em milímetros (mm).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

(PARTE QUÍMICA)

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO (PARTE QUÍMICA)

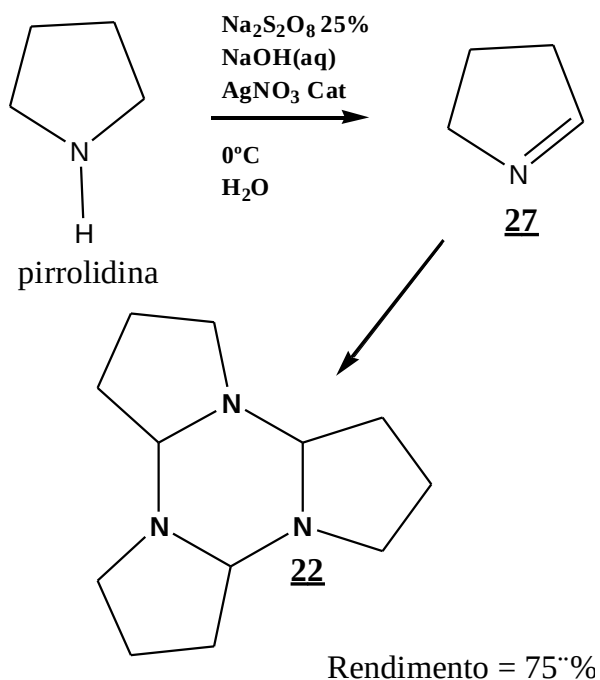
5.1 SÍNTESE DAS HIDRAZONAS DERIVADAS DO *N*-(BENZOIL)-2-ISOXAZOLINA[5,4-*b*]PIRROLIDINA

O material de partida utilizado foi o enecarbamato endocíclico de 5 membros obtido através de uma reação de *N*-acilação da pirrolina, proveniente do seu respectivo trímero à -78 °C. Dessa forma, demos início a síntese conforme as etapas relatas a seguir

5.1.1 Preparação do trímero da 1-pirrolina 22

Através de uma oxidação catalítica da pirrolidina pelo persulfato de sódio, obtivemos a Δ^1 -pirrolina 27. Essa reação foi realizada em meio básico utilizando como catalizador o nitrato de prata (AgNO_3). O trímero da pirrolina 22 foi obtido ainda em meio reacional por conta da instabilidade e reatividade do composto da Δ^1 -pirrolina 27, apresentando uma boa estabilidade (Esquema 03).

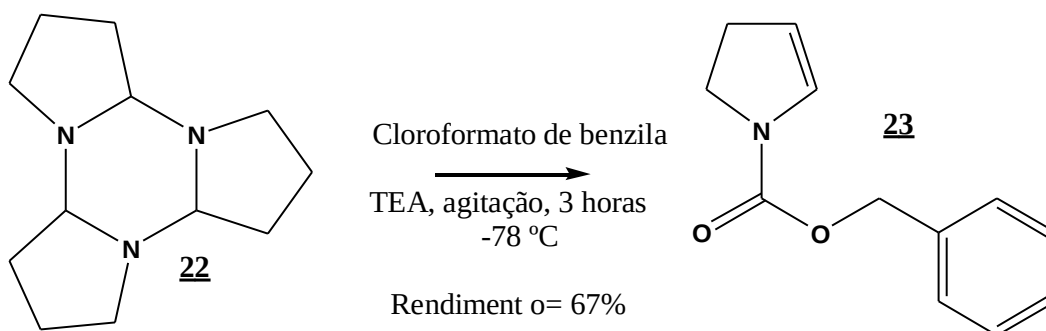
Esquema 03. Obtenção do trímero da pirrolina 22



5.1.2 Síntese do enecarbamato endocíclico N-(BENZILOXICARBONIL)-2-PIRROLINA 23

Após a obtenção do trímero da Δ^1 -pirrolina 22, partimos para a obtenção do enecarbamato endocíclico de 5 membros 23, metodologia amplamente dominada pelo grupo de pesquisa⁽³⁹⁾. Através da N-acilação do trímero da Δ^1 -pirrolina 22 com o grupo protetor carbamato de benzila (CBZ), obtivemos o enecarbamato endocíclico de 5 membros protegido 23, com um rendimento de 67% (Esquema 04).

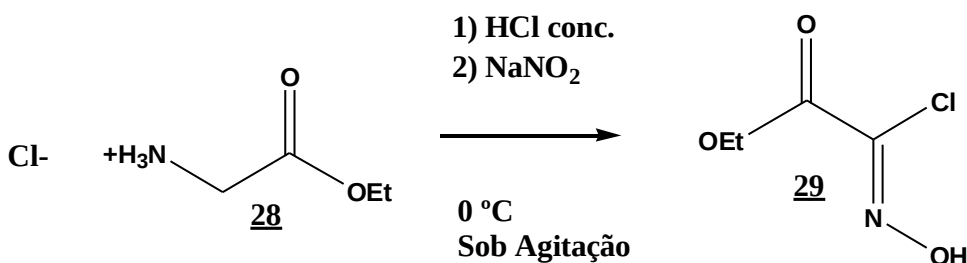
Esquema 04. Obtenção do enecarbamato endocíclico de 5 membros protegido



5.1.3 Síntese do clorooximidoacetato de etila, precursor do N-óxido de nitrila – CEFNO 29

O clorooximidoacetato de etila 29 foi obtido em meio ácido (HCl) através de uma reação de oxidação, utilizando o nitrito de sódio (NaNO_2), da glicina esterificada 28, obtendo-se um pó branco (Esquema 05).

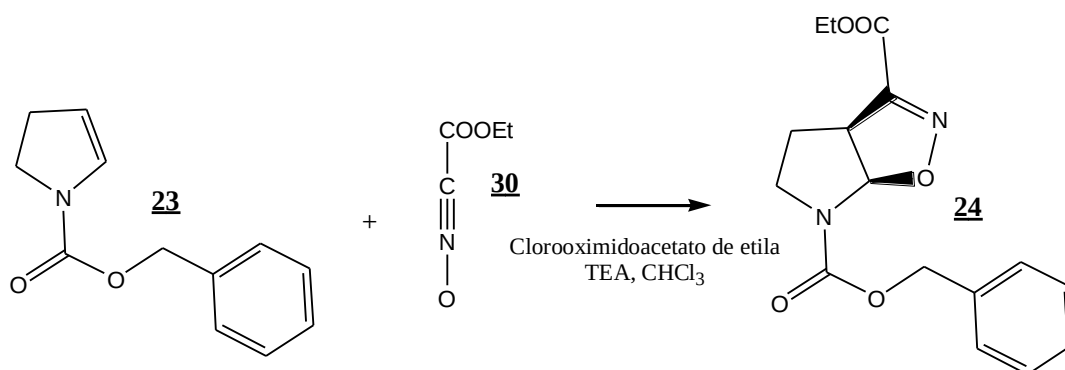
Esquema 05. Obtenção do clorooximidoacetato de etila



5.1.4 Síntese do ester isoxazolinico 24, através da reação de cicloadição 1,3 dipolar

O Cicloaduto do ester isoxazolinico 24 foi obtido através da reação desenvolvida por nosso grupo de pesquisa. A reação acontece através da cicloadição 1,3-dipolar do N-óxido de nitrila (formado durante a reação) com o enecarbamato endocíclico de 5 membros 23, formando a forma racêmica do mesmo (Esquema 06).

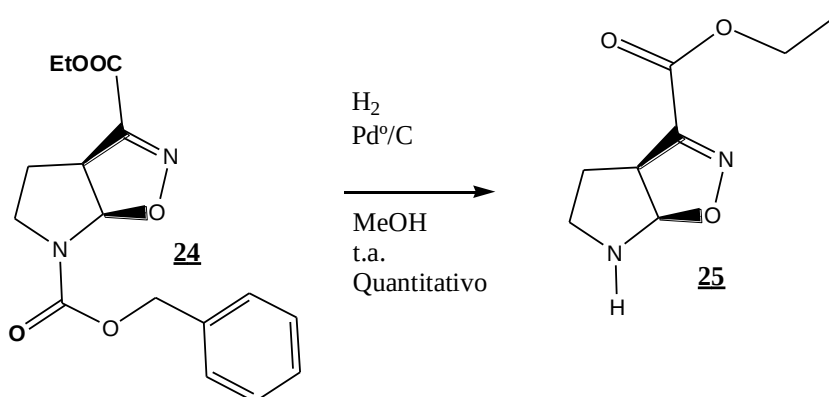
Esquema 06. Obtenção do cicloaduto de ester isoxazolinico 24



5.1.5 Reação de desproteção do 41 nitrogenio pirrolidinico de 24

Com a finalidade de obtermos uma izoxazolina benzoilada 26, partimos para a desproteção do heterociclo da 2-isoxazolina 24 através da reação de hidrogenólise, retirando o carbamato de benzila (CBZ) anteriormente introduzido e obtendo-se um isoxazolina desprotegida 25 pronta para uma N-benzoilação no nitrogênio N6 (esquema 07).

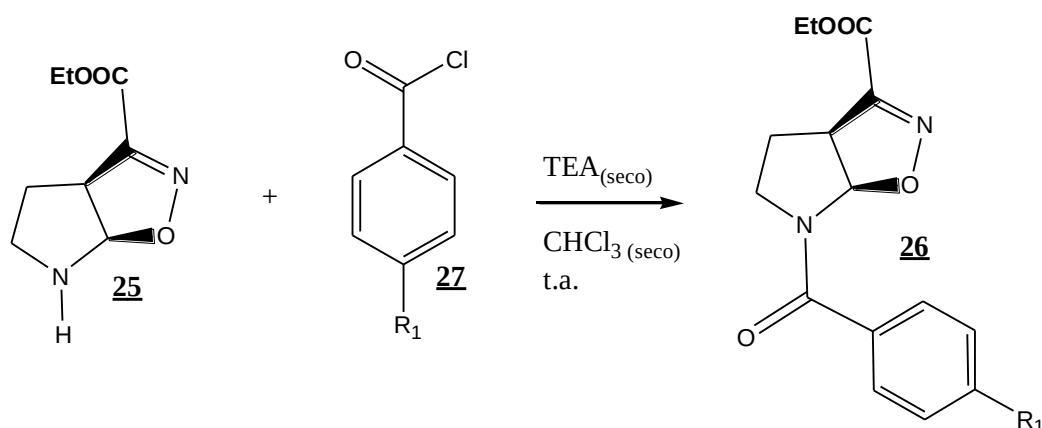
Esquema 07. Obtenção da isoxazolina desprotegida 25



5.1.6 Reação de N-benzoilação da isoxazolina desprotegida **25** com cloretos de benzoila para substituídos **27**.

Para fazermos a N-Benzoilação, O Cicloaduto do ester ixoxazolínic desprotegido **25** foi colocado para reagir com o cloreto de benzoila para-substituído **27** e através de reações de cicloadição 1,3 dipolar, foram sintetizadas as N-benzoil-izoxazolina **26** de acordo com o grupo R^1 (Esquema 08).

Esquema 08. Reação de n-benzoilação da isoxazolina desprotegida com cloretos de benzoila



5.1.7 Síntese da hidrazida **1** derivada do heterociclo 2-isoxazolina[5,4-*b*]pirrolidina **26**.

As hidrazidas **31** obtidas foram sintetizadas através da reação entre a hidrazina com as isoxazolinas pirrolidínicas **26** (esquema 09). As isoxazolinas foram solubilizadas em etanol e adicionou-se a hidrazina a 80%. A reação em agitação, após 1 hora houve a formação da hidrazida, sendo confirmada através de CCD.

Essa etapa é de grande importância pois para a formação das hidrazonas na etapa seguinte necessitamos que aconteça a formação da hidrazida na posição 3 do anel isoxazolínic.

As hidrazidas foram identificadas por métodos espectrométricos ^1H RMN e ^{13}C RMN. Os espectros de ^1H RMN e IVFT da hidrazida **31** estão demonstrados na figura 08 e 09. Analisando os sinais, em 4,55 ppm observamos um sinal referente aos hidrogênios NH_2 da hidrazida. Devido à presença de rotâmeros, observamos um sinal largo duplicado em 6,2 ppm e 6,62 ppm referente ao hidrogênio do metino, α ao

nitrogênio na junção dos anéis. O hidrogênio NH da hidrazida apresenta-se como um singlete em 9,84 ppm.

Esquema 09. Síntese da hidrazida derivada do heterociclo 2-isoxazolina[5,4-*b*]pirrolidina

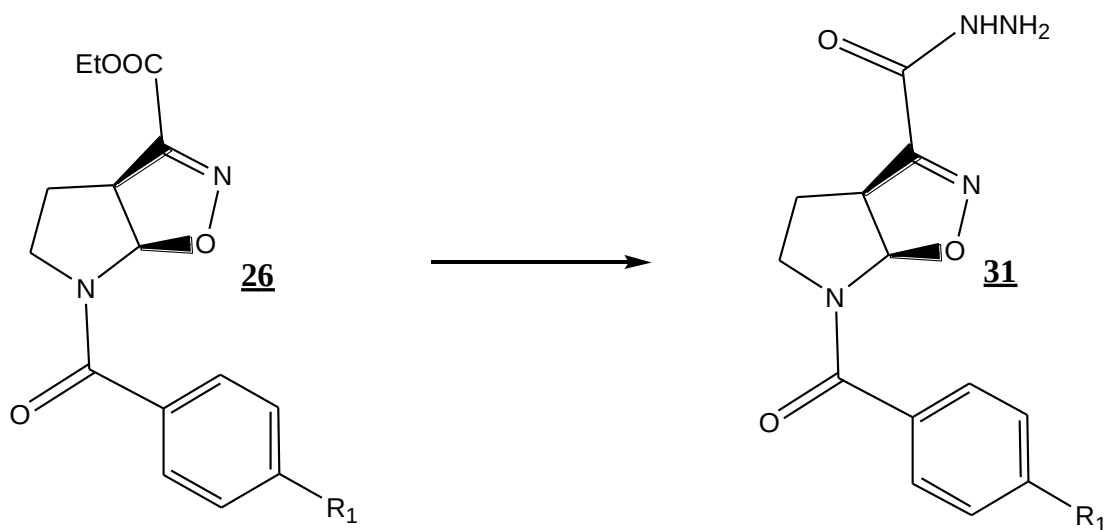


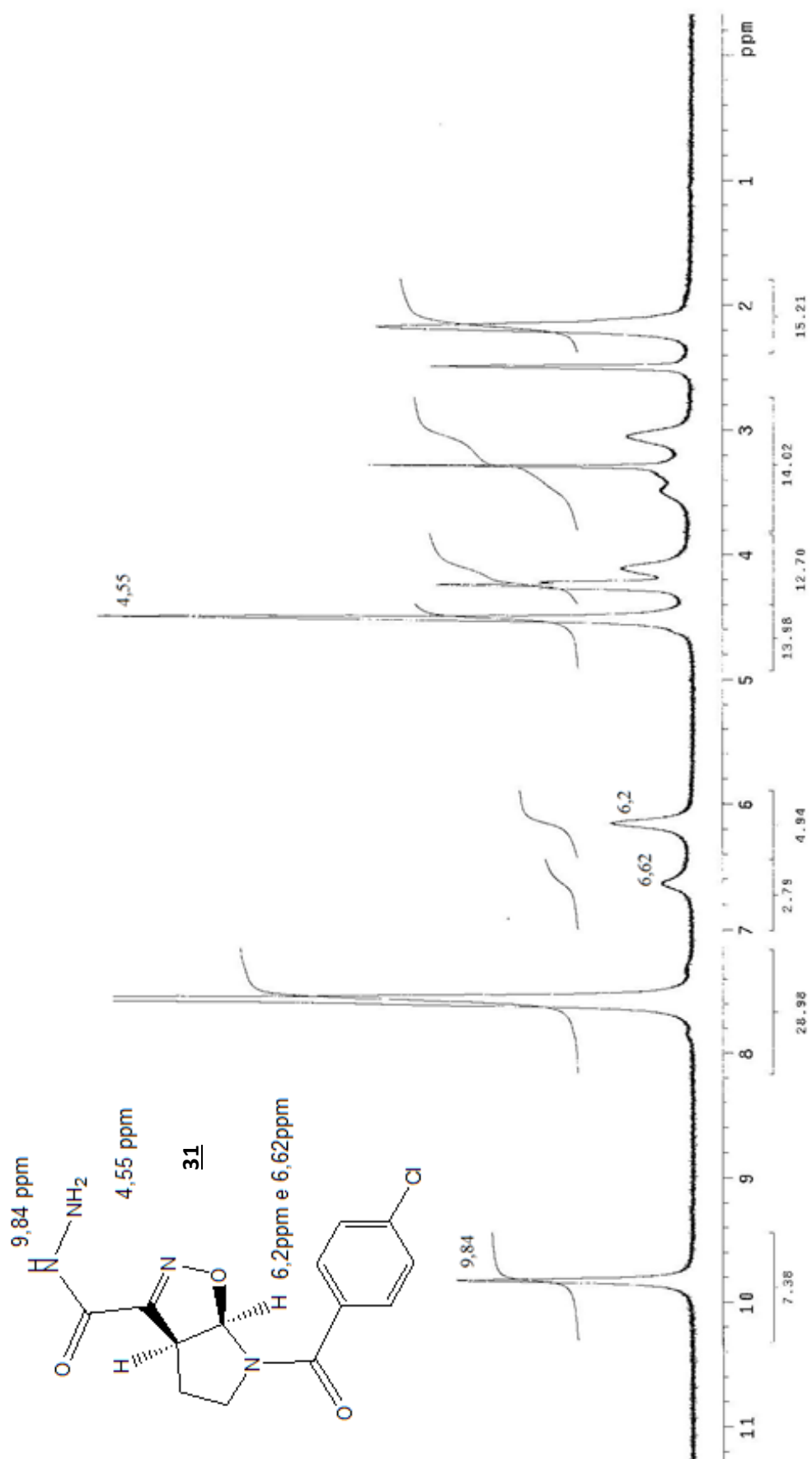
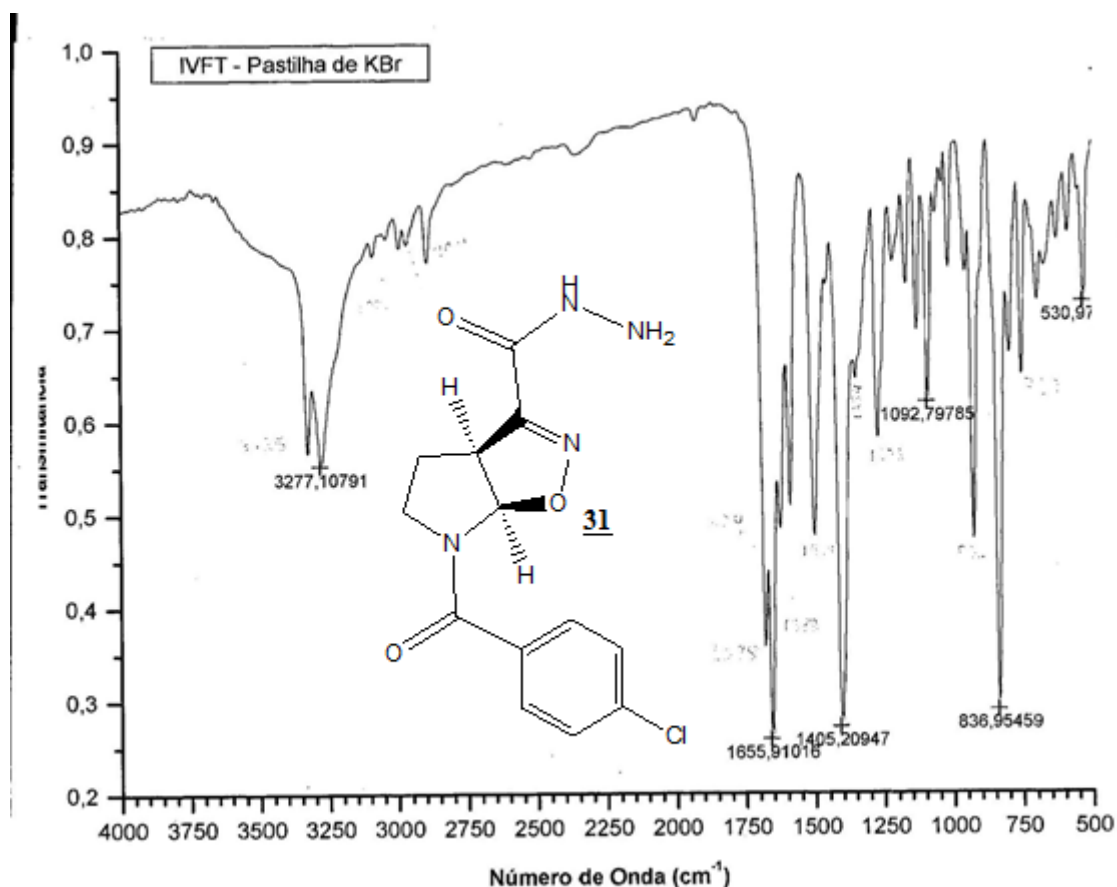
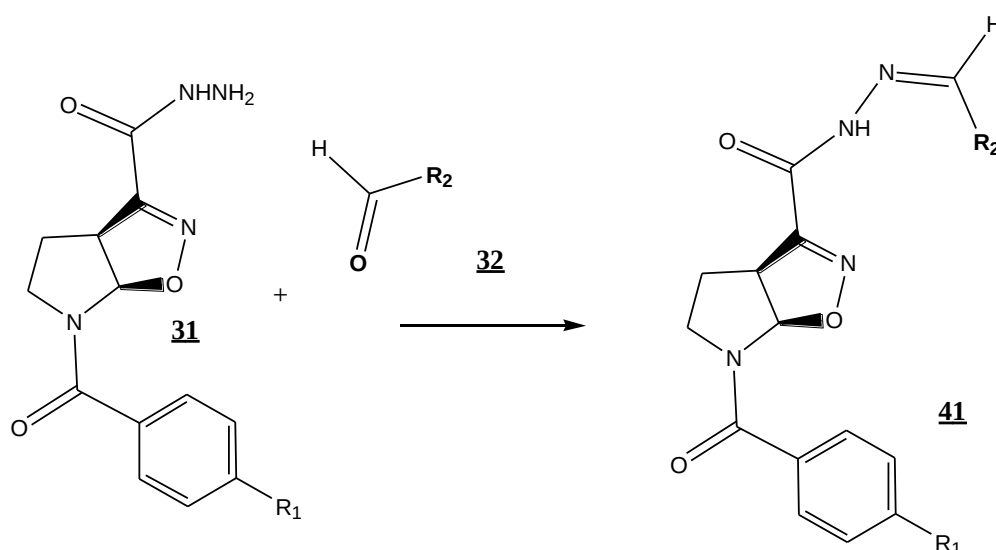
Figura 08 – Espectros de ^1H RMN da hidrazida 31

Figura 09 – IVFT da hidrazida 31

5.1.8 Síntese das hidrazonas 20 derivadas do heterobícclo 2-isoxazolina [5,4-*b*]pirrolidina

Através da condensação das hidrazidas 1 com aldeídos aromáticos (Figura 10), foi possível a obtenção das hidrazonas 41-46. Essa reação já foi realizada em nosso grupo de pesquisa e é bem descrito na literatura⁽³³⁾, conforme o esquema 10.

As hidrazidas 1 foram solubilizadas em etanol, contendo o HCl concentrado (2 gotas) para funcionar como catalisador da reação. O aldeído aromático foi adicionado sobre esta solução a temperatura ambiente, durando em torno de 1 hora, havendo uma precipitação no meio reacional indicando a formação da hidrazona. O meio reacional foi resfriado em banho de gelo e neutralizado com bicarbonato de sódio 10%. Adicionamos ainda o etanol para res cristalização, sendo filtrada em funil sinterizado e seco em recipiente contendo cloreto de cálcio.

Esquema 10. Síntese das hidrazonas derivadas do heterobícclo 2-isoxazolina [5,4-*b*] pirrolidina

As hidrazidas **1** formadas variaram conforme o cloreto de benzoil utilizado na etapa de *N*-benzoilação (*p*-Cl e *p*-F) e também nos aldeídos utilizados, nos sintetizando 06 novos derivados hidrazônicos. A figura 10 nos mostra os aldeídos utilizados na reação de condensação e a tabela 01 nos mostra os rendimentos das hidrazonas formadas.

Figura 10 – Aldeídos aromáticos

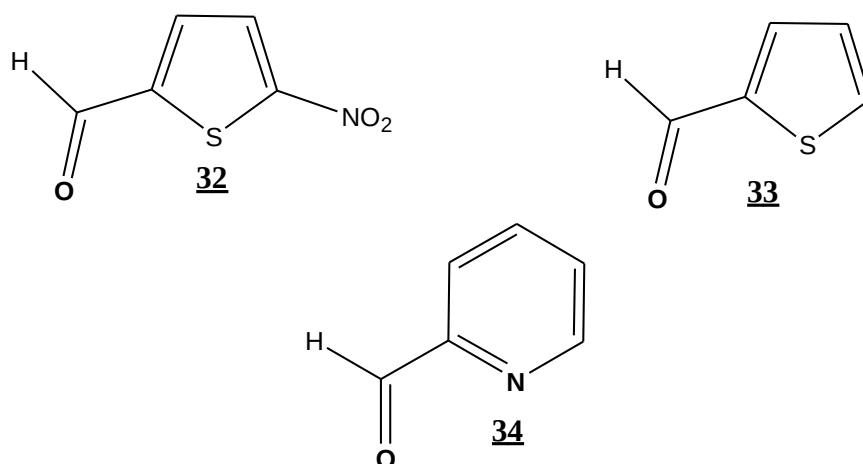


Tabela 01 – Rendimentos das hidrazonas sintetizadas

R¹	Aldeídos	Rendimento
Cl	5-Nitro-2Tiofeno benzaldeido	77%
Cl	2-Tiofeno benzaldeido	71%
Cl	2-Piridina benzaldeido	50%
F	5-Nitro-2Tiofeno benzaldeido	51%
F	2-Tiofeno benzaldeido	38%
F	2-Piridina benzaldeido	24%

Os rendimentos apresentaram-se abaixo da faixa relatada em outros estudos realizados. As hidrazonas N- 4-fluorobenzoiladas foram obtidas com rendimentos baixos, porem isso foi devido a perdas do produto durante o procedimento de purificacao em hexano.

Uma análise minuciosa por métodos espectrométricos (¹H RMN, ¹³C RMN e IV-FT) das Hidrazonas foi realizada para determinação da estrutura.

A figura 11 e 12 mostra a hidrazona **35** com os sinais de ¹H RMN. O hidrogênio característico do CH=N, apresentou-se como um singlete, integrando para um único hidrogênio, possuindo um deslocamento entre 8ppm e 9ppm, próximos aos hidrogênios aromáticos. Um singlete próximo a 10ppm foi observado, sendo esse sinal característico do hidrogênio NN-H das hidrazonas, conforme descritos na literatura. Os demais pontos são característicos da estrutura.

No espectro de IVFT, as bandas correspondentes aos hidrogenios caracteristicos de hidrazonas estao em torno de 3274-3472 cm⁻¹ (Figura 13)

Figura 11 – Hidrazona 35 com seus deslocamentos químicos no ^1H RMN

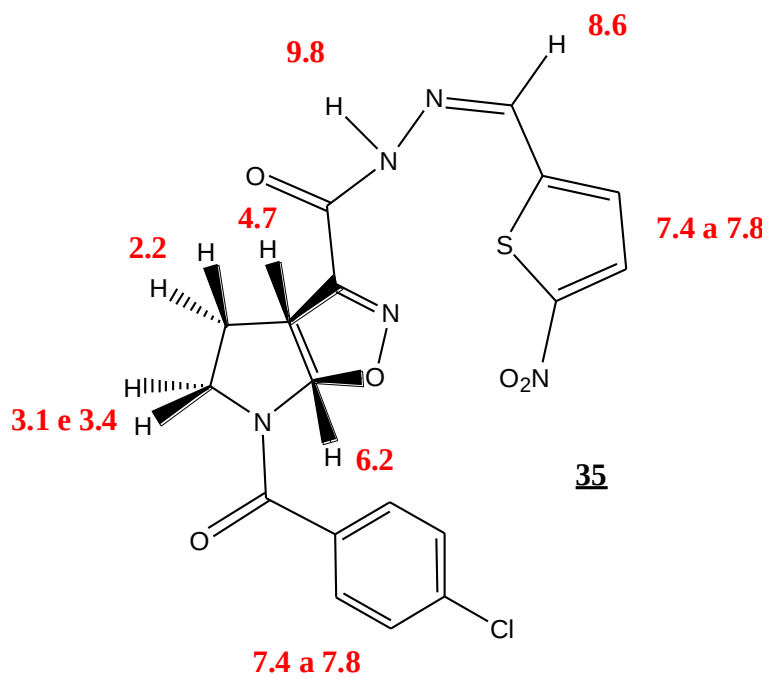


Figura 12 – Espectros de ^1H RMN da hidrazona 35

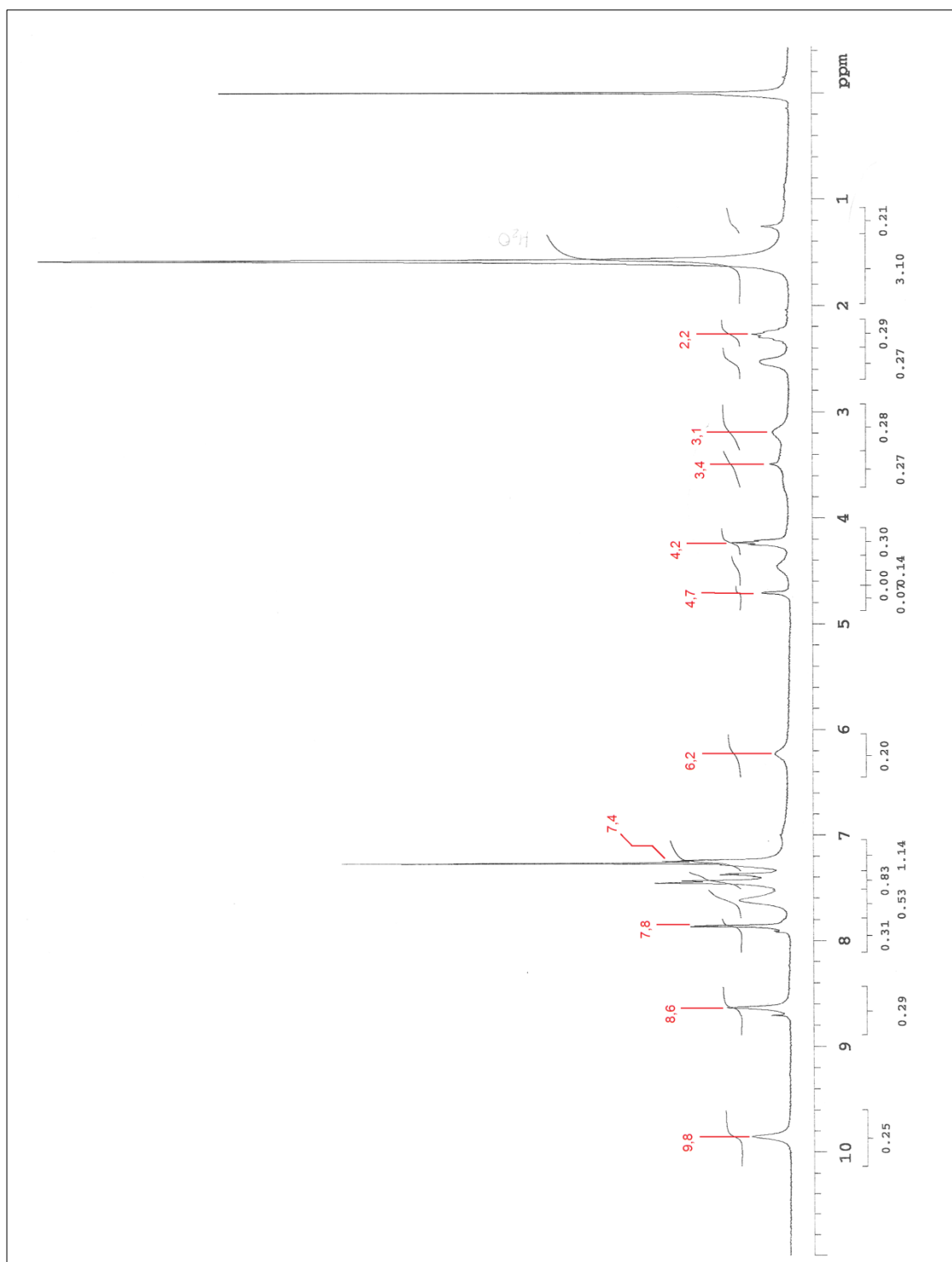
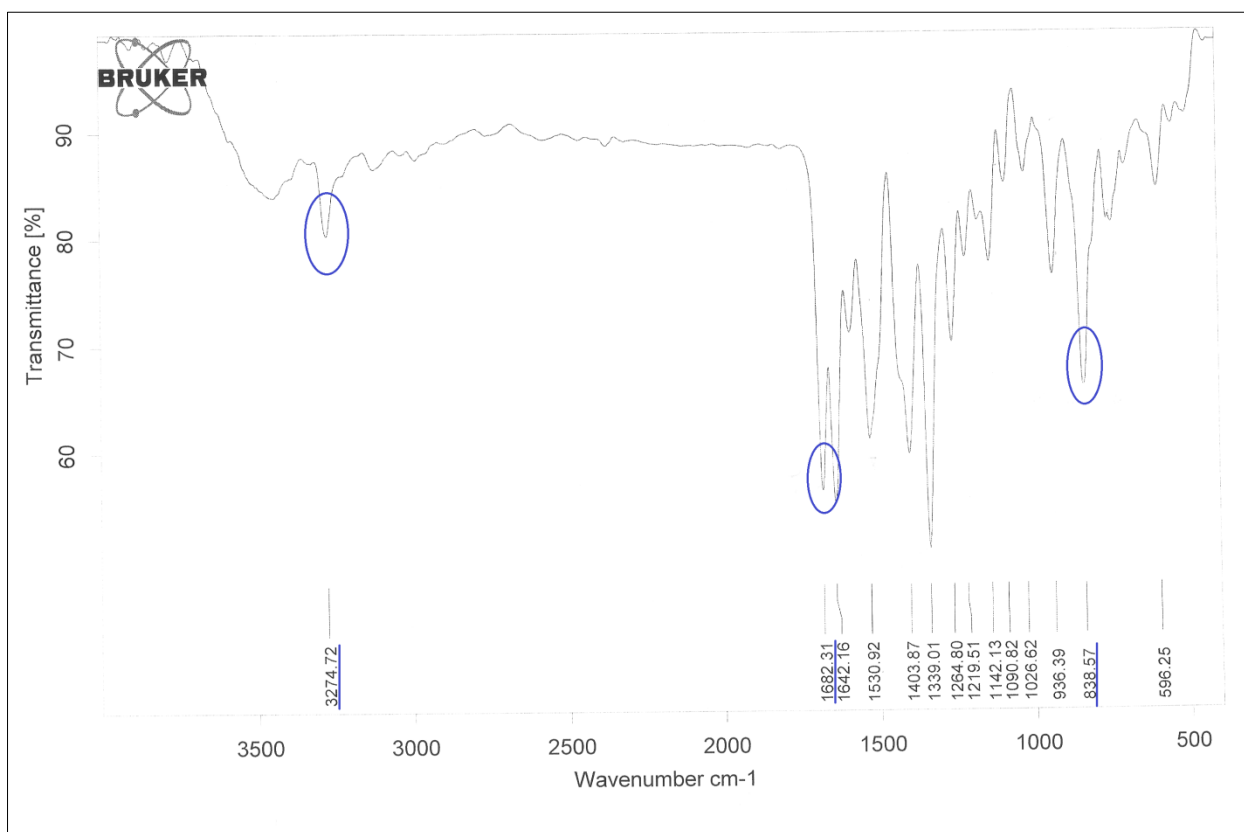


Figura 13 – IVFT da hidrazona 35

RESULTADOS E DISCUSSÃO

(PARTE BIOLOGICA)

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO (PARTE BIOLÓGICA)

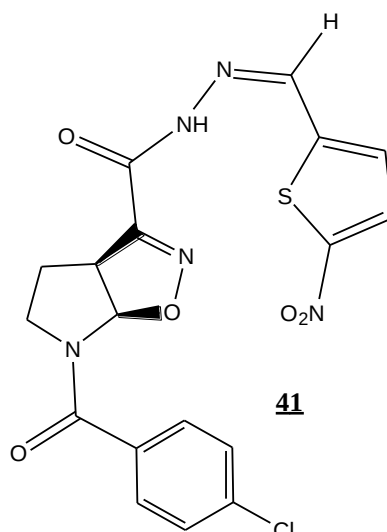
As hidrazonas foram submetidas, em triplicata, a testes antimicrobianos para as bactérias (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*) e para os fungos (*Candida albicans*, *Candida krusei*). Na literatura, os derivados de isoxazolinias possuem uma boa atividade para os microorganismos testados como a *Klebsiella pneumoniae*⁽⁸⁾.

As novas hidrazonas isoxazolinicas formaram halos pouco expressivos, não inibindo satisfatoriamente o crescimento das bactérias analisadas, conforme a tabela 02.

Tabela 02 - Halos de inibição (mm) produzidas pelas hidrazonas nos microorganismos avaliados

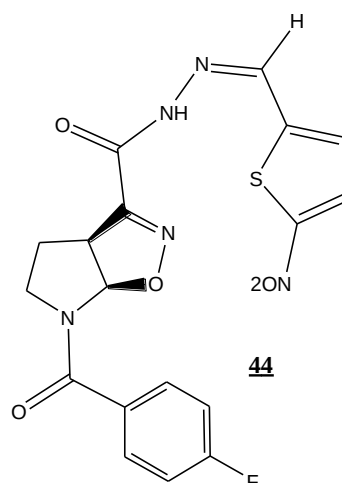
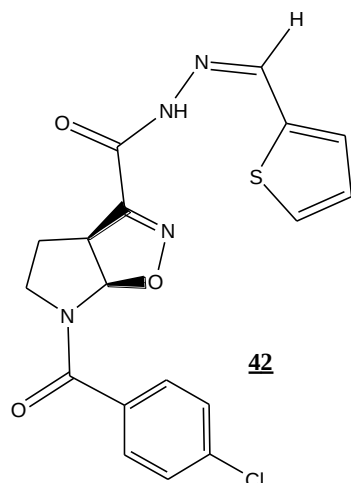
	41	42	43	44	45	46
<i>Staphylococcus aureus</i>	11/11/-	- / - / -	11/11/-	11/-/11	- / - / -	- / - / -
<i>Bacillus subtilis</i>	13/-/12	11/11/11	- / - / -	11/11/-	- / - / -	- / - / -
<i>Micrococcus luteus</i>	- / - / -	- / - / -	- / - / -	11/-/-	- / - / -	- / - / -
<i>Enterococcus faecalis</i>	- / - / -	- / - / -	- / - / -	- / - / -	- / - / -	- / - / -
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	- / - / -	- / - / -	- / - / -	- / - / -	- / - / -	- / - / -
<i>Candida albicans</i>	- / - / -	- / - / -	- / - / -	- / - / -	- / - / -	- / - / -
<i>Candida krusei</i>	- / - / -	- / - / -	- / - / -	- / - / -	- / - / -	- / - / -

As novas hidrazonas isoxazolinicas apresentaram um halo menor que 15,0 mm para os microorganismos testados, sendo a hidrazona que apresentou o maior halo de inibição a hidrazona **41**, com 13 mm de halo de inibição para o microorganismo *Bacillus subtilis* e de 11 mm de halo de inibição para o microorganismo *Staphylococcus aureus*. Essa mesma hidrazona **41** não apresentou atividade antifúngica, não apresentando nenhum halo de inibição para os fungos analisados.



As demais hidrazonas **42** e **44** apresentaram uma atividade antibacteriana para o *Bacillus subtilis* menor que a hidrazona **41**, possivelmente o grupo nitro presente na posição 5 do aldeído introduzido no derivado isoxazolílico influencia nas atividades contra esses microorganismos.

A hidrazona **44** apresentou ainda atividade para os microorganismos *Staphylococcus aureus* e *Micrococcus luteus* com o mesmo halo de 11 mm de inibição.



A hidrazona **43** apresentou atividade antibacteriana apenas contra o *Staphylococcus aureus*, com mesmo halo de inibição da hidrazona **41** de 11 mm.

As hidrazonas **45** e **46** que produzida a partir da condensação da hidrazida com o aldeído contendo 2-tiofeno **33** e 2-piridina **34**, não produziu nenhuma atividade contra os microorganismos testados e as demais hidrazonas apresentaram uma

baixa inibição. Em trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa, hidrazonas sintetizadas apresentaram um bom potencial antimicrobiano, com halos de inibição de até 21 mm sobre o microorganismo *Staphylococcus aureus*⁽⁶⁾. Os aldeídos introduzidos no heterociclo da hidrazida contendo o núcleo da 2-isoxazolina pouco influenciaram na atividade antimicrobiana da estrutura apesar do halo de inibição de 13 mm apresentado pela hidrazona **41**.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

7. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

7.1 MATERIAL E MÉTODOS

A síntese do enecarbamato endocíclico de 5 membros assim como a reação de cicloadição 1,3-dipolar são sensíveis a umidade, sendo realizadas com materiais precientemente secos em estufa por no mínimo 4h a 120 °C e sob atmosfera de argônio.

A trietilamina (TEA) foi tratada com hidreto de cálcio e destilado antes da sua utilização. O tetrahidrofurano (THF) foi tratado com sódio/benzofenona e foi previamente destilado antes do seu uso. Na reação de hidrogenólise utilizamos a reação sob pressão positiva de hidrogênio através do seu borbulhamento durante 1h.

A cromatografia em camada delgada (CCD) foi realizada em cromatofolhas de alumínio (gel de sílica 60), com espessura de 0,2 mm, contendo indicador para 254 nm. Através de uma lâmpada de U.V. ENF – 2400 C/F, ácido fosfomolibdico 7% em etanol e absorção de iodo, foi possível a visualização das manchas na placa cromatográfica.

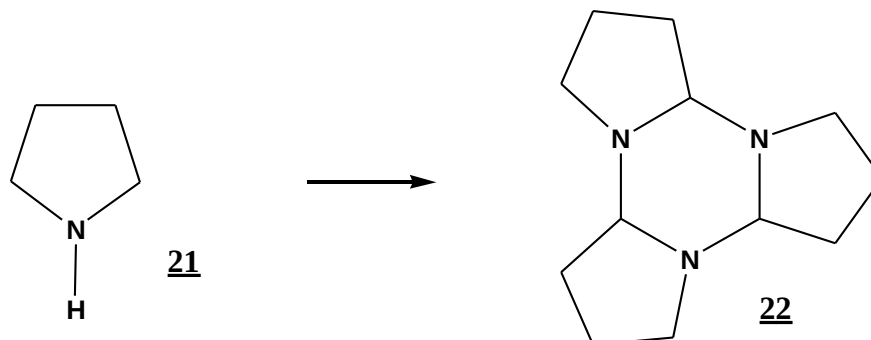
As colunas cromatográficas realizadas utilizaram o gel de sílica 60 (230 – 400 mesh) e eluidas sob pressão (coluna flash).

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

Os espectros de ^1H RMN foi obtido em aparelhos Varian Unity 400 MHz. O padrão interno utilizado foi o tetrametilsilano. Os sinais dos espectros de ^1H RMN são designados da seguinte forma: deslocamento químico (ppm), multiplicidade (s=singlete, d=dublete, dl=dublete largo, t=triplete, tl=triplete largo, q=quarteto, dd=duplo dublete, dt=duplo triplete, ddl=duplo dublete largo, m=multiplete, ml=multiplete largo, sl=sinal largo), constate de acoplamento (Hz) e número de hidrogênios.

7.2 SÍNTESE RACÊMICA DE DERIVADOS DE 2-ISOXAZOLINAS PIRROLIDÍNICAS

7.2.1 Síntese do trímero da Δ^1 -Pirrolina 22



Para formação do trímero da Δ^1 -pirrolina **22** foram utilizados 108 mmols (equivalentes a 8,7mL) de uma solução de pirrolidina **21**, 215 mmols (equivalentes a 8,61g) de hidróxido de sódio e 0,48 mmols (equivalentes a 0,088g) de nitrato de prata em 90 mL de água destilada em um balão de 500 mL em agitação à 0°C. Com um funil de adição de 100 mL, iniciou-se a adição de 107,9 mmols (equivalentes a 33,82g) de persulfato de sódio 25% em 90 mL de água destilada. Do início ao fim da adição a reação é deixada a 0°C em agitação. Ao término da adição a reação continua em agitação a 0°C durante 1 hora, deixando a temperatura ambiente em agitação durante 3 horas.

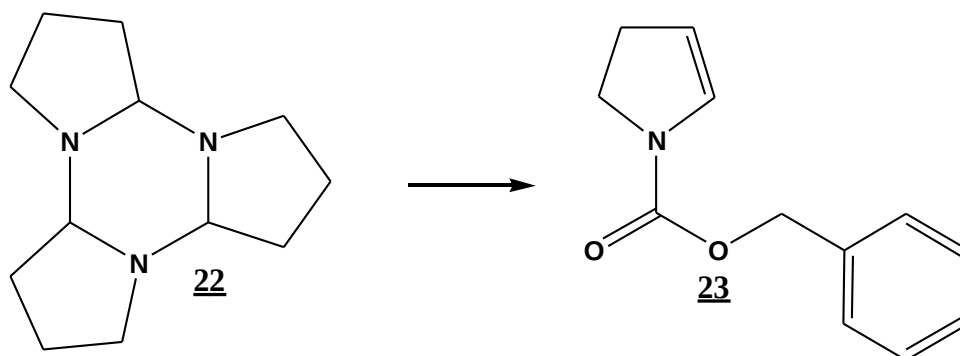
Passado o tempo da reação iniciamos a extração utilizando 90mL de Diclorometano em 3 etapas com um funil de extração de 250mL. Após a extração, a fase orgânica foi secada com sulfato de sódio anidro e o solvente removido no rotaevaporador, obtendo-se 4,6g de um óleo amarelado, sendo a reação de um rendimento de 65%.

DADOS ESPECTROMÉTRICOS

¹H RMN (CDCl₃, ppm, 300 MHz, t.a.).

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

7.2.2 Síntese do n-(benziloiloxycarbonil)-2-pirrolina 23



Utilizando um microdestilador, iniciamos a destilação de uma solução obtida de 4,6g do trímero da Δ^1 -pirrolina 22 em 217 mL de Tetrahidrofurano (THF), recolhendo o destilado em um balão de 2 bocas de 500 mL pré-resfriado 0°C.

Ao término da destilação, a solução destilada foi colocada em agitação e aquecimento até entrar em refluxo. Nesse momento foi adicionado com uma seringa de 20 mL, 43,2 mmols (equivalentes a 6,2 mL) de Trietilamina (TEA) e com uma seringa de 50 mL, 44,4 mmols (equivalentes a 15,16 mL) do clorofornato de benzila em tolueno a 50%. A reação foi deixada durante 4 horas em agitação e aquecimento.

Após as 4 horas de reação, foi realizada a filtração da suspensão obtida em um funil sinterizado, obtendo-se um líquido amarelo após a remoção do solvente. Realizamos uma coluna cromatográfica para purificação do N-(benziloiloxycarbonil)-2-pirrolina 23 pois havia a presença de alguns subprodutos da reação. Utilizamos o Hexano na coluna cromatográfica e recolhemos 80 mL do solvente antes de iniciarmos o sistema de Acetato de etila/Hexano (1 : 9). Recolhemos 38 tubos onde o enecarbamato 23 foi identificado nos tubos 13 ao 23 através da realização de placas cromatográficas (CCD), removendo-se o solvente e obtendo-se 3 g do N-(benziloiloxycarbonil)-2-pirrolina 23, um líquido incolor.

DADOS ESPECTROMÉTRICOS

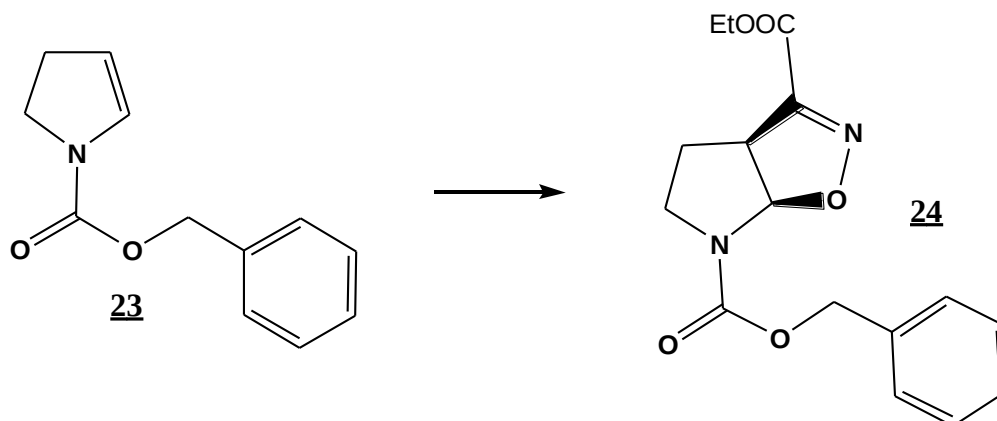
^1H RMN (CDCl_3 , ppm, 300 MHz, t.a.), presença de rotâmeros.

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

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

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

7.2.3 Síntese do ester 6-benzil-3-etil do ácido 3a,4,5,6a-tetrahidropirroló [3,2-d]isoxazol-3,6-dicarboxílico



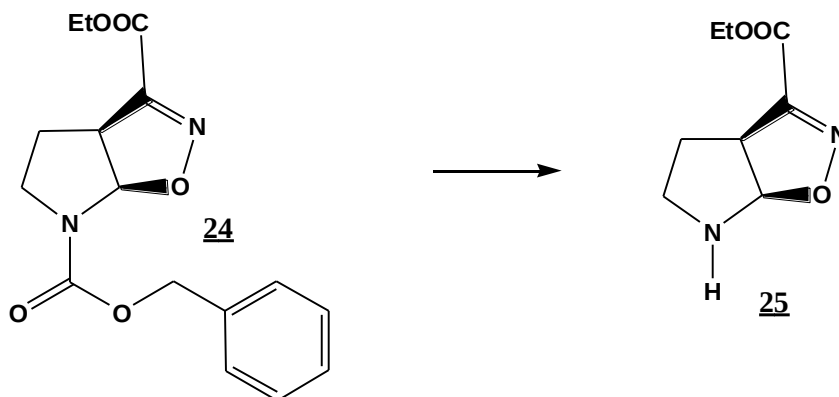
Em um balão contendo o N-(benziloxicarbonil)-2-pirrolina **23**, foi adicionado 60mL de clorofórmio e 2,6 mL de Trietilamina previamente destilados. Em seguida foi colocado o funil de adição com 2,58g do cloroximidoacetato de etila previamente solubilizado em clorofórmio. Iniciou-se a adição gota a gota. Ao término da adição, a reação continuou por mais 2 horas em agitação e foi realizada uma CCD para observar a formação do cicloaduto **24**. Foi realizada uma extração e evaporou-se o solvente. O sal formado foi filtrado em funil sinterizado utilizando uma mistura de acetato/hexano 40%. Removendo-se o solvente obtivemos um óleo amarelo viscoso que foi submetido a cromatografia em coluna, obtendo-se 3,5g do cicloaduto **24**.

DADOS ESPECTROMÉTRICOS

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

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

7.2.4 Síntese do éster 3-etil do ácido 3a,4,5,6^a-tetrahidropirrólo [3,2-d]isoxazol-3-carboxílico 25



No cicloaduto do éster 3-etil do ácido 3^a,4,5,6^a-Tetrahidropirrólo [3,2-d]isoxazol-3-carboxílico 24 contido em um balão de 250 mL, foram adicionados 185 mL de metanol e 0,15g de paládio/carbono 10%, deixando a reação em agitação. Em seguida, borbulha-se o gás hidrogênio deixando a reação durante 1 hora em agitação sob pressão positiva.

Após 1 hora de reação, remove-se o metanol e solubiliza-se em clorofórmio, sendo seca em sulfato de sódio anidro, filtrada em funil sinterizado e removido o clorofórmio, obtendo-se 1,8g do cicloaduto da isoxazolina desprotegida pura 25. O rendimento dessa reação é de 100% e não foi necessário a realização de coluna cromatográfica para purificação do produto.

DADOS ESPECTROMÉTRICOS

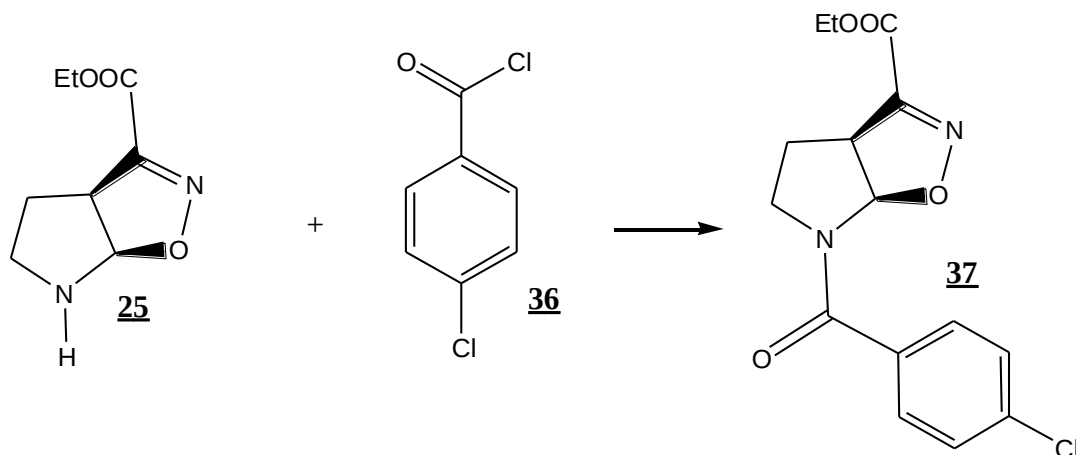
¹H RMN (CDCl₃, ppm, 300 MHz, t.a.), presença de rotâmeros.

¹H RMN (CDCl₃, ppm, 300 MHz, t.a.), 6,07 (d; J= 6,9 Hz; 1H); 4,32 (m; 2H); 3,87 (m; 1H); 3,12 (m; 1H); 2,81 (m; 2H); 2,07 (m; 2H); 1,35 (t; J= 6 Hz; 3H).

¹³C RMN (CDCl₃, ppm, 75 MHz, t.a.).

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

7.2.5 Síntese do ester 3-etil do ácido 6-(4-clorobenzoil)-4,5,6a-tetrahidro-3aH-pirrólo [3,2-d]isoxazol-3-carboxílico 37



Em um balão de 250 mL foram adicionados 9,78mmols (equivalentes a 1,8g) da isoxazolina N- desprotegida **25**, 1,3 mL de trietilamina seca e 125 mL de clorofórmio seco. Adiciona-se lentamente com uma seringa de 5 mL na reação em agitação 9,78 mmols (equivalentes a 1,7g) de cloreto 4-clorobenzoila **36**. Após a adição, deixa-se a reação em agitação durante 1 hora a temperatura ambiente.

Em seguida ao término da reação, remove-se o solvente. A isoxazolina N-benzoilada **37** é purificada através da cromatografia em coluna utilizando Acetato de etila/hexano 3 : 7, obtendo-se 2,0g do N-(4-clorobenzoil)-isoxazolina **37**. Essa reação possui um rendimento de 62%

DADOS ESPECTROMÉTRICOS

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

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

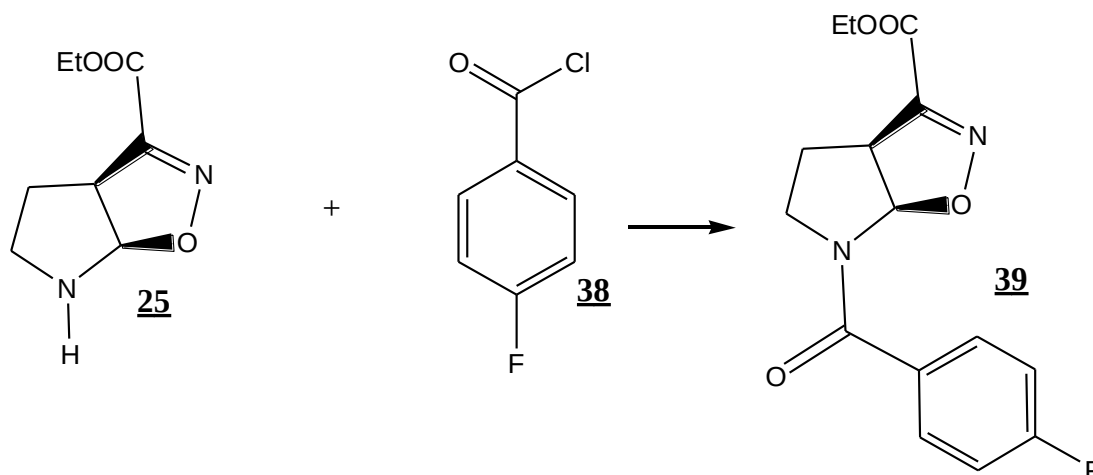
¹³C RMN (CDCl₃, ppm, 75 MHz, t.a.)

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

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

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

7.2.6 Síntese do ester 3-etil do ácido 6-(4-fluorobenzoil)-4,5,6a-tetrahidro-3aH-pirrólo [3,2-d]isoxazol-3-carboxílico **39**



Em um balão de 250 mL foram adicionados 9,78mmols (equivalentes a 1,8g) da isoxazolina N- desprotegida **25**, 1,3 mL de trietilamina seca e 125 mL de clorofórmio seco. Adiciona-se lentamente com uma seringa de 5 mL na reação em agitação 9,78 mmols (equivalentes a 1,5g) de cloreto 4-fluorobenzóila **38**. Após a adição, deixa-se a reação em agitação durante 1 hora a temperatura ambiente.

Em seguida ao término da reação, remove-se o solvente. A isoxazolina N-benzóilada **39** é purificada através da cromatografia em coluna utilizando Acetato de etila/hexano 3 : 7, obtendo-se 1,5g do N-(4-clorobenzóil)-isoxazolina **39**. Essa reação possui um rendimento de 51%

DADOS ESPECTROMÉTRICOS

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

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

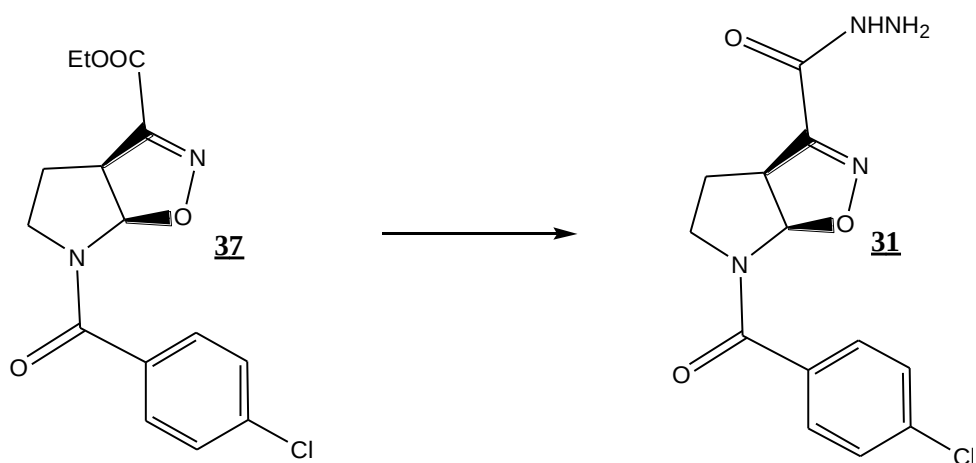
¹³C RMN (CDCl₃, ppm, 75 MHz, t.a.)

14,08 (CH₃); 27,95 (CH₂); 43,53 (CH₂); 51,19 (CH); 62,4 (CH₂); 96,17 (CH); 115,6 (d; J= 21,5 Hz; CH); 130,4 (CH); 164,1 (d; J= 250,0 Hz; C-F); 131,0 (C); 152,4 (C); 159,8 (C=O); 168,7 (C=O).

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

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

7.2.7 Síntese da hidrazida do ácido 6-(4-clorobenzoil)-4,5,6a-tetrahidro-3aH-pirrólo [3,2-d]isoxazol-3-carboxílico 31



Em um balão de 100 mL foram adicionados 6,29 mmols (equivalentes a 200mg) do ester da isoxazolina 37 e em seguida foram colocados 3 mL de etanol absoluto. A solução em agitação foi adicionada 6,29 mmols da hidrazina 80%. A reação foi mantida a temperatura ambiente e em agitação durante 1 hora, comprovando o seu término através de uma CCD.

Removemos o solvente da hidrazida no rotaevaporador, a hidrazida precipitou nos fornecendo 160mg da hidrazida pura 31, correspondendo a um rendimento de 80%.

DADOS ESPECTROMÉTRICOS

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

2,18 (sl; 2H); 3,05 e 3,49 (sl; 1H; rotâmero); 4,11 (sl; 1H); 4,25 (m; 1H); 4,51 (sl; 2H); 6,16 e 6,63 (sl; 1H; rotâmero); 7,57 (sl; 4H); 9,82 (sl; 1H).

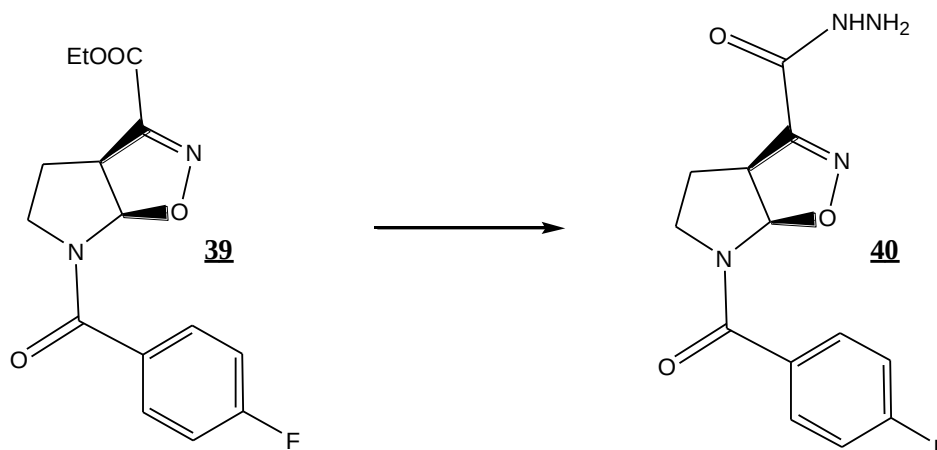
¹³C RMN (DMSO, ppm, 75 MHz, t.a.), presença de rotâmeros.

26,7 e 27,5 (CH₂; rotâmero); 43,5 e 47,4 (CH; rotâmero); 50,4 e 52,3 (CH₂; rotâmero); 91,5 e 94,1 (CH; rotâmero); 128,4 (CH); 129,5 (CH); 134,2 (C); 135,3 (C); 154,5 (C=N); 157,9 (C=O); 167,9 (C=O).

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

3325, 3277, 2992, 2966, 2901, 1678, 1655, 1589, 1405, 1273, 1021, 931, 837, 760, 601.

7.2.8 Síntese da hidrazida do ácido 6-(4-fluorobenzoil)-4,5,6a-tetrahidro-3aH-pirrólo [3,2-d]isoxazol-3-carboxílico **40**



Em um balão de 100 mL foram adicionados 4,9 mmols (equivalentes a 150mg) do ester da isoxazolina *N*-benzoilada **39** e em seguida foram colocados 3 mL de etanol absoluto. A solução em agitação foi adicionada 4,9 mmols da hidrazina 80%. A reação foi mantida a temperatura ambiente e em agitação durante 1 hora, comprovando o seu término através de uma CCD.

Removemos o solvente da hidrazida no rotaevaporador, a hidrazida precipitou nos fornecendo 110mg da hidrazida pura **40**, correspondendo a um rendimento de 78%.

DADOS ESPECTROMÉTRICOS

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

2,17 (m; 2H); 3,03 e 3,40 (m;1H;rotâmero); 4,13 (m;1H); 4,24 (m;1H); 4,53 (sl;2H); 6,16 e 6,65 (sl;1H;rotâmero); 7,32 (sl;2H); 7,65 (sl;2H); 9,87 (s;1H).

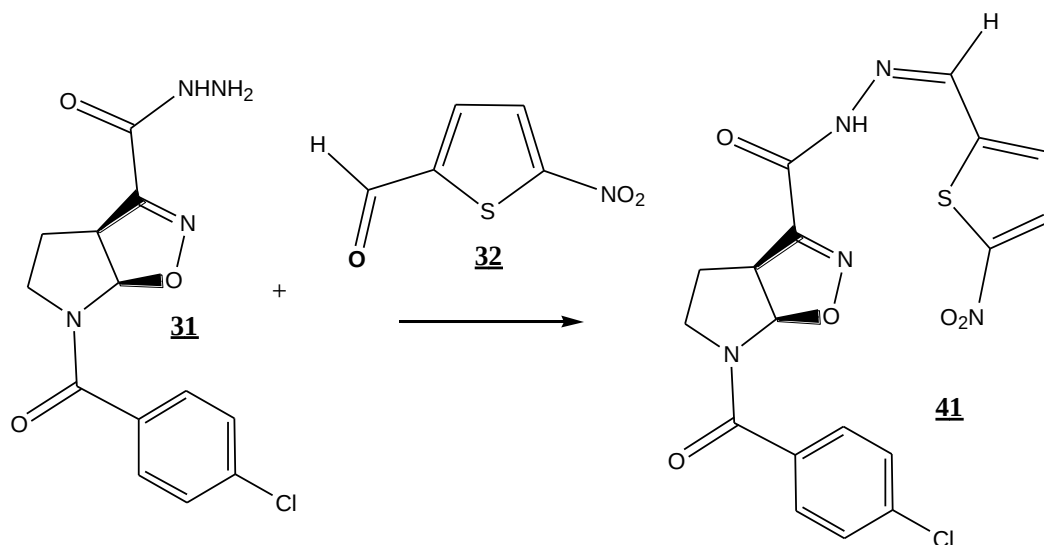
¹³C RMN (DMSO, ppm, 75 MHz, t.a.), presença de rotâmeros.

26,7 e 28,1 (CH₂; rotâmero); 43,5 e 47,4 (CH; rotâmero); 50,4 e 52,2 (CH₂; rotâmero); 91,5 e 94,3 (CH;rotâmero); 115,3 e 115,6 (CH, d, ²J=21,5 Hz); 130,2 (CH); 131,9 (C); 154,4 (C=N); 157,9 (C=O); 161,5 e 164,8 (C, d, ¹J=246 Hz); 168 (C=O).

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

33,14, 3271, 2966, 2901, 1687, 1653, 1598,1400, 1219, 1167, 930, 845, 796, 601.

7.2.9 Síntese da (5-nitro-2-tiofeno) hidrazona do ácido 6-(4-clorobenzoil)-4,5,6a-tetrahydro-3aH-pirrólo [3,2-d]isoxazol-3-carboxílico **41**



Em um balão contendo 0,52 mmols (equivalente a 160mg) de hidrazida **31** em etanol absoluto (3 mL), 2 gotas de ácido clorídrico foi adicionado 0,52 mmols (equivalente a 82mg) 5-nitro-2-tiofeno benzaldeído **32**. A reação ficou em agitação a temperatura ambiente por 1 hora. Em seguida a reação foi resfriada em banho de gelo sob agitação e neutralizada com um solução aquosa de NaHCO_3 10%. O etanol foi removido no rotaevaporador e foi adicionado hexano gelado formando um precipitado que foi filtrado em funil sinterizado e seco em um recipiente contendo cloreto de cálcio, nos fornecendo 180 mg da hidrazona pura **41** correspondendo a um rendimento de 77%.

DADOS ESPECTROMÉTRICOS

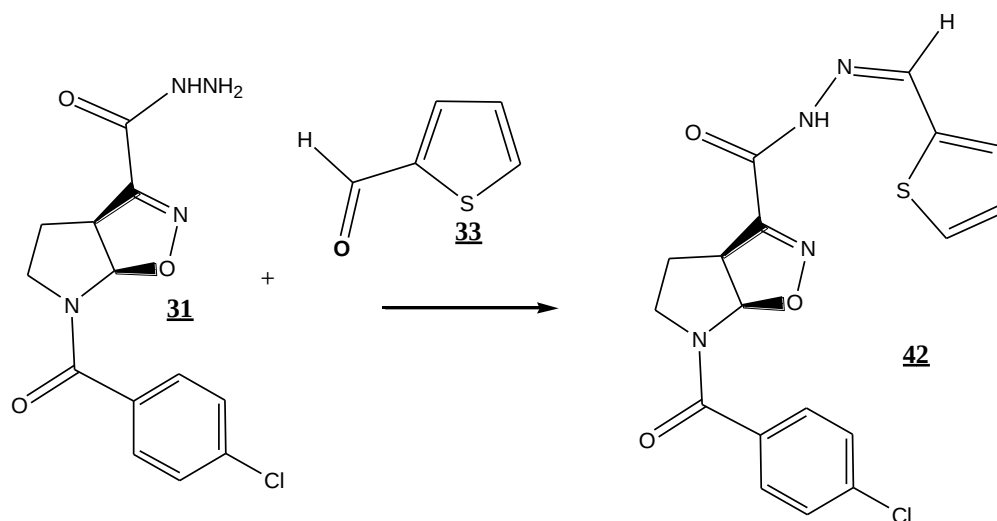
^1H RMN (CdCl_2 , ppm, 400 MHz, t.a.), presença de rotâmeros.

2,2 (t; 3H); 3,1 e 3,4 (m;1H;rotâmero); 4,2 (m;1H); 4,7 (m;1H); 6,2 (s;1H); 7,4 (sl;2H); 7,8 (sl;2H); 8,6 (s;1H), 9,8 (s;1H).

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

596.25, 838.57, 936.39, 1026.62, 1090.82, 1142.13, 1219.51, 1264.80, 1339.01, 1403.87, 1530.92, 1642.16, 1682.31, 3274.72.

7.2.10 Síntese da (2-tiofeno) hidrazona do ácido 6-(4-clorobenzoil)-4,5,6a-tetrahidro-3aH-pirrólo [3,2-d]isoxazol-3-carboxílico 31



Procedimento experimental semelhante ao 5.1.9

Hidrazida **31** (0,52mmols, 160mg), 3mL de etanol, 2 gotas de ácido clorídrico e 2-tiofeno benzaldeído **33** (0,52mmols, 58mg).

Recristalização em hexano, forneceu 150mg da hidrazona **42** correspondendo a um rendimento de 71%.

DADOS ESPECTROMÉTRICOS

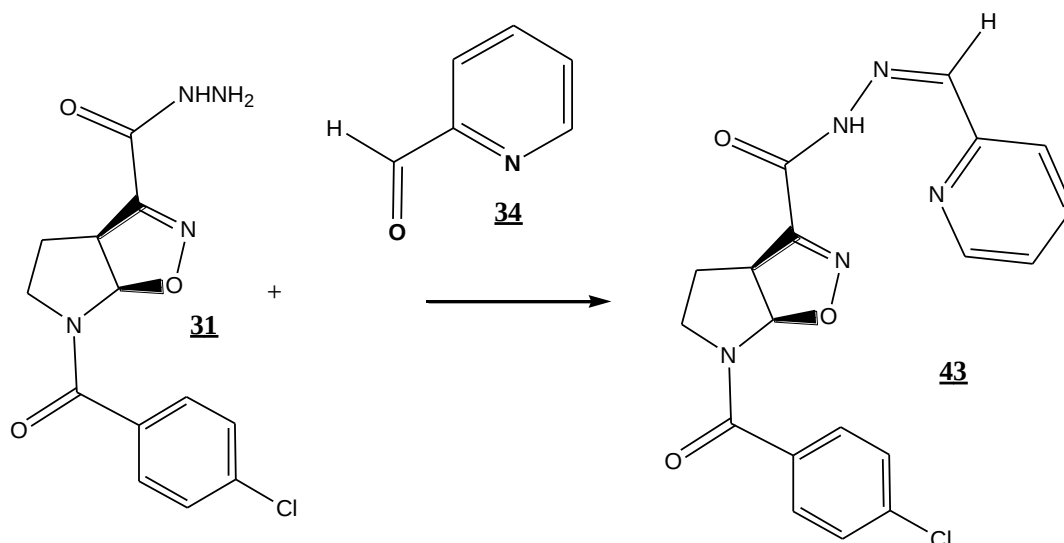
¹H RMN (CdCl₃, ppm, 400 MHz, t.a.), presença de rotâmeros.

2,25 (t; 3H); 2,55 (m, 3H); 3,15 (m, 3H); 4,25 (m;3H); 4,43 (m;3H); 6,2 (s;1H); 7,0 e 7,4 (sl;2H); 8,52 (s;1H), 9,8 (s;1H).

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

720.71, 855.05, 1093.46, 1174.62, 1270.63, 1401.63, 1559.82, 1656.85, 3453.02.

7.2.11 Síntese da (2-piridina) hidrazona do ácido 6-(4-clorobenzoil)-4,5,6a-tetrahidro-3aH-pirrólo [3,2-d]isoxazol-3-carboxílico 31



Procedimento experimental semelhante ao 5.1.9

Hidrazida 31 (0,52mmols, 160mg), 3mL de etanol, 2 gotas de ácido clorídrico e 2-Piridina benzaldeído 34 (0,52mmols, 55,6mg).

Recristalização em hexano forneceu 100mg da hidrazona 43 correspondendo a um rendimento de 50%.

DADOS ESPECTROMÉTRICOS

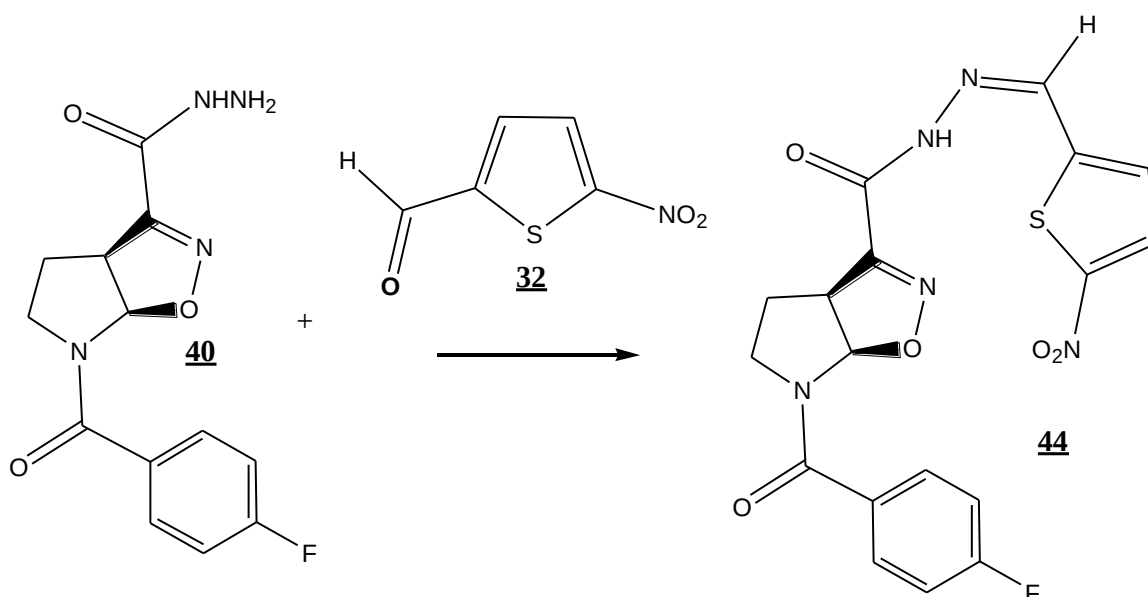
^1H RMN (CdCl_2 , ppm, 400 MHz, t.a.), presença de rotâmeros.

2,2 (sl; 3H); 3,2 (sl, 3H); 4,2 (sl, 1H); 4,4 (sl;1H); 4,43 (m;3H); 6,2 (s;1H); 7,2 e 7,7 (m;2H); 8,6 (s;1H), 10.1 (s;1H).

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

839.35, 1169.77, 1270.43, 1410.85, 1472.35, 1582.67, 1638.57, 1679.06, 3472.91.

7.2.12 Síntese da (5-nitro-2-tiofeno)hidrazona do ácido 6-(4-fluorobenzil)4,5,6a-tetrahidro-3aH-pirrólo [3,2-d]isoxazol-3-carboxílico 44



Procedimento experimental semelhante ao 5.1.9

Hidrazida **40** (0,55mmols, 160mg), 3mL de etanol, 2 gotas de ácido clorídrico e 5-nitro-2-tiofeno benzaldeído **32** (0,55mmols, 86mg).

Recristalização em hexano, e posterior purificação em hexano nos forneceu 120mg da hidrazona **44**, correspondendo a um rendimento de 51%.

DADOS ESPECTROMÉTRICOS

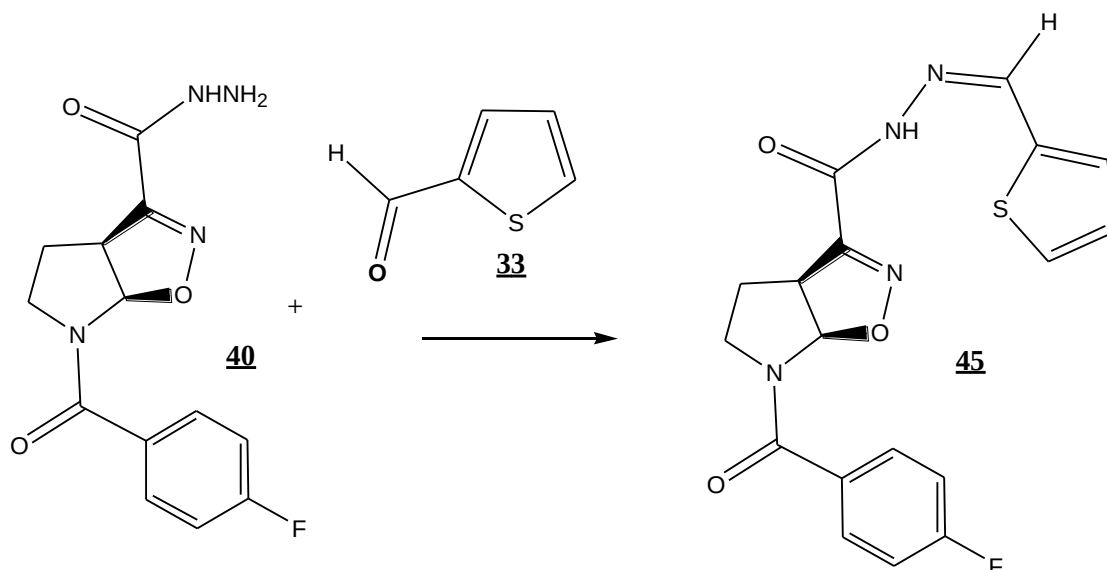
¹H RMN (CdCl₃, ppm, 400 MHz, t.a.), presença de rotâmeros.

2,1 (s; 3H); 3,2 (m, 3H); 3,5 (m, 1H); 4,2 (sl;1H); 7,1 e 7,8 (m;2H); 8,6 (s;1H), 9,8 (s;1H).

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

855.04, 932.62, 1228.99, 1267.94, 1339.81, 1404.27, 1596.56, 1656.00, 3040.02.

7.2.13 Síntese da (2-tiofeno) hidrazona do ácido 6-(4-fluorobenzoil)-4,5,6a-tetrahidro-3aH-pirrólo [3,2-d]isoxazol-3-carboxílico 40



Procedimento experimental semelhante ao 5.1.9

Hidrazida 40 (0,55mmols, 160mg), 3mL de etanol, 2 gotas de ácido clorídrico e 2-tiofeno benzaldeído 33 (0,55mmols, 61,6mg).

Recristalização em hexano, e posterior purificação em hexano nos forneceu 80mg da hidrazona 45 correspondendo a um rendimento de 38%.

DADOS ESPECTROMÉTRICOS

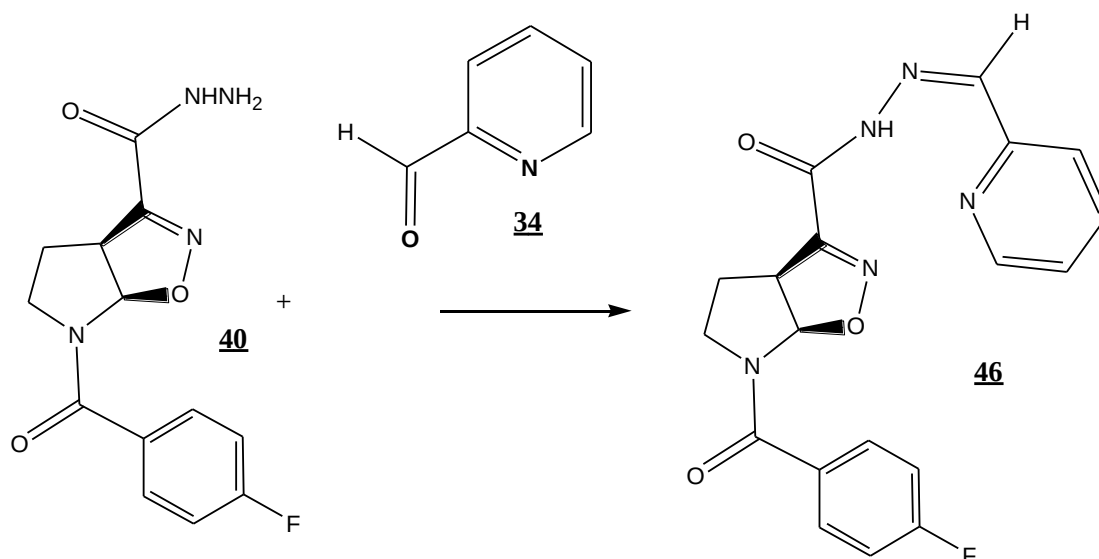
^1H RMN (CdCl_2 , ppm, 400 MHz, t.a.), presença de rotâmeros.

2,2 (m; 3H); 2,5 (sl, 1H); 4,2 (sl, 1H); 6,2 (s;1H); 7,0 e 7,6 (m;2H); 8,5 (s;1H), 9,9 (s;1H).

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

607.82, 714.69, 758.03, 849.05, 932.61, 1150.72, 1227.62, 1266.77, 1413.89, 1548.27, 1646.76, 3455.06.

7.2.14 Síntese da (2-piridina) hidrazona do ácido 6-(4-fluorobenzoil)-4,5,6a-tetrahidro-3aH-pirrólo [3,2-d]isoxazol-3-carboxílico 40



Procedimento experimental semelhante ao 5.1.9

Hidrazida 40 (0,55mmols, 160 mg), 3mL de etanol, 2 gotas de ácido clorídrico e 2-piridina benzaldeído 34 (0,55mmols, 58,5mg).

Recristalização em hexano, e posterior purificação em hexano nos forneceu 50mg da hidrazona 46 correspondendo a um rendimento de 24%.

DADOS ESPECTROMÉTRICOS

^1H RMN (CdCl_3 , ppm, 400 MHz, t.a.), presença de rotâmeros.

2,1 (m; 3H); 2,3 (sl, 1H); 3,3 (sl, 3H); 4,1 (s;1H); 4,3 (sl; 1H); 6,2 (sl, 1H); 6,7 (sl, 1H); 7,3, 7,7 e 7,9 (m;2H); 8,5 (s;1H), 12,4 (s;1H).

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

751.69, 792.80, 847.77, 934.54, 1167.65, 1229.27, 1273.39, 1416.59, 1472.15, 1591.56, 1638.66, 1680.98, 2998.19, 3454.79.

CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

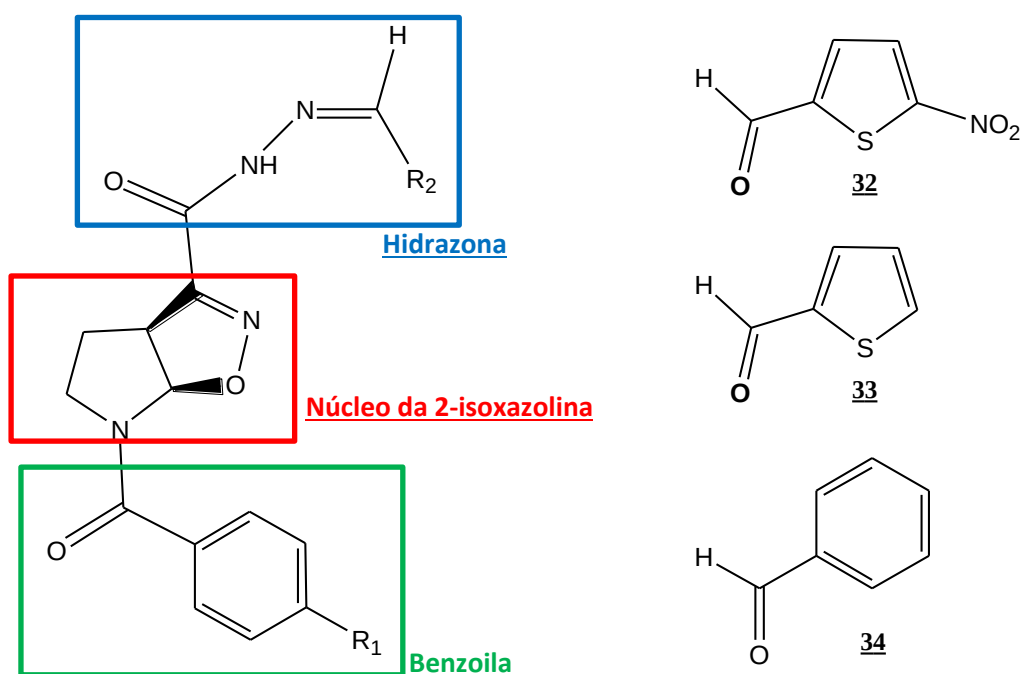
8. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

8.1 CONCLUSÃO

Com a finalidade de obtermos novos derivados de hidrazonas (Figura 14), exploramos quimicamente o núcleo 2-isoxazolina [5-4-b] pirrolidina, sendo obtidas com sucesso e com rendimentos de moderado a bom.

Obtivemos 06 novos derivados de isoxazolinias, elucidadas por métodos espectrométricos e avaliadas quanto a sua atividade antimicrobiana.

Figura 14 – Hidrazona e os aldeídos utilizados



$R_1 = \text{Cl ; F}$

$R_2 = \text{32, 33 e 34}$

Os novos derivados de hidrazonas não apresentaram resultados antimicrobianos significativos, pois não houve a inibição bacteriana satisfatória para classifica-lo como um potencial agente antimicrobiano, como relatado na literatura.

8.2 PERSPECTIVAS

- Otimização da metodologia sintética para obtenção de mais derivados hidrazônicos com aldeídos aromáticos substituídos.
- Avaliação dos novos derivados hidrazônicos quanto a sua atividade anti-inflamatória
- Avaliação dos novos derivados hidrazônicos quanto a sua atividade antichagásica

REFERENCIAS

- 1 MELO, J.O.F.; DONNICI, L.C.; AUGUSTI, R.; FERREIRA, V.F.; SOUZA, M.C.B.V.; FERREIRA, M.L.G.; CUNHA, A.C. Heterociclos 1,2,3-triazólicos: histórico, métodos de preparação, aplicações e atividades farmacológica, Quim. Nova, Vol. 29, No. 3, 569-579, 2006.
- 2 KATRIZKY, A.R.; REES, C.W. Comprehensive heterocyclic Chemistry. The structure, Reactions, Synthesis and uses of Heterocyclic Compounds 1984, volume 6, Pergamon Press
- 3 ALMEIDA, V.M. Tese de doutorado - departamento de ciências farmacêuticas UFPE,
- 4 GARCIA, P.C.; CRUZ, S.V.; MIRÓN, C.E. Química Farmacéutica I, Departamento de farmacologia i química terapeutica, Universitat de Barcelona.
- 5 BARREIRO, E.J.; FRAGA, C.A.M. Química Medicinal – As bases moleculares da ação dos farmacos, 2ª edição.
- 6 CORREA, G. Dissertação de mestrado - departamento de ciências farmacêuticas UFPE
- 7 KANG, Y. K.; SHIN, K. J.; YOO, K. H.; SEO, K. J.; HONG, C. Y.; LEE, C.; PARK, S. Y.; KIM, D. J.; PARK, S. W. Synthesis and Antibacterial Activity of New Carbapenems Containing Isoxazole Moiety. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, v. 10, p. 95-99, 2000
- 8 VARSHNEY, V.; MISHRA, N. N.; SHUKLA, P. K.; SAHU, D. P. Synthesis and antibacterial evaluation of isoxazolinyl oxazolidinones: Search for potent antibacterial. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, v. 19, p. 3573–3576, 2009.

- 9 PIRRUNG, M. C.; TURNEY, L. N.; RAETZ, C. R. H.; RUSCHE, K. M. J. *Med Chem*, 45, 4359-4370, 2002.
- 10 W.-WELLS, M. A.; WERBLOOD, H. M.; GOLDSCHMIDT, R.; BUSH, K.; FOLENO, B. D.; HILLIARD, J. J.; MELTON, J.; WIRA, E.; MACIELAG, M. J. The synthesis and antimicrobial evaluation of a new series of isoxazolinyloxazolidinones. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 14, p. 3069–3072, 2004.
- 11 KUÇUKGUZEL, Ş.G.; ROLLAS, S.; KUÇUKGUZEL, İ; KIRAZ, M. Synthesis and Antimycobacterial activity of some coupling products from 4-aminobenzoic acid hydrazones. *Eur. J. Med. Chem.* 34, 1093-1100, 1999.
- 12 KAI, H.; MATSUMOTO, H.; HATTORI, N.; TAKASE, A.; FUJIWARA, T.; SUGIMOTO, H.; *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 11, 1997-2000, 2001.
- 13 GRUTAS, W. C.; VENKATARAMAM, R.; CHONG, L.S.; YODER, J. E.; EPP J. B.; STANGA, M. A.; KIM, E.H. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v 3, 125-128, 1995.
- 14 DIAZ, D.D.; FINN, M.G.; SHARPLESS, K.B.; FOKIN, V.V.; HAWKER, C.J.; *Cicloaddicion 1,3-dipolar de azidas y alquinos I: principals aspectos sinteticos*, Real sociedad espanola de quimica, 2008.
- 15 ROLLAS, S.; GULERMAN, N.; ERDENIZ, H. Synthesis and antimicrobial activity of some new hydrazones of 4-fluorobenzoic acid hydrazide and 3-acetyl-2,5-dissubstituted-1,3,4-oxadizolines, 57, 171-174, 2002.
- 16 KOMURCU, Ş.G.; ROLLAS, S.; ÜLGEN, M.; GORROD, J.W; ÇEVIKBAS, A. Evaluation of Some Arylhydrazones of p-Aminobenzoic acid hydrazide as

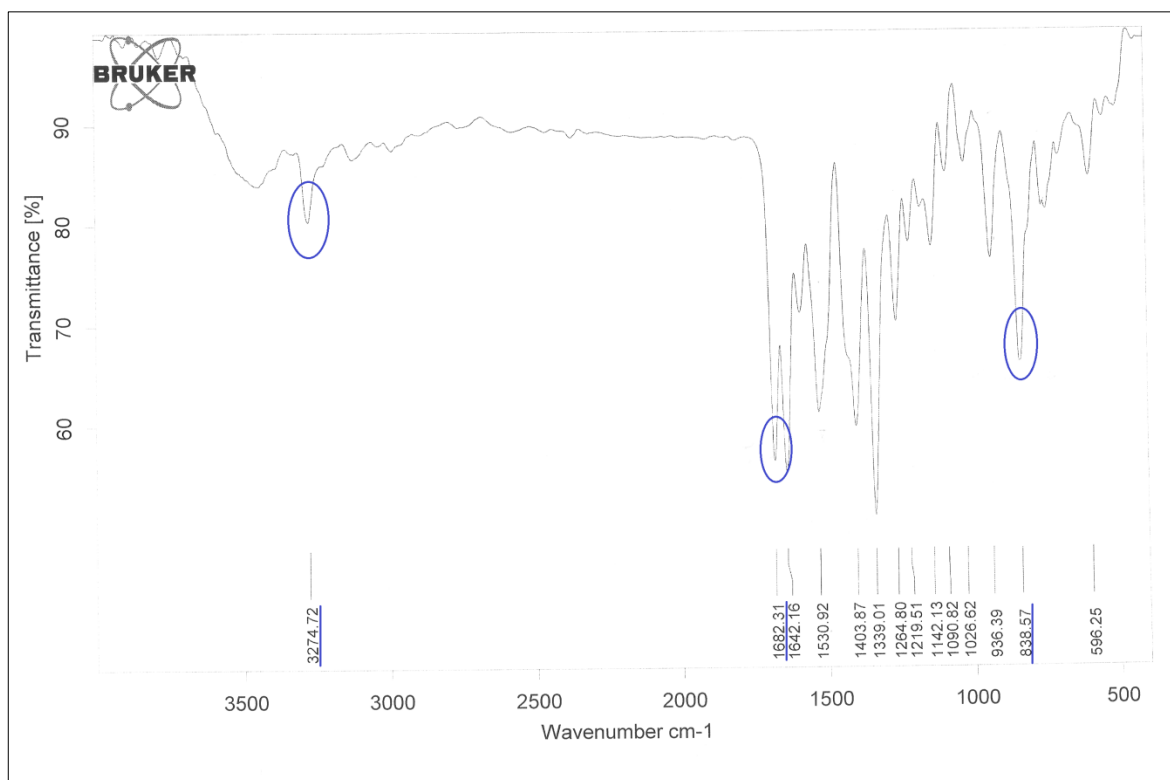
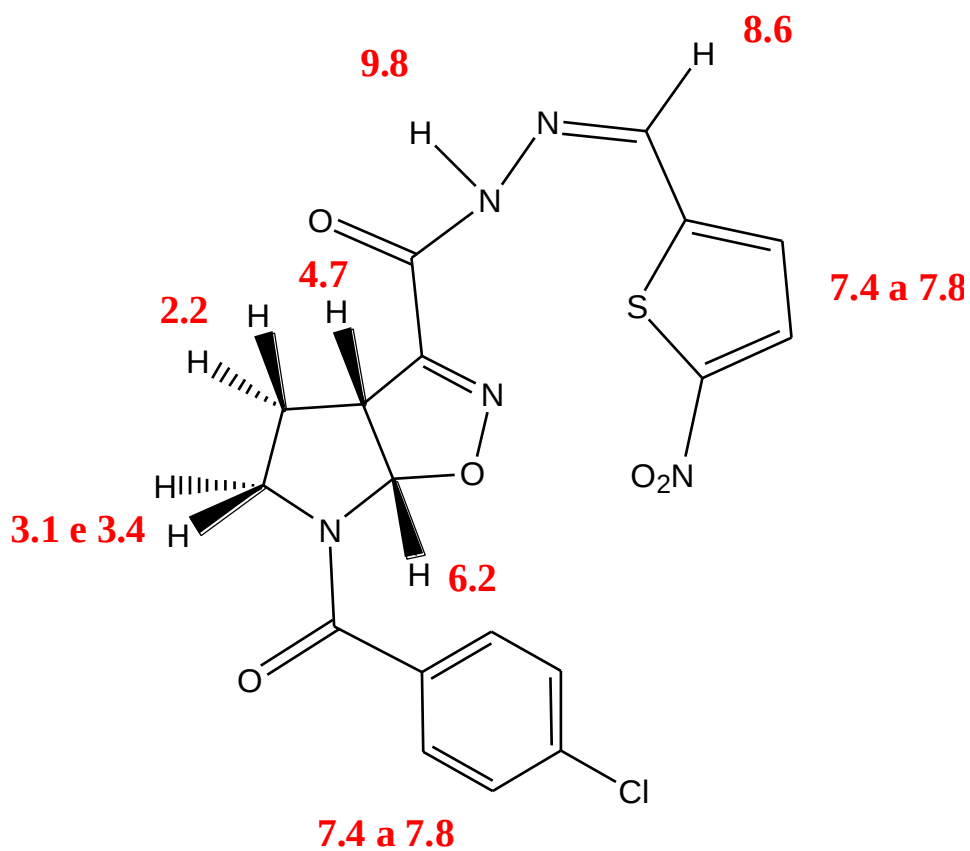
- Antimicrobial Agents and Their *in-vitro* Hepatic Microsomal Metabolism. *Boll. Chim. Farm*, 134, 375-379, 1995.
- 17 MASUNARI, A.; TAVARES, L.C. A new class of nifuroxazide analogues : Synthesis of 5 nitrophenyl derivatives with antimicrobial activity against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*. *Bioorg. Med. Chem.*, 15 , 4229-4236,, 2007.
 - 18 KUÇUKGUZEL, Ş.G.; ROLLAS, S.; ERDENİZ, H.; KIRAZ, M. Synthesis, Characterization and Antimicrobial Evaluation of Ethyl 2-Arylhydrazono-3-oxobutyrate, *Eur. J. Med. Chem*, 34, 153-160, 1999.
 - 19 LIMA, P.C.; LIMA, L.M.,; SILVA, K.C.; LEDA, P.H.; MIRANDA, A.L.P.; FRAGA, C.A.M; BARREIRO, E.J.; Synthesis and analgesic activity of novel N-acylhydrazones and isomers, derived from natural safrole. *Eur J Med Chem*, 35, 187-203, 2000.
 - 20 KUÇUKGUZEL, Ş.G.; ROLLAS, S.; Biological activities of hydrazine derivatives, *Molecules*, 12, 1910-1939, 2007.
 - 21 GARCIA SANCHEZ, J.E.; LOPEZ, R.; PRIETO, J. (Eds.). *Antimicrobianos en Medicina*. Sociedad Española de Quimioterapia. Prous Science, Barcelona, 1999.
 - 22 BENTLEY, R. The development of penicillin: genesis of a famous antibiotic. *Perspect Biol Med.*, 48(3):444-52, 2005.
 - 23 CHAMBERS, H.F.; SANDE, M.A. Antimicrobial Agents, Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, Hardman JG, Limbird LE, Molinoff PB, Ruddon RW, Gilman AG eds, cap. 43, p.1029, 1996.
 - 24 EDWARDS, D.I. History of antimicrobial chemotherapy. En: Edwards D.I, editor. *Antimicrobial drug action*. London: M cmillan; 1980. p. 3-7

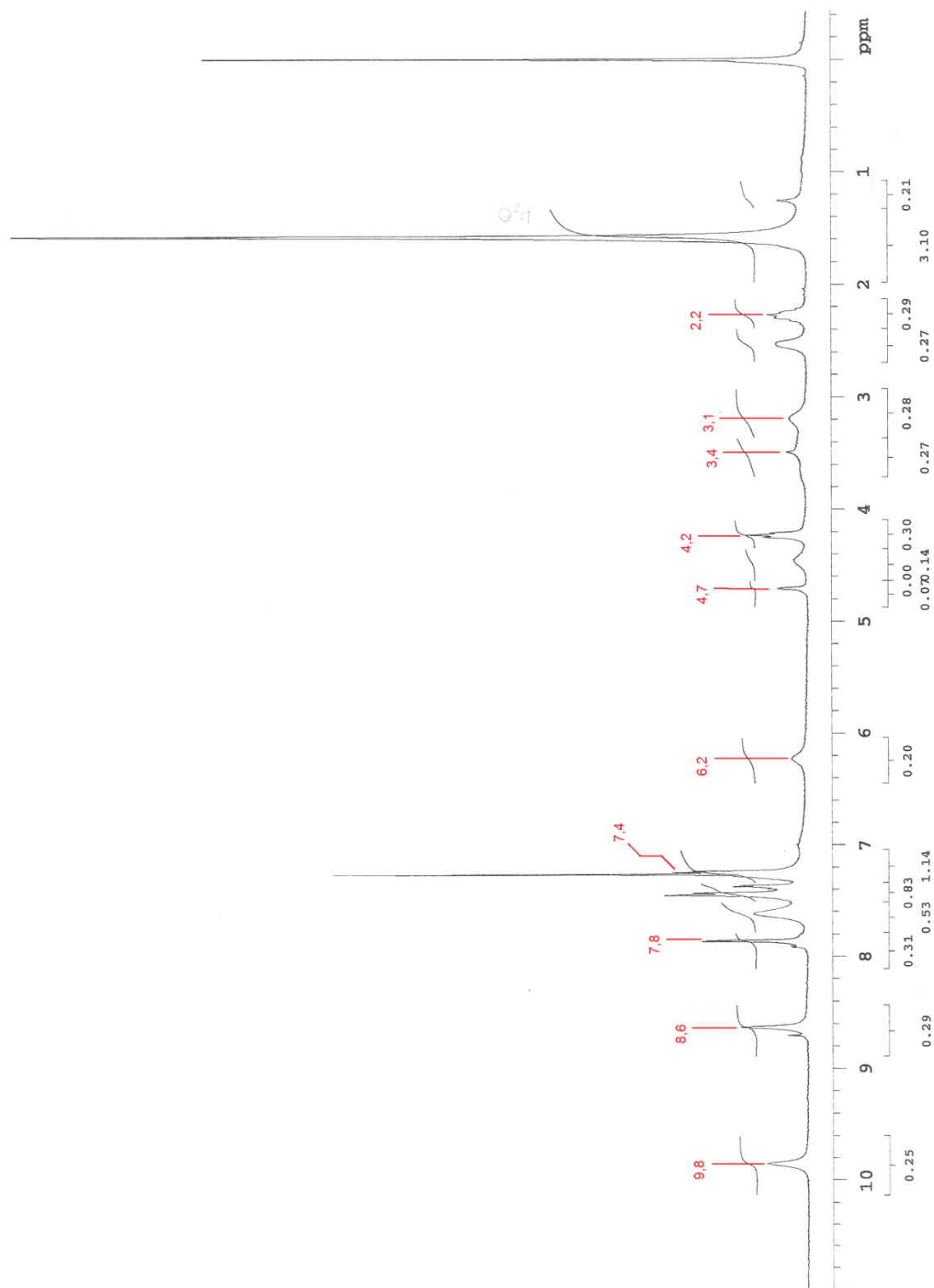
- 25 MOTA, L.M.; VILAR, F.C.; DIAS, L.B.A.; NUNES, T.F.; MORIGUTI, J.C. *Rational use of antimicrobials*, Medicina, Ribeirão Preto, 43, 164-72, 2010.
- 26 WANNMACHER, L. Uso indiscriminado de antibióticos e resistência microbiana: uma guerra perdida? Uso racional de medicamentos: temas selecionados, Brasília, v. 1, n. 4, mar. 2004.
- 27 LARA, E.B. La resistencia bacteriana y el mal uso de antibióticos en hospitales. Una historia sin fin REVISTA DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS EN PEDIATRÍA Vol. XIX Núm. 76 abril-junio, 2006.
- 28 CRESPO, M. P. La lectura interpretativa del antibiograma: Una herramienta para predecir la resistencia bacteriana en el laboratorio de microbiología de rutina. **Colomb Med**, v. 33, p. 179-193, 2002.
- 29 BARBOSA, H.; TORRES, R.; BAYARDO, B. Microbiologia básica. São Paulo (SP): Atheneu, 1998.
- 30 NETO, V. A.; LEVI, G.C.; LOPES, H.V.; MENDONÇA, J.S.; BALDY, J.L.S. Antibióticos na pratica medica. 5 ed. São Paulo: Roca, 304, 2000.
- 31 BRODY, T.M.; LAMER, J.; MINERMAN, K.P.; NEU, C.H. farmacologia Humana - da molécula a clinica; guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, 71-73, 1997.
- 32 TANGALLAPALLY, R.P.; SUN, D.; RAKESH; BUDHA, N.; LEE, R.E.B.; LENAERTS, A. J. M.; MEIBOHM, B.; LEE, R. E. Discovery of novel isoxazoles as biological agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 14, p. 3818-3824, 2006.
- 33 ROLLAS, S.; GULERMAN, N.; ERDENIZ, H. Synthesis and antimicrobial activity of some new hidrazones of 4-fluorobenzoic acid hydrazide and 3-acetyl-2-5disubstituted-1,3,4-oxadiazolines; *Il farmaco*, 57, 171-174, 2002.

- 34 BARBERAN, J.; RODRIGUEZ, J.A.G.; GONZALEZ, J.; PRIETO, J. Historia de los antimicrobianos. SCM, Madrid 2003.
- 35 ALMEIDA, V.M.; SANTOS, R.J.; GOES, A.J.S.; SOUZA, I.A.; DE FARIA, A.R. Rev Bras Ciencias da Saude, 9,275-282, 2005.
- 36 DE FARIA, A. R. Tese de doutorado -Instituto de Química - UNICAMP, 1996.
- 37 KOROLKOVAS, A. Quimica Farmaceutica, Ed. guanabara Koogan S.A. Rio de Janeiro-RJ, 48-49, 1988.
- 38 SIEMANN, S.; EVANOFF, D. P.; MARRONE, L.; CLARKE, A. J.; VISWANATHA, T.; DMITRIENKO, G. I. *N*-Arylsulfonyl Hydrazones as Inhibitors of IMP-1 Metallo- β -Lactamase. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 46, 2450-2457, 2002.
- 39 SANTOS, R.J. Reações de cicloadição 1,3-dipolar de enecarbamatos e enamidas endocíclicas de 5 membros com *n*-óxidos de nitrila. Síntese e avaliação das atividades anti-inflamatórias e antimicrobiana de derivados isoxazolínicos bicíclicos 5 membros. Recife, 2003.
- 40 KUÇUKGUZEL, S.G.; MAZI, A.; SAHIN, F.; OZTURK, S.; STABLES, J. Synthesis and biological activities of diflunisal hidrazide-hidraziones; Eur. J. Med Chem, 38, 1005-1013, 2003.

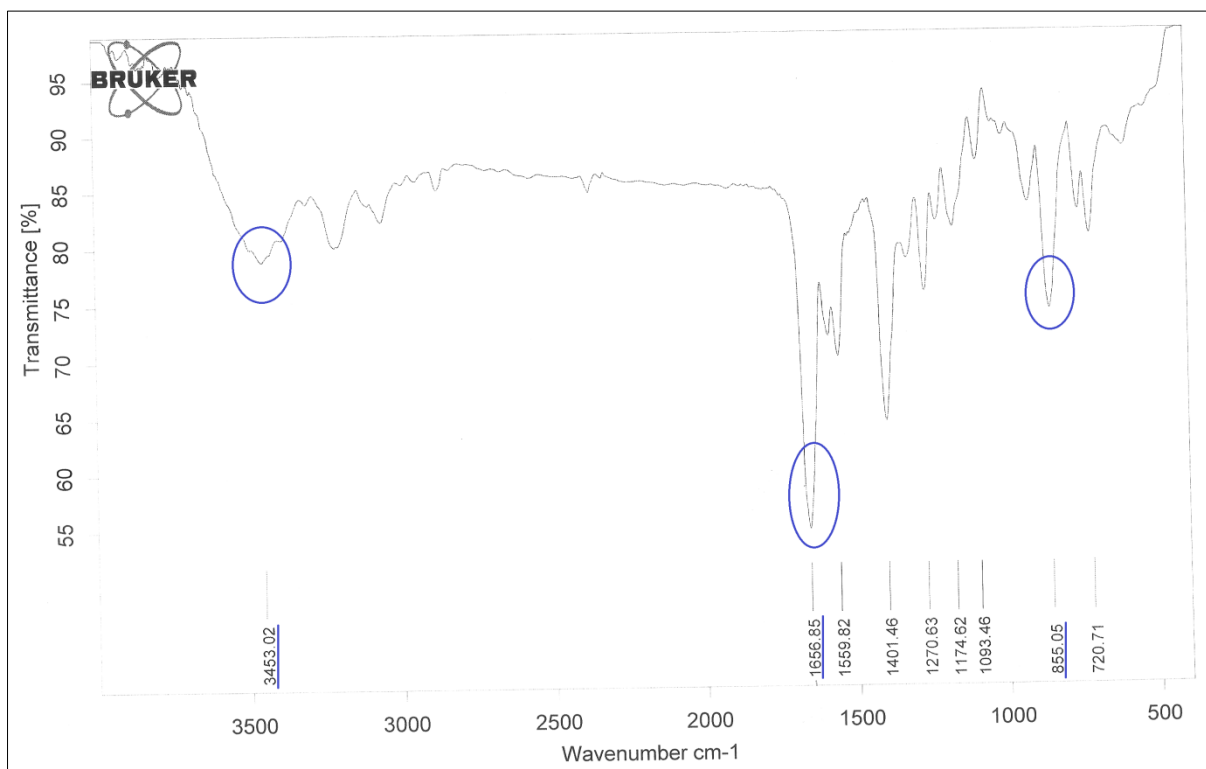
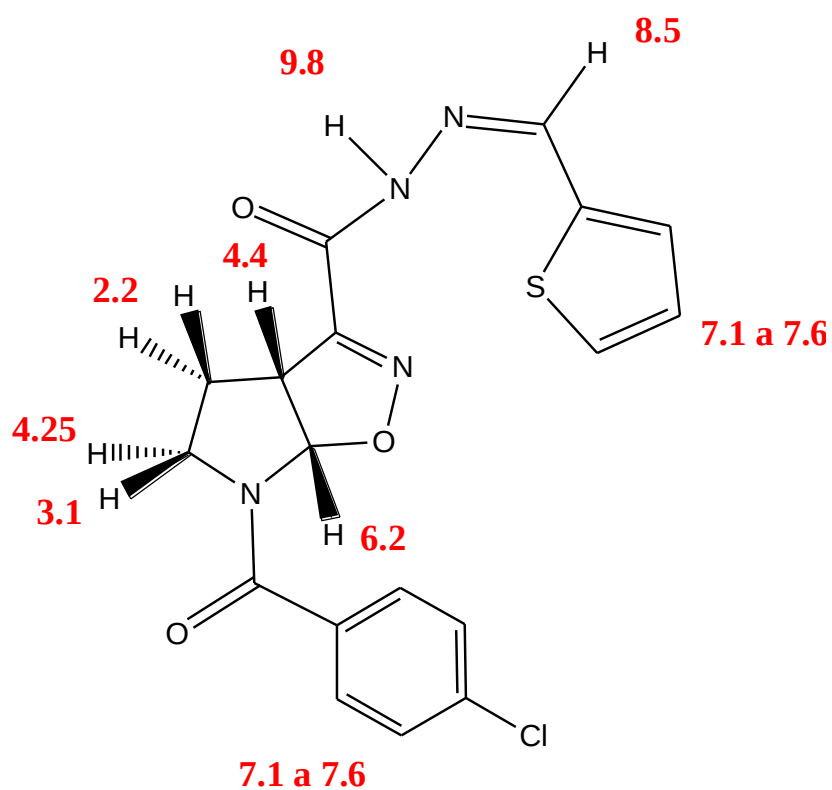
ANEXOS

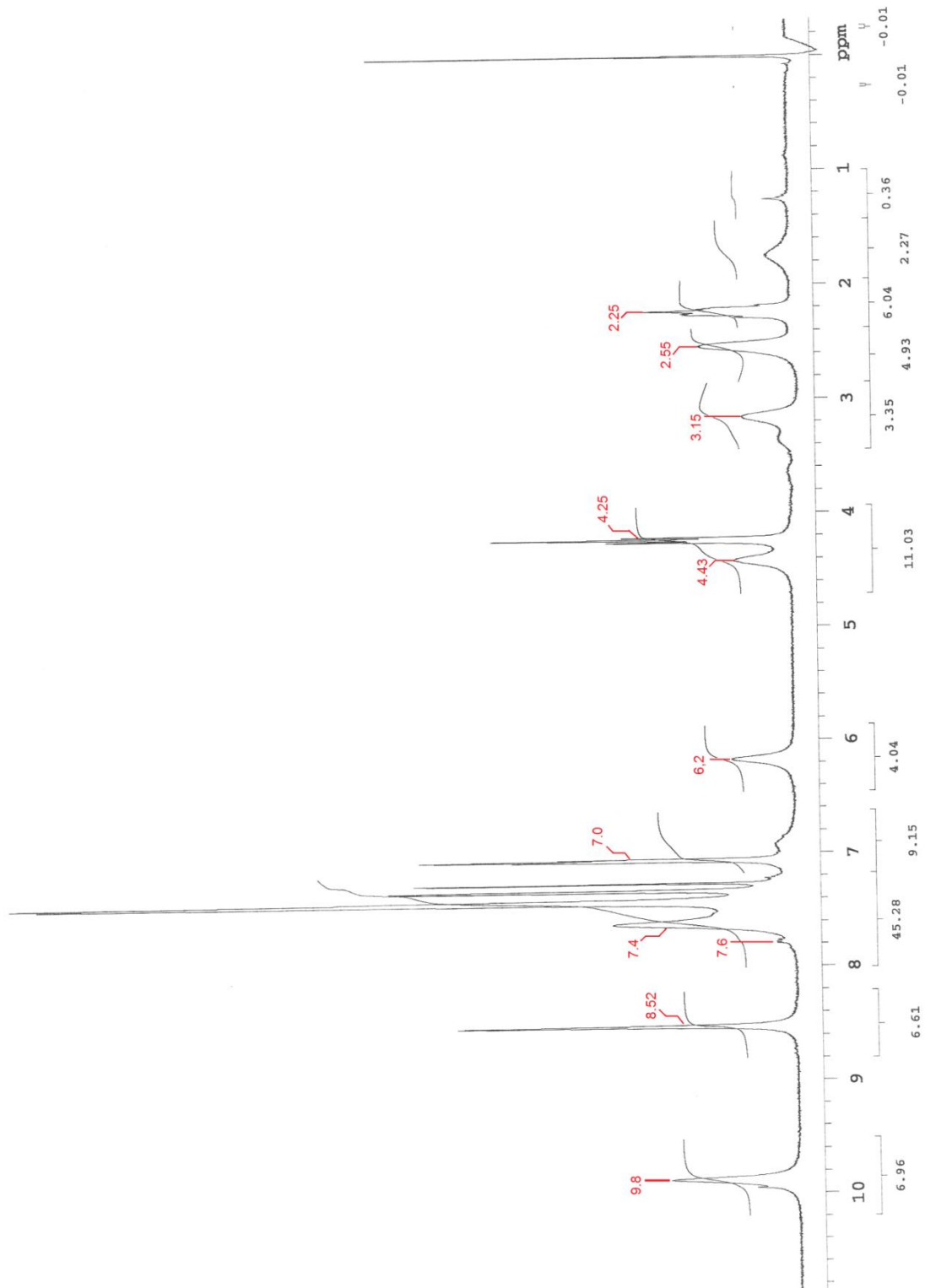
Anexo A - Estrutura e IV cm^{-1} da hidrazona **41**



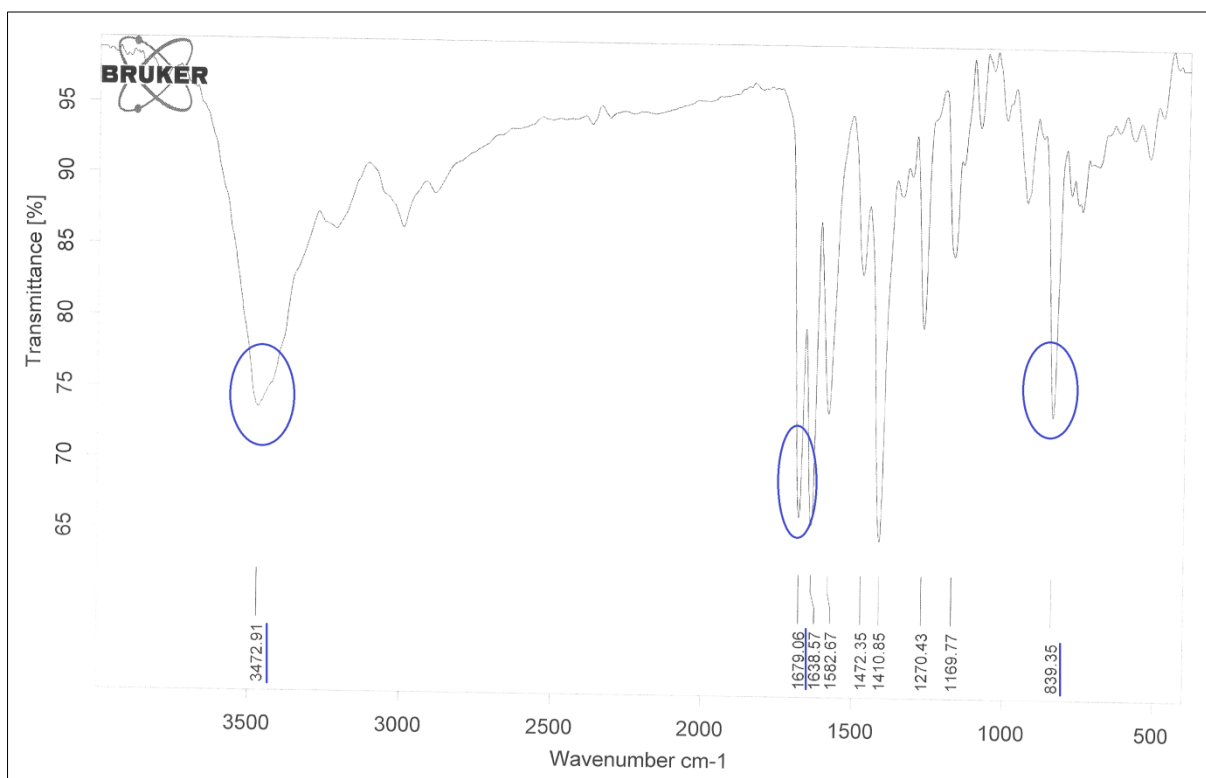
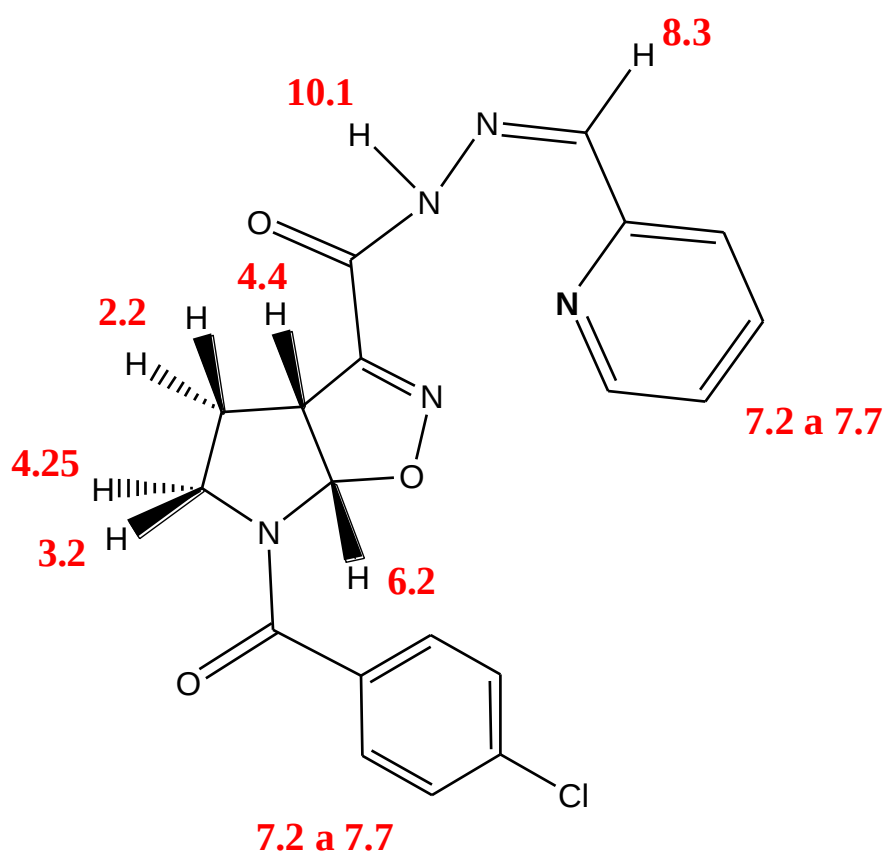
Anexo B – RMN H^{-1} da estrutura da hidrazona 41

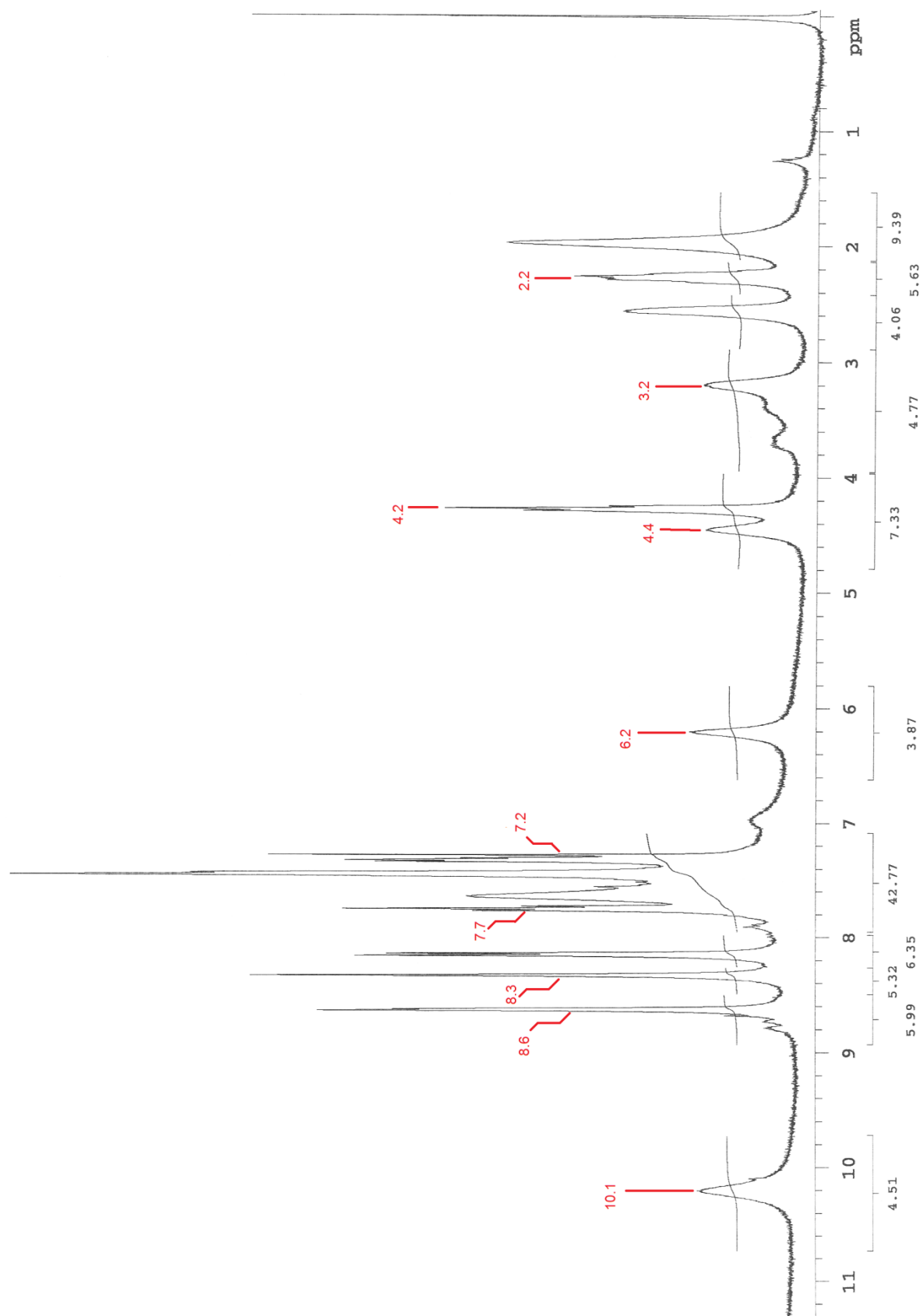
ANEXO C. Estrutura e IV cm^{-1} da hidrazona 42



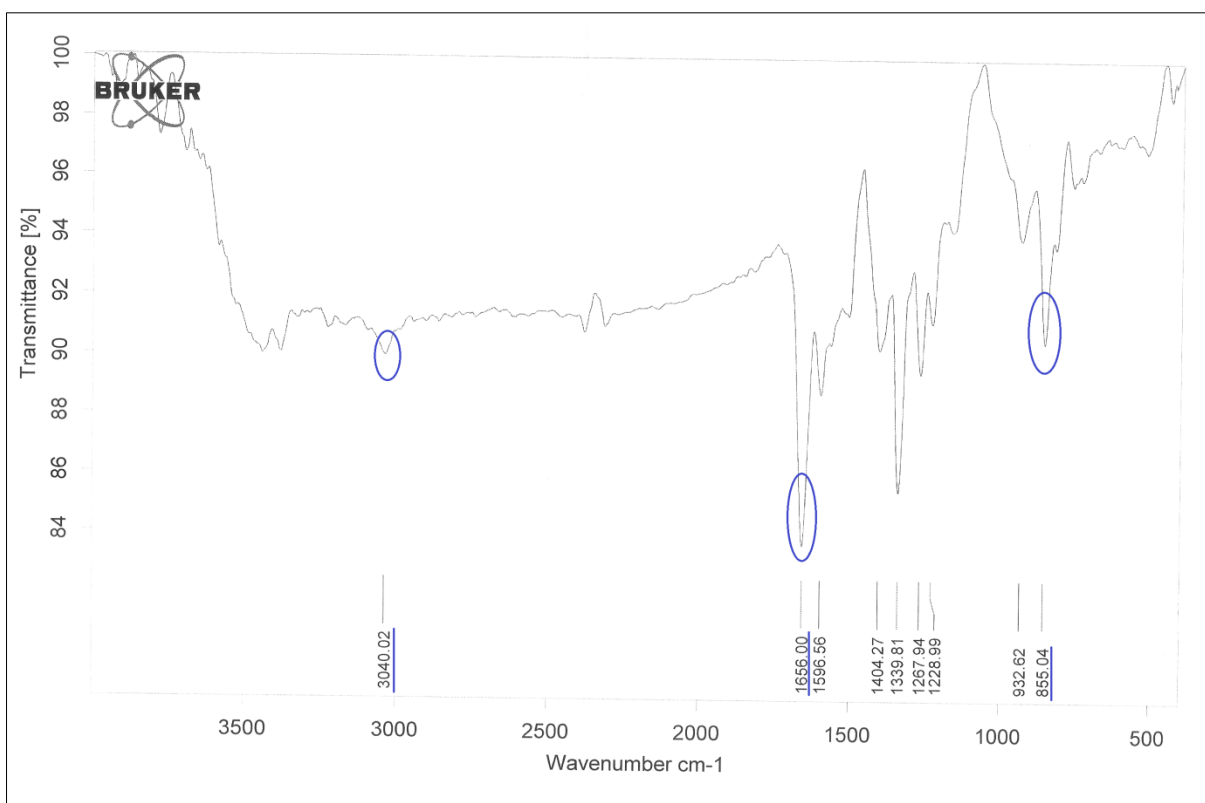
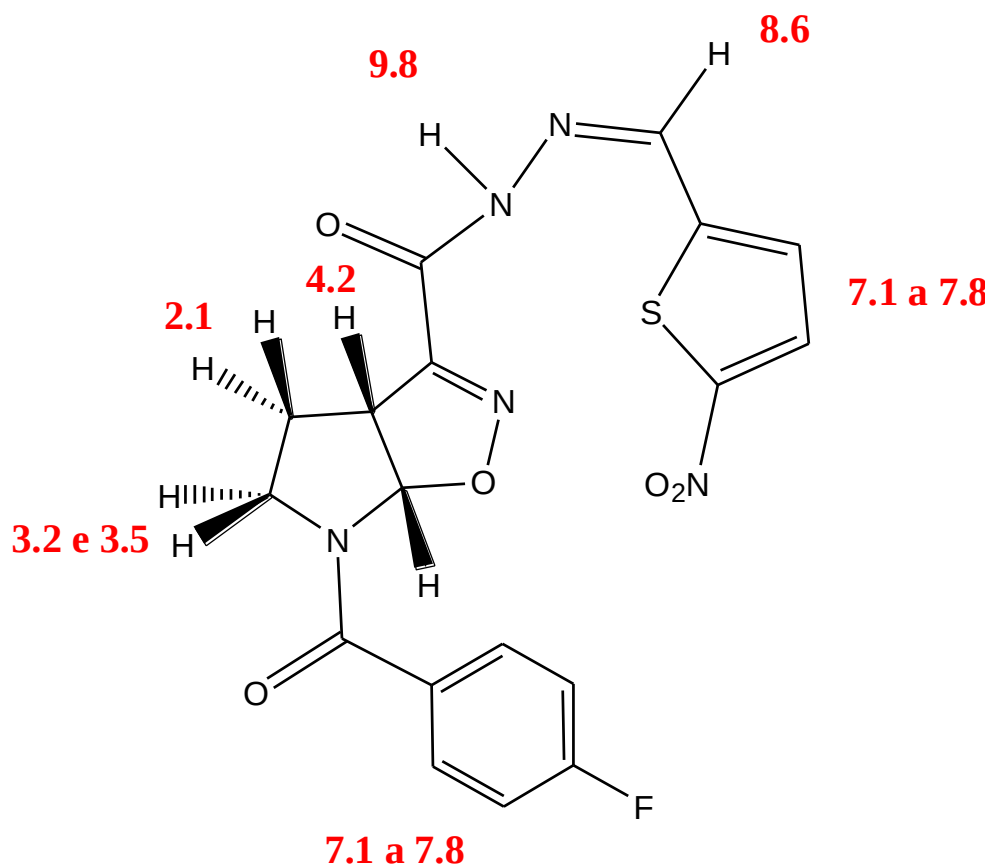
ANEXO D. RMN H^1 da hidrazona 42

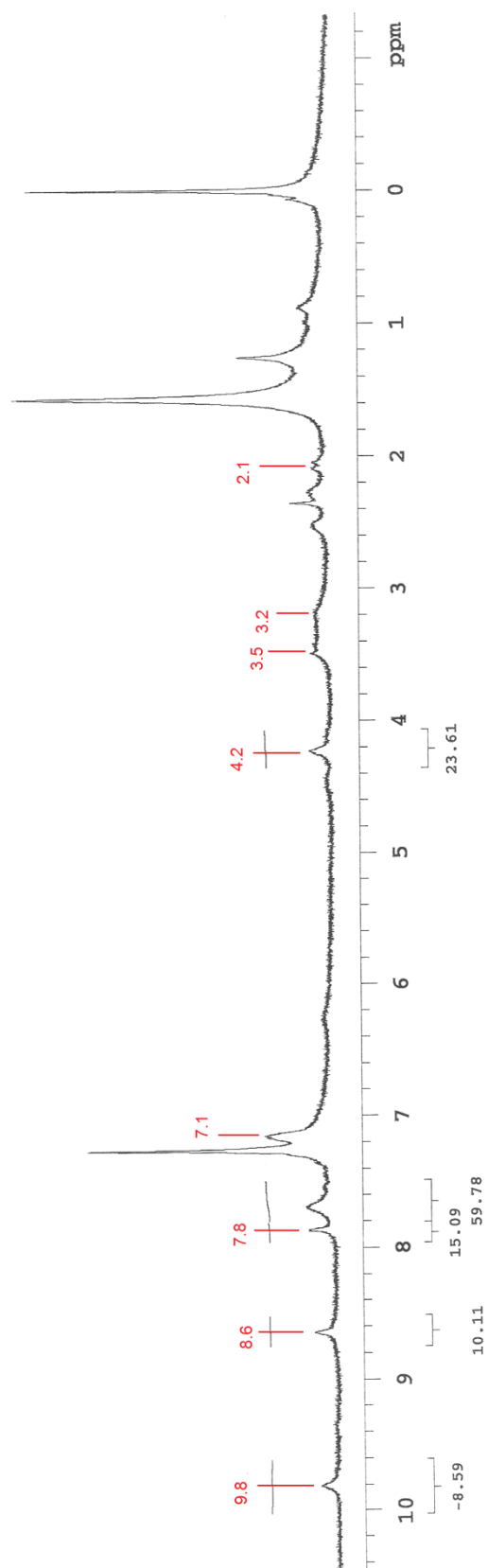
ANEXO E. Estrutura e IV cm^{-1} da hidrazona 43



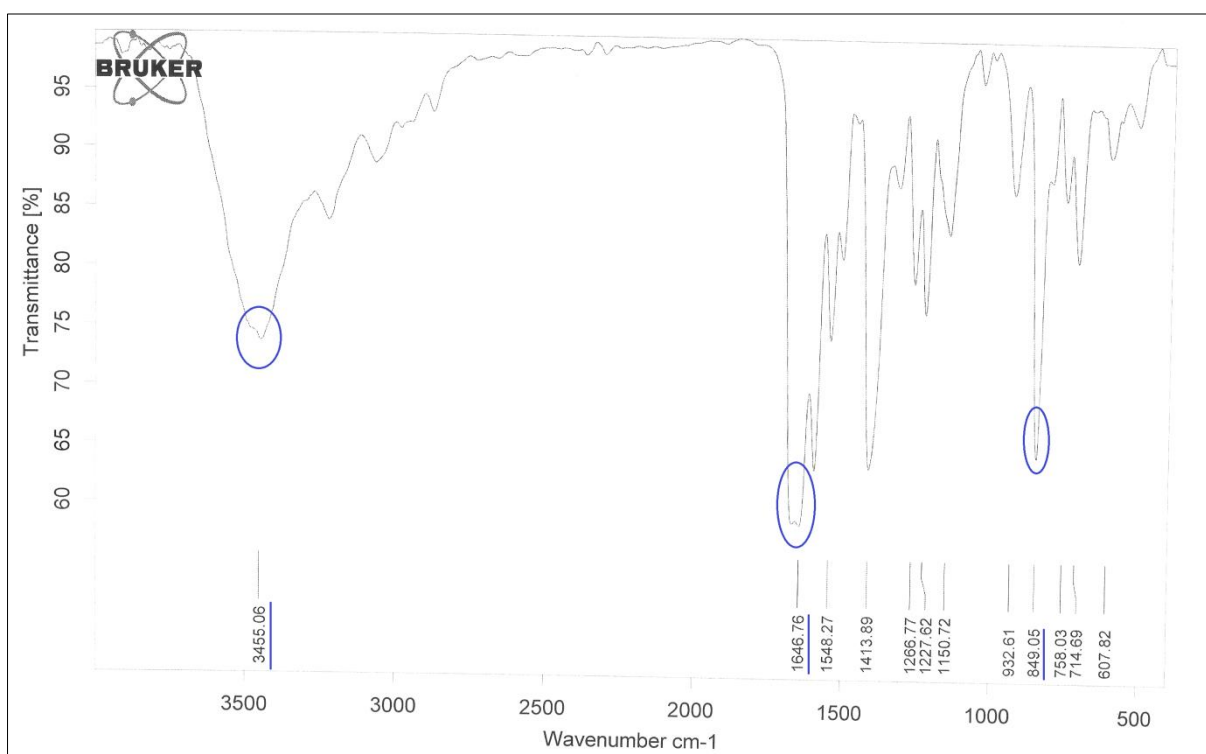
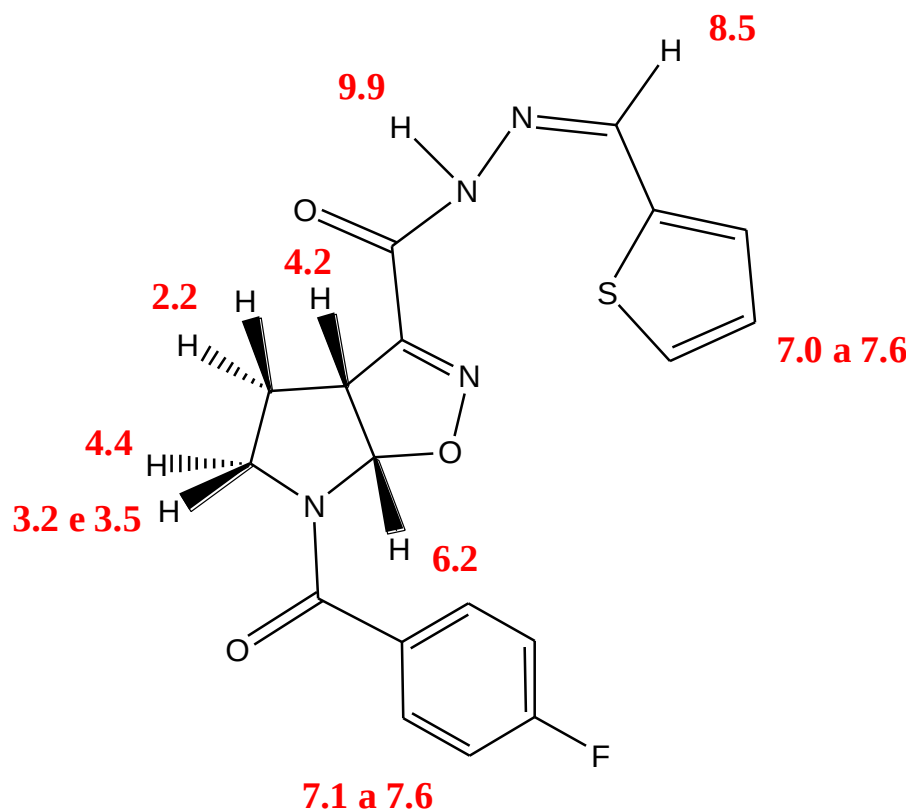
ANEXO F. RMN H^{-1} da estrutura da hidrazona 43

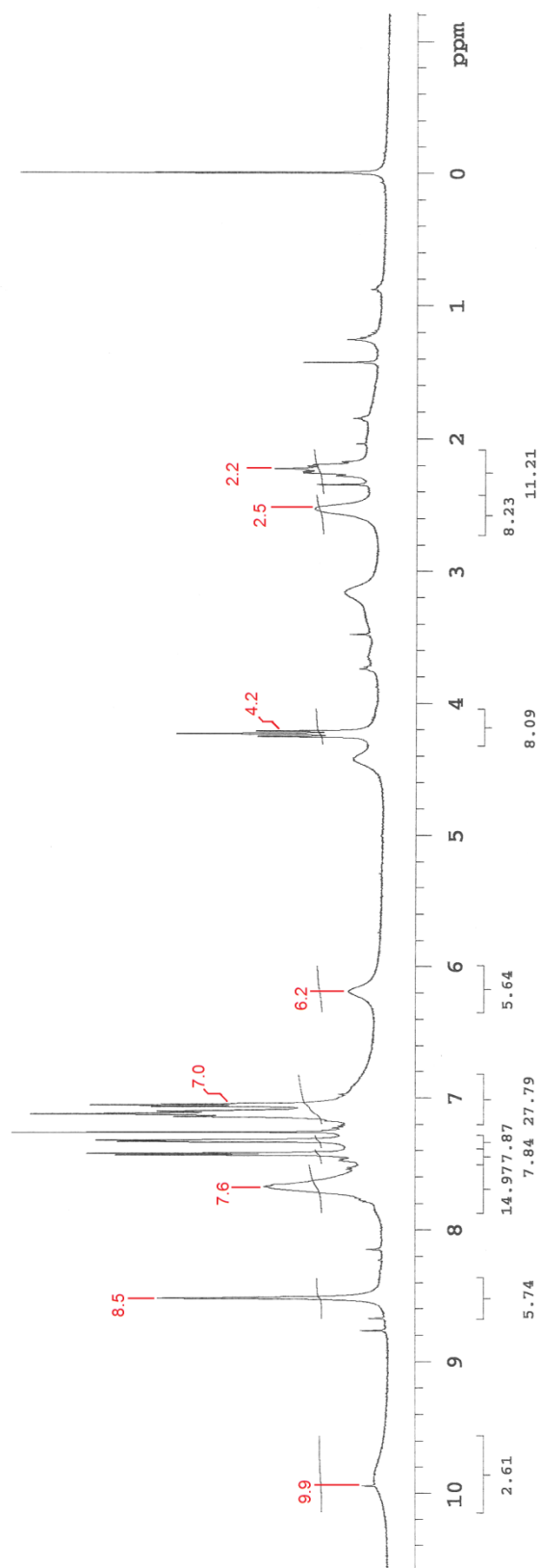
ANEXO G. Estrutura e IV cm^{-1} da hidrazona 44



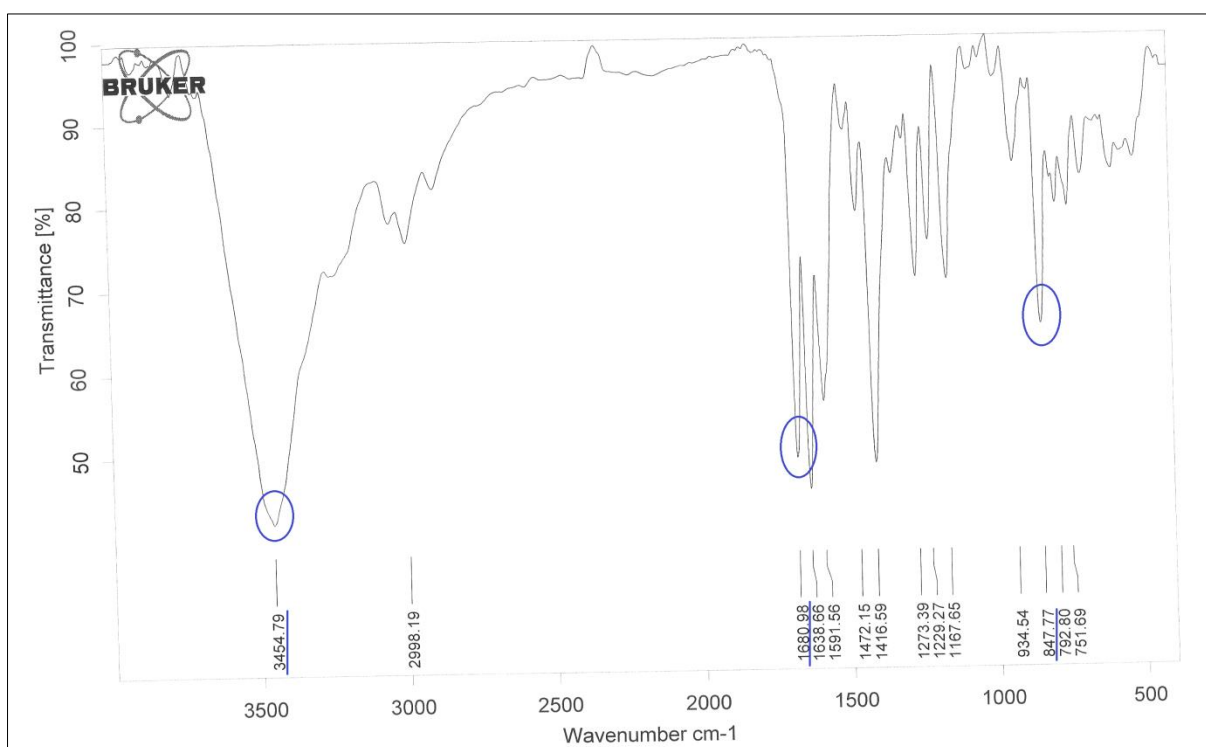
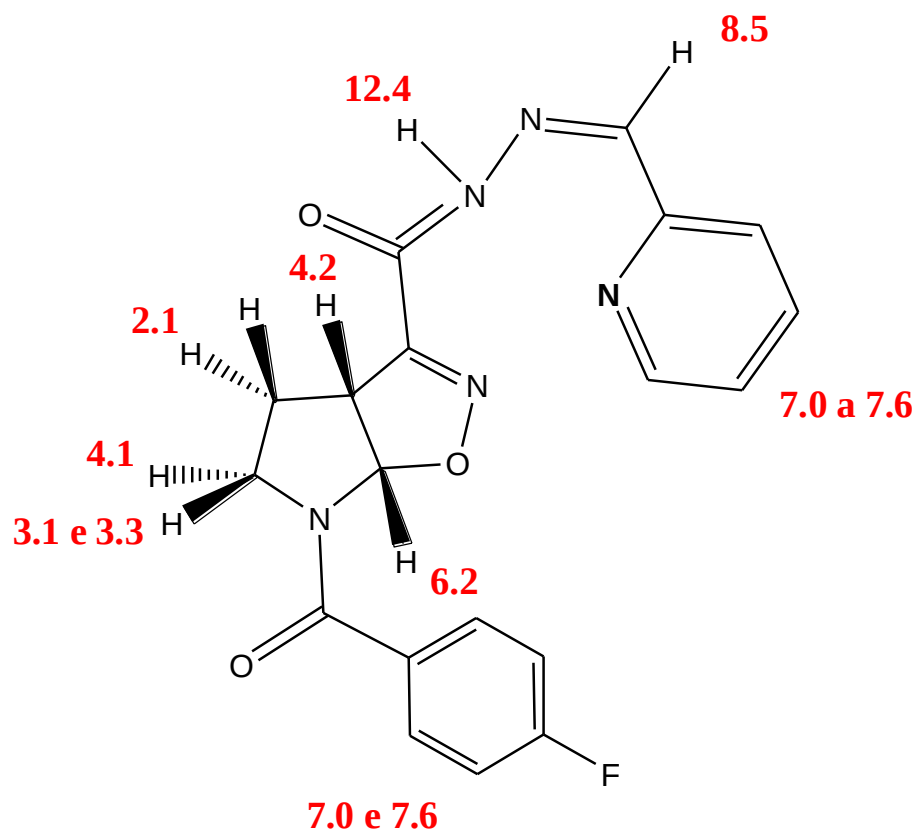
ANEXO H. RMN H^{-1} da estrutura da hidrazona 44

ANEXO I. Estrutura e IV cm^{-1} da hidrazona 45



ANEXO J. RMN H^{-1} da estrutura da hidrazona 45

ANEXO K. Estrutura e IV cm^{-1} da hidrazona 46



ANEXO L. RMN H^{-1} da estrutura da hidrazona 46