



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
LABORATÓRIO DE SÍNTESE ORGÂNICA APLICADA À FÁRMACOS
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

JÉSSICA ARAÚJO BEZERRA MESQUITA

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTICHAGÁSICA E
ANTILEISHMANIA DE NOVOS DERIVADOS TIOSSEMICARBAZÔNICOS E
ISOXAZOLÍNICOS AZA-BICÍCLICOS DE SEIS MEMBROS**

Recife
2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
LABORATÓRIO DE SÍNTESE ORGÂNICA APLICADA À FÁRMACOS

JÉSSICA ARAÚJO BEZERRA MESQUITA

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTICHAGÁSICA E
ANTILEISHMANIA DE NOVOS DERIVADOS TIOSSEMICARBAZÔNICOS E
ISOXAZOLÍNICOS AZA-BICÍCLICOS DE SEIS MEMBROS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco, requisito obrigatório, para a obtenção do Título de Mestre em Inovação Terapêutica.

ORIENTADOR

Prof. Dr. Antônio Rodolfo de Faria

CO-ORIENTADORA

Prof^a. Valéria Pereira Hernandes

Recife

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD

Mesquita, Jéssica Araújo Bezerra

Síntese e avaliação das atividades antichagásica e antileishmania de novos derivados tiossemicarbazônicos e isoxazolinícos aza-bicíclicos de seis membros / Jéssica Araújo Bezerra Mesquita. – 2018.

176 f. : il.

Orientador: Antônio Rodolfo de Faria.

Coorientadora: Valéria Pereira Hernandez.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica, Recife, 2018.

Inclui referências e anexos.

1. Doenças parasitárias. 2. Farmacologia. I. Faria, Antônio Rodolfo de (Orientador). II. Hernandez, Valéria Pereira (Coorientadora). III. Título.

616.96

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2018 - 269

JÉSSICA ARAÚJO BEZERRA MESQUITA

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTICHAGÁSICA E
ANTILEISHMANIA DE NOVOS DERIVADOS TIOSSEMICARBAZÔNICOS E
ISOXAZOLÍNICOS AZA-BICÍCLICOS DE SEIS MEMBROS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco, requisito obrigatório, para a obtenção do Título de Mestre em Inovação Terapêutica.

Aprovada em: 13 de março de 2018

BANCA EXAMINADORA

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

PRIMEIRA EXAMINADORA EXTERNA: Prof.^a Dr.^a Marina Galdino da Rocha Pitta
(Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica – Universidade Federal de Pernambuco)

SEGUNDA EXAMINADORA EXTERNA: Prof.^a Dr.^a Ivani Malvestiti
(Departamento de Química Fundamental - Universidade Federal de Pernambuco)

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Santíssima Trindade, a Nossa Senhora de Fátima e a Nossa Senhora da Conceição por todas as bênçãos, graças, saúde e vitórias alcançadas. “Toda honra e toda glória ao nosso Senhor”.

Agradeço ao Prof. Dr. Antônio Rodolfo, idealizador deste projeto, a quem possuo eterna gratidão pelas aulas de química que tive a oportunidade de assistir, por ser um excelente orientador, pela oportunidade de fazer parte do LASOF, pela dedicação que tem com os seus alunos, por ser um exemplo de professor e pessoa.

Agradeço a professora Valéria Hernandez e a seu grupo de pesquisa, pela realização dos ensaios antichagásicos e leishmanicida e pela co-orientação.

Agradeço à minha família, aos meus pais Socorro e Neto por terem me ajudado em todos os momentos de minha vida, à minha irmã Joyce por ser uma amiga/irmã. Às minhas avós (Nair e Mariinha) por todas as orações e apoio, ao meu avô Juvenal por todos os conselhos e ensinamentos. Aos meus tios (Juliana e Juvenal Filho) por sempre estarem presentes na minha vida.

Agradeço ao meu esposo Joelson por estar presente em todos os momentos, sempre tendo sábias palavras, paciência, dedicação e inteligência. Por me incentivar diariamente a sempre estudar e ir atrás dos meus objetivos.

Agradeço todos os dias por fazer parte do LASOF e ter pessoas tão amáveis e especiais ao meu redor. Por isso aproveito a dedicatória para agradecer aos integrantes do LASOF e grandes irmãos: Marlene, Eduarda, Maria Clara, Felipe, Lucas, Dênis e Agamenon, pelo companheirismo, amizade e ajuda. O LASOF é minha segunda família, cada um destes tem um lugar especial no meu coração.

Agradeço ao IMIP, pela oportunidade de estar trabalhando em um hospital de referência, que agrega muitos conhecimentos e pelo aperfeiçoamento profissional constante. Em especial agradeço a minha chefe Dr. Mércia Veras pela oportunidade, confiança, conhecimentos transmitidos e pelas autorizações excedidas de trocas de

plantões. Às Farmacêuticas e amigas Marília Ribeiro, Nayane Rabelo e Cybelle Marques pelo companheirismo profissional, conselhos, amizade e confiança.

Agradeço as secretárias do Departamento de Ciências Farmacêuticas, Fátima e Danielle, por serem excelentes profissionais e pessoas.

Agradeço a Pós-Graduação em Inovação Terapêutica e ao seu Corpo Docente. Em especial agradeço ao secretário da Pós-Graduação, Paulo Germano por ser um profissional competente, organizado e prestativo.

Agradeço ao LTM – UFPE, especialmente ao Prof. Dr. Pedro Rolim e a doutoranda Cybelle Marques, por realizarem as análises de infravermelho.

Agradeço a Central Analítica do DQF-UFPE, especialmente as técnicas Abene e Eliete, por realizarem as análises de RMN.

Agradeço ao CNPq pelo financiamento do projeto.

RESUMO

A tripanossomíase e a leishmaniose são doenças infecto-parasitárias classificadas como negligênciadas pela OMS. Essas infecções continuam sendo o problema de saúde pública mais grave na América Latina. O tratamento para a doença de chagas está baseado na administração de duas drogas: Nifurtimox e Benznidazol. Embora possuam atividade significativa na fase aguda da doença, na fase crônica sua eficácia é muito limitada. De modo semelhante, o tratamento para todas as formas de leishmaniose está baseado na administração de agentes à base de antimônio, que são utilizados desde a década de 1940. Devido à existência de cepas resistentes fármacos de segunda linha (pentamidina, anfotericina B e a miltefosina) são utilizados, porém este tratamento geralmente é caro e provoca diversos efeitos colaterais. Por estas razões, são necessários o desenvolvimento de novas substâncias químicas com efeitos tripanocida e leishmanicida. Isoxazolinazóis aza-bicíclicos de cinco e seis membros foram desenvolvidas anteriormente e aplicadas sinteticamente neste trabalho na obtenção de novos derivados tiossemicarbazônicos, híbridos contendo tais núcleos, especificamente a série de seis membros. Existem vários relatos na literatura de interessantes atividades biológicas para derivados que contém 2-isoxazolinazóis e tiossemicarbazonas em suas estruturas, como atividade antimicrobiana, antitumoral, antichagásica, anti-leishmaniose, entre outras. Neste trabalho, foram descritas as reações de cicloadição 1,3-dipolar entre as enamidas endocíclicas de seis membros (**29a, 29b**) e o *N*-óxido de nitrila CEFNO **40**, onde foram obtidos os ésteres isoxazolinazólicos azabícíclicos de seis membros (**30a, 30b**). As enamidas (**29a, 29b**), utilizadas como material de partida, foram obtidas a partir da acilação da 1-piperideína (trímero da 1-piperideína) **28a** e tiveram rendimentos de 58% **29b** e 99% **29a**. Os ésteres isoxazolinazólicos **30** tiveram rendimentos de 35% (**30a**) e 30% (**30b**), estes foram reduzidos a álcoois isoxazolinazólicos **31** via NaBH₄, que tiveram rendimentos de 68% (**31a**) e 54% (**31b**). A partir dos álcoois, foram sintetizados os aldeídos isoxazolinazólicos **32** via oxidação de Swern com rendimentos de 83% (**32b**) e 85% (**32a**). A última etapa se deu por meio de uma condensação dos aldeídos isoxazolinazólicos azabícíclicos de seis membros **32** com diferentes tiossemicarbazidas **46**, adquiridas comercialmente. As moléculas finais tiveram rendimentos de 70% **33b**, 62% **33c**, 84% **33a** e 52% **33d**, foram caracterizadas através da espectroscopia de RMN (1D e 2D) e infravermelho, assim como tiveram suas características físico-

químicas determinadas. A síntese foi finalizada com êxito e as inéditas tiossemicarbazonas isoxazolínicas foram conduzidas à testes de citotoxicidade, atividade inibitória frente as formas epimastigota (cepa DM28c) e a tripomastigota (cepa Y) de *Trypanosoma cruzi* e atividade leishmanicida frente as formas amastigota (macrófagos RAW 264.7) e promastigotas de *Leishmania amazonensis* (cepa WHOM/00 LTB 0016) e *Leishmania infantum* (cepa MHOM/MA/67/ITMAP-263). De modo geral, os compostos finais apresentaram atividade antichagásica e antileishmania, tendo destaque para a tiossemicarbazona isoxazolínica *p*-OCH₃ **33d** (IC₅₀ = 12,6 µM) que demonstrou ser mais ativa, frente a forma tripomastigota, que o benznidazol (IC₅₀ = 40,96 µM). Este mesmo composto apresentou uma citotoxicidade (CC₅₀ = 250,22 µM) 4,4 vezes menor que a miltefosina (CC₅₀ = 56,67 µM) e demonstrou uma maior atividade leishmanicida.

Palavras chaves: 2-isoxazolina. Tiossemicarbazona. Atividade antichagásica. Atividade leishmanicida.

ABSTRACT

Trypanosomiasis and leishmaniasis are infectious and parasitic diseases classified as neglected by WHO. These infections continue to be the most serious public health problem in Latin America. The treatment for Chagas' disease is based on the administration of two drugs: Nifurtimox and Benznidazole. Although they have significant activity in the acute phase of the disease, in the chronic phase their effectiveness is very limited. Similarly, treatment for all forms of leishmaniasis is based on the administration of antimony-based agents, which have been used since the 1940s. Due to the existence of resistant strains of second-line drugs (pentamidine, amphotericin B and miltefosine) are used, however this treatment is usually expensive and causes several side effects. For these reasons, the development of new chemicals with trypanocidal and leishmanicidal effects is necessary. Five and six-membered azabicyclic isoxazolines have been previously developed and applied synthetically in this work to obtain novel thiosemicarbazonic derivatives, hybrids containing such nuclei, specifically the six-membered series. There are several reports in the literature of interesting biological activities for derivatives containing 2-isoxazolines and thiosemicarbazones in their structures, such as antimicrobial, antitumor, antichagasic, anti-leishmaniasis, among others. In this work, 1,3-dipolar cycloaddition reactions were reported between six-membered endocyclic enamides (**29a**, **29b**) and nitrile *N*-oxide CEFNO **40**, where six-membered azabicyclic isoxazoline esters (**30a**, **30b**). The enamides (**29a**, **29b**) used as the starting material were obtained from the acylation of 1-piperidine (1-piperidine trimer) **28a** and had reductions of 58% **29b** and 99% **29a**. The isoxazoline esters **30** had yields of 35% (**30a**) and 30% (**30b**), these were reduced to isoxazoline alcohols via NaBH₄, which yielded 68% (**31a**) and 54% (**31b**) yields. From the alcohols, the isoxazoline aldehydes **32** were synthesized via Swern oxidation in yields of 83% (**32b**) and 85% (**32a**). The latter step was by condensation of the six-membered azabicyclic isoxazolinic aldehydes **32** with different, commercially acquired thiosemicarbazides **46**. The final molecules had yields of 70% **33b**, 62% **33c**, 84% **33a** and 52% **33d**, were characterized by NMR (1D and 2D) and infrared spectroscopy, as well as their physicochemical characteristics. The synthesis was successfully completed and the novel isoxazoline thiosemicarbazones were tested for cytotoxicity, inhibitory activity against epimastigote forms (strain DM28c) and trypanosometa (strain Y) of *Trypanosoma cruzi* and leishmanicidal activity against amastigote forms (RAW

264.7 macrophages) and promastigotes from *Leishmania amazonensis* (strain WHOM / 00 LTB 0016) and *Leishmania infantum* (strain MHOM / MA / 67 / ITMAP-263). In general, the final compounds presented antichagasic and antileishmania activity, with emphasis on thiosemicarbazone isoxazoline *p*-OCH₃ **33d** (IC₅₀ = 12,6 µM), which showed to be more active than trypomastigote form than benznidazole (IC₅₀ = 40, 96 µM). This same compound had a cytotoxicity (CC₅₀ = 250,22 µM) 4,4 times lower than miltefosine (CC₅₀ = 56,67 µM) and demonstrated a higher leishmanicidal activity.

Keywords: 2 - isoxazoline. Thiosemicarbazone. Antichagasic activity. Leishmanicidal activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 -	Molécula híbrida contendo os núcleos 2-isoxazolina e tiossemicarbazona.....	26
Figura 02 -	Tipos de isoxazolinas - isoxazol, 2-isoxazolina, 3-isoxazolina, 4-isoxazolina e isoxazolidina, respectivamente.....	28
Figura 03 -	Exemplo de moléculas biologicamente ativas que contém o grupo 2-isoxazolina, sintetizadas por BASAPPA et al., 2003.....	28
Figura 04 -	Nistatina, antifúngico utilizado como padrão nas pesquisas de BASAPPA et al., 2003.....	29
Figura 05 -	Exemplo de moléculas biologicamente ativas que contém o grupo 2-isoxazolina, sintetizadas por ISMAIL et al., em 2015.....	29
Figura 06 -	Derivado da 2-isoxazolina desenvolvido por PRAJAPTI et al., 2015.....	30
Figura 07 -	Etoposido, fármaco de referência utilizado como padrão nas pesquisas de PRAJAPTI et al., 2015.....	30
Figura 08 -	Derivado da 2-isoxazolina desenvolvido por PRAJAPTI et al., 2015.....	30
Figura 09 -	Antimicrobianos utilizados como padrões nas pesquisas de PRAJAPTI et al., 2015.....	31
Figura 10 -	Nitrofurfuril-hidrazona, potente antichagásico, desenvolvido no nosso grupo de pesquisa por DE ALEMEIDA et al., 2010.....	31
Figura 11 -	Benznidazol, fármaco antichagásico de referência.....	32
Figura 12 -	Derivados do ácido hidroxâmico contendo o núcleo 2-isoxazolina desenvolvido por MENEZES D. R. et al., 2015.....	32
Figura 13 -	Combinação dos orbitais moleculares na reação de cicloadição 1,3-dipolar (GOMES A. T. 2014).....	33
Figura 14 -	Bis-heterociclos contendo o núcleo 2-isoxazolina, desenvolvida por ISMAIL et al., 2015.....	35
Figura 15 -	Cumarinas funcionalizadas com isoxazolinas, desenvolvida por ISMAIL et al., 2015.....	36
Figura 16 -	Levamisol, padrão utilizado nas pesquisas de ISMAIL et al., 2015.....	36

Figura 17 -	Numeração das tiossemicarbazonas reproduzida por Tenório R. P. et al., 2005.....	38
Figura 18 -	Moléculas, candidatas a fármacos, contendo tiossemicarbazonas (JALLAPALLY et al., 2014).....	39
Figura 19 -	Híbridos de piperazina-tiossemicarbazona substituídos à base de 2-butil-4-cloroimidazol (JALLAPALLY et al., 2014).....	43
Figura 20 -	Metisazona, fármaco efetivo na profilaxia do vírus da varíola, desenvolvido por BAUER D. J. E SADLER P. W., 1961.....	44
Figura 21 -	Derivado tiossemicarbazônico com potencial ação quelante desenvolvido por FRENCH et al., 1966.....	44
Figura 22 -	Derivados tiossemicarbazônicos e semicarbazônicos desenvolvidos por AGGARWAL et al., 2008.....	47
Figura 23 -	Aril-tiossemicarbazonas desenvolvida por Silva A. C. et al., 2017.....	48
Figura 24 -	Estruturas de 5-nitrofuriltiossemicarbazonas com atividade <i>anti-T cruzi</i> (Silva B. V., Silva B. N. M., 2017).....	48
Figura 25 -	4-nitrobenzaldeído tiossemicarbazona derivada do S-limoneno, desenvolvido por BRITTA E. A. et al., 2014.....	49
Figura 26 -	A. Formas evolutivas do <i>Trypanosoma cruzi</i> B. Hospedeiro vertebrado C. Vetor inseto.....	51
Figura 27 -	Ciclo evolutivo do <i>Trypanosoma cruzi</i>	51
Figura 28 -	Benznidazol 21 e Nifurtimox 22 , fármacos antichagásicos.....	52
Figura 29 -	Ciclo biológico da Leishmania no hospedeiro vertebrado e no inseto vetor.....	56
Figura 30 -	Formação do dímero do <i>N</i> -óxido de nitrila 47	70
Figura 31 -	Espectro de RMN de ¹ H do cicloaduto isoxazolínico <i>p</i> -CH ₃ 30a	73
Figura 32 -	Espectro de RMN de ¹³ C do cicloaduto isoxazolínico <i>p</i> -CH ₃ 30a	73
Figura 33 -	Espectro de RMN de ¹ H do álcool isoxazolínico <i>p</i> -CH ₃ 31a	76
Figura 34 -	Espectro de RMN de ¹³ C do álcool isoxazolínico <i>p</i> -CH ₃ 31a	76

Figura 35 -	Espectro de RMN de ^1H do aldeído isoxazolínico <i>p</i> -CH ₃ 32a	79
Figura 36 -	Espectro de RMN de ^{13}C do aldeído isoxazolínico <i>p</i> - CH ₃ 32a	79
Figura 37 -	Dados espectométricos de RMN de ^1H da tiossemicarbazona isoxazolínica 33a	85
Figura 38 -	Espectro de RMN de ^1H da tiossemicarbazona isoxazolínica 33a	85
Figura 39 -	Dados espectométricos de RMN de ^{13}C da tiossemicarbazona isoxazolínica 33a	86
Figura 40 -	Espectro de RMN de ^{13}C da tiossemicarbazona isoxazolínica 33a	86
Figura 41 -	Figura 39 - Espectro de IV-FT da tiossemicarbazona isoxazolínica 33a	87
Figura 42 -	Espectro ilustrativo de IV-FT das inéditas tiossemicarbazonas isoxazolínicas 33b , 33c , 33d	87
Figura 43 -	Espectros de RMN por correlação HSQC, 33a	88
Figura 44 -	Derivados tiossemicarbazônicos isoxazolínicos que tiveram a maior e menor citotoxicidade, em relação ao fármaco padrão utilizado (Benznidazol).....	116
Figura 45 -	Ilustração comparativa da citotoxicidade e atividade leishmanicida frente a forma amastigota dos derivados híbridos tiossemicarbazônicos e isoxazolínicos.....	120

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 01 -	Exemplo de reação de cicloadição 1,3-dipolar. O cicloaduto exemplificado foi desenvolvido por Almeida et al, em 2009.....	33
Esquema 02 -	Exemplos de cicloadições 1,3-dipolares pelo mecanismo concertado e diferentes tipos de dipolo.....	34
Esquema 03 -	Representação genérica da síntese de isoxazolininas a partir de aliloximas realizada por TRIANDAFILLIDI et al., em 2016.....	36
Esquema 04 -	Estratégias para obtenção de tiossemicarbazonas descritas por TENÓRIO R. P. et al., 2005.....	40
Esquema 05 -	Mecanismo de formação de tiossemicarbazonas reproduzido por TENÓRIO et al., 2005.....	41
Esquema 06 -	Mecanismo de formação de tiossemicarbazidas substituídas na posição N-4 com grupos incomuns reproduzido por TENÓRIO et al., 2005.....	42
Esquema 07 -	Formação de tiossemicarbazidas a partir de hidrato de hidrazina com isotiocianatos reproduzido por TENÓRIO et al., 2005.....	42
Esquema 08 -	Formação de tiossemicarbazidas a partir de derivados de amina com dissulfeto de carbano, seguida da adição de hidrato de hidrazina reproduzido por TENÓRIO et al., 2005.....	43
Esquema 09 -	Síntese dos derivados tiossemicarbazônicos adicionados em 5-metoxisalicialdeído (SUBHASHREE et al., 2017)	45
Esquema 10 -	Síntese dos derivados tiossemicarbazônicos adicionados em 2-hidroxi-1-naftaldeído (SUBHASHREE et al., 2017)	45
Esquema 11 -	Mecanismo de ação proposto dos fármacos Nifurtimox e benznidazol (Adaptado de DIAS, L. C., 2009)	53
Esquema 12 -	Rota sintética para obtenção dos novos compostos tiossemicarbazônicos e isoxazolínicos aza-bicíclicos de seis	

	membros, derivados do heterocíclico 2-isoxazolina [5,4-b]piperidina	63
Esquema 13 -	Suposto mecanismo de destrimerização para obtenção das enamidas endocíclicas de seis membros, partindo do trímero da 1-piperideína	67
Esquema 14 -	Suposto mecanismo da síntese do cloridrato de glicina esterificada	68
Esquema 15 -	Mecanismo de cicloadição 1,3-dipolar, proposto por Dos Santos, em 2003, entre enamidas endocíclicas ou enecarbamatos com o <i>N</i> -óxido de nitrila CEFNO	72
Esquema 16 -	Mecanismo reacional para formação do álcool isoxazolínico.....	75
Esquema 17 -	Mecanismo da reação de Swern, oxidação dos álcoois isoxazolínicos aos respectivos aldeídos isoxazolínicos.....	78
Esquema 18 -	Mecanismo reacional para obtenção das inéditas tiossemicarbazonas isoxazolínicas aza-bicíclicas de seis membros.....	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 -	Derivados tiossemicarbazônicos, que despontaram como potentes antichagásicos (LORENA BLAU et al., 2013)	46
Tabela 02 -	Rendimentos obtidos na síntese das enamidas endocíclicas de seis membros <u>29</u>	66
Tabela 03 -	Rendimentos obtidos na síntese dos ésteres isoxazolínicos <u>30</u>	71
Tabela 04 -	Rendimentos obtidos na síntese dos álcoois isoxazolínicos <u>30</u>	75
Tabela 05 -	Rendimentos obtidos na síntese dos aldeídos isoxazolínicos <u>32</u>	78
Tabela 06 -	Rendimento obtido na síntese das novas moléculas híbridas, tiossemicarbazonas isoxazolínicas <u>33</u> , condensadas com diferentes tiossemicarbazidas <u>46</u>	82
Tabela 07 -	Valores de Citotoxicidade e IC ₅₀ das tiosemicarbazonas isoxazolínicas frente a forma epimastigota do <i>T. cruzi</i>	116
Tabela 08 -	Valores de Citotoxicidade e IC ₅₀ das tiosemicarbazonas isoxazolínicas frente a forma tripomastigota <i>T. cruzi</i>	117
Tabela 09 -	Valores de Citotoxicidade e IC ₅₀ sobre a forma promastigota de <i>L. amazonenses</i> e <i>L. infantum</i> das tiosemicarbazonas isoxazolínicas.....	118
Tabela 10 -	Valores de Citotoxicidade e IC ₅₀ das tiosemicarbazonas isoxazolínicas frente a forma amastigota de <i>L. amazonenses</i> e <i>L. infantum</i>	119

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CCD - Cromatografia em Camada Delgada
CC_{50%} - Concentração citotóxica a 50%
CEFNO – Óxido de Carboetoxiformonitrila
CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais
COSY - Espectroscopia de Correlação Homonuclear
DIBAL-H - Hidreto de Di-Isobutil Alumínio
DMSO - Di-Metil Sulfóxido
FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz
FMO - Orbitais Moleculares de Fronteira
HOMO - Orbital Molecular Ocupado de Maior Energia
HM – Hibridização Molecular
HSQC - Correlação Heteronuclear Single-Quantum
IC_{50%} - Concentração inibidora de 50%
IUPAC - União Internacional de Química Pura e Aplicada
IV – FT - Infra-Vermelho por Transformada de Fourier
IV-ATR - Infra-Vermelho por Reflectância Total Atenuada
LASOF - Laboratório de Síntese Orgânica Aplicada a Fármacos
LUMO - Orbital Molecular Não-Ocupado de Menor Energia
MTT - [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5diphenyltetrazolium bromide]
NB2 – Nível de Biossegurança 2
OMS - Organização Mundial de Saúde
QSAR – Relação Quantitativa Estrutura Atividade
RMN - Ressonância Magnética Nuclear
RPMI - Instituto Roswell Park Memorial
R_f - Fator de retenção
SAR – Relação estrutura atividade
SFB – Soro Fetal bovino
TEA - Trietilamina
THF - Tetrahydrofurano
UV - Ultra - Violeta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
1.1	OBJETIVOS	27
1.1.1	Objetivo Geral	27
1.1.2	Objetivos Específicos	27
2	REVISÃO DA LITERATURA	28
2.1	ISOXAZOLINAS	28
2.1.1	A importância das 2-isoxazolinias	28
2.1.2	Síntese do núcleo e de derivados da 2-isoxazolina	32
2.2	TIOSSEMICARBAZONAS	37
2.2.1	A importância das tiossemicarbazonas	38
2.3	FORMAS DE OBTENÇÃO DE TIOSSEMICARBAZONAS	39
2.3.1	Obtenção direta das tiossemicarbazonas	40
2.3.2	Obtenção indireta das tiossemicarbazonas pela preparação Prévia de tiossemicarbazidas, utilizando hidrato de hidrazina	41
2.4	SÍNTESE E DERIVADOS DA TIOSSEMICARBAZONA	43
2.5	DOENÇA DE CHAGAS.	49
2.5.1	Histórico da doença e Epidemiologia	49
2.5.2	O protozoário - <i>Trypanosoma cruzi</i> e seu ciclo evolutivo	50
2.5.3	Tratamento da doença de Chagas	52
2.5.4	Mecanismo de ação do Nifurtimox e Benznidazol	52
2.5.5	Doença de Chagas - fases, forma de transmissão e prevenção	54
2.6	LEISHMANIOSE	54
2.6.1	Histórico da doença e epidemiologia	54
2.6.2	O protozoário - Leishmania e seu ciclo evolutivo	55
2.6.3	Leishmaniose - forma de transmissão e prevenção	57
2.6.4	Tratamento da leishmaniose e mecanismo de ação dos fármacos utilizados	58
3	METODOLOGIA	61
3.1	ESTUDO QUÍMICO	61

4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
4.1	ETAPAS PARA OBTENÇÃO DO TRÍMERO DA 1-PIPERIDEÍNA <u>28a</u>	64
4.2	SÍNTESE DAS ENAMIDAS ENDOCÍCLICAS DE SEIS MEMBROS <u>29</u>	66
4.3	SÍNTESE DO CLORIDRATO DE GLICINA ESTERIFICADA <u>38</u>.....	67
4.4	SÍNTESE DO CLOROOXIMIDOACETATO DE ETILA <u>39</u> – PRECURSOR DO CEFNO <u>40</u>	69
4.5	SÍNTESE DOS ÉSTERES ISOXAZOLÍNICOS AZA-BICÍCLICOS DE SEIS MEMBROS <u>30</u>	69
4.6	SÍNTESE DOS ÁLCOOIS ISOXAZOLÍNICOS AZA-BICÍCLICOS DE SEIS MEMBROS <u>31</u>	74
4.7	SÍNTESE DOS ALDEÍDOS ISOXAZOLÍNICOS AZA-BICÍCLICOS DE SEIS MEMBROS <u>32</u>	77
4.8	SÍNTESE DAS TIOSSEMICARBAZONAS ISOXAZOLÍNICAS DE SEIS MEMBROS <u>33</u> CONDENSAÇÃO ENTRE ALDEÍDOS ISOXAZOLÍNICOS <u>32</u> E TIOSSEMICARBAZIDAS <u>46</u>	80
5	PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.	89
5.1	MATERIAIS E MÉTODOS.....	89
5.2	SÍNTESE DO TRÍMERO DA 1-PIPERIDEÍNA <u>28a</u>.....	90
5.2.1	Preparação do acetato de piperidínio <u>34</u>	90
5.2.2	Preparação da Solução de hipoclorito de cálcio.....	91
5.2.3	Titulação do Hipoclorito de cálcio	91
5.2.4	Obtenção da N-cloropiperidina.....	91
5.2.5	Obtenção do trímero da 1-piperideína <u>28a</u>	92
5.3	SÍNTESE DAS ENAMIDAS ENDOCÍCLICAS DE SEIS MEMBROS_ <u>29</u>	93
5.3.1	Síntese da N-(4-metoxibenzoil)-2-piperideína <u>29b</u>	94
5.3.2	Síntese da N-(4-toluilbenzoil)-2-piperideína <u>25a</u>	95
5.4	SÍNTESE DO CLORIDRATO DE GLICINA ESTERIFICADA <u>38</u>.....	96
5.5	SÍNTESE DO CLOROOXIMIDOACETATO DE ETILA <u>39</u> (PRECURSOR DO CEFNO) <u>40</u>	96

5.6	CICLOADIÇÃO 1,3-DIPOLAR DAS ENAMIDAS ENDOCÍCLICAS <u>37</u> COM O CLOROOXIMIDOACETATO DE ETILA <u>30</u>	97
5.6.1	Síntese do éster 7-(4-metoxibenzoila)-3a,4,5,6,7,7a- Hexahidroisoxazolo[5,4,-b]piridina-3-carboxilato de etila <u>30b</u>	97
5.6.2	Síntese do éster 7-(4-metilbenzoila)-3a,4,5,6,7,7a- Hexahidroisoxazolo[5,4,-b]piridina-3-carboxilato de etila <u>30a</u>	99
5.7	SÍNTESE DOS ÁLCOOIS ISOXAZOLÍNICOS <u>31</u> (REDUÇÃO DO GRUPAMENTO ÉSTER EM C3).	100
5.7.1	Síntese do álcool (4-metoxibenzoila)-3-hidroximetil-3a,4,5,6- tetrahidroisoxazol [5,4- <i>b</i>]piridin-7-il-metanona <u>31b</u>	100
5.7.2	Síntese do álcool (4-metilbenzoila)-3-hidroximetil-3a,4,5,6- tetrahidroisoxazol [5,4- <i>b</i>]piridin-7-il-metanona <u>31a</u>	101
5.8	SÍNTESE DOS ALDEÍDOS <u>32</u> VIA OXIDAÇÃO DE SWERN.....	102
5.8.1	Síntese do aldeído (4-metoxibenzoila)-3a,4,5,6,7,7a- hexahydroisoxazole [5,4, <i>b</i>]piridina carbaldeído <u>32b</u>	102
5.8.2	Síntese do aldeído (4-metilbenzoila)-3a,4,5,6,7,7a- hexahydroisoxazole [5,4, <i>b</i>]piridina carbaldeído <u>32a</u>	103
5.9	CONDENSAÇÃO DOS ALDEÍDOS ISOXAZOLÍNICOS <u>32</u> COM DIFERENTES TIOSSEMICARBAZIDAS <u>46</u>	104
5.9.1	Síntese da tiossemicarbazona (4-metoxibenzoila) - 3a,4,5,6,7,7a – hexahydroisoxazole[5,4- <i>b</i>]piridin-3-il-metileno- <i>N</i> -fenilhidrazinacarbotioamida <u>33d</u>	104
5.9.2	Síntese da tiossemicarbazona (4-metilbenzoila) - 3a,4,5,6,7,7a – hexahydroisoxazole[5,4- <i>b</i>]piridin-3-il-metileno- hidrazinacarbotioamida <u>33b</u>	106
5.9.3	Síntese da tiossemicarbazona (4-metilbenzoila) - 3a,4,5,6,7,7a – hexahydroisoxazole[5,4- <i>b</i>]piridin-3-il-metileno- <i>N</i> -fenilhidrazinacarbotioamida <u>33c</u>	107
5.9.4	Síntese da tiossemicarbazona (E)- <i>N</i> -metil-2-((7-(4-metilbenzoila) - 3a,4,5,6,7,7a – hexahydroisoxazole[5,4- <i>b</i>]piridin-3-il)metileno) hidrazinacarbotioamida <u>33a</u>	109
6	ATIVIDADES BIOLÓGICAS.....	111

6.1	AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE.....	111
6.1.1	Materiais e Métodos.....	111
6.1.2	Animais.....	111
6.1.3	Obtenção de células esplênicas.....	111
6.1.4	Avaliação da atividade tóxica dos compostos em células de camundongos isogênicos.....	112
6.2	ATIVIDADE ANTICHAGÁSICA.....	112
6.2.1	Cultura de <i>Trypanosoma cruzi</i>	112
6.2.2	Avaliação da atividade dos compostos contra <i>Trypanosoma Cruzi</i>	113
6.2.2.1	Frente a epimastigotas.....	113
6.2.2.2	Frente a tripomastigotas.....	113
6.3	ATIVIDADE LEISHMANICIDA.....	114
6.3.1	Cultura de <i>Leishmania amazonenses</i> e <i>Leishmania infantum</i>	114
6.3.2	Avaliação da atividade dos compostos contra <i>Leishmania amazonenses</i> e <i>Leishmania infantum</i>	114
6.3.2.1	Frente a promastigotas.....	114
6.3.2.2	Frente a amastigotas.....	115
7	DISCUSSÃO.....	115
7.1	ATIVIDADE ANTICHAGÁSICA.....	115
7.2	ATIVIDADE LEISHMANICIDA.....	118
7.3	PROTEASES DE <i>Leishmania</i>	120
8	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	122
	REFERÊNCIAS.....	124
	ANEXO A – ESPECTRO DE RMN DE ¹ H 300 MHz, <u>30a</u>	140
	ANEXO B – ESPECTRO DE RMN DE ¹³ C 75 MHz , <u>30a</u>	141
	ANEXO C – DEPT ¹³ C, <u>30a</u>	142
	APÊNDICE A – ESPECTRO DE RMN DE ¹ H 400 MHz, <u>31a</u>	143
	APÊNDICE B – ESPECTRO DE RMN DE ¹³ C 100 MHz, <u>31a</u>	144

APÊNDICE C – DEPT ^{13}C , <u>31a</u>	145
APÊNDICE D – ESPECTRO DE RMN DE ^1H 400 MHz, <u>32a</u>	146
APÊNDICE E – ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C 100 MHz, <u>32a</u>	146
APÊNDICE F – DEPT ^{13}C , <u>32a</u>	148
APÊNDICE G – ESPECTRO DE RMN DE ^1H 300 MHz, <u>33a</u>	149
APÊNDICE H – ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C 75 MHz, <u>33a</u>	150
APÊNDICE I – DEPT ^{13}C , <u>33a</u>	151
APÊNDICE J – ESPECTRO DE RMN POR CORRELAÇÃO HSQC, <u>33a</u>	152
APÊNDICE L – ESPECTRO DE RMN POR CORRELAÇÃO HSQC, <u>33a</u>	153
APÊNDICE M – ESPECTRO DE INFRAVERMELHO, <u>33a</u>	154
APÊNDICE N – ESPECTRO DE RMN DE ^1H 300 MHz, <u>33b</u>	155
APÊNDICE O – ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C 75 MHz, <u>33b</u>	156
APÊNDICE P – DEPT ^{13}C , <u>33b</u>	157
APÊNDICE Q – ESPECTRO DE RMN POR CORRELAÇÃO HSQC, <u>33b</u>	158
APÊNDICE R – RMN BIDIMENSIONAL HOMONUCLEAR COSY, <u>33b</u>	159
APÊNDICE S – ESPECTRO DE INFRAVERMELHO, <u>33b</u>	160
APÊNDICE T – ESPECTRO DE RMN DE ^1H 300 MHz, <u>33c</u>	161
APÊNDICE U – ESPECTRO DE RMN de ^{13}C 75 MHz, <u>33c</u>	162
APÊNDICE V – DEPT ^{13}C , <u>33c</u>	163
APÊNDICE X – ESPECTRO DE RMN POR CORRELAÇÃO HSQC, <u>33c</u>	164
APÊNDICE Z – ESPECTRO DE RMN POR CORRELAÇÃO HSQC, <u>33c</u>	165
APÊNDICE AA – RMN BIDIMENSIONAL HOMONUCLEAR COSY, <u>33c</u>	166
APÊNDICE AB – RMN BIDIMENSIONAL HOMONUCLEAR COSY, <u>33c</u>	167
APÊNDICE AC – ESPECTRO DE INFRAVERMELHO, <u>33c</u>	168
APÊNDICE AD – ESPECTRO DE RMN DE ^1H 300 MHz, <u>33d</u>	169

APÊNDICE AE – ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C 75 MHz, <u>33d</u>	170
APÊNDICE AF – DEPT ^{13}C , <u>33d</u>	171
APÊNDICE AG – ESPECTRO DE RMN POR CORRELAÇÃO HSQC, <u>33d</u>	172
APÊNDICE AH – ESPECTRO DE RMN POR CORRELAÇÃO HSQC, <u>33d</u>	173
APÊNDICE AI – RMN BIDIMENSIONAL HOMONUCLEAR COSY, <u>33d</u>	174
APÊNDICE AJ – RMN BIDIMENSIONAL HOMONUCLEAR COSY, <u>33d</u>	175
APÊNDICE AL – ESPECTRO DE INFRAVERMELHO, <u>33d</u>	176

1 INTRODUÇÃO

A doença de Chagas descoberta em 1909 por Carlos Chagas, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* e transmitida ao homem por insetos triatomíneos (conhecidos como “barbeiros”), representa uma condição infecciosa classificada como enfermidade negligenciada pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 2012; WHO, 2013). Em comparação com a leishmaniose, malária e esquistossomose, a doença de Chagas é responsável por maior mortalidade e morbidade em países endêmicos, incluindo o Brasil (BONNEY K. M., 2014; RAMSEY J. M. et al., 2014).

A distribuição espacial da doença é limitada primariamente ao continente americano em virtude da distribuição de mais de 140 espécies do inseto vetor (Triatominae, Hemiptera, Reduviidae), daí ser também denominada “tripanossomíase americana” (WHO, 2010). Progressivamente, no entanto, a doença tem alcançado países não endêmicos, mediante o deslocamento de pessoas infectadas e por meio de outros mecanismos, sendo a transmissão transfusional considerada a principal via de propagação em países não endêmicos. (MONCAYO A., SILVEIRA A. C., 2009; REQUENA-MÉNDEZ A. et al., 2015).

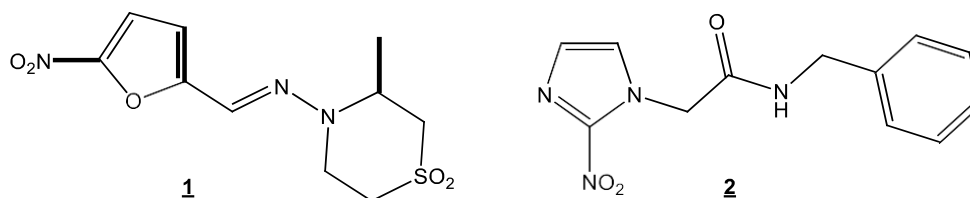
Estima-se que, a doença de chagas afete cerca de 8 a 10 milhões de pessoas em todo o mundo, tornando-se um sério problema global. Atualmente, a doença é a principal causa de insuficiência cardíaca no sul dos países americanos, sendo um desafio mundial de saúde pública. (PALACE-BERL, et al., 2013; MENEZES D. R., et al., 2015).

Outra doença infecto-parasitária considerada negligenciada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) é a leishmaniose, uma doença crônica causada por protozoários do gênero *Leishmania*, que são transmitidos de animais para humanos pela picada de flebotomíneos infectados, pertencentes principalmente aos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia*, popularmente chamados de “mosquito palha” ou “cangalhinha” (SACKS D., NOBEN-TRAUTH N., 2002; BATES P. A., 2007). De forma semelhante ao *T. cruzi*, a *Leishmania* também apresenta um ciclo de vida heteroxênico, estando presente no hospedeiro na forma amastigota (aflagelada) e no vetor diferenciam-se em promastigota (flagelada) (BRASIL, MS, 2006; WHO, 2012).

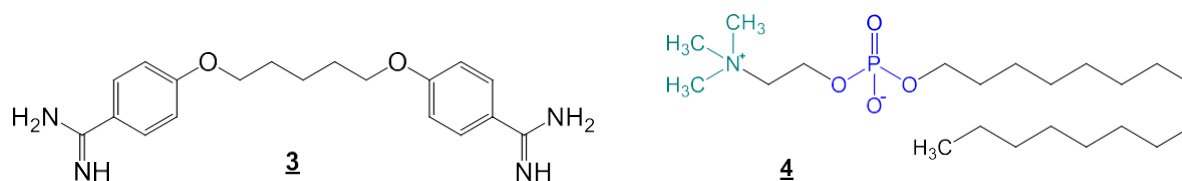
Atualmente, estima-se que 12 milhões de indivíduos estejam infectados com *Leishmania*, e que mais de 350 milhões de pessoas vivam em áreas de risco de infecção da doença (ALVAR J. et al., 2012). As leishmanioses são endêmicas em 98

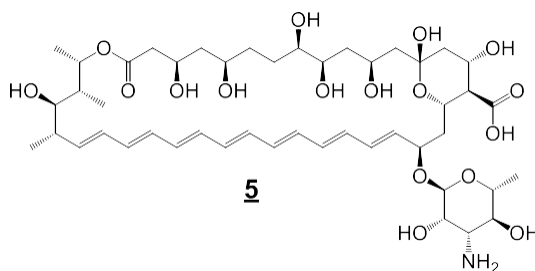
países, com cerca de 700.000 a 1 milhão de casos notificados a cada ano, e uma estimativa de 20.000 a 30.000 mortes anuais (WHO, 2018), sendo considerada pela OMS um problema de saúde pública mundial (GUERRA J. A. O. et al., 2007).

Os métodos disponíveis para o diagnóstico e tratamento das duas doenças tropicais negligenciadas não apresentam a eficácia e aplicabilidade desejadas. O tratamento etiológico atual para a doença de chagas está baseado na administração de duas drogas, Nifurtimox **1** (um nitrofurano fabricado pela Bayer) e Benznidazol **2** (um derivado de nitroimidazol fabricado pela Roche), lançados em 1967 e 1971, respectivamente. Ambos inibem a síntese de DNA, RNA e das proteínas, possuem esquema terapêutico prolongado, efeitos tóxicos e cepas naturalmente resistentes. (OLIVEIRA M. F. et al., 2008; AGUIRRE G. et al., 2004).



De maneira semelhante, os agentes antimoniais foram a base do tratamento medicamentoso para todas as formas de leishmaniose desde a década de 1940, mas o desenvolvimento de cepas resistentes tem sido um grande problema associado ao uso dessas drogas (DELMAS F. et al., 2002). Atualmente, a pentamidina **3**, a miltefosina **4** e a anfotericina B **5** são administradas como terapêutica de segunda linha, sendo importante destacar que a miltefosina **4** é a única droga administrada por via oral. No entanto, este tratamento é geralmente caro e provoca efeitos colaterais adversos (DEA-AYUELA M. A. et al., 2009). Diante dos fatores expostos, existe a necessidade do desenvolvimento de novos fármacos com atividade anti-*T. cruzi* e anti-leishmania que, por um lado, apresentem menor toxicidade, e por outro, maior eficácia.





Dentro desse contexto se insere a Química Medicinal, uma ciência multidisciplinar que combina várias especialidades, como Química Orgânica, Bioquímica, Físico-Química, Farmacologia, Informática, Biologia Molecular, Biologia Estrutural, Biologia Celular, entre outras (AMARAL A. T. et al., 2017).

De acordo com o Subcomitê de Química Medicinal e Desenvolvimento de Drogas da Divisão de Química e Saúde Humana da União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC), a Química Medicinal é a disciplina que estuda os aspectos relacionados à descoberta, invenção e preparação de substâncias bioativas de interesse terapêutico, e os fatores moleculares do modo de ação dos fármacos, incluindo a compreensão da relação entre estrutura química e atividade, além de aspectos relacionados à absorção, distribuição, metabolismo, eliminação e toxicidade. Portanto, a Química Medicinal é uma ciência fundamentada em Química, que envolve aspectos importantes das Ciências Farmacêuticas, Médicas e Biológicas (AMARAL A. T. et al., 2017).

Uma estratégia clássica utilizada pela Química Medicinal no desenho de novos protótipos é a hibridização molecular (HM), que pode ser definida sucintamente como a junção de fragmentos bioativos em uma estrutura molecular química única. (VIEGAS-JUNIOR et al., 2007; BARREIRO E. J. et al., 2002). Segundo Nepali e Colaboradores, a hibridização molecular (HM) pode estar baseada na junção de fármacos distintos (HM do tipo droga-droga) ou de grupos farmacofóricos de fármacos distintos (HM do tipo farmacofórica). Em ambos os casos, a nova molécula produzida por HM passa a se chamar de híbrido, o qual frequentemente apresenta maior afinidade e eficácia que os compostos que lhe deram origem (NEPALI K. et al., 2014).

Na literatura, encontram-se diversos relatos de atividade biológica para o núcleo 2-isoxazolina, como atividade antimicrobiana (KUMAR A. B. V. K. et al., 2014; ROUF, SAHIN, TANYELI, 2017; ZAKI Y. H. et al., 2016), anticancerígena (PRAJAPTI S. K. et al., 2015; ROUF, SAHIN, TANYELI, 2017), antifúngica (BASAPPA et al., 2003, MISHRA R. C., 2004), antichagásica (DE ALMEIDA, 2010; MENEZES D. R., et al.,

2015), entre outras. Da mesma forma são encontrados inúmeros relatos para o núcleo tiossemicarbazona, como atividade anticancerígena (TÜRKKAN E., et al., 2017), antimicrobiana (TÜRKKAN E. et al., 2017; PAHONTU E. et al., 2016), antitumoral (ALTINTOP M. D. et al., 2016), antichagásica (BLAU L. et al., 2013 ; RIGOL C. et al., 2005, VITAL D. G. et al., 2016, LORANZO N. B. H. et al. 2012, FERNÁNDEZ M. et al. 2015), antileishmania (SILVA B. V., SILVA B. N. M., 2017) entre outras.

Baseado nestes dados, este trabalho teve por objetivo a síntese de novas moléculas híbridas, contendo os núcleos 2-isoxazolina azabícíclica e tiossemicarbazonas (figura 1), com potenciais atividades antichagásicas e anti-leishmania. Sendo importante destacar que, as isoxazolinas azabíclicas de 5 e 6 membros foram desenvolvidas anteriormente no Laboratório de Síntese Orgânica Aplicada a Fármacos (LASOF) e submetidas à várias atividades biológicas.

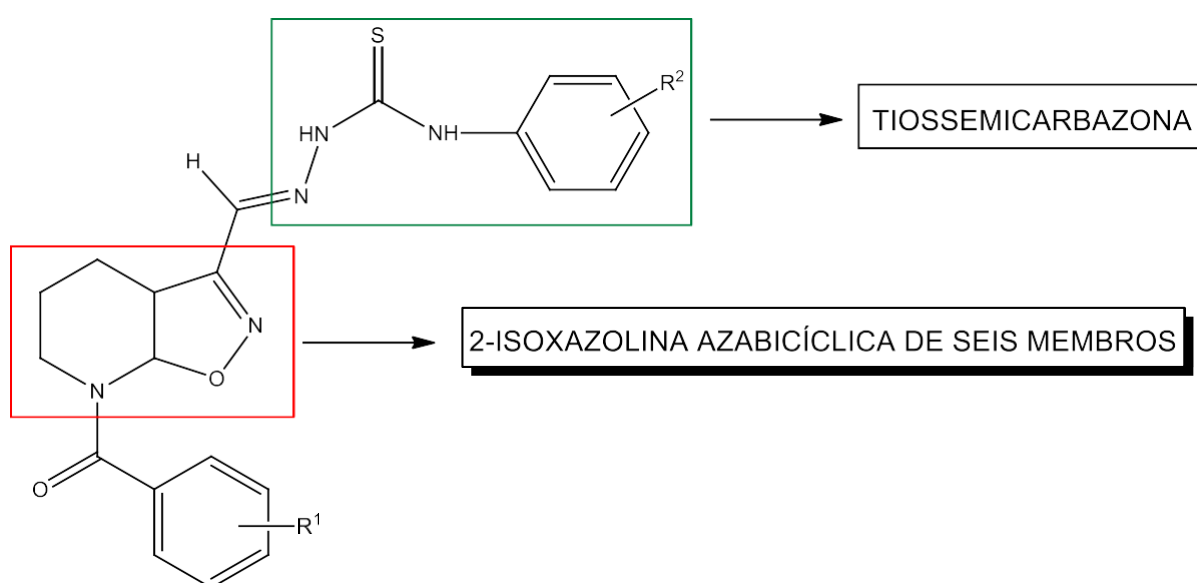


Figura 1 - Molécula híbrida contendo os núcleos 2-isoxazolina e tiossemicarbazona.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Obter novas tiossemicarbazonas-isoxazolínicas aza-bicíclicas de seis membros, executando sua elucidação estrutural e avaliando suas atividades antileishmania e antichagásica.

1.1.2 Objetivos específicos

- a) Sintetizar inéditas tiossemicarbazonas-isoxazolínicas aza-bicíclicas de seis membros, a partir da reação de cicloadição 1,3-dipolar e posterior condensação dos aldeídos obtidos com diferentes tiossemicarbazidas.
- b) Purificar e determinar as propriedades físico-químicas das novas moléculas.
- c) Elucidar as novas estruturas moleculares obtidas por meio de espectroscopias de ressonância magnética nuclear (^1H e ^{13}C), infravermelho e de massas.
- d) Avaliar a citotoxicidade, assim como as IC_{50} para as formas epimastigotas e tripomastigotas do parasita *T. cruzi* dos derivados híbridos, tendo como padrão o fármaco de referência Benznidazol.
- e) Avaliar a citotoxicidade, assim como as IC_{50} para as formas promastigotas e amastigotas do parasita *L. amazonensis* e *L. infantum* dos derivados híbridos, tendo como padrão o fármaco de referência Miltefosina.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ISOXAZOLINAS

São importantes heterocíclicos de 5 membros que possuem em sua estrutura dois heteroátomos ligados entre si (nitrogênio e oxigênio). As isoxazolininas ocupam uma posição significativa na química orgânica devido à sua existência em uma ampla gama de produtos sintéticos bioativos. (ROUF A. et al., 2017; ALMEIDA V. M., 2003). A classificação das diferentes isoxazolininas se dá por meio do grau de instauração do anel heterocíclico, de acordo com a posição da ligação π (π) que se identifica o tipo de isoxazolinina (figura 2), ressaltando que elas são derivadas do núcleo isoxazol. (ALMEIDA V. M., 2003).

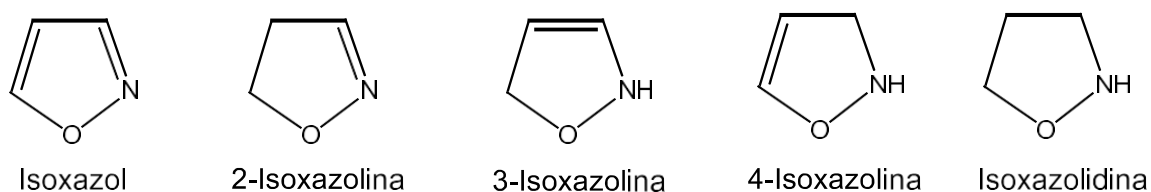


Figura 2 - Tipos de isoxazolininas: isoxazol, 2-isoxazolinina, 3-isoxazolinina, 4-isoxazolinina e isoxazolidina, respectivamente.

2.1.1 A importância das 2-isoxazolininas

De acordo com as pesquisas de Basappa et al., 2003, foi observado que o derivado 2-isoxazolinina (figura 3) despontou como um potente antifúngico, sua atividade foi comparável ou melhor que a nistatina (figura 4) (BASAPPA et al., 2003).

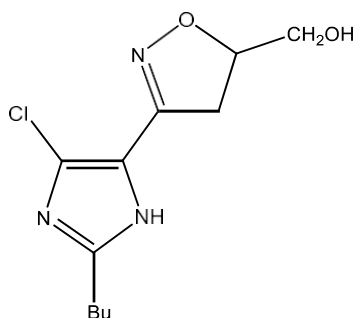


Figura 3 – Potente antifúngico derivado da 2-isoxazolinina desenvolvido por BASAPPA et al., 2003.

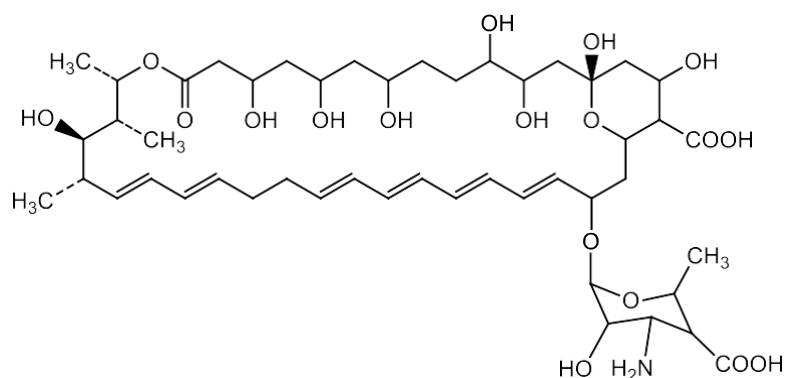


Figura 4 – Nistatina, antifúngico utilizado como padrão nas pesquisas de BASAPPA et al., 2003.

O núcleo derivado 2-isoxazolina (figura 5) com ambos os substituintes (R_1 e R_2) descritos acima, destacou-se como excelente potenciador imunológico. Os derivados foram submetidos a ensaios de proliferação de linfócitos *in vitro* seguidos por estudos *in vivo*. (ISMAIL et al., 2015).

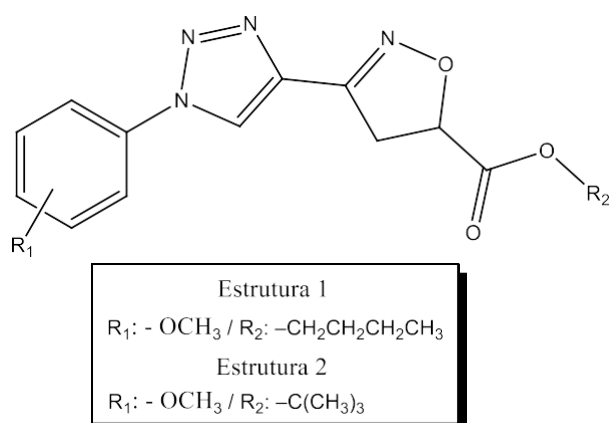


Figura 5 – Potenciador imunológico derivado da 2-isoxazolina desenvolvido por ISMAIL et al., 2015.

Prajapati et al., 2015, avaliou a atividade anticancerígena e antimicrobiana de uma série de compostos contendo o núcleo 2-isoxazolina. Por meio de diferentes análises foi evidenciado que a (figura 6) teve uma notável atividade antimicrobiana. Quando foi avaliada a atividade anticancerígena foi observado que da série estudada apenas a (figura 6) despontou como o composto citotóxico mais ativo, ressaltando que a droga de referência utilizado nas análises foi o etoposido (figura 7), fármaco utilizado para retardar o crescimento tumoral através da inibição da enzima topoisomerase II. (PRAJAPTI et al., 2015).

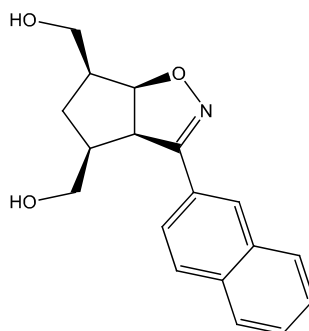


Figura 6 – Derivado da 2-isoxazolina desenvolvido por PRAJAPTI et al., 2015, despontou como o composto citotóxico mais ativo da série analisada.

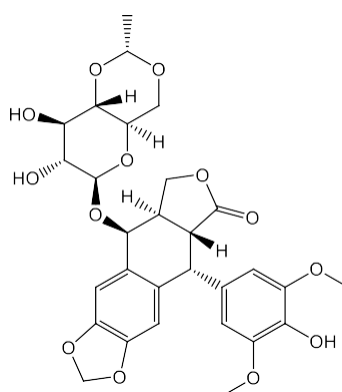


Figura 7 – Etoposido, fármaco anticancerígeno utilizado como padrão nas pesquisas PRAJAPTI et al., 2015.

Com relação à atividade antimicrobiana, foi observado que ambas as estruturas com os R apresentados (figura 8), contendo o núcleo 2-isoxazolina, exibiram notável atividade em relação aos fármacos padrões (Ampicilina, Gentamicina e Anfotericina B) (figura 9), utilizados nas análises. (PRAJAPTI et al., 2015).

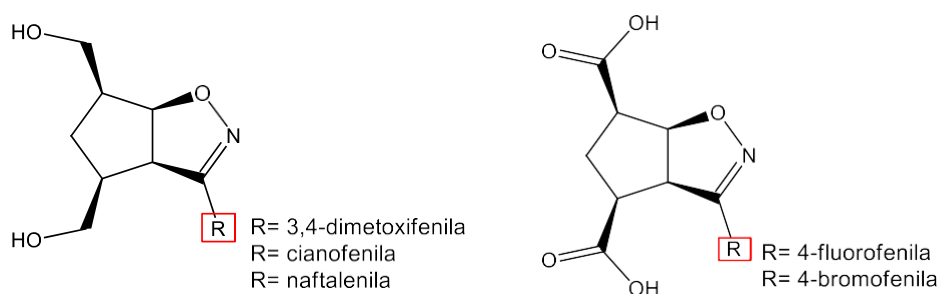


Figura 8 – Derivado da 2-isoxazolina desenvolvido por PRAJAPTI et al., 2015, exibiram notável atividade antimicrobiana.

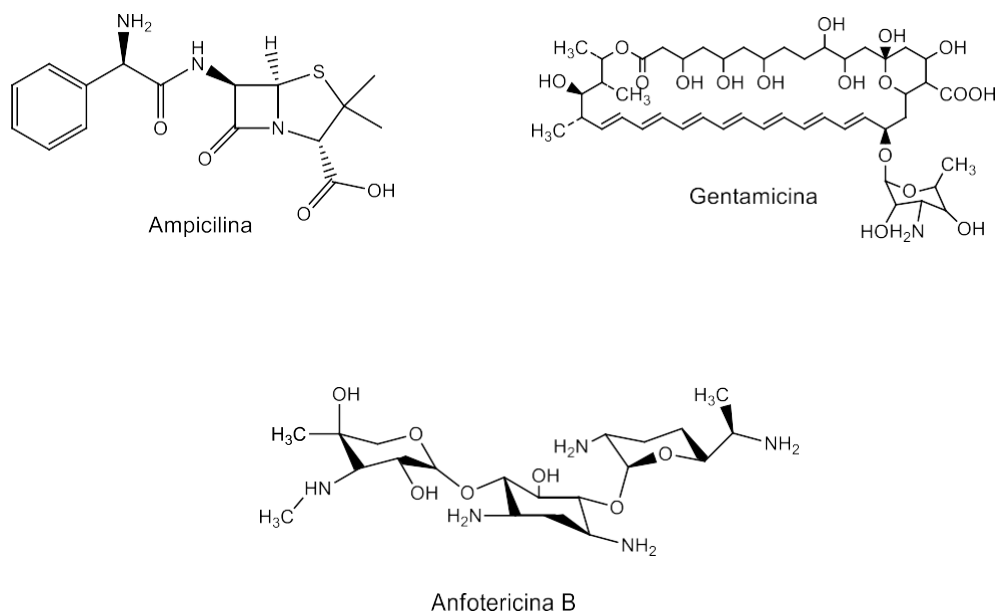


Figura 9 – Antimicrobianos utilizados como padrões nas pesquisas de PRAJAPTI et al., 2015.

A nitrofurfuril-hidrazona (figura 10), derivada do núcleo 2-isoxazolina azabíclica, foi sintetizada no nosso grupo de pesquisa e despontou como o antichágasico mais potente da série analisada. A mesma demonstrou uma ação inibitória numa concentração de 2,33 $\mu\text{g/mL}$, bem próxima ao do benznidazol (figura 11) cuja a concentração é de 1,73 $\mu\text{g/mL}$ (DE ALMEIDA, G. C., et al., 2010).

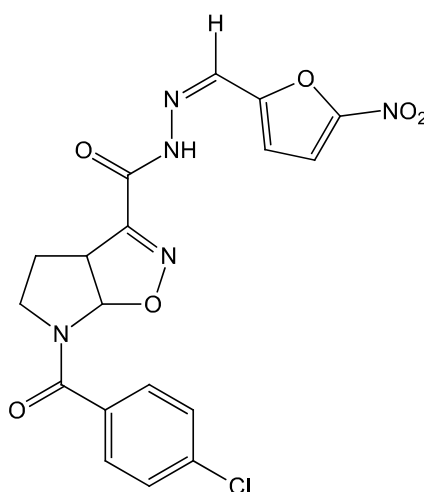


Figura 10 – Nitrofurfuril-hidrazona isoxazolinica desenvolvida em nosso grupo de pesquisa despontou como um potente antichágásico.

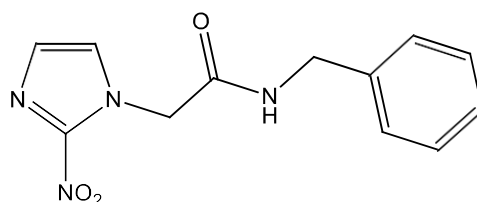


Figura 11 – Benznidazol, fármaco utilizado como padrão para análise antichagásica da nitrofurfuril-hidrazona.

Menezes D. R. et al., 2015 sintetizou uma série de derivados do ácido hidroxâmico contendo o núcleo 2-isoxazolina. Da série analisada 2 compostos (figura 12) despontaram como potentes antichagásicos. Os dois derivados isoxazolínicos induziram uma redução significativa no número de parasitas intracelulares e, conseqüentemente, mostraram atividade na multiplicação do parasita. Ambos os compostos foram capazes de reduzir as peptidases de cisteína e diminuir a atividade das metalopeptidases (MENEZES D. R. et al., 2015).

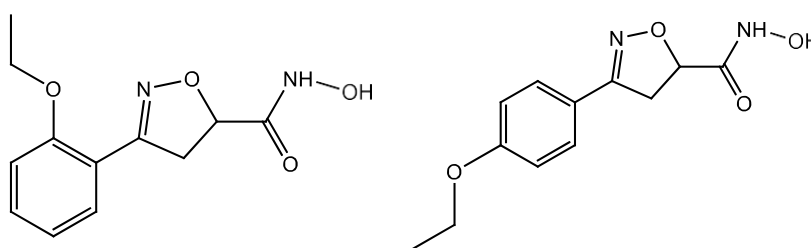
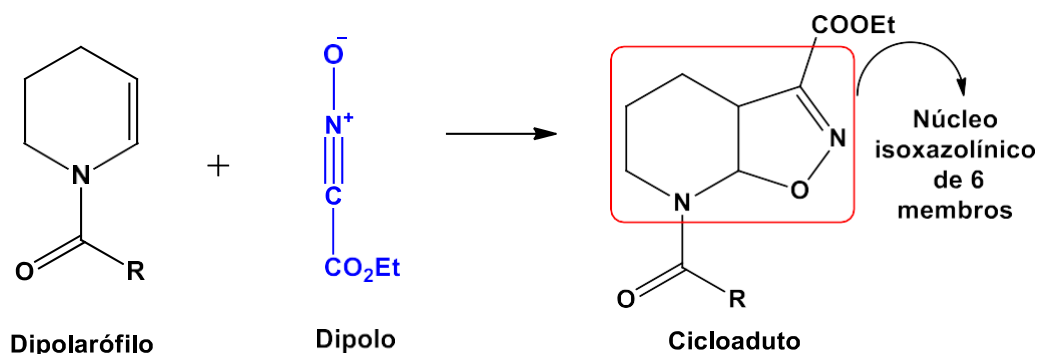


Figura 12 – Derivados de ácido hidroxâmico com ação potencial contra a doença de Chagas.

2.1.2 Síntese do núcleo e de derivados da 2-isoxazolina

A partir da reação de cicloadição 1,3-dipolar é possível obter variados heterociclos de 5 membros, que são de grande interesse para as pesquisas e indústrias. Dentro dessa variedade de heterociclos é possível citar a 2-isoxazolina, núcleo promissor devido às diversificadas atividades biológicas relatadas na literatura. Existem diversas formas de obtenção do núcleo 2-isoxazolina, algumas serão descritas mais adiante, sendo importante destacar que o método mais utilizado é a reação de cicloadição 1,3-dipolar, também conhecida como cicloadição [3+2] (GUCMA et al., 2014; ALMEIDA et al., 2009).

No mecanismo da cicloadição 1,3-dipolar; o dipolarófilo e o dipolo reagem entre si formando o núcleo isoxazolinico, chamado de cicloaduto, que possui em sua estrutura o núcleo 2-isoxazolina.



Esquema 01 - Reação de cicloadição [3+2]

Os orbitais moleculares possuem um papel importante nas reações químicas e na reatividade em nível atômico. Neste contexto, o conceito de orbital de fronteira introduzido por Fukui, refere-se ao uso da densidade eletrônica dos orbitais de fronteira, HOMO e LUMO, para prever a posição mais reativa sobre espécies químicas: HOMO (Orbital Molecular Ocupado de maior energia) e LUMO (Orbital Molecular não ocupado de menor energia) (PEREIRA et al., 2016). Uma ferramenta que emergiu recentemente é o FERMO (Orbital Molecular de Fronteira Efetivo para a Reação), proposto por Da Silva e Ramalho, que descreve a quebra e formação de novas ligações químicas, esse novo conceito surgiu com o propósito de complementar os argumentos HOMO e LUMO, já que existem algumas limitações (DA SILVA R. R. et al., 2006).

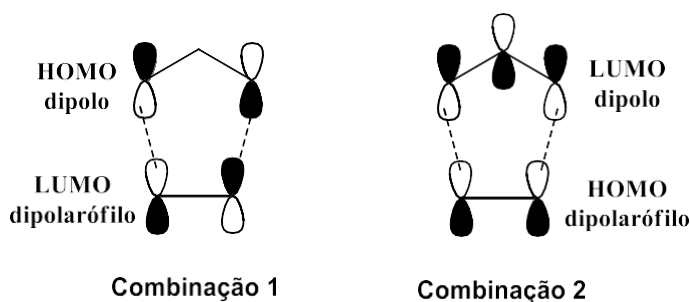


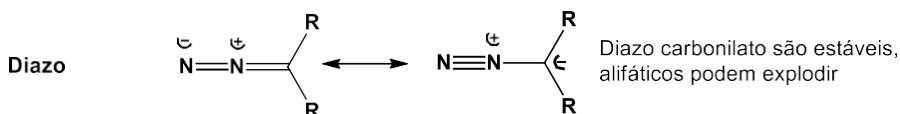
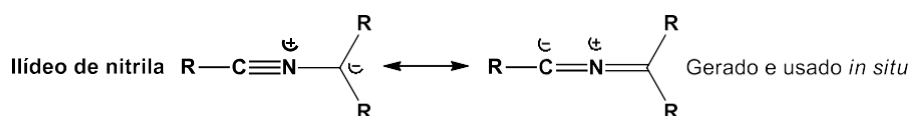
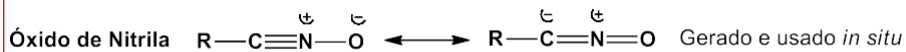
Figura 13 - Combinação dos orbitais moleculares na reação de cicloadição 1,3-dipolar (GOMES A. T. 2014).

A partir da teoria dos orbitais moleculares de fronteira (FMO), é possível explicar o mecanismo da reação de cicloadição 1,3-dipolar, que podem ser consideradas como uma das mais importantes e de grande interesse em química orgânica e sintética. Esta reação pode acontecer a partir de dois mecanismos (concertado e o não concertado), no mecanismo concertado só existe uma única etapa para formação do cicloaduto, já no mecanismo não concertado existe a formação do intermediário, pois na formação do cicloaduto uma ligação acontece por vez (DOS SANTOS R. J., 2003).

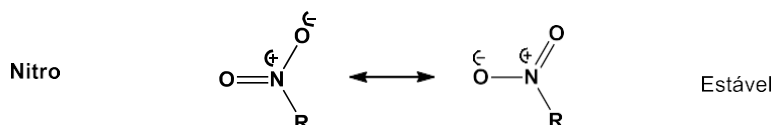
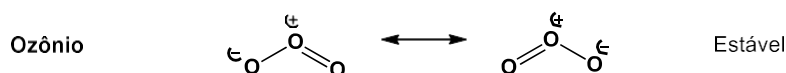
A grande importância dessa síntese está relacionada com a facilidade da formação de compostos heterociclos de 5 membros. (PEREIRA D. H. et al., 2016; DOS SANTOS R. J., 2003).



1,3 dipolos lineares "sp"



1,3 dipolos angulares "sp²"



Esquema 2 - Cicloadições 1,3-dipolares pelo mecanismo concertado e exemplos de dipolo (MELO J. O. F. et al., 2006).

Ismail et al., 2015, sintetizou uma série de novos bis-heterociclos que englobam o núcleo 2-isoxazolina e triazóis, estes foram produzidos por meio de um novo procedimento (*one-pot*) que envolve a geração *in-situ* de óxido de nitrila e a sua cicloadição 1,3-dipolar a acrilados variadamente substituídos. A série sintetizada foi submetida a ensaios de proliferação de linfócitos *in vitro* seguidos por estudos *in vivo* dos compostos mais ativos, a fim de avaliar sua influência sobre vários aspectos do sistema imunológico. De acordo com os testes da série analisada, foi confirmado que os compostos contendo o núcleo 2-isoxazolina (figura 14) possuem uma excelente atividade imunopotenciadora (ISMAIL T. et al., 2015).

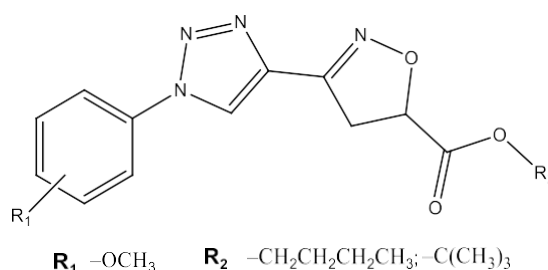
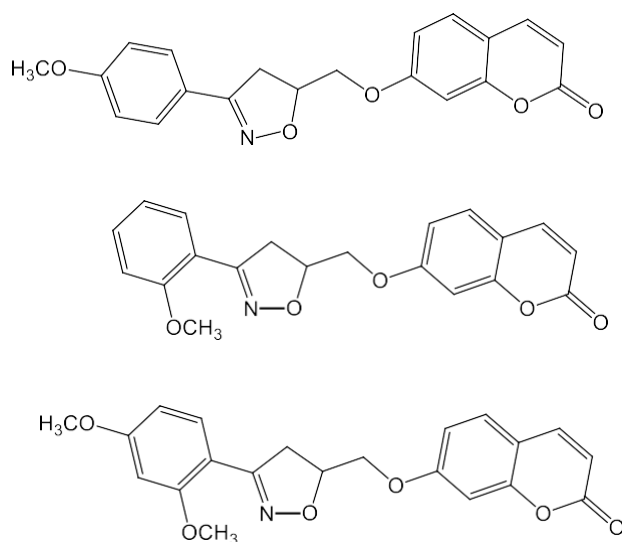


Figura 14 - Bis-heterociclos contendo o núcleo 2-isoxazolina, desenvolvida por ISMAIL et al., 2015.

Outra série produzida por Ismail et al., 2015, envolve a síntese de cumarinas funcionalizadas com isoxazolinias através da ciclização 1,3-dipolar de *N*-óxido de nitrila com cumarinas aliladas. O foco do trabalho foi à síntese de imunoestimuladores seletivos através da conjugação de isoxazolinias diversamente substituídas e 7-hidroxycumarinas. O esquema sintético proposto foi observado como altamente regioespecífico com rendimentos consideráveis (> 90%). Os testes biológicos *in vitro* e *in vivo* foram realizados e os resultados estabelecem que as cumarinas funcionalizadas com isoxazolina exibem excelente atividade de potencialização imune, especialmente os compostos apresentados (figura 15) cuja atividade foi maior que o padrão utilizado, Levamisol (figura 16) (ISMAIL T. et al., 2015).



Figuras 15 - Cumarinas funcionalizadas com isoxazolininas, desenvolvida por ISMAIL et al., 2015.

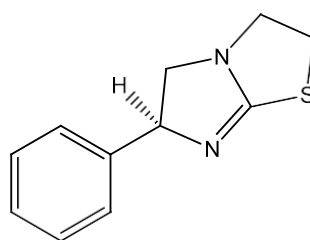
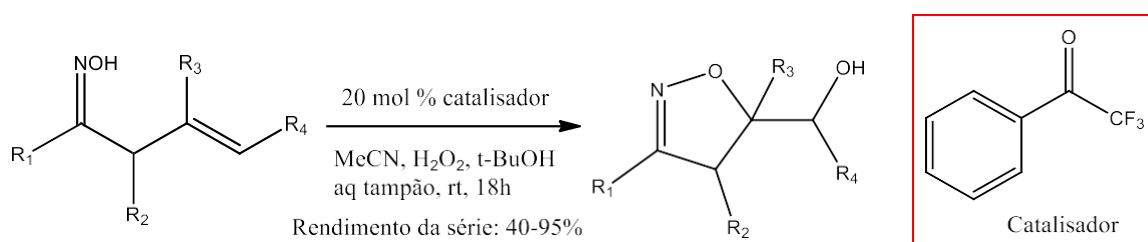


Figura 16 – Levamisol, padrão utilizado nas pesquisas de ISMAIL et al., 2015.

Em uma pesquisa recente, o núcleo 2-isoxazolina foi sintetizado por meio de uma síntese verde, sustentável e organocatalítica de isoxazolininas a partir de aliloximas. A síntese se deu por meio de uma oxidação catalisada por 2,2,2-trifluoroacetofenona de aliloximas, utilizando H_2O_2 como oxidante verde (TRIANDAFILLIDI I. et al., 2016).



Esquema 3 – Formação do núcleo 2-isoxazolina a partir de aliloximas desenvolvido por Triandafillidi et al., 2016.

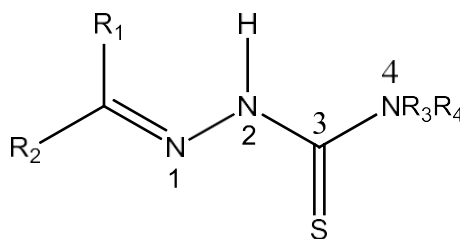
2.2 TIOSSEMICARBAZONAS

As tiossemicarbazonas pertencem a um grupo de derivados da tioureia, suas aplicações biológicas são estudadas desde 1956, quando Brockman et al., 1956, relatou a atividade antitumoral dos derivados tiossemicarbazônicos 2-formilpiridina. (BROCKMAN R. W. et al., 1956). Este núcleo possui uma grande importância devido às suas versáteis atividades biológicas, ampla aplicação na indústria e sensibilidade analítica para vários íons metálicos (SUBHASHREE et al., 2017).

De acordo com BHARTI et al., 2003, as propriedades biológicas das tiossemicarbazonas são atribuídas à capacidade que apresentam de formar complexos com cátions metálicos, atuando como agentes quelantes. Modificações na capacidade quelante levam igualmente a alterações na atividade biológica. (BHARTI N. et al., 2003).

Estes compostos são geralmente obtidos pela reação de condensação quimiosseletiva de tiossemicarbazidas com aldeídos ou cetonas, e recebem a denominação da classe tiossemicarbazona após o nome do respectivo aldeído ou cetona condensado (CASAS J. S.; TASENDE M. S. G.; SORDO J., 2000; HANG H. C.; BERTOZZI C. R., 2001).

Do ponto de vista sintético, apresentam como característica principal sua versatilidade de obtenção, assim como sua vasta aplicação como intermediários de muitos núcleos importantes (TENÓRIO R. P. et al., 2005). Em geral, estas moléculas apresentam baixo custo de síntese, além de grande economia de átomos, uma vez que, com exceção da água que é liberada na sua síntese, todos os outros átomos dos compostos reagentes estarão presentes na molécula final (Du X et al., 2002; TENÓRIO R. P. et al., 2005). A estrutura química das tiossemicarbazonas e a numeração dos seus átomos segundo a IUPAC (PANICO R.; POWELL W. H.; RICHER J. C., 1993) é mostrado na figura 17.



$R_1, R_2, R_3, R_4 = \text{H, Alquil e aril}$

Figura 17 – Numeração das tiossemicarbazonas reproduzida por Tenório R. P. et al., 2005

2.2.1 A importância das Tiossemicarbazonas

Entre a classe de moléculas pequenas descritas na literatura, as tiossemicarbazonas são de grande interesse devido aos seus modos de ligação e versatilidade estrutural, com a capacidade de variar os substituintes $R_1 - R_4$, mostrados na figura 17. Além disso, os métodos para a preparação de derivados de tiossemicarbazonas são geralmente muito simples, com base na reação de aldeídos ou cetonas com tiossemicarbazidas (LEOVAC V.M. *et al.*, 2007; MELLADO O.G.; CORTES E.C. *et al.*, 2009).

Na literatura, existem diferentes atividades relatadas de moléculas que contém o núcleo tiossemicarbazona. Algumas atividades citadas são: antimicrobiana (TÜRKKAN E. *et al.*, 2017; PAHONTU E. *et al.*, 2016), anti-inflamatória (SUBHASHREE G. R. *et al.*, 2017), anticancerígena (TÜRKKAN E. *et al.*, 2017; WANG Y. *et al.*, 2017; FRENCH F. A. *et al.*, 1966), anticonvulsivante (AGGARWAL N. *et al.*, 2008), antituberculostáticos (JALLAPALLY A. *et al.*, 2014), antiviral (HAMRE D.; BERNSTEIN J.; DONOVICK R., 1950), antichagásica (BLAU L. *et al.*, 2013), antileishmaniose (SILVA B. V., SILVA B. N. M., 2017; SILVA A. C. *et al.*, 2017). A figura 18 apresenta derivados com diferentes atividades, candidatos a fármacos, contendo tiossemicarbazonas.

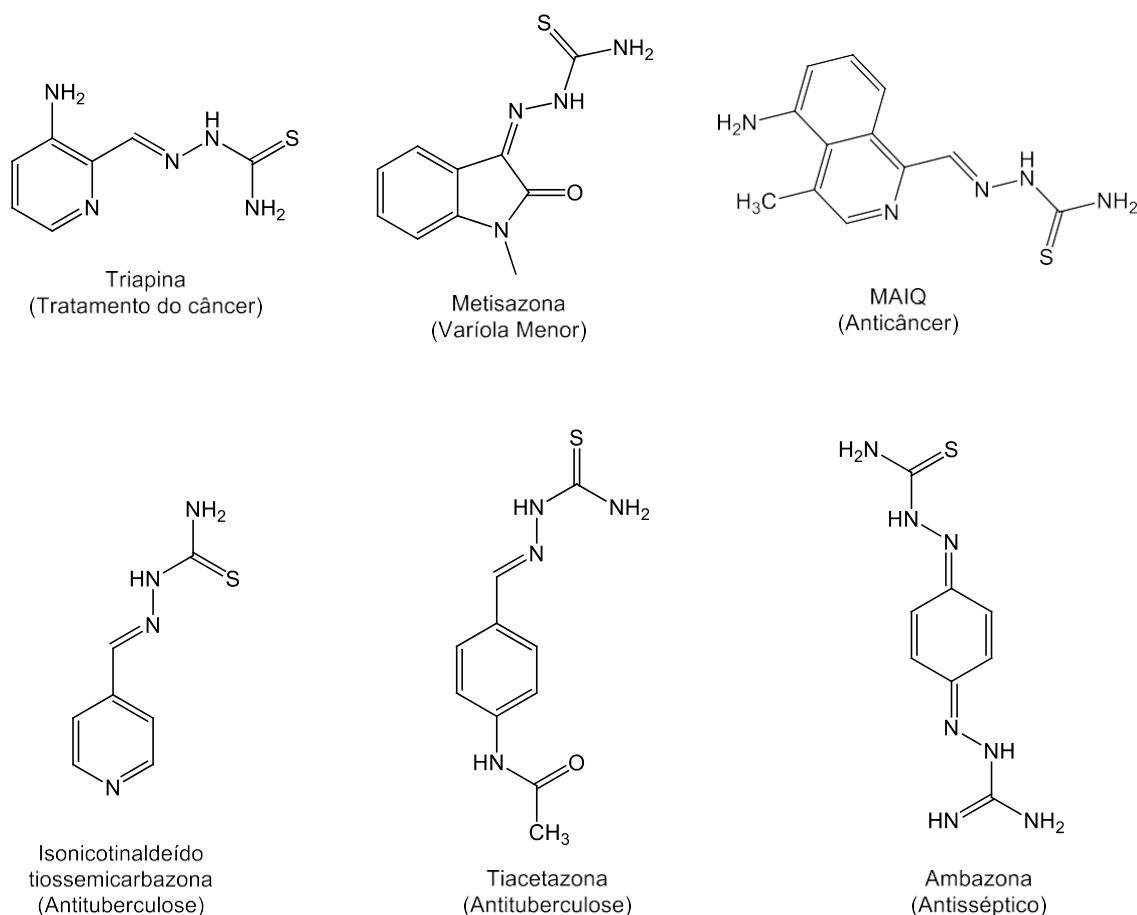
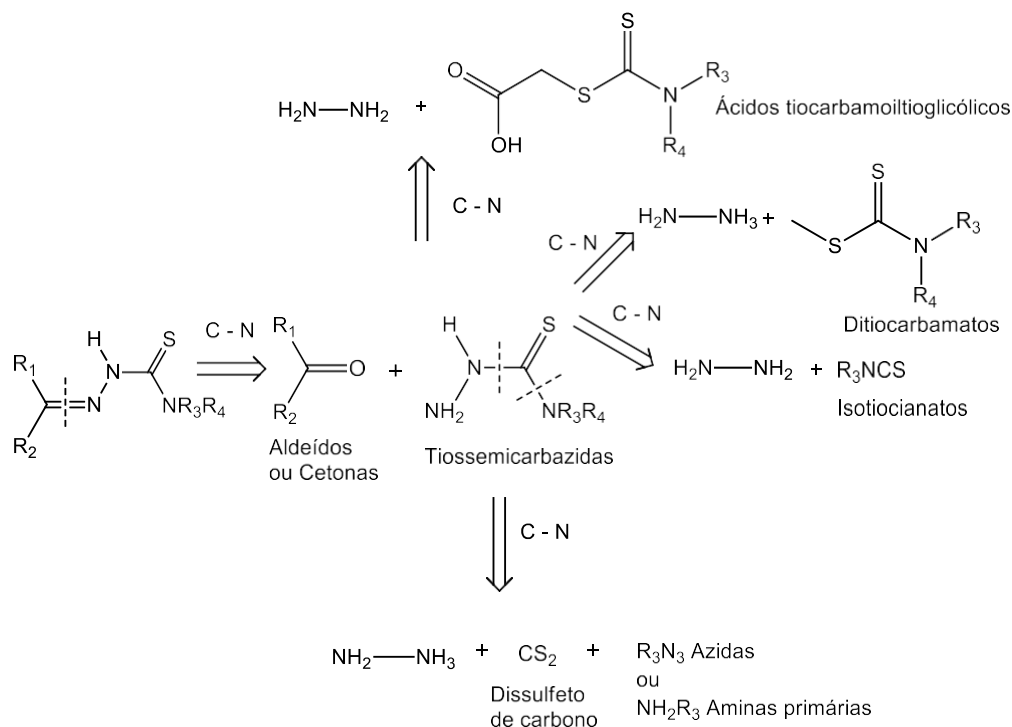


Figura 18 - Moléculas, candidatas a fármacos, contendo tiossemicarbazonas (JALLAPALLY et al., 2014).

2.3 FORMAS DE OBTENÇÃO DE TIOSSEMICARBAZONAS

Para obtenção das tiossemicarbazonas duas estratégias de síntese podem ser empregadas: obtenção direta, pela reação quimiosseletiva de aldeídos ou cetonas com as tiossemicarbazidas, e obtenção indireta, através da preparação prévia das tiossemicarbazidas, utilizando hidrazina ($\text{NH}_2\text{-NH}_2$) e diferentes reagentes, seguida de condensação com o derivado carbonilado específico (TENÓRIO R. P. et al., 2005).



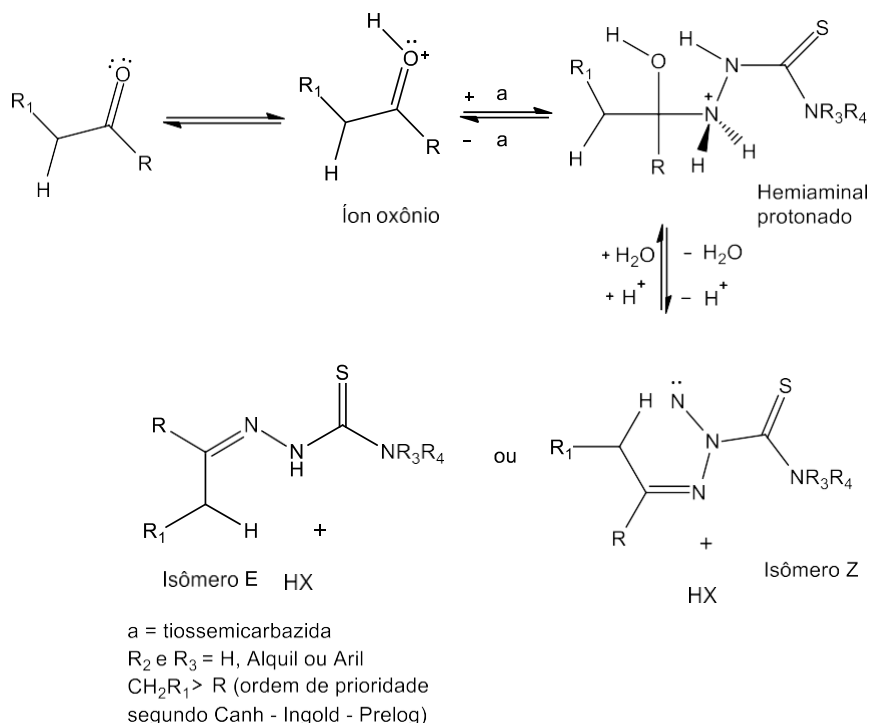
Esquema 4 – Estratégias para obtenção de tiossemicarbazonas descritas por Tenório R. P. et al., 2005.

2.3.1 Obtenção direta das Tiossemicarbazonas a partir de tiossemicarbazidas

As tiossemicarbazidas podem ser adquiridas comercialmente. A síntese é descrita pela condensação equimolar de um derivado carbonilado, do tipo aldeído ou cetona, com tiossemicarbazidas em meio alcoólico sob refluxo e quantidades catalíticas de ácido (HOLLA B. S. et al., 2003; SARODNICK G., et al., 2003; SOMOGLY L., 1991; WEINSTOCK L. T.; CHENG C. C., 1979). Esta reação é bastante conhecida por sua alta quimiosseletividade, versatilidade e rapidez, apresentando geralmente altos rendimentos. A alta quimiosseletividade está associada a capacidade de o grupo funcional reagir sem afetar outras funcionalidades potencialmente reativas. (HANG H. C.; BERTOZZI C. R., 2001; BENBROOK D. M. et al., 1997; RODRIGUEZ E. C.; MARCAURELLE L. A.; BERTOZZI C. R., 1998).

O mecanismo reacional inicia-se com a protonação do oxigênio da carbonila para formar o intermediário íon oxônio, seguida de ataque nucleofílico do nitrogênio N-1 da tiossemicarbazida para formar o intermediário hemiaminal protonado. Este perde uma molécula de água e, após neutralização, forma-se a tiossemicarbazona (esquema 5)

(COSTA P.; PILLI R.; PINHEIRO S.; VASCONCELLOS M., 2003; SOLOMONS, G.; FRYHLE, C., 2002, TENÓRIO R. P. et al., 2005).



Esquema 5 – Mecanismo de formação de tiossemicarbazonas reproduzido por Tenório et al., 2005.

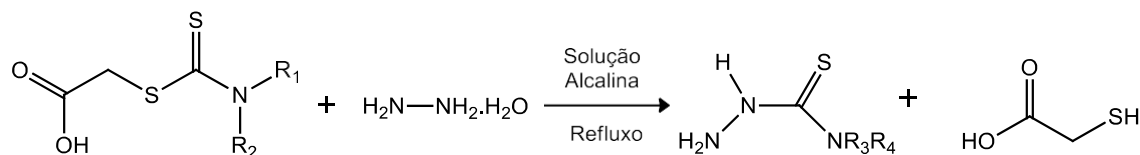
2.3.2 Obtenção indireta das tiossemicarbazonas pela preparação prévia de tiossemicarbazidas, utilizando hidrato de hidrazina como material de partida

Existem diversos métodos para obtenção indireta das tiossemicarbazidas, a seguir são descritos três formas distintas de obtenção de tiossemicarbazidas a partir de hidrato de hidrazina (TENÓRIO et al., 2005).

✓ Reação com ácido tiocarbamoiltioglicólico

Este método fornece uma rota bem interessante quando se pretende obter tiossemicarbazidas substituídas na posição N-4 com grupos incomuns, não encontrados comercialmente (TENÓRIO et al., 2005). A reação ocorre em meio alcalino, sob refluxo, contendo ácido tiocarbamoiltioglicólico e hidrato de hidrazina. Estes reagem para formar a tiossemicarbazida, liberando o ácido tioglicólico (BHARTI N. et al., 2002) (Esquema 6). Os ácidos tiocarbamoiltioglicólicos, por sua vez, podem

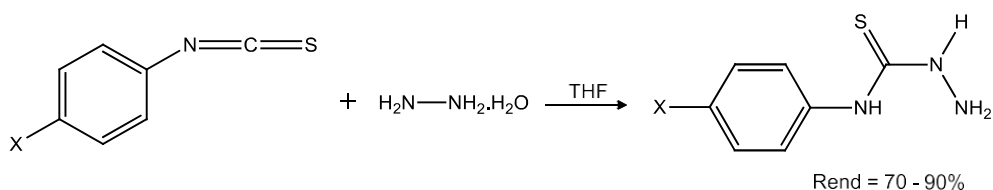
ser obtidos segundo metodologia desenvolvida por O'Sullivan e colaboradores (O'SULLIVAN D. G.; SADLER P. W.; WEBLEY C. 1963).



Esquema 6 – Reação de formação de tiossemicarbazidas substituídas na posição N-4 com grupos incomuns reproduzido por Tenório et al., 2005.

✓ Reação com isotiocianatos

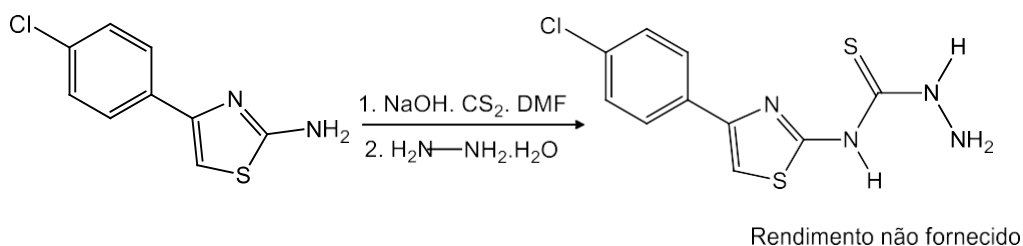
O hidrato de hidrazina reage com isotiocianatos para formar tiossemicarbazidas (DUFFY K. J. et al., 2002; GÜRSOY A., TERZIOGLU N., ÖTÜK G., 1997; PAPASTAIKOUDI T. S., 1995). Esta reação geralmente apresenta rendimentos entre 70 e 90% (esquema 7) (TENÓRIO et al., 2005).



Esquema 7 – Formação de tiossemicarbazidas a partir de hidrato de hidrazina com isotiocianatos reproduzido por Tenório et al., 2005.

✓ Reação com dissulfeto de carbono

A reação de derivados de amina com dissulfeto de carbono, seguida da adição de hidrato de hidrazina é um método muito útil na preparação de tiossemicarbazidas (TENÓRIO et al., 2005). Pandeya et al., 1999, utilizou esta metodologia para sintetizar, em uma única etapa, a tiossemicarbazida a partir de 2-amino-4-(p-cloro-fenil)-tiazol (esquema 8) (PANDEYA S. N. et al., 1999).



Esquema 8 – Formação de tiossemicarbazidas a partir de derivados de amina com dissulfeto de carbano, seguida da adição de hidrato de hidrazina reproduzido por Tenório et al., 2005.

2.4 SÍNTESE E DERIVADOS DA TIOSSEMICARBAZONA

Jallapally et al., 2014, sintetizaram uma série de híbridos de piperazina-tiossemicarbazona substituídos à base de 2-butil-4-cloroimidazol, onde foi combinado três fragmentos farmacofóricos diferentes em uma única estrutura molecular. Da série sintetizada, foi realizada a atividade antimicrobacteriana *in vitro* contra *Mycobacterium tuberculosis*, onde foi comprovado que os compostos da figura 19 contendo o núcleo tiossemicarbazona despontaram como os agentes antituberculosos mais ativos e com o menor perfil de citotoxicidade em comparação com a série avaliada (JALLAPALLY A. et al., 2014).

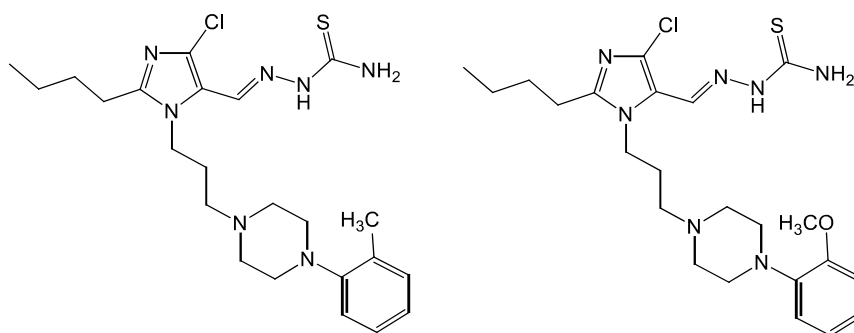


Figura 19 - Híbridos de piperazina-tiossemicarbazona substituídos à base de 2-butil-4-cloroimidazol (JALLAPALLY et al., 2014).

Em 1960 Bauer D. J. e Sadler P. W., demonstraram que a N-metilisatina tiossemicarbazona (metisazona) (figura 20) era efetiva na profilaxia do vírus da varíola. O composto, comercializado com o nome de Marboran[®], foi empregado na profilaxia da varíola na Índia e, mais tarde, no tratamento de complicações resultantes

da vacinação, mas apresenta efeitos colaterais pronunciados (BAUER, D. J. and SADLER P. W., 1961).

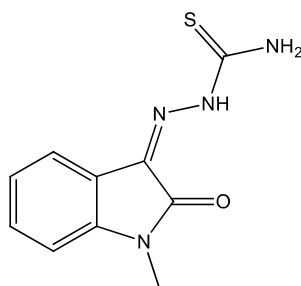


Figura 20 – Metisazona, fármaco efetivo na profilaxia do vírus da varíola, desenvolvido por Bauer D. J. e Sadler P. W., 1961.

Em 1966 French et al., formularam hipóteses a respeito do modo de ação de tiossemicarbazonas (N)-heterocíclicas e verificaram que esses compostos estariam atuando como agentes quelantes tridentados. Eles observaram que a 1-formilisoquinolina tiossemicarbazona (figura 21) possuiu uma maior atividade e menor toxidez, frente as outras moléculas analisadas (FRENCH F. A. et al, 1966).

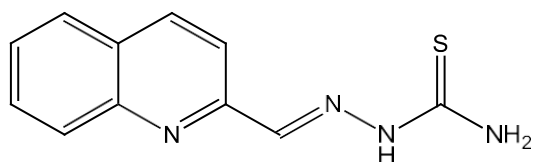
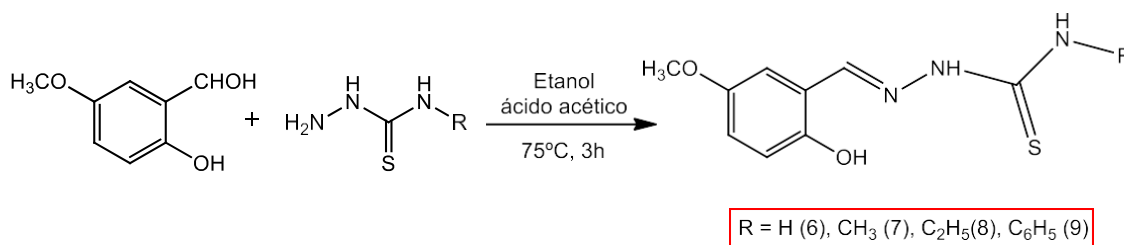


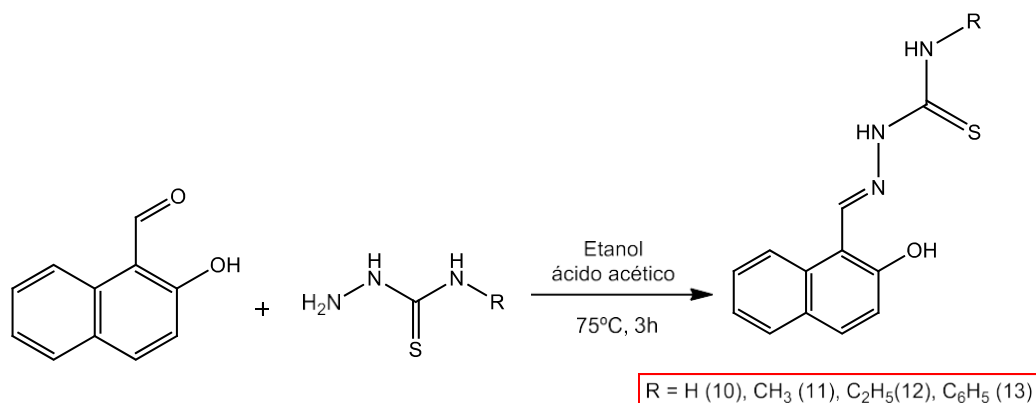
Figura 21 – Derivado tiossemicarbazônico com potencial ação quelante desenvolvido por French et al., 1966.

Subhashree G. R. et al., 2017, sintetizaram uma série de tiossemicarbazonas anexadas a 5-metoxisalicilaldeído (esquema 9) e tiossemicarbazonas anexadas a 2-hidroxi-1-naftaldeído (esquema 10) a partir das reações entre 5-metoxisalicilaldeído / 2-hidroxi-1-naftaldeído e tiossemicarbazidas não substituídas. O objetivo era verificar as propriedades biológicas provocadas pela substituição, na posição *N*-terminal, dos derivados da tiossemicarbazida. Estudos *in vitro* e *in sílico* revelaram um potencial promissor anti-inflamatório dos derivados tiossemicarbazônicos. Os compostos **7**, **9**, **11**, **12** e **13** apresentados no esquema 9 e esquema 10 tiveram uma atividade anti-inflamatória significativa, ressaltando que a molécula **12** apresentada no esquema 10,

teve o maior potencial de inibição em relação a série sintetizada. (SUBHASHREE G. R. et al., 2017).



Esquema 9 - Síntese dos derivados tiossemicarbazônicos adicionados em 5-metoxisalicialdeído (SUBHASHREE et al., 2017).



Esquema 10 - Síntese dos derivados tiossemicarbazônicos adicionados em 2-hidroxi-1-naftaldeído (SUBHASHREE et al., 2017).

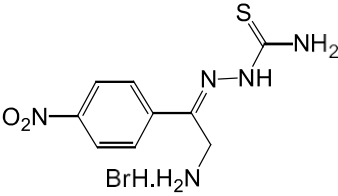
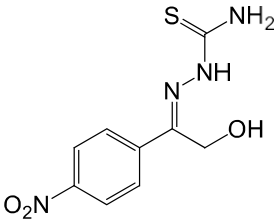
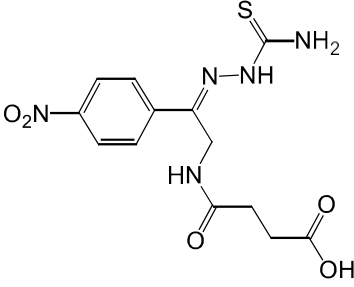
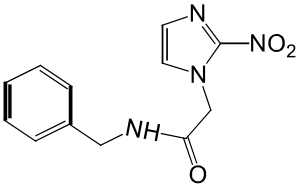
Lorena Blau et al., 2013 sintetizaram uma série de 12 aril tiossemicarbazonas, que foram planejadas para atuar sobre duas enzimas principais, cruzaina e tripanotona redutase. Estas enzimas são utilizadas como alvos da atividade tripanocida no controle da doença de Chagas, com um perfil mutagênico mínimo.

Três tiossemicarbazonas aromáticas *p*-nitro **14**, **15**, **16** (tabela 01) apresentaram alta atividade contra *Trypanosoma cruzi* em ensaios *in vitro* (IC₅₀ < 57 µM), e nenhum perfil mutagênico foi observado em testes de micronúcleos. O composto **14** foi cerca de cinco vezes mais potente que o benznidazol (tabela 01). Também foi observado que a posição relativa do grupo nitro no anel aromático, bem como sua presença ou ausência, produz grandes mudanças na atividade biológica.

Todos os compostos, sintetizados por Lorena Blau e colaboradores, foram testados *in vitro* contra formas epimastigotas do *T. cruzi*. Embora a epimastigota não

seja uma forma infecciosa do parasita, o teste in vitro de antitripanossoma contra esta forma é válido como uma triagem de potenciais compostos tripanocidas (BLAU L. et al., 2013). Vários trabalhos demonstraram que os compostos mais ativos contra a forma epimastigota frequentemente correspondem aos compostos mais ativos contra tripomastigotas, apesar da grande variância dos valores de IC₅₀ entre eles (CAPUTTO M. E., et al., 2012; CARNEIRO P.F., et al., 2012; CARVALHO S. A., et al., 2012).

Tabela 01 - Derivados tiossemicarbazônicos, que despontaram como potentes antichagásicos (LORENA BLAU et al., 2013).

Composto	Estrutura	IC ₅₀	% Inibição da Cruzaína
14		2.1 µg/mL (6.3 µM)	20
15		9.59 µg/mL (37.7 µM)	10
16		4.25 µg/mL (12.0 µM)	50
Controle		9.00 µg/mL (34.6 µM)	Não testado

Aggarwal et al., 2008, sintetizaram uma série de tiosemicarbazonas e semicarbazonas com o propósito de atender os requisitos estruturais essenciais para a atividade anticonvulsivante. Todos os compostos foram avaliados quanto à atividade anticonvulsivante após a administração intraperitoneal (i.p.) a camundongos. Para esta avaliação foram utilizados dois métodos (convulsão induzida por eletrochoque máximo - MES e metrazol subcutâneo - ScMet), o comprometimento motor mínimo foi determinado pelo teste de rotorod. De acordo com os testes, foi observado que as semicarbazonas **17**, **19** e as tiosemicarbazonas **18**, **20** dos grupos carbonílicos lipofílicos (citral e carvona) mostraram excelente atividade (AGGARWAL N. et al., 2008).

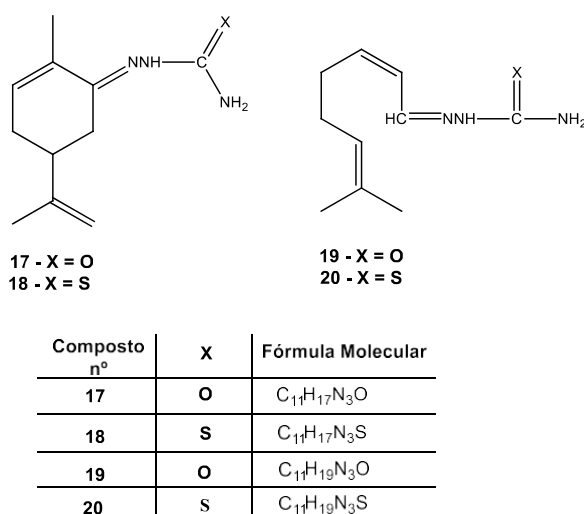


Figura 22 - Derivados tiosemicarbazônicos e semicarbazônicos desenvolvidos por AGGARWAL et al., 2008.

SILVA A. C. et al., 2017, avaliaram a citotoxicidade em células hospedeiras, atividade leishmanicida e o potencial imunomodulador de sete aril-tiosemicarbazonas (figura 23). A citotoxicidade celular hospedeira foi determinada em macrófagos peritoneais de rato BALB/c, a atividade antiparasitária foi determinada contra promastigotas e amastigotas de WHOM/00LTB 0016 de *L. amazonensis*. Foi observado que as tiosemicarbazonas arílicas apresentaram atividade antiparasitária in vitro contra formas extracelular e intracelular de *L. amazonensis*. No entanto, ao contrário da Anfotericina B, estes compostos apresentaram baixa citotoxicidade para as células hospedeiras. Além da atividade antiparasitária observada, os compostos

exibiram propriedades moduladoras na secreção de citocinas e no teor de nitrito de macrófagos não infectados e infectados por *L. amazonensis*.

Em resumo, foi demonstrado a atividade antiparasitária *in vitro* contra *L. amazonensis* para aril-tiosemicarbazonas, que é possível alcançar pela modulação do perfil de citocinas Th1. Sendo uma descoberta potencialmente útil para o desenvolvimento de novos fármacos contra a leishmaniose cutânea.

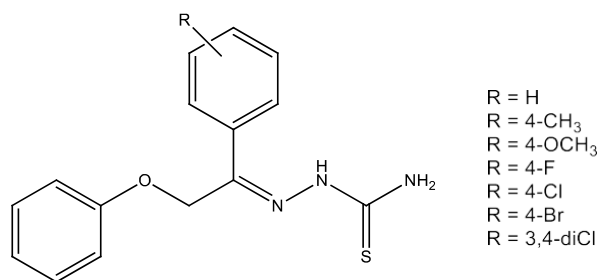


Figura 23 – Aril-tiossemicarbazonas desenvolvida por Silva A. C. et al., 2017, apresentaram atividade antiparasitária *in vitro* contra *L. amazonenses*.

Silva B. V., Silva B. N. M., 2017; sintetizaram derivados de tiosemicarbazona do 5 - [(trifluorometil) feniltio] -2-furaldeído com substituintes removíveis de elétrons no anel aromático (figura 24), estes apresentaram boa atividade para cepas de *T. Cruzi*. O composto **23** (figura 24) foi o mais notável da série estudada, com uma LC50 nas cepas Punta Lobos e Querétaro de 3,2 e 3,4 µg/mL, respectivamente, indicando que o grupo nitro presente na molécula potencializa sua atividade.

Os compostos **21** - **24** que continham o grupo trifluorometil nas posições orto, meta e para, respectivamente, no anel de benzeno apresentaram pouca eficiência em comparação com o nifurtimox e benznidazol. Nem o anel aromático saturado com flúor **24** foi mais ativo do que o composto nitroaromático **23** (SILVA B. V., SILVA B. N. M., 2017).

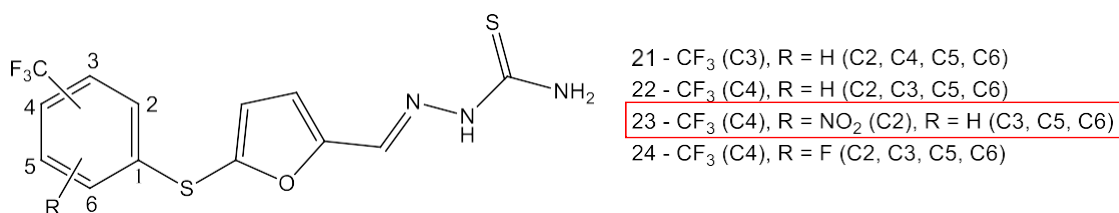


Figura 24 – Estruturas de 5-nitrofuriltiossemicarbazonas com atividade *anti-T. cruzi* (Silva B. V., Silva B. N. M., 2017).

Britta E. A. et al., 2014, avaliaram a atividade leishmanicida do novo 4-nitrobenzaldeído tiossemicarbazona (figura 25) que foi derivado do S-limoneno. Neste estudo foi observado a atividade inibidora significativa dependente da concentração contra amastigotas intracelulares e baixa atividade citotóxica contra macrófagos (BRITTA E. A. et al., 2014).

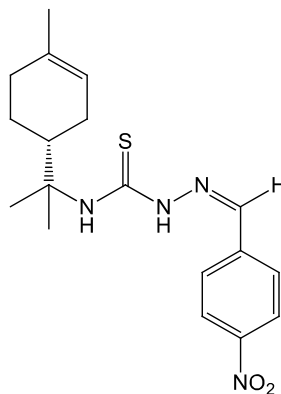


Figura 25 - Estrutura da 4-nitrobenzaldeído tiossemicarbazona derivada do S-limoneno que despontou como um potente leishmanicida, desenvolvido por BRITTA E. A. et al., 2014.

2.5 DOENÇA DE CHAGAS

2.5.1 Histórico da doença e Epidemiologia

A doença de chagas é considerada uma das patologias de mais larga distribuição no continente americano, quem a descobriu foi o médico/pesquisador brasileiro Carlos Justiniano Ribeiro Chagas em 1909. Essa grande descoberta ocorreu durante uma expedição à pequena cidade de Lassance (interior do estado de Minas Gerais) feita pelo pesquisador (MALAFAIA G., RODRIGUES A. S. L., 2010).

O cientista mineiro fez uma tripla descoberta, pois o mesmo descobriu o vetor, popularmente conhecido como barbeiro, o agente etiológico (o protozoário *Trypanosoma cruzi*) e descreveu toda patologia da doença. No mesmo ano da descoberta Oswaldo Cruz publicou uma célebre frase, “o descobrimento desta moléstia constitui o mais belo exemplo do poder da lógica a serviço da ciência. Nunca até agora, nos domínios das pesquisas biológicas, se tinha feito um descobrimento tão complexo e brilhante e, o que mais, por um só pesquisador” (MALAFAIA G., RODRIGUES A. S. L., 2010).

A doença de Chagas constitui um dos principais problemas médico-sociais brasileiros e um grave problema de saúde pública na América Latina. Estimativa atual da Organização Mundial de Saúde (OMS) indica prevalência de infecção pelo *Trypanosoma cruzi* em torno de 13 milhões de pessoas em 15 países, com incidência anual de 200.000 casos (WHO, 2013). No Brasil, com o controle das transmissões vetorial e transfusional, estima-se em dois a três milhões de pessoas infectadas, com prevalência atual da infecção inferior a 0,2% (DIAS, J. C. P., 2006). Minas Gerais é considerado um dos estados brasileiros com maior prevalência da endemia chagásica. A região centro-oeste sempre apresentou elevada endemicidade, destacando-se o município de Bambuí, onde as ações de controle da transmissão vetorial tiveram início na década de 40 (DIAS, J. C. P., 2007).

2.5.2 O protozoário: *Trypanosoma cruzi* e seu ciclo evolutivo

O *Trypanosoma cruzi* é uma espécie de protozoário flagelado da família Trypanosomatidae, cujo ciclo biológico (figura 27) apresenta três fases: (amastigota, epimastigota e tripomastigota) (figura 26A) e se desenvolve em mamíferos e insetos reduvídeos (figura 26B, 26C), por essa razão seu ciclo evolutivo é heteróximo. Devido a esta particularidade o protozoário desenvolveu mecanismos adaptativos que permitem sua sobrevivência às diversas mudanças físico-químicas na passagem de um hospedeiro para o outro (FIOCRUZ, 2017).

O *T. cruzi* apresenta um ciclo de vida do tipo heteroxênico, onde o parasita passa por uma fase de multiplicação intracelular no hospedeiro vertebrado e outra extracelular no inseto vetor (ARGOLO A. M. et al., 2008). A sintomatologia da doença está dividida em duas fases clínicas, a aguda (inicial), praticamente assintomática onde o parasita encontra-se abundante na corrente sanguínea e a fase crônica na qual quase não se encontra o parasita em circulação (ARGOLO A. M. et al., 2008).

Em resumo, o ciclo no hospedeiro vertebrado se inicia quando o barbeiro, ao se alimentar do sangue do indivíduo, elimina, em suas fezes e urina, o parasito na forma infectante, tripomastigota metacíclico, que infecta as células do hospedeiro, como as do coração. No interior destas, o parasito muda para a forma amastigota, onde se multiplicam por divisão binária e por fim ocorre a mudança para a forma tripomastigota sanguícola e conseqüentemente a ruptura celular com disseminação do parasito pela corrente sanguínea. Na corrente sanguínea, o parasito pode ser transmitido para o

inseto por meio da picada pelo barbeiro (não infectado), onde no intestino do vetor, o parasito muda para a forma epimastigota, multiplicando-se e tornando-se novamente a forma infectante ao hospedeiro vertebrado (FIOCRUZ, 2017).

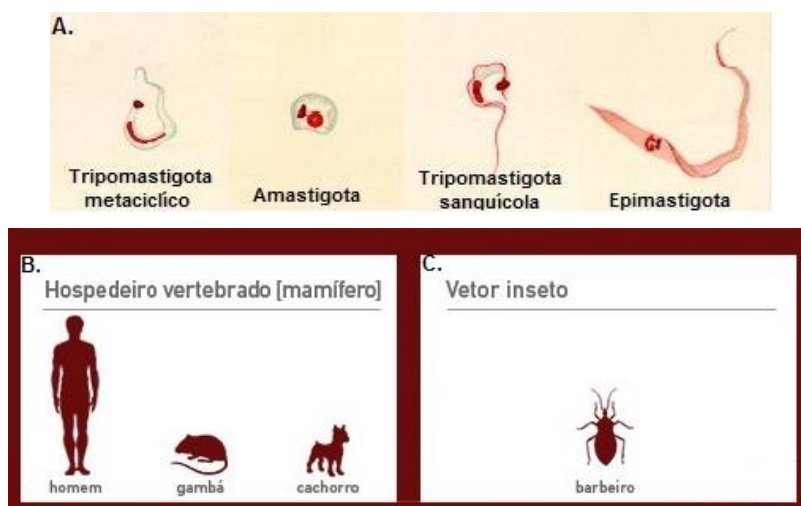


Figura 26 - A. Formas evolutivas do *Trypanosoma cruzi* B. Hospedeiro vertebrado (mamífero). C. Vetor inseto. (Adaptado de: <http://www.invivo.fiocruz.br/chagas/doen-ciclo-trypanosoma.html>).

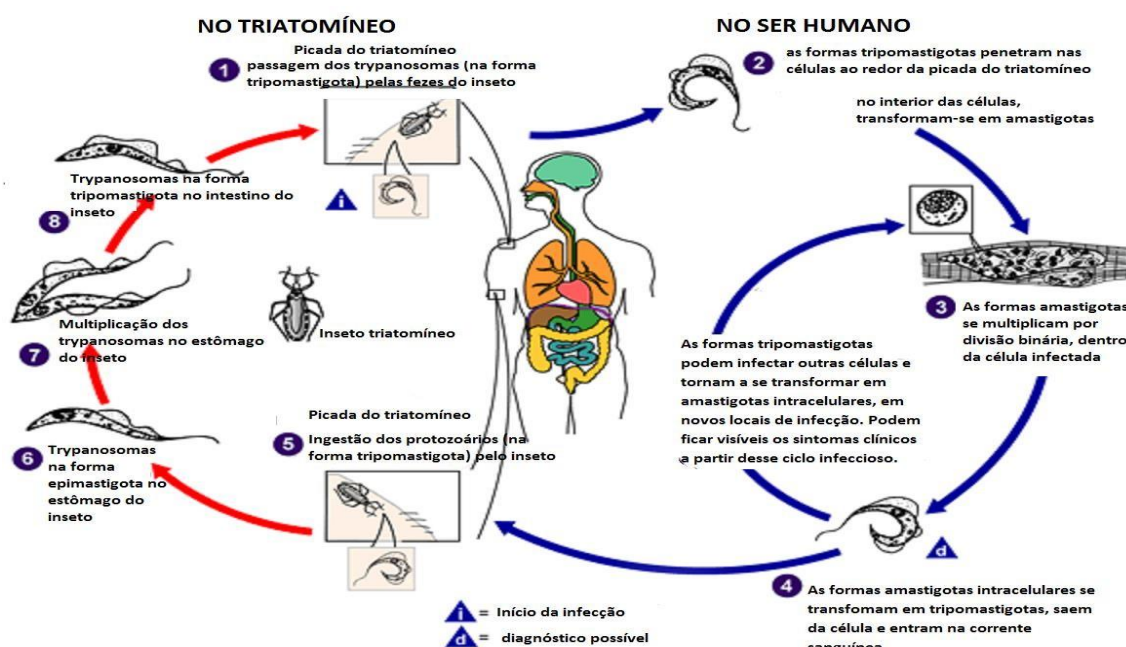


Figura 27 - Ciclo evolutivo do *Trypanosoma cruzi* no hospedeiro vertebrado e no inseto vetor (Adaptado de: http://www.cpqrr.fiocruz.br/informacao_em_saude/CICT/Doenca_de_chagas.htm. Acesso em: 23/10/2017).

2.5.3 Tratamento da doença de Chagas

O tratamento etiológico atual está baseado na administração de duas drogas, Nifurtimox 1 e Benznidazol 2, ambos possuem atividade significativa na fase aguda da doença com até 80% de cura parasitológica, porém na fase crônica a eficácia é relativa, sendo importante destacar que são os únicos fármacos com aplicabilidade clínica comprovada (URBINA J. A., DOCAMPO R., 2003). Devido à relativa eficácia na fase crônica, a produção de efeitos colaterais e a existência de cepas resistentes ao Nifurtimox 1 e Benznidazol 2 (figura 28) se faz necessário o desenvolvimento de novos fármacos.

Na literatura, são descritas inúmeras drogas com potencial atividade antichagásica. Trossini et al., 2010, otimizou a síntese da hidroximetilnitrofurazona, que apresentou atividade *in vitro* contra o *Trypanosoma cruzi*; em outro trabalho foi verificado por Robledo-O’Ryan et al., 2017, que as hidroxi-3-arilcumarinas exercem atividade tripanocida para a forma epimastigota. Nas pesquisas de Papadopoulos et al., 2013, foi avaliada *in vitro* a atividade tripanocida para a forma amastigota, de piperazinas a base de nitrotriazol e 2-amino-1,3-benzotiazoles à base de nitrotriazol.

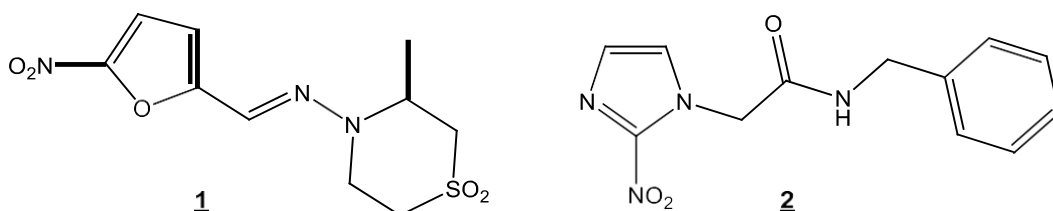


Figura 28 - Fármacos de referência para o tratamento da doença de chagas: Nifurtimox 1 e Benznidazol 2

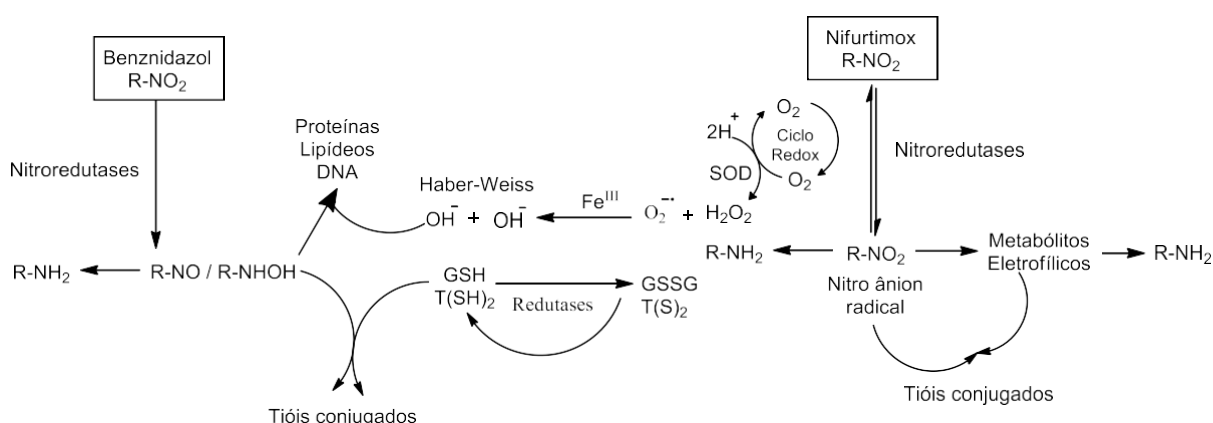
2.5.4 Mecanismo de ação do Nifurtimox e Benznidazol

O Nifurtimox e o Benznidazol atuam por meio da formação de radicais livres e metabólitos nucleofílicos. O grupo nitro de ambas as drogas é reduzido pela ação da nitroredutase, induzindo a formação de vários radicais livres intermediários e de metabólitos nucleofílicos. (DÍAZ D. E. et al., 1988).

O mecanismo de ação do Nifurtimox (esquema 11) envolve a produção de radicais livres por meio da redução do grupamento nitro, o que leva a uma intoxicação

do parasito (URBINA J. A., 1999). Como consequência, os tecidos do hospedeiro também podem ser lesados e ocorrer reações de hipersensibilidade, anorexia, vômitos, polineurite e depressão da produção de células da medula óssea. O principal mecanismo de ação do Nifurtimox contra o *T. cruzi* é a produção do radical livre hidroxila ($\text{OH}\cdot$) (URBINA J. A., 2002).

O mecanismo de ação do benznidazol (esquema 11) ainda não está totalmente elucidado, pode agir por meio do mecanismo de ação stress redutivo, envolvendo a modificação covalente das macromoléculas por intermediários nitroreduzidos, ou por outras interações de nitroredução com os componentes do parasito (URBINA J. A., 2002; DOCAMPO R.; MORENO S. N., 1984). Tem sido demonstrado que o Benznidazol incrementa a fagocitose, aumenta a letalidade do *Trypanosoma cruzi* por meio da indução de produção da citocina interferon gama e da inibição da NADH-fumarato redutase do *T. cruzi* (DOCAMPO R.; MORENO S. N., 1984). A droga distribui-se no meio extra e intracelular, agindo tanto sobre as formas tripomastigotas como sobre as formas amastigotas (POLAK A.; RICHLE R., 1978; SILVEIRA C. A. N. et al., 2000). O Benznidazol também causa efeitos colaterais, sendo os mais importantes a dermatopatia alérgica e a polineuropatia periférica, que, em alguns casos, pode levar à interrupção do tratamento (URBINA J. A., 1999; URBINA J. A.; DOCAMPO, 2003).



Esquema 11 - Mecanismo de ação proposto dos fármacos nifurtimox e benznidazol (Adaptado de DIAS, L. C., 2009).

2.5.5 Doença de Chagas: fases, forma de transmissão e prevenção.

A doença de Chagas possui três fases: aguda, indeterminada e crônica. A fase aguda é a inicial, caracterizada por febre, linfadenopatia e hepatoesplenomegalia. Com frequência, essa fase passa despercebida, uma vez que seus sintomas podem ser confundidos com outras infecções. A fase subsequente, conhecida como indeterminada, não apresenta sintomatologia importante do ponto de vista clínico e pode perdurar por muitos anos. Por fim, a fase crônica e a mais perigosa, pois nesta fase é observado o comprometimento cardíaco (miocardite grave), aumento do volume do coração (cardiomegalia) ou digestivo, com o aumento do diâmetro de regiões do trato digestivo. Nesta fase, a atenção médica deverá ser constante, já que existe a gradativa redução da qualidade de vida e de trabalho do paciente (BARBOSA L. G. N., 2009; FIOCRUZ, 2017).

A transmissão da doença de Chagas pela via vetorial é considerada o mecanismo de transmissão de maior relevância epidemiológica, correspondendo a 80% dos casos (ARAS R. et al., 2003). No entanto, de acordo com o boletim epidemiológico do Ministério da Saúde de 2015, a forma de transmissão oral se destacou como a principal via de transmissão da infecção chagásica, sendo importante destacar que 87,5% desses registros são do estado do Pará (Ministério da Saúde (BR); Secretaria de Vigilância em Saúde, 2015). Outras formas de transmissão que devem ser consideradas são: congênita, transfusional, acidental e transplantar.

As principais formas de prevenção contra a doença de chagas são: controle populacional do barbeiro, conservação das casas (principalmente em zona rural), aplicação de inseticidas, utilização de telas e higienização dos alimentos consumidos.

2.6 LEISHMANIOSE

2.6.1 Histórico da doença e Epidemiologia

As leishmanioses são enfermidades provocadas por protozoários do gênero *Leishmania*, que de acordo com a espécie podem produzir manifestações cutânea, mucocutânea, cutânea difusa e viscerais. Historicamente as descrições de leishmaniose cutânea humana remontam do século I d.C. e na América a doença é conhecida desde a época de 400 a 900 d.C. (FORGANHOLI J. N., ZAPPA V., 2011)

O primeiro relato de Leishmaniose Visceral (LV) foi na Grécia, em 1835. Em 1869 foi denominada na Índia de “Kala-jwar” (febre negra) ou “Kala-azar” (Calazar) em virtude do escurecimento da pele ocorrido durante a doença (MARZOCHI, M. C. A., 1981). A primeira descrição do parasita foi feita na Índia por William Leishman, em 1903, ao realizar uma autópsia em um cadáver de um soldado que foi internado no hospital de Netley, com disenteria e hepato-esplenomegalia (VERONESI R., FOCCACIA R., 2002).

Em 1908, Charles Nicolle demonstrou o papel do cão como hospedeiro da *Leishmania denovani*. Em 1924, Knowles et al., identificaram o parasita no intestino do *Phlebotomus argentipes*. Porém, somente em 1942, a transmissão da *L. denovani* ao homem, pela picada do *P. argentipes*, foi definitivamente demonstrada, fechando assim o ciclo desta zoonose (VERONESI R., FOCCACIA R., 2002).

Estimativa atual da Organização Mundial de Saúde (OMS) indica prevalência de infecção pela *Leishmaniose* em torno de 14 milhões de pessoas em 88 países, com incidência anual de 2.000.000 de casos e 59.000 óbitos (BATISTA, F. M. A., 2014). O Brasil possui uma elevada incidência de casos de Leishmaniose tegumentar americana (LTA) e Leishmaniose visceral (LV), de acordo com a OMS existem cerca de 22.296 casos de LTA e 3.526 casos de LV, sendo importante destacar que aproximadamente 40% destes casos estão concentrados na região nordeste (WERNECK, G. L., 2010; BRASIL, MS, 2010).

2.6.2 O protozoário: *Leishmania* e seu ciclo evolutivo

A leishmaniose é uma doença causada por uma espécie de protozoário parasita de células fagocitárias de mamíferos, especialmente de macrófagos, que são capazes de resistir a destruição após fagocitose.

O ciclo evolutivo do parasita é heteroxênico, compreende uma fase nos hospedeiros invertebrados onde as formas promastigotas se multiplicam por divisão binária no tubo digestivo das fêmeas dos flebotomíneos, e a outra fase nos hospedeiros vertebrados, reservatórios mamíferos, nos quais as formas amastigotas vivem e se multiplicam, também por divisão binária, no interior dos vacúolos parasitóforos dos macrófagos (figura 29) (MCCONVILLE M.J., HANDMAN E., 2007).

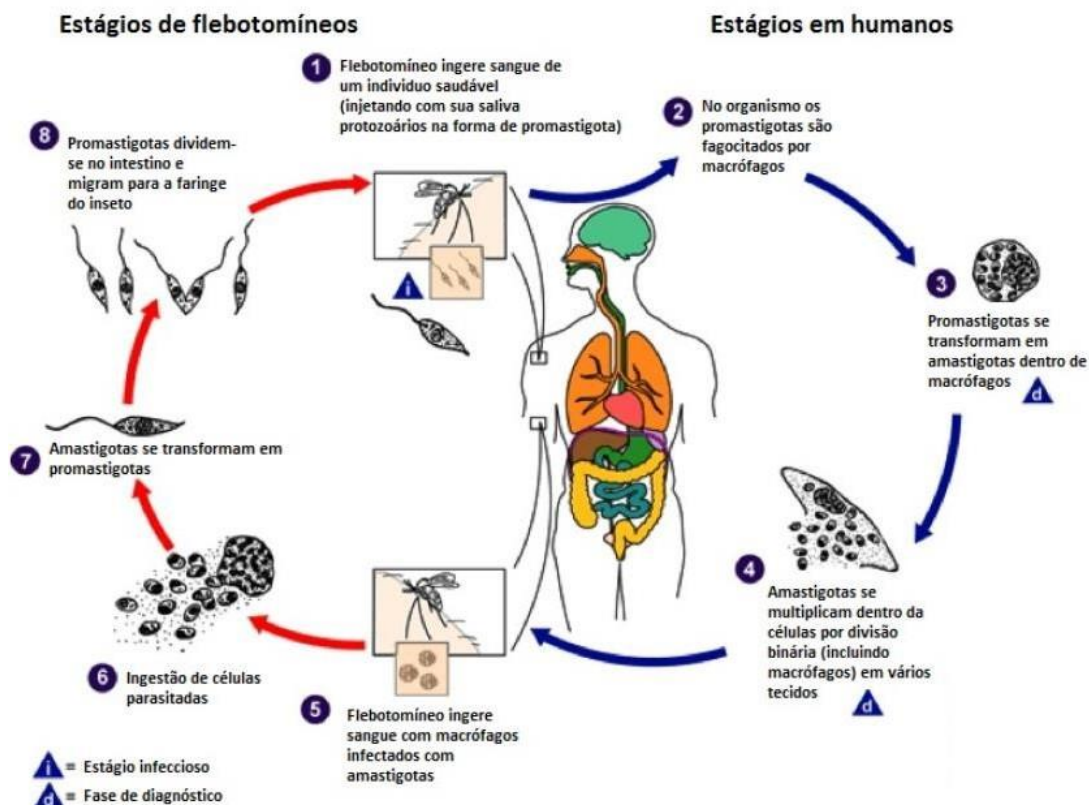


Figura 29 - Ciclo biológico da *Leishmania* no hospedeiro vertebrado e no inseto vetor (Figura modificada de CDC, 2018. Disponível em: <http://www.abcdamedicina.com.br/leishmaniose-visceral-e-cutanea-clinica-ciclo-de-vida-do-parasita.html>).

A *leishmania* se desenvolve no vertebrado durante o respasto sanguíneo, onde a fêmea do flebotomíneo introduz formas promastigotas metacíclicas no local da picada; estas são interiorizadas por macrófagos teciduais, que se transformam em amastigotas, iniciando o processo de reprodução no interior do vacúolo parasitóforo. Em seguida ocorre o rompimento do macrófago e liberação dos parasitas no interstício, estes são fagocitados por novos macrófagos, ressaltando que os macrófagos parasitados podem ser ingeridos pela fêmea de flebotomíneo durante o respasto sanguíneo. No estômago do inseto, macrófagos se rompem liberando formas amastigotas, que se transformam em promastigotas e se dividem por divisão binária. As formas promastigotas migram para o intestino e colonizam as regiões do piloro e íleo, transformando-se em paramastigota que se aderem ao epitélio e se reproduzem. As formas paramastigotas se transformam em promastigotas metacíclicas que migram para o estômago e em seguida para a faringe do inseto (WHO, 2018).

2.6.3 Leishmaniose: forma de transmissão e prevenção

A Leishmaniose representa um conjunto de enfermidades diferentes entre si, que podem comprometer pele, mucosas e vísceras, dependendo da espécie do parasito e da resposta imune do hospedeiro. São produzidas por diferentes espécies de protozoário pertencente ao gênero *Leishmania* (DESJEUX P., 2004).

Existem dois tipos de leishmaniose: Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) e a Leishmaniose Visceral (a forma mais grave, também conhecida como calazar). As principais manifestações clínicas da leishmaniose cutânea e a mucocutânea são lesões cutâneas e lesões mucosas, que se iniciam no ponto de inoculação das promastigotas infectantes, através da picada do vetor (PAVLI A., MALTEZOU, H.C., 2010). Já na leishmaniose visceral as principais características são febre, astenia, adinamia, anorexia, perda de peso, caquexia, esplenomegalia e hepatoesplenomegalia (GURUNG P., THIRUMALA-DEVI K., 2015).

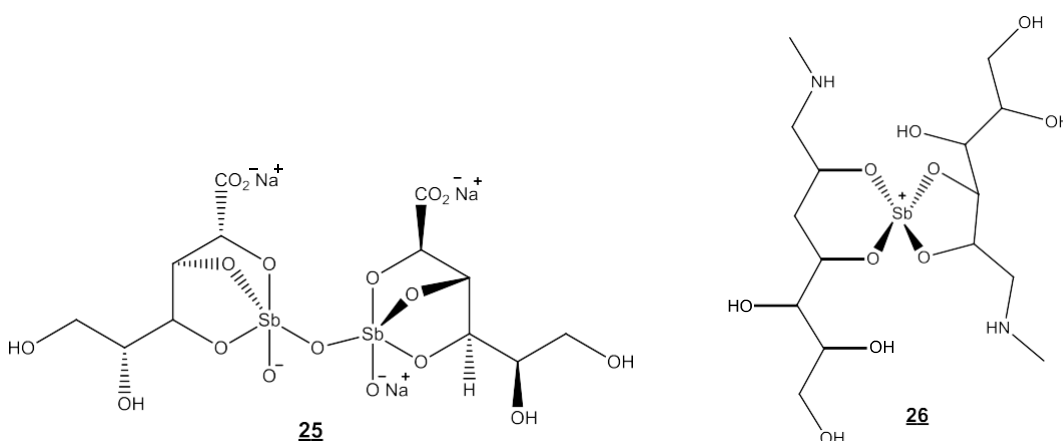
A transmissão da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) ocorre através da picada de insetos transmissores infectados. O controle da LTA deve ser abordado, de maneira abrangente, sob os aspectos da vigilância epidemiológica, medidas de atuação na cadeia de transmissão, medidas educativas e medidas administrativas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006; BASANO S. A., CAMARGO L. M. A., 2004).

A Leishmaniose Visceral ou Calazar é considerada a forma mais grave pois é uma doença sistêmica que atinge as células do sistema mononuclear fagocitário do homem e de animais, sendo os órgãos mais afetados o baço, fígado, lífonodos, medula óssea e pele. A transmissão se dá pela picada das fêmeas de insetos flebotomíneos das espécies *Lutzomyia longipalpis* ou *Lutzomyia cruzi* infectados pela *Leishmania chagasi*.

O controle da LV deve ser abordado, de maneira abrangente, sob os aspectos do Programa Nacional de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral, cujo principal objetivo é a redução da morbi-mortalidade (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007; CHAPPUIS F. et al., 2007).

2.6.4 Tratamento da Leishmaniose e mecanismo de ação dos fármacos utilizados.

O tratamento da leishmaniose baseia-se na administração de antimoniais pentavalente que são utilizados desde 1945, sendo administrado por via muscular ou intravenosa (OLIVEIRA, L. F., 2011). Entre os antimoniais pentavalentes mais consumidos no mundo estão o estibogluconato de sódio **25** e o antimoniato de meglumina **26** (SERENO, D., 2001; BASTOS M. M. et al., 2016).



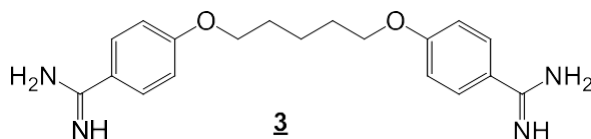
O mecanismo de ação dos antimoniais pentavalentes é a inibição das enzimas da via glicolítica e da β -oxidação em amastigotas, mas sendo um metal pesado, acredita-se que interfira em outras vias metabólicas da *Leishmania*, bem como com a do hospedeiro (HERERWALDT, B. L.; LANCET, 1999; DAVISON, R. N., 1998). Também foi observado que são capazes de inibir a topoisomerase II de *L. panamensis* e de *L. donovani* (LUCIMI, A., 1998).

Em uma pesquisa desenvolvida por Sereno et al., 2001, foi demonstrado experimentalmente que compostos de antimônio trivalente são extremamente ativos para promastigotas de diferentes espécies de *Leishmania*, enquanto a forma pentavalente é menos ativa (SERENO, D. et al., 2001).

Outras drogas, como pentamidina **3**, miltefosina **4** e anfotericina B **5** são utilizadas como medicamentos de segunda linha (COPELAND N. K., ARONSON N. E., 2015). No entanto, estes compostos apresentam limitações, tais como efeitos secundários tóxicos que conduzem a toxicidade hepática, esplênica e renal; longa duração do tratamento e resistência do parasita.

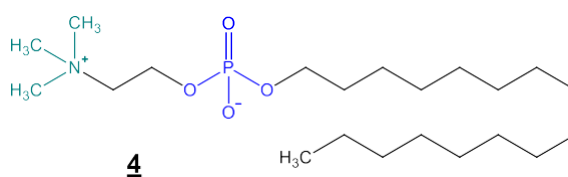
A pentamidina **3** é um derivado sintético da amidina, eficaz contra grande número de protozoários patogênicos, incluindo espécies de *Leishmania*. Quanto a seu

mecanismo de ação, sabe-se que interfere com o transporte de aminoácidos, compete com poliaminas pelos ácidos nucleicos e pode também preferencialmente ligar-se ao DNA do cinetoplasto (PAULA C. D. R. et al., 2003).



A miltefosina **4** é uma alquilfosfocolina desenvolvida originalmente para o tratamento do câncer (Unger et al., 1989). Atualmente desponta como a melhor alternativa para o tratamento da leishmaniose visceral, uma vez que o fármaco pode ser administrado por via oral, ao contrário de outros (JHA, T. K. et al., 1999).

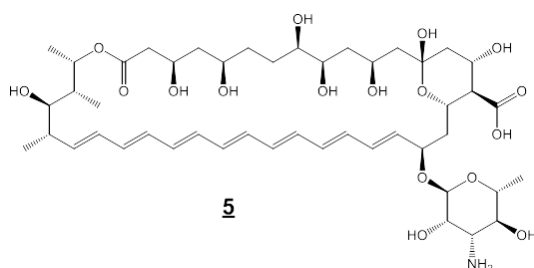
Apesar de sua eficácia comprovada por diferentes estudos, o mecanismo de ação da miltefosina ainda não foi estabelecido, mas alguns pesquisadores sugerem que ela possui propriedades imunomoduladoras que auxiliam no mecanismo (EUE, I., 1995; SAFA, O., 1997). Outros estudos propõem que esta molécula atua no parasito, provocando apoptose e a alteração das vias de sinalização celular mediada por lipídeos (ARTHUR, G., 1998). Em 2000, Lux e colaboradores demonstraram que este fármaco inibe a enzima 1-acil-2-lisoglicero-3- fosfocolina aciltransferase na forma promastigota do micro-organismo (LUX, H., 2000).



A anfotericina B **5** é um antifúngico da classe dos polienos recomendada para os casos graves de leishmaniose não responsiva ao tratamento convencional, com ameaça de morte. Seu uso é bastante restrito devido aos inúmeros efeitos tóxicos que apresenta, como febre, calafrios, hipotensão ou hipertensão, diminuição da função renal e dos níveis séricos de potássio (CROFT S. L., 2003; AMATO V. S., 2007).

O mecanismo de ação desta droga **5** decorre de sua ligação ao ergosterol, com conseqüente alteração de permeabilidade de membrana e do equilíbrio osmótico do

parasita (SAHA A. K. et al., 1986; OLLIARO P. L., BRYCESON A. D. M, 1993; URBINA J. A., 1997).



Devido a poucas alternativas atuais disponíveis, no mercado, se faz necessário a identificação de novos compostos com maior eficácia e menos efeitos tóxicos (SUNDAR S., CHAKRAVARTY J., 2013; CHÁVEZ-FUMAGALLI M. A. et al., 2015).

3 METODOLOGIA

3.1 ESTUDO QUÍMICO

O Esquema 12 apresenta a rota de síntese das novas tiossemicarbazonas isoxazolínicas de seis membros **33**. A piperidina **27**, obtida comercialmente, é o material de partida da rota sintética, por meio da oxidação do *N*-cloropiperideína (produto sintetizado a partir da piperidina), em meio básico, usando hidróxido de potássio, obtém-se a 1-piperideína (produto bastante instável). Por esse motivo no meio reacional esta sofre trimerização, formando o trímero da 1-peperideína **28a**. A partir da destrimerização do trímero da 1-piperideína **28a** e adição dos agentes acilantes (cloretos de benzoila) serão obtidas as enamidas endocíclicas **29**, que são as precursoras da rota sintética.

A escolha dos substituintes em R₁ **30**, nas respectivas enamidas endocíclicas de seis membros, a princípio foi realizada com dois grupamentos Orto-Para dirigentes variando o tipo de efeito eletrônico no anel (efeito indutivo e efeito ressonante), com o objetivo de avaliar os rendimentos das reações e analisar os possíveis efeitos eletrônicos nas atividades biológicas.

A reação procederá com a cicloadição das enamidas endocíclicas **29** e o óxido de carboetoxiformonitrila (CEFNO), que levará à obtenção dos cicloadutos isoxazolínicos de seis membros **30** que, sofrerão redução do grupamento éster em C3, via borohidreto de sódio (NaBH₄), onde serão obtidos os álcoois isoxazolínicos de seis membros **31**. Estes por meio da reação de Swern sofrerão oxidação branda, produzindo os respectivos aldeídos isoxazolínicos de seis membros **32**.

Por fim, será realizada a condensação dos aldeídos isoxazolínicos **32** com diferentes tiossemicarbazidas, obtidas comercialmente, produzindo as inéditas tiossemicarbazonas isoxazolínicas de seis membros **33**. Nesta última etapa, será utilizado o etanol (P.A.) como solvente e o ácido clorídrico concentrado como catalizador da reação (REIS S. L. G. B. et al., 2011).

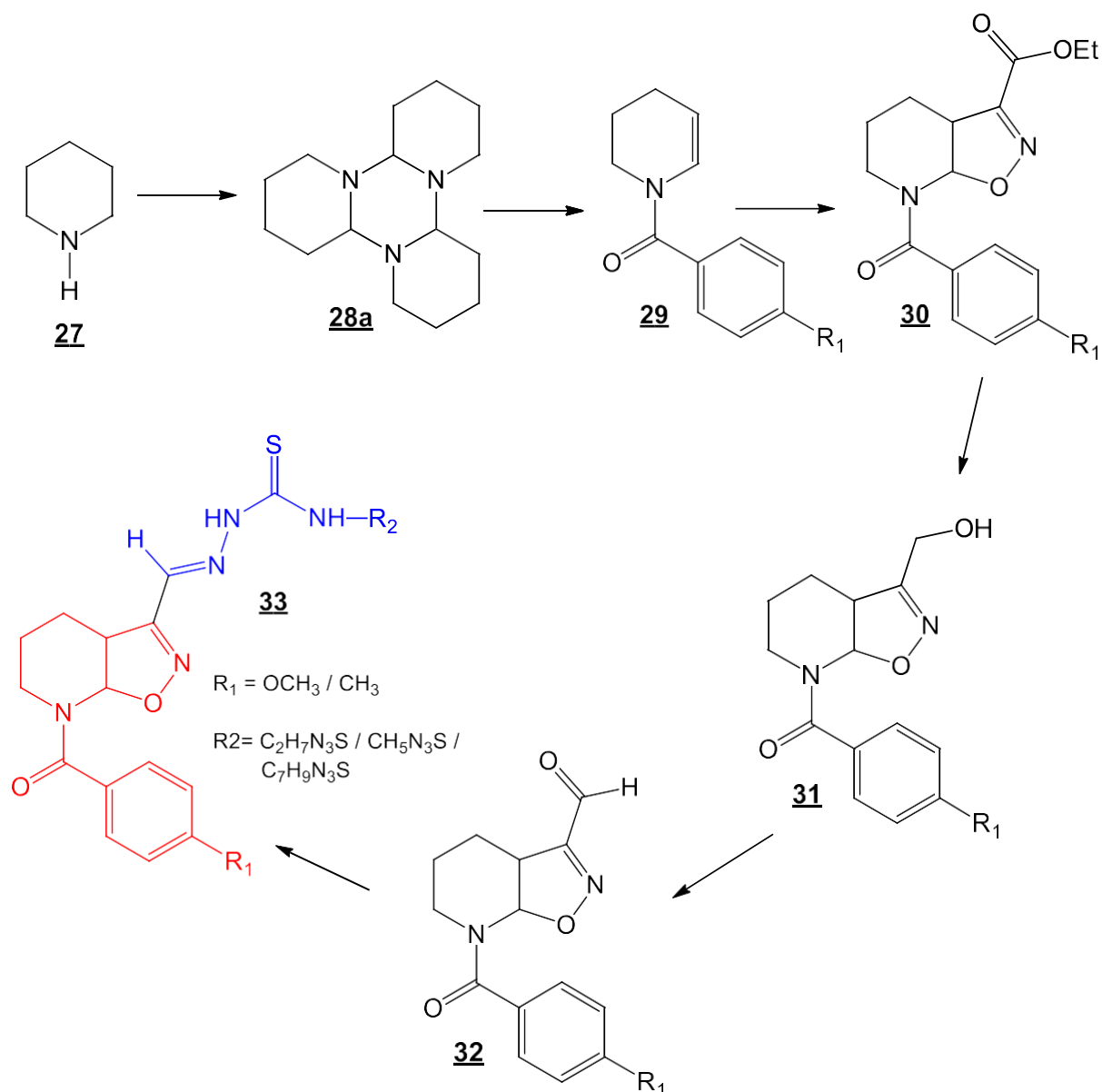
A escolha dos substituintes em R₂ **33**, nos novos compostos tiossemicarbazônicos e isoxazolínicos aza-bicíclicos de seis membros, a princípio foi realizada com substituintes orgânicos (alquila, arila e tiossemicarbazida não substituída), tendo como objetivo a análise comparativa dos três grupos funcionais

com relação aos rendimentos e aos possíveis efeitos eletrônicos nas atividades biológicas.

Como já mencionado anteriormente, a hibridização molecular, uma estratégia clássica utilizada pela química medicinal, é a técnica deste trabalho. O objetivo principal é a junção de dois grupos farmacofóricos distintos em uma única molécula.

Os inúmeros relatos de tiossemicarbazonas com diferentes atividades biológicas, antitumoral (ALTINTOP M. D. et al., 2016), antichagásica (BLAU L. et al., 2013; RIGOL C. et al., 2005, VITAL D. G. et al., 2016, LORANZO N. B. H. et al. 2012, FERNÁNDEZ M. et al. 2015), antileishmania (SILVA B. V., SILVA B. N. M., 2017) entre outras e a simplicidade na obtenção das mesmas induziu a busca por derivados desse grupamento farmacofórico que contenha o núcleo isoxazolínico aza-bicíclico, desenvolvido no nosso grupo de pesquisa por ALMEIDA et al., 2009.

A síntese dessas inéditas tiossemicarbazonas isoxazolínicas aza-bicíclicas foi planejada com o propósito de possuírem atividade antiparasitária, tendo como alvo principal o *T. cruzi* e a leishmaniose.

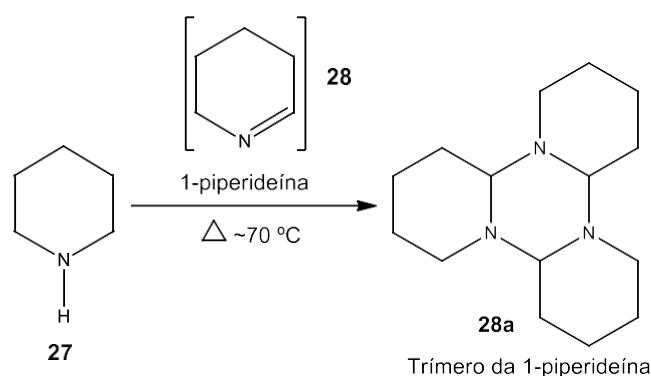


Reagentes utilizados: a) **I)** AcOH glacial, **II)** N-clorosuccinimida/KOH b) cloretos de benzoíla, Et₃N, THF c) Et₃N, Clorooxiimidoacetato de etila, THF d) NaBH₄, MeOH e) DMSO, TEA, cloreto de oxalila, CH₂Cl₂, f) Tiossemicarbazidas

Esquema 12 - Rota sintética para obtenção dos novos compostos tiossemicarbazônicos e isoxazolínicos aza-bicíclicos de seis membros, derivados do heterocíclico 2-isoxazolina [5,4-*b*]piperidina.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

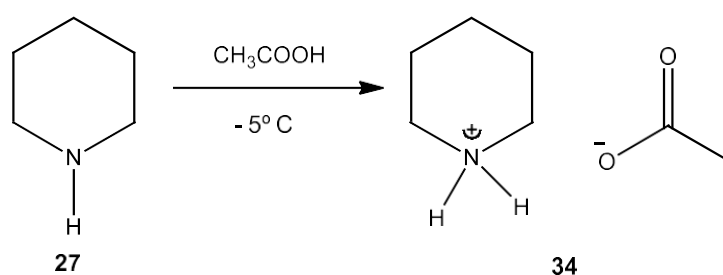
O trímero da 1-piperideína **28a** foi preparado em três etapas, que serão descritas posteriormente. Esta síntese é de grande importância, já que é a partir dela que toda rota sintética foi desenvolvida. É importante mencionar que, o trímero da 1-piperideína apresenta boa estabilidade, por esse motivo o mesmo pode ser sintetizado em multigramas e armazenado por tempo indeterminado.



4.1 ETAPAS PARA A OBTENÇÃO DO TRÍMERO DA 1-PIPERIDEÍNA

1º Etapa: Obtenção do acetato de piperidínio **34**

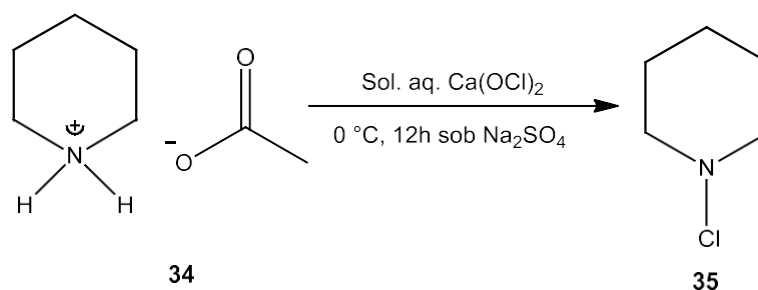
O acetato de piperidínio **34**, precursor da *N*-cloro piperidina **35**, foi obtido a partir de uma reação ácido-base entre a piperidina **27**, obtida comercialmente, e o ácido acético glacial. O produto foi utilizado na reação subsequente sem prévia purificação, pois trata-se de uma reação quantitativa.



2º Etapa: Obtenção do *N*-cloropiperidina **35**

A *N*-cloropiperidina **35** foi obtida a partir da reação entre o acetato de piperidínio **34**, previamente obtido, com hipoclorito de cálcio ($\text{Ca}(\text{OCl})_2$), resultando a *N*-cloração da piperidina, o mecanismo dessa reação se deu por via radicalar.

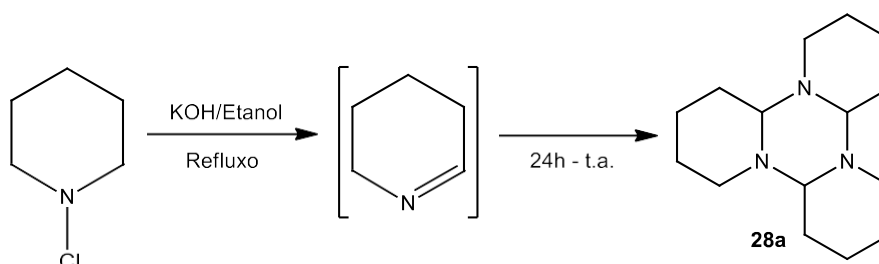
A solução de hipoclorito de cálcio ($\text{Ca}(\text{OCl})_2$), foi preparada de acordo com o procedimento descrito na literatura (CLAXTON G. P., ALLEN L., GRISAR J. M., 2003), sendo utilizado o hipoclorito de cálcio HTH para piscinas (65 %). A solução foi titulada de acordo com o método iodométrico (KI , $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$).



3º Etapa: Obtenção do Trímero da 1-piperideína **28a**

Nesta última etapa, a *N*-cloropiperidina **35** reage com o hidróxido de potássio, convertendo-se na 1-piperideína **28**, que é bastante instável. Devido a esta particularidade, no próprio meio reacional a 1-piperideína trimeriza formando o trímero da 1-piperideína **28a**, que é muito estável.

O trímero da 1-piperideína **28a**, foi obtido pelo método de cristalização, onde foi utilizado acetona gelada à $-20\text{ }^\circ\text{C}$. O produto obtido foi 1,42 g de trímero, correspondendo a um rendimento de 38 %. A confirmação da sua formação foi realizada através da faixa de fusão ($58\text{ }^\circ\text{C} - 62\text{ }^\circ\text{C}$), já descrito na literatura (Organic Syntheses, Coll. Vol., 1988).



4.2 SÍNTESE DAS ENAMIDAS ENDOCÍCLICAS DE SEIS MEMBROS 29

A síntese das enamidas endocíclicas de seis membros 29, a partir do trímero da 1-piperideína 28a, foi realizada a partir de uma adaptação da síntese dos homólogos de 5 membros, desenvolvido em nosso grupo de pesquisa. Esta síntese foi realizada em duas etapas.

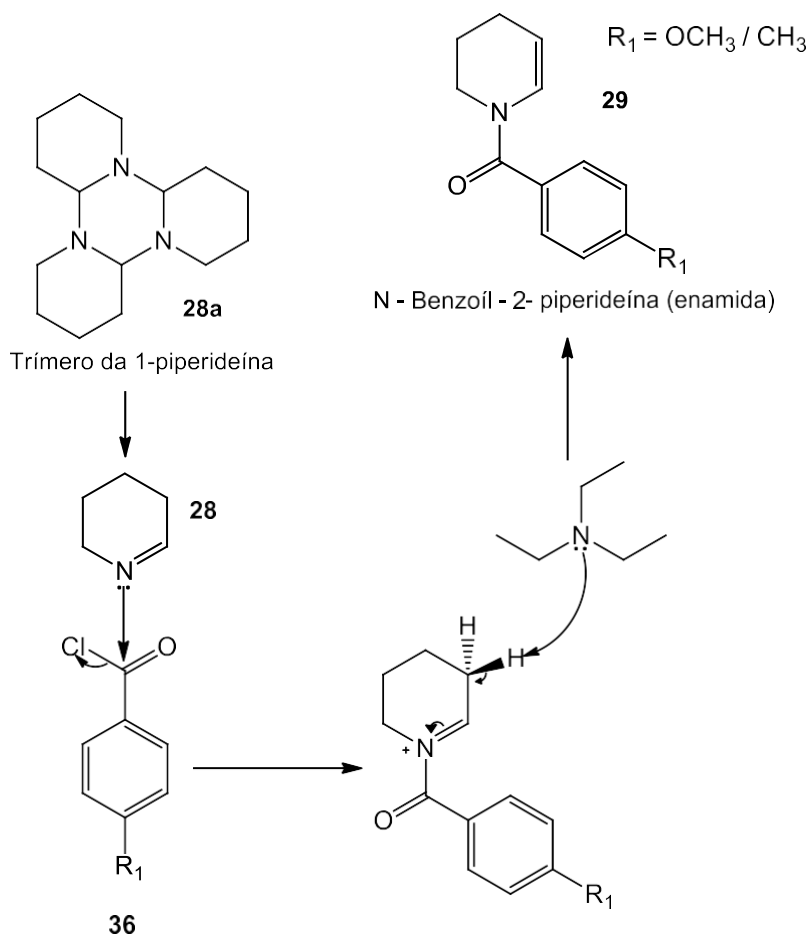
Inicialmente uma solução de trímero da 1-piperideína e a trietilamina em THF foram colocadas sob refluxo, para destrimerização do trímero da 1-piperideína 28a e formação do seu respectivo monômero 28. A presença da base, trietilamina, é importante para restaurar o par de elétrons do nitrogênio do anel piperidínico, por meio de uma reação ácido base, com abstração do próton em C3 pelo par de elétrons livre do nitrogênio da trietilamina, com formação da ligação *pi* na posição C2 e C3 do anel piperidínico. A alta reatividade da trietilamina está diretamente relacionada a presença do par de elétrons livres do átomo de nitrogênio que gera uma forte nucleofilia e pela nuvem eletrônica *pi* contida no anel piperidínico. O esquema 13 descreve o mecanismo desta reação.

A segunda etapa é caracterizada pela adição lenta do agente *N*-acilante (cloretos de benzoila) 36 para obtenção das diferentes enamidas endocíclicas de seis membros *p*-substituídas 29, com distintas propriedades eletrônicas e rendimentos. Isso foi possível devido a variação dos cloretos de benzoila 36, sendo estes elétron-doadores e elétron-retiradores.

O término da reação foi verificado por CCD, onde foi observado através da radiação ultravioleta (UV) a formação do produto e a ausência da mancha do cloreto de benzoila *p*-substituído 36. Outra técnica utilizada para confirmação foi a revelação através do vapor de iodo, onde foi detectado pontos de coloração marrom avermelhado. Isso acontece devido a interação do vapor do iodo com a nuvem eletrônica *pi* da ligação dupla contida no anel piperidínico da enamida.

Tabela 02: Rendimentos obtidos na síntese das enamidas endocíclicas de seis membros

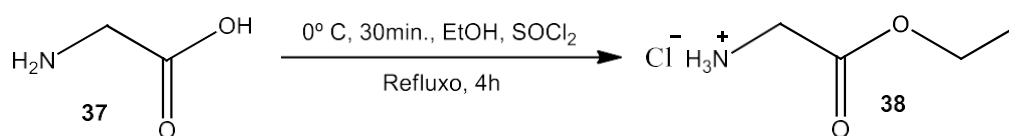
Enamidas Endocíclicas de seis membros <i>p</i> -substituídas	Rendimentos %
<u>29a</u> - CH ₃	99
<u>29b</u> - OCH ₃	58



Reagentes utilizados - Cloretos de benzoíla (OCH_3 ; CH_3), Et_3N , THF.

Esquema 13 - Suposto mecanismo de destrimerização para obtenção das enamidas endocíclicas de seis membros, partindo do trímero da 1-piperideína.

4.3 SÍNTESE DO CLORIDRATO DE GLICINA ESTERIFICADA **38**

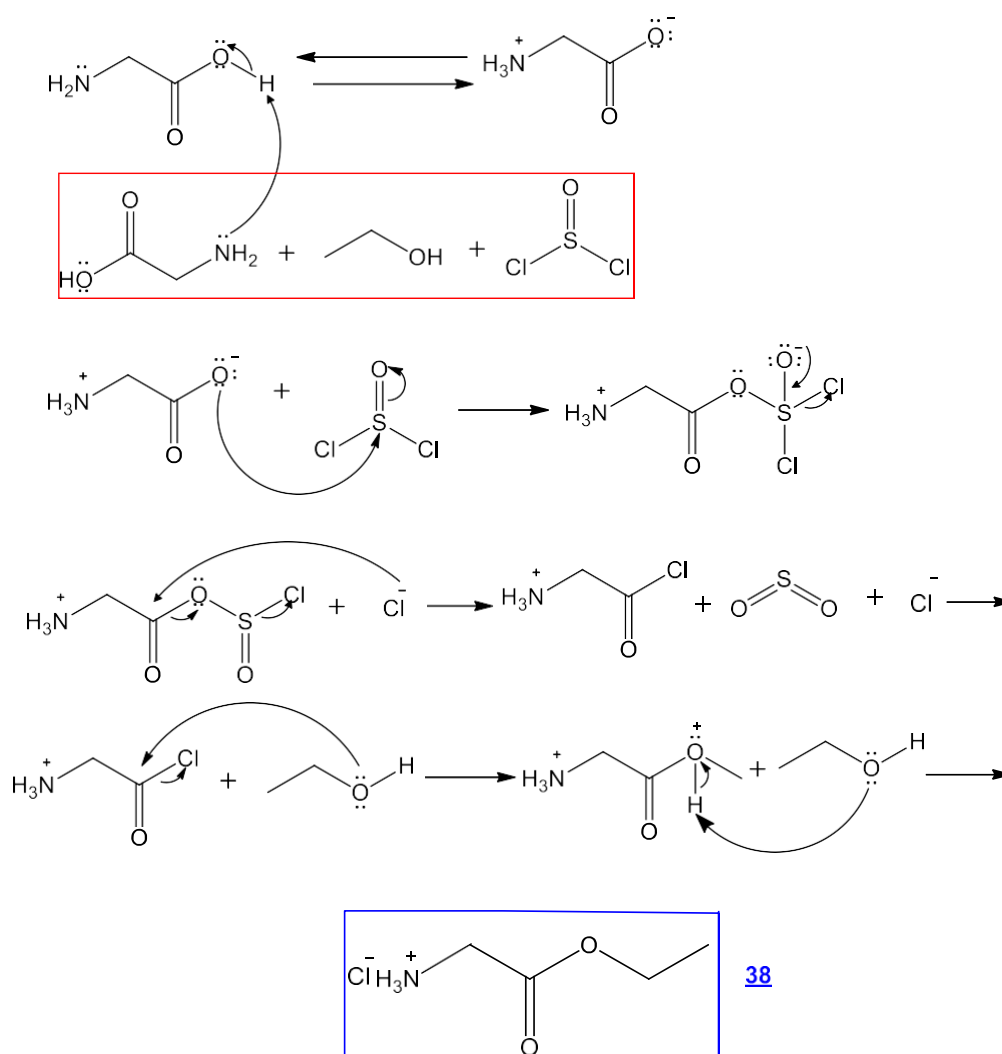


Em meio etanólico, sob agitação e aquecimento, o aminoácido glicina **37** é adicionado e convertido em sua forma *zwitterion*, devido a abstração do hidrogênio da carboxila pela amina primária do íon dipolar. Em seguida, ocorre o ataque nucleofílico

do carboxilato do íon dipolar sobre o enxofre eletrofílico do cloreto de tionila (SOCl_2), formando um intermediário, que em seu rearranjo elimina o íon cloreto.

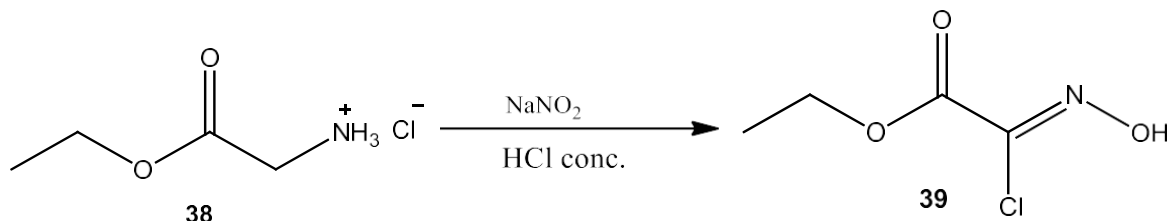
A carbonila do intermediário formado sofre o ataque nucleofílico do ânion cloreto, formando o cloreto de acila, o gás dióxido de enxofre e liberando outro íon cloreto no meio reacional.

O cloreto de acila gerado sofre o ataque nucleofílico do etanol sobre sua carbonila, formando assim o sal cloreto de glicina esterificada **38**. Segue o mecanismo (esquema 14).



Esquema 14 – Suposto mecanismo de síntese do cloridrato de glicina esterificada.

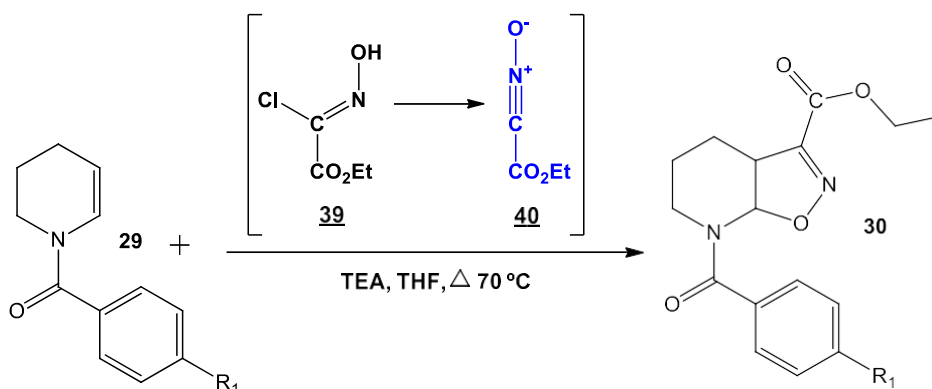
4.4 SÍNTESE DO CLOROOXIMIDOACETATO DE ETILA **39**, PRECURSOR DO *N*-ÓXIDO DE NITRILA – CEFNO **40**



O clorooximidoacetato de etila **39** é o precursor do CEFNO **40**, obtido *in situ* na reação de cicloadição 1,3-dipolar. A sua síntese se deu por meio da oxidação do cloridrato de glicina esterificada **38**, tendo como agente oxidante o nitrito de sódio (NaNO_2), em meio ácido (HCl).

O precursor do *N*-óxido de nitrila possui uma boa estabilidade, por esse motivo ele foi sintetizado em multi-gramas e armazenado por um longo período. Sua purificação foi realizada por meio da recristalização em hexano resfriado. O rendimento desta reação foi de 69 % e a faixa de fusão entre 69 – 73 °C, conforme literatura (KOZIKOWSKI, A. P.; ADAMCZYK, M., 1983).

4.5 SÍNTESE DOS ÉSTERES ISOXAZOLÍNICOS AZA-BICÍCLICO DE SEIS MEMBROS **30**



As isoxazolíneas aza-bicíclicas de 5 e 6 membros foram desenvolvidos no LASOF por Almeida et al, em 2009, sendo uma descoberta inédita visto que até então não havia relatos na literatura. Esta síntese é considerada a etapa chave do processo,

devido a formação do núcleo isoxazolíneo, grupo farmacofórico, e importante intermediário para o desenvolvimento de inúmeras moléculas com potenciais atividades biológicas.

O núcleo isoxazolíneo aza-bicíclico de seis membros é formado na síntese do éster isoxazolíneo (cicloaduto) **30**, a partir da reação de cicloadição 1,3-dipolar entre a enamida endocíclica de seis membros **29** e o *N*-óxido de nitrila (CEFNO) **40**, gerado *in situ*, a partir do clorooximidoacetato de etila **39** e trietilamina (TEA). A trietilamina atua como uma base, desprotonando o clorooximidoacetato de etila **39** para formação do *N*-óxido de nitrila (CEFNO) **40**.

Para a síntese do éster isoxazolíneo **30**, é imprescindível a adição lenta do clorooximidoacetato de etila (precursor) **39** sobre a solução de enamida endocíclica de seis membros **29** e TEA, sob refluxo. A adição lenta do precursor **39** aumenta a formação do cicloaduto **30** e consequentemente diminui a formação do dímero do *N*-óxido de nitrila **47** (figura 30).

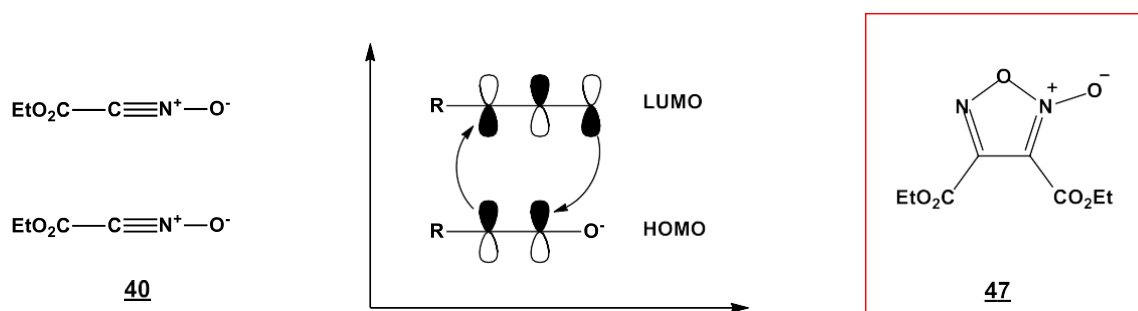


Figura 30 – Formação do dímero do *N*-óxido de nitrila **47**

Toda reação foi acompanhada por CCD, onde foi verificado a formação do éster isoxazolíneo **30** (esquema 15) e do dímero do *N*-óxido de nitrila **47**, ressaltando que as enamidas de seis membros **29** não são consumidas completamente. No entanto, a enamida que não reagiu é integralmente recuperada através da cromatografia em coluna flash.

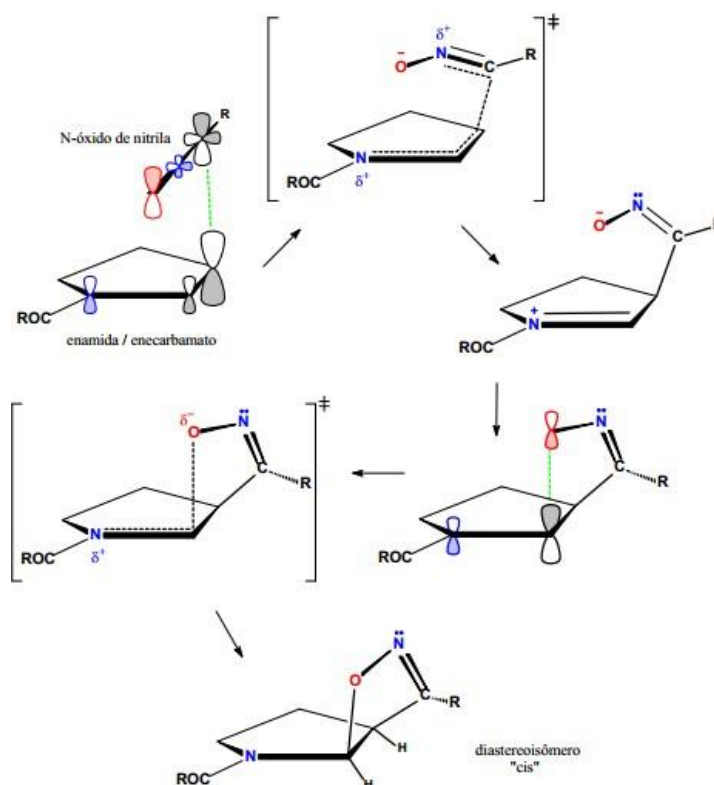
Para o núcleo isoxazolíneo de seis membros foi observado um aumento significativo no rendimento desta síntese quando feita sob refluxo, o aumento foi de aproximadamente 10%. Sendo importante mencionar que, o clorooximidoacetato de etila **39** e a TEA são colocados em excesso no meio reacional com o propósito de aumentar a formação do cicloaduto.

Tabela 03 - Rendimentos obtidos na síntese dos ésteres isoxazolínicos

Cicloadutos isoxazolínicos 30	Rendimentos (%)
30a - CH ₃	35
30b - OCH ₃	30

O mecanismo da reação de cicloadição 1,3-dipolar, para formação do núcleo 2-isoxazolina aza bicíclico, foi proposto por Dos Santos, em 2003, esquema 15. Ele descreveu a participação das enamidas endocíclicas ou enecarbamatos com o *N*-óxido de nitrila CEFNO **40**, baseado no mecanismo de cicloadição não concertado. Esta reação é controlada pelos orbitais moleculares de fronteira (HOMO e LUMO).

Neste mecanismo, não ocorre a formação simultânea das duas ligações na reação de cicloadição, isso pode ser explicado devido a linearidade do *N*-óxido de nitrila CEFNO **40** (dipolo do tipo alenila), ocasionada pela hibridização *sp* do carbono e do nitrogênio, e a grande diferença dos valores de coeficiente de orbital HOMO do enecarbamato/enamida. A formação da ligação do carbono β ao átomo de nitrogênio com o carbono do *N*-óxido de nitrila é concluída primeiro, formando um intermediário *N*-acil-imínio dipolar, que possui uma estrutura angular *N*-óxido de imina, que devido à maior proximidade espacial, possibilitará a adição do oxigênio ao carbono do acil-imínio, ocorrendo a formação da segunda ligação sigma a partir da aproximação frontal entre o orbital preenchido do oxigênio com o orbital LUMO do imínio.



Esquema 15 – Suposto mecanismo de cicloadição 1,3-dipolar, proposto por Dos Santos, em 2003, entre enamidas endocíclicas de cinco e seis membros ou enecarbamatos com o *N*-óxido de nitrila CEFNO.

Nos espectros de ressonância magnética nuclear (figuras 31 e 32), os sinais característicos da formação do heterobíccico aparecem aproximadamente em 4,2 ppm e 6,2 ppm em RMN de ^1H e 40 ppm e 90 ppm em RMN de ^{13}C , confirmando a formação do anel 2-isoxazolina aza-bicíclica. É importante destacar que, este heterobíccico não é plano, devido a esta particularidade a relaxação do spin é comprometida, por esse motivo os sinais diagnósticos do heterobíccico em RMN de ^1H e RMN de ^{13}C possuem baixa intensidade e são alargados nos espectros de RMN de ^1H .

O sinal característico do hidrogênio e do carbono da função éster ($\text{O} - \text{CH}_2$) são desblindados devido ao efeito indutivo gerado pelo átomo de oxigênio e aparecem respectivamente em 4,3 ppm em RMN de ^1H e 62 ppm em RMN de ^{13}C . O singlete da metila (CH_3) do éster etílico aparece em 1,3 ppm em RMN de ^1H e 13,9 ppm em RMN de ^{13}C , confirmando a formação da função éster **30a**. Os sinais diagnósticos dos carbonos metilênicos em 18 ppm e 41 ppm, confirmam que o núcleo é de seis membros.

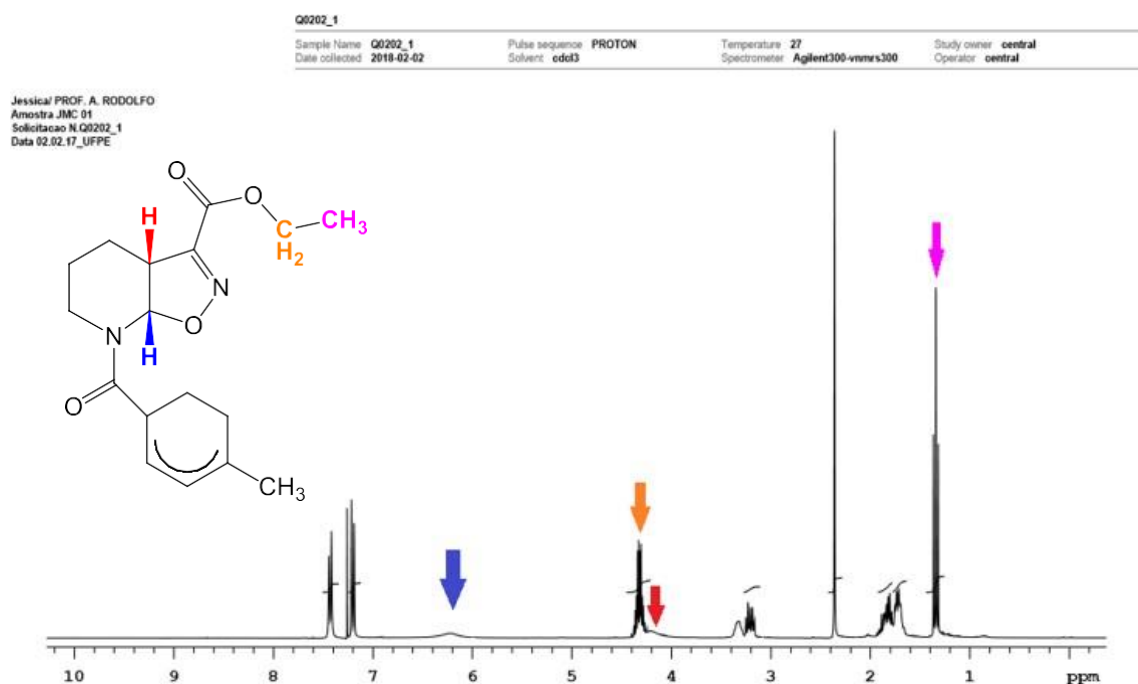


Figura 31 - Espectro de RMN de ^1H do cicloaduto isoxazolinico *p*-CH₃ **30a**

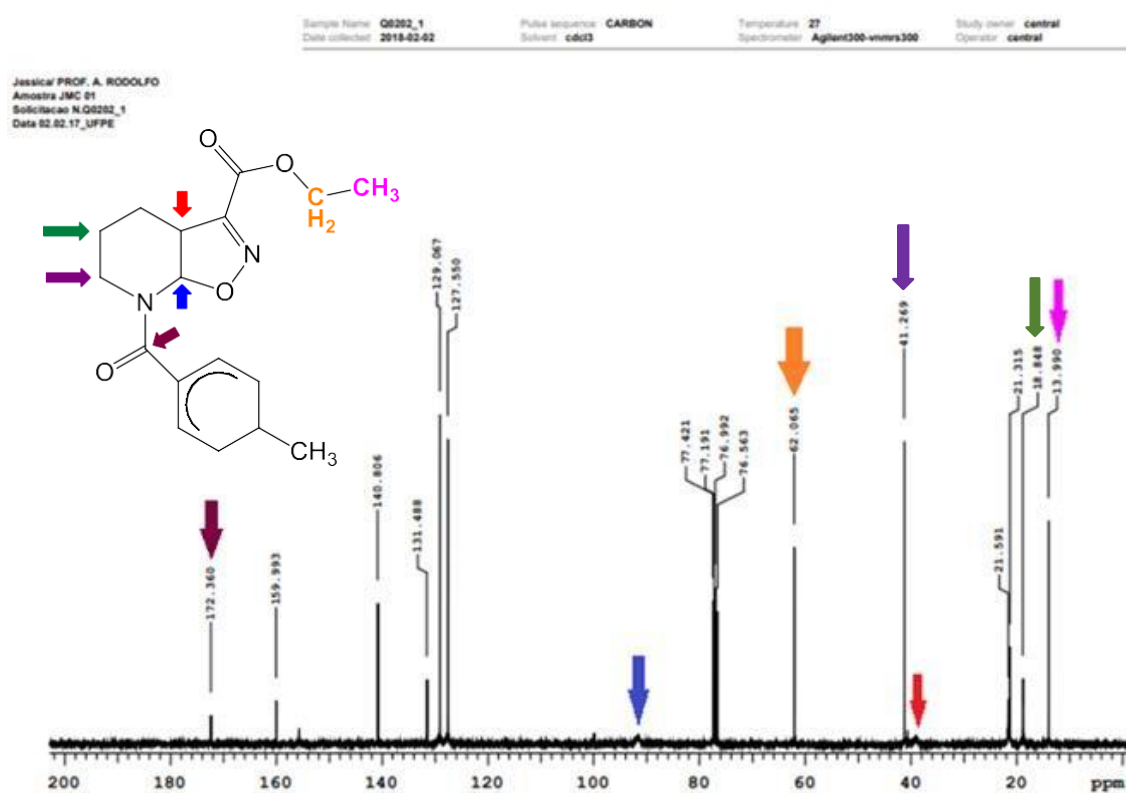
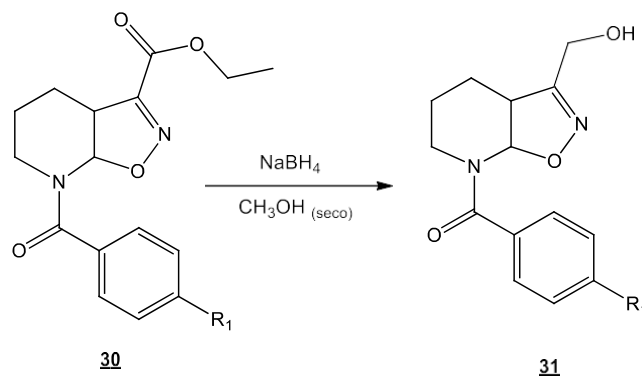


Figura 32 - Espectro de RMN de ^{13}C do cicloaduto isoxazolinico *p*-CH₃ **30a**

4.6 SÍNTESE DOS ÁLCOOIS ISOXAZOLÍNICOS AZA-BICÍCLICOS DE SEIS MEMBROS 31



Nesta reação, ocorre a redução do éster isoxazolínico **30** ao álcool isoxazolínico **31** pelo agente redutor NaBH_4 .

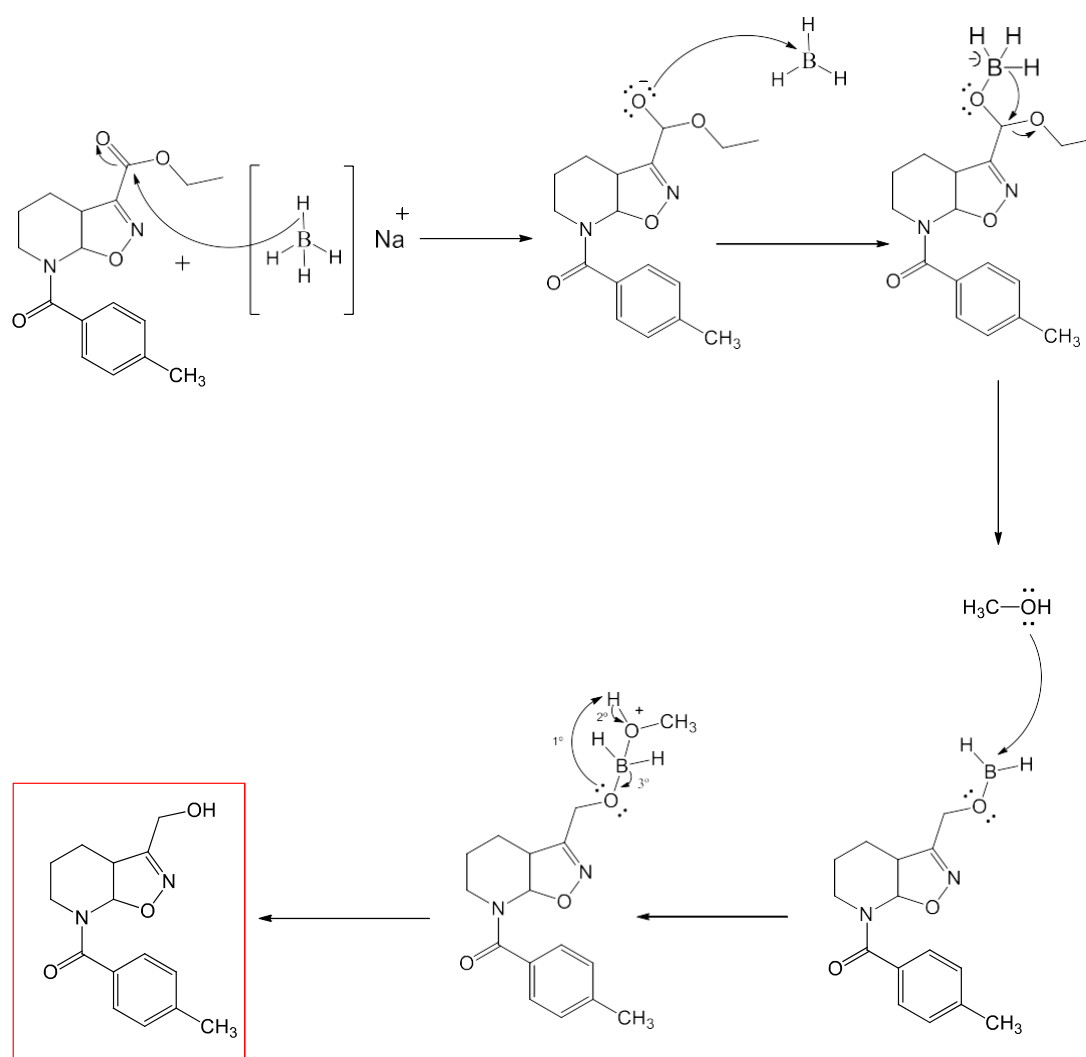
A redução direta do éster em C3 para o respectivo aldeído **32** em C3, necessário para a condensação posterior com as tiossemicarbazidas, não foi possível, pois reagentes tradicionais para este tipo de redução, como DIBAL-H e superhidreto $[(\text{Et}_3\text{AlH})\text{Li}]$, não promoveram a redução esperada, permanecendo intactos os ésteres isoxazolínicos **38**. Pelo motivo explicitado acima, foi feita uma redução do éster **30** ao respectivo álcool **31**, para posterior oxidação branda ao aldeído **32**, o que nos propiciou dar sequência na via sintética dos híbridos isoxazolina/tiossemicarbazonas.

O borohidreto de sódio (NaBH_4) é um agente redutor muito efetivo e seletivo, embora não seja utilizado com frequência na redução de ésteres, ele foi utilizado neste trabalho por ser um redutor brando, que proporcionou a redução apenas em C3 do éster isoxazolínico, formando assim o álcool isoxazolínico. O mecanismo desta reação está descrito na figura no esquema 16.

O álcool *p*- CH_3 **31a**, intermediário inédito, foi caracterizado estruturalmente por meio da espectroscopia de RMN de ^1H e ^{13}C (figuras 33 e 34). Os sinais característicos do carbono e dos hidrogênios metilênicos ligados a função álcool ($\text{CH}_2 - \text{OH}$) aparecem respectivamente em 4,3 ppm em RMN de ^1H e 57,1 ppm em RMN de ^{13}C . O sinal diagnóstico do hidrogênio da função álcool aparece em 3,19 ppm em RMN de ^1H . O sinal diagnóstico do radical metila (CH_3) aparece em 2,34 ppm em RMN de ^1H e 18,8 ppm em RMN de ^{13}C , confirmando a formação do álcool isoxazolínico *p*- CH_3 **31a**.

Tabela 04 - Rendimentos obtidos na síntese dos álcoois isoxazolínicos

Álcoois isoxazolínicos <u>31</u>	Rendimentos (%)
<u>31a</u> - CH ₃	68
<u>31b</u> - OCH ₃	54



Esquema 16 – Suposto mecanismo reacional para formação do álcool isoxazolínico

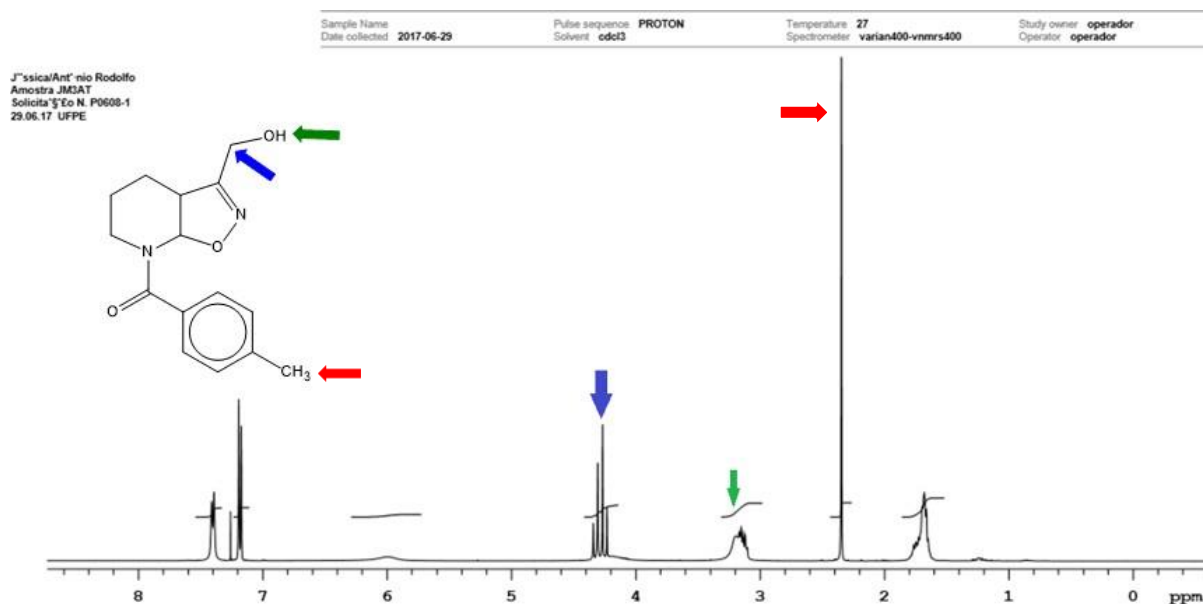


Figura 33 - Espectro de RMN de ^1H do álcool isoxazolínico *p*-CH₃ **31a**

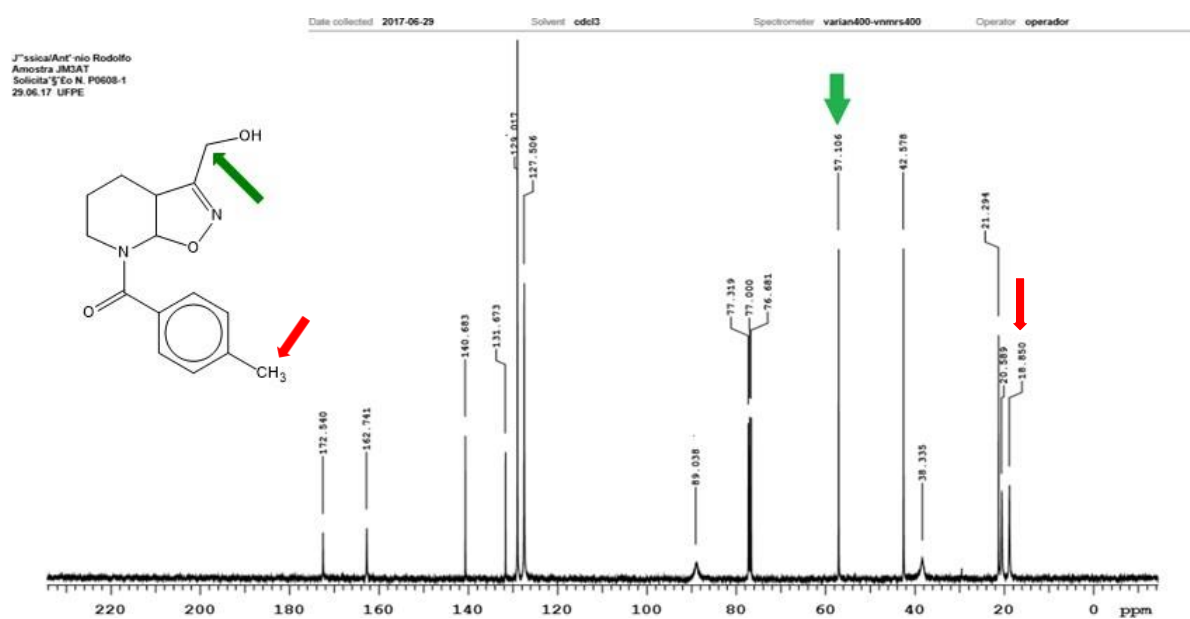
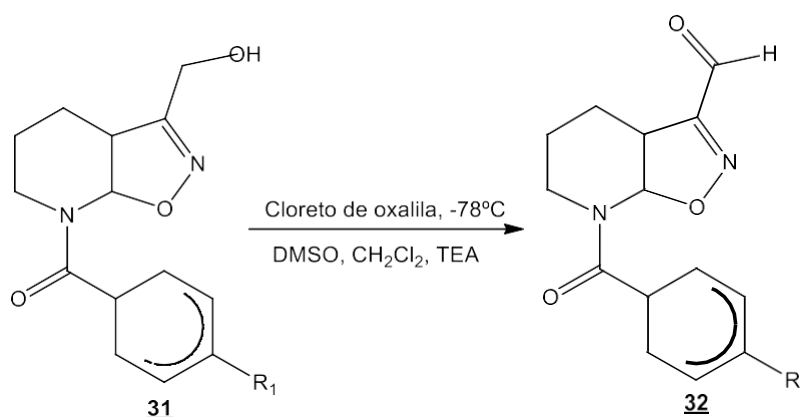


Figura 34 - Espectro de RMN de ^{13}C do álcool isoxazolínico *p*-CH₃ **31a**

4.7 SÍNTESE DOS ALDEÍDOS ISOXAZOLÍNICOS AZA BICÍCLICOS DE SEIS MEMBROS 32



A síntese dos aldeídos foi realizada a partir da oxidação branda de Swern (MANCUSO, HUANG & SWERN, 1981; REIS S. L. G. B., 2011). A etapa inicial da oxidação do álcool isoxazolínico 31, se deu por meio da ativação do dimetilsulfóxido (DMSO) 41 pelo cloreto de oxalila 42, a -70°C , formando um intermediário 43 que se decompõe rapidamente, liberando dióxido e monóxido de carbono, produzindo o cloreto de dimetilclorosulfônico 44.

Com a adição do álcool isoxazolínico 31, ocorreu o ataque nucleofílico do par de elétrons da hidroxila sobre o dimetilclorosulfônico 44, formando um intermediário-chave, íon alcoxissulfônico 45. Este íon foi desprotonado por meio da adição da trietilamina (TEA), formando o aldeído isoxazolínico aza-bicíclico de seis membros 32. Como subproduto da reação, foi formado o cloreto de trietilamônio e o gás dimetilsulfeto, este possui um forte odor, característico da reação de Swern, o mecanismo desta reação está descrito no esquema 17.

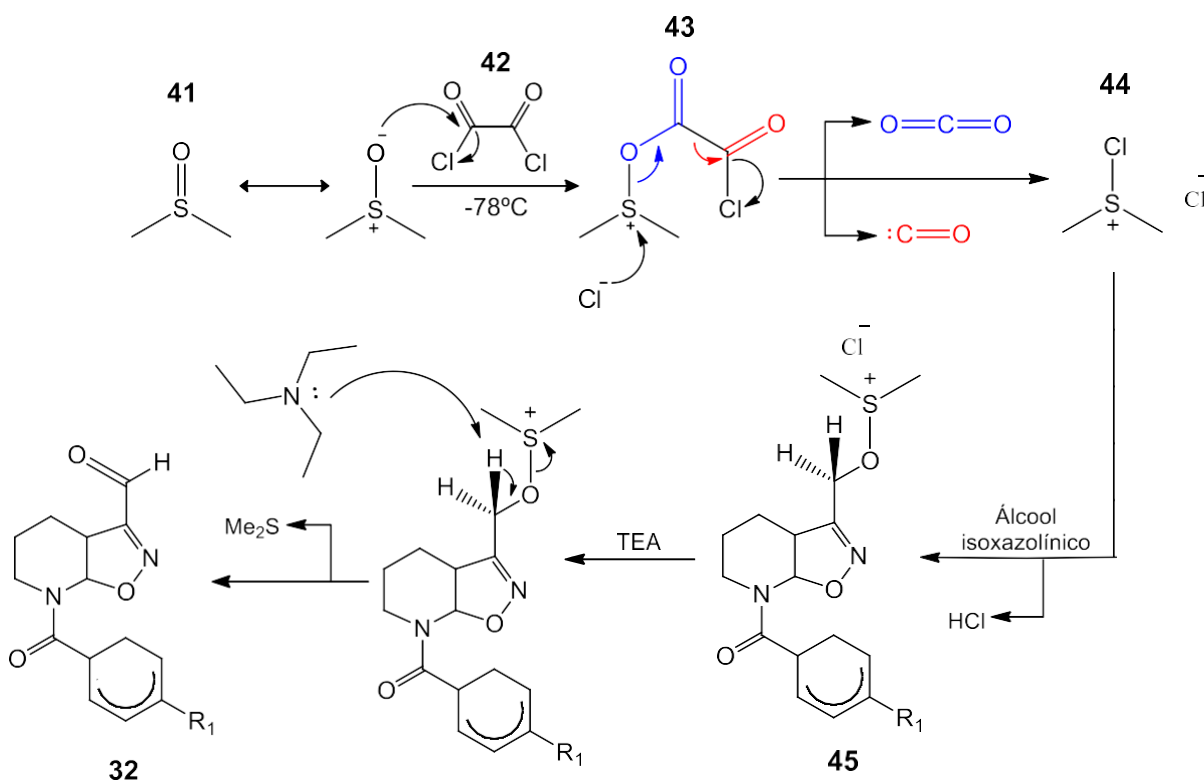
A reação durou cerca de 40 minutos e o processo de purificação foi realizado através da cromatografia em coluna flash, bons rendimentos foram obtidos.

O *p*-toluilbenzaldeído 32a, intermediário inédito, foi caracterizado estruturalmente por meio da espectroscopia de RMN de ^1H e ^{13}C (figuras 35 e 36), confirmando a formação do aldeído 32a. Os sinais característicos do carbono e do hidrogênio da carbonila ($\text{H} - \text{C} = \text{O}$) são altamente desblindados, devido ao efeito de anisotropia diamagnética e pelo efeito indutivo gerado pelo átomo de oxigênio. O sinal

característico do carbono e do hidrogênio da função aldeído ($\text{H} - \text{C} = \text{O}$) aparecem respectivamente em 9,75 ppm em RMN de ^1H e 185,6 ppm em RMN de ^{13}C . Os hidrogênios presentes no núcleo 2-isoxazolina aza-bicíclica possuem deslocamentos e comportamentos semelhantes em todas as moléculas sintetizadas neste trabalho.

Tabela 05 - Rendimentos obtidos na síntese dos aldeídos isoxazolínicos

Aldeídos isoxazolínicos 32	Rendimentos (%)
40a - CH_3	85
40b - OCH_3	83



Esquema 17 – Suposto mecanismo da reação de Swern, oxidação dos álcoois isoxazolínicos aos respectivos aldeídos isoxazolínicos.

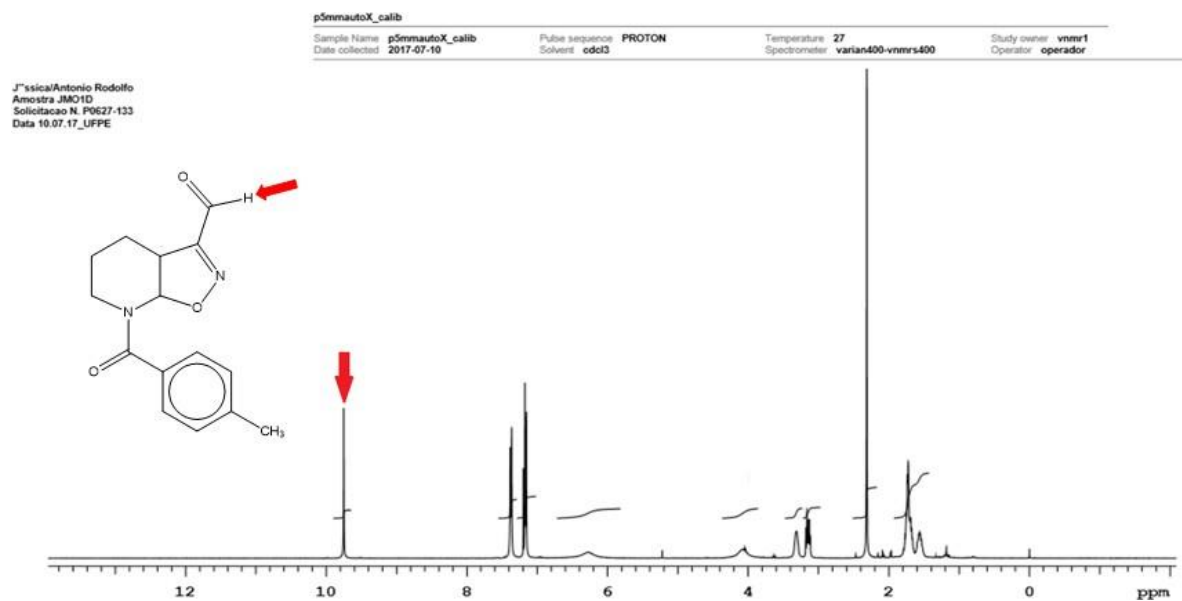


Figura 35 - Espectro de RMN de ^1H do *p*-toluilbenaldeído isoxazolinico **32a**

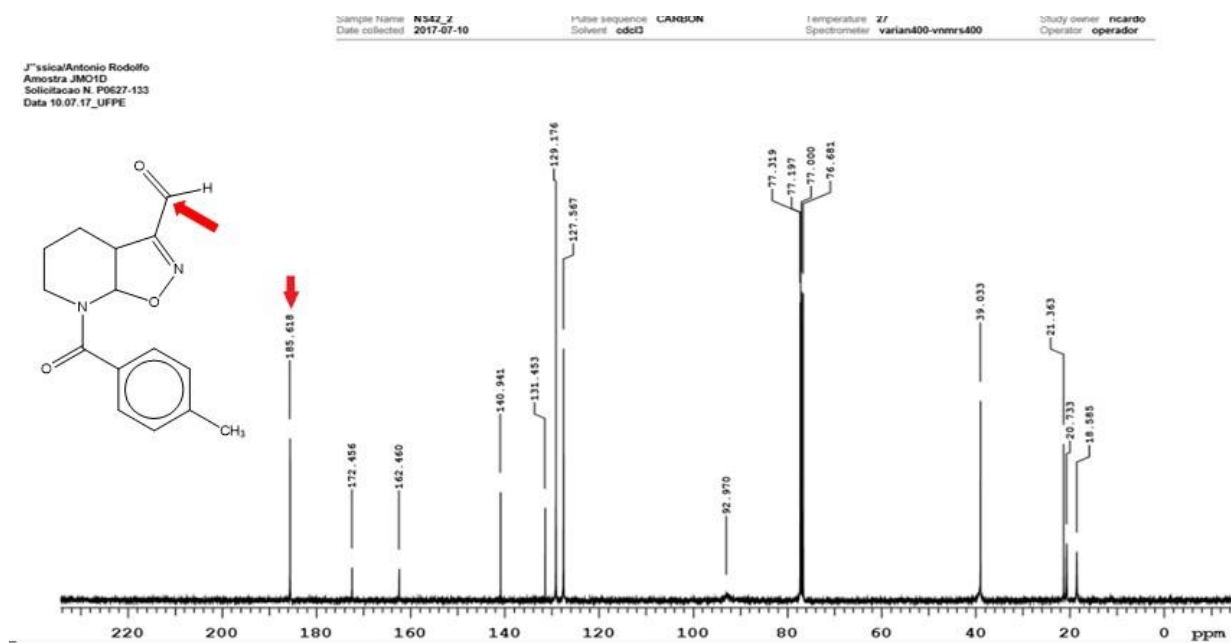
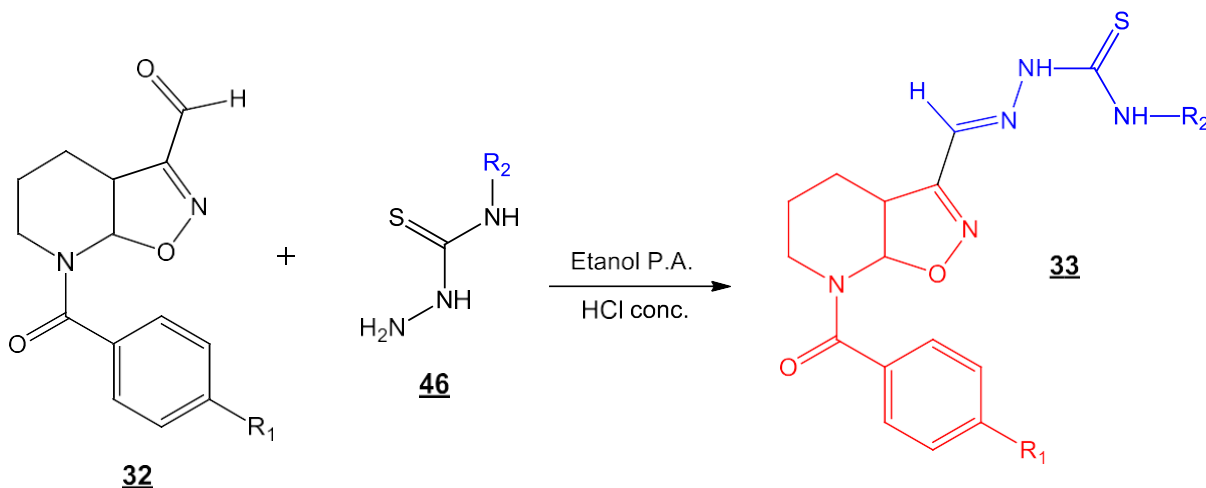


Figura 36 - Espectro de RMN de ^{13}C do *p*-toluilbenaldeído isoxazolinico **32a**

4.8 SÍNTESE DAS TIOSSEMICARBAZONAS ISOXAZOLÍNICAS AZA-BICÍCLICAS DE SEIS MEMBROS **33**. CONDENSAÇÃO ENTRE ALDEÍDOS ISOXAZOLÍNICOS **32** E TIOSSEMICARBAZIDAS **46**



Na literatura, encontram-se diferentes formas de síntese para obtenção de tiossemicarbazonas (CHANDRA, S.; PARMAR, S.; KUMAR, Y, 2009; CUNHA, S.; DA SILVA, T. L, 2009; TENÓRIO, R. P. et al., 2005).

As reações de condensação entre diferentes tiossemicarbazidas **46** e aldeídos **32**, em meio ácido, foi baseada na metodologia praticada por (GLIGORIJEVIĆ N. et al., 2009) e pelo estudo de revisão realizado por (TENÓRIO, R. P. et al., 2005), que elucidava as diversas vias para obtenção de tiossemicarbazidas. A obtenção direta das tiossemicarbazonas a partir de tiossemicarbazidas, foi a via utilizada para obtenção das inéditas tiossemicarbazonas isoxazolínicas **33**. Esta reação é bastante conhecida por sua alta quimioseletividade, versatilidade e rapidez, apresentando geralmente altos rendimentos (TENÓRIO R. P. et al., 2005).

A condensação das diferentes tiossemicarbazidas **46**, adquiridas comercialmente, foi realizada com os aldeídos isoxazóis **32** (*p*-OCH₃, *p*-CH₃), dissolvidos em etanol P.A. sob temperatura ambiente e quantidades catalíticas de ácido clorídrico concentrado. Quatro condensações diferentes foram feitas e tiveram características distintas.

A escolha dos substituintes em R₂ **33**, nos novos compostos tiossemicarbazônicos e isoxazolínicos aza-bicíclicos de seis membros, a princípio foi realizada com substituintes orgânicos (alquil, arila e tiossemicarbazida não

substituída), tendo como objetivo a análise comparativa dos três grupos funcionais com relação aos rendimentos e aos possíveis efeitos eletrônicos nas atividades antichagásica e leishmanicida.

Uma particularidade interessante desta síntese é a condição reacional, pois as condensações dos aldeídos isoxazolínicos com diferentes tiossemicarbazidas são realizadas em temperatura ambiente e sem controle de pH, isso pode ser explicado devido a termossensibilidade e a alta reatividade dos aldeídos isoxazóis **32** em solução. Essa alta reatividade favorece a precipitação da tiossemicarbazona no meio reacional, proporcionando uma reação rápida, simples e com bons rendimentos.

Na literatura, as reações de condensações de aldeídos com tiossemicarbazidas necessitam de refluxo e pH controlado. Em valores de pH menores que 4, há possibilidade de ocorrer protonação do nitrogênio N-1 da tiossemicarbazida e, conseqüentemente, a velocidade de condensação será mais lenta. Por outro lado, em pH > 5, a velocidade de reação também diminui (COSTA, P., 2003; SOLOMONS, G.; FRYHLE, C., 2002).

O mecanismo desta reação inicia-se com a protonação do oxigênio da carbonila do aldeído para formar o intermediário íon oxônio, seguida do ataque nucleofílico do nitrogênio N-1 da tiossemicarbazida para formar o intermediário hemiaminal protonado. Este perde uma molécula de água e, após neutralização pelo próprio etanol, forma-se a tiossemicarbazona (TENÓRIO R. P. et al, 2005). O esquema 18 descreve o mecanismo desta reação.

A condensação do *p*-toluilbenzaldeído **32a** com a 4-fenil-tiossemicarbazida **46c** e com a tiossemicarbazida **46b** foi realizada por meio da adição lenta do aldeído **32a** (último reagente). Depois da completa adição o meio ficou turvo, com 25 minutos de agitação foi observado por meio da CCD a formação do produto, porém nesse intervalo ainda tinha muito aldeído, após 45 minutos foi observado a completa formação do produto.

Como a 4-metil-3-tiossemicarbazida **46a** e o *p*-metoxibenzaldeído **32b** são parcialmente solúveis no etanol a condensação deles com o *p*-toluilbenzaldeído **32a** e com a 4-fenil-tiossemicarbazida **46c** respectivamente, sofreram algumas adaptações. O *p*-metoxibenzaldeído **32b** parcialmente solubilizado no etanol e o *p*-toluilbenzaldeído **32a** foram colocados no meio reacional, seguido da adição direta das tiossemicarbazidas **46c** e **46a** respectivamente e de 1 gota de HCl conc. Tais modificações também foram baseadas na metodologia praticada por (GLIGORIJEVIĆ

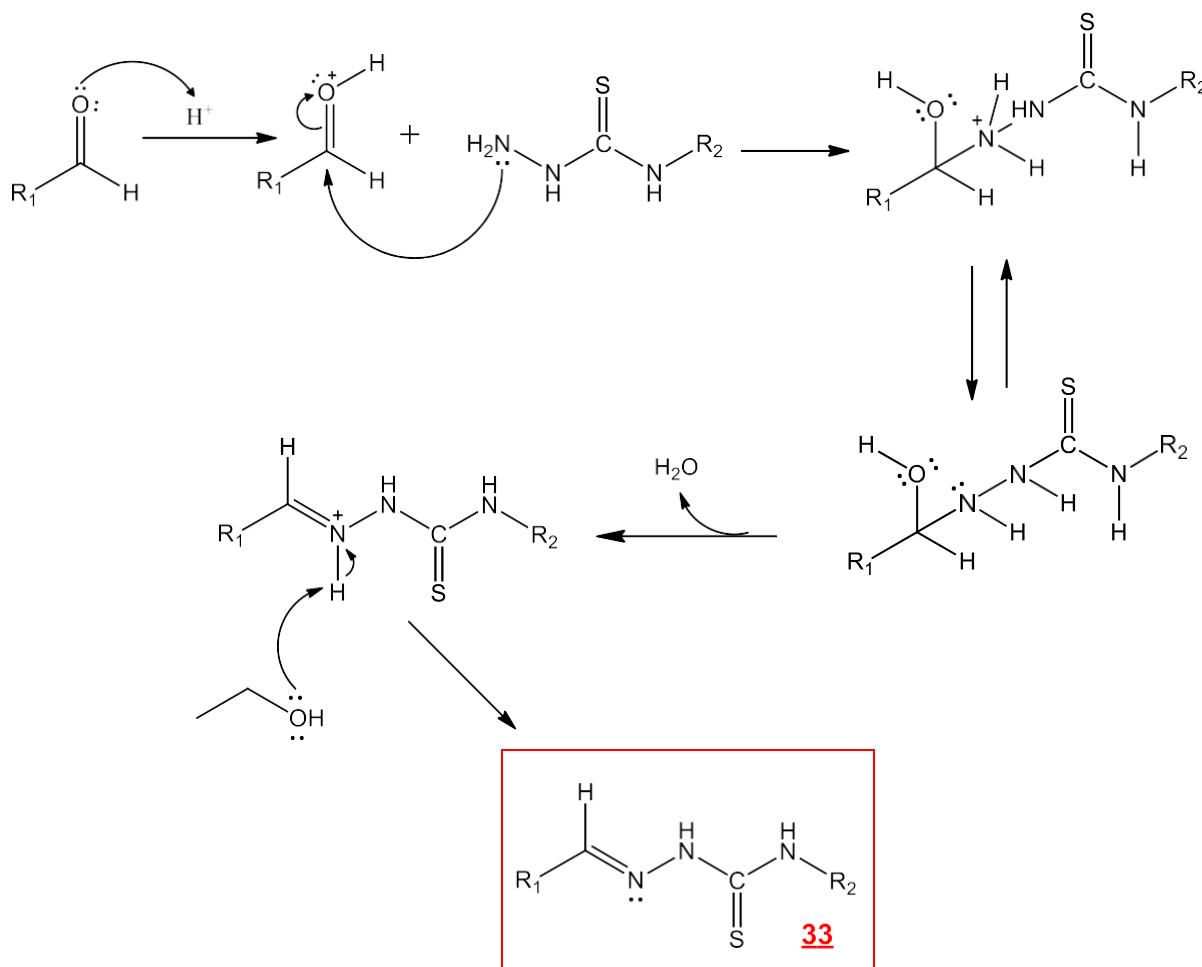
N. et al., 2009) e pelo estudo de revisão realizado por (TENÓRIO R. P. et al, 2005); com o propósito de obter rendimentos consideráveis, já que a solubilização parcial de ambos iria afetar os rendimentos.

Os rendimentos das reações de condensação, descritos na tabela 06, estão dentro da faixa apresentados na literatura (CHANDRA, S.; PARMAR, S.; KUMAR, Y. SYNTHESIS, 2009; BERALDO, H., 2004), para outras condensações de diferentes tiossemicarbazidas com aldeídos.

O processo de purificação se deu por meio de consecutivas lavagens com etanol P.A. e metanol P.A., seguida de centrifugações para retirada do sobrenadante e repetição do processo. Na reação foi observado que o método de lavagem para as tiossemicarbazonas isoxazolínicas não foi um processo rápido, mas ajudou bastante na purificação dos mesmos. Outro método utilizado após consecutivas lavagens foi a filtração a vácuo, com funil sinterizado, onde os produtos foram lavados e filtrados repetidas vezes com etanol P.A. e metanol P.A., obtendo assim as diferentes tiossemicarbazonas isoxazolínicas aza-bicíclicas de seis membros **33** (TENÓRIO R. P. et al, 2005; GLIGORIJEVIĆ N. et al., 2009).

Tabela 06 – Rendimentos obtidos na síntese dos novos derivados tiossemicarbazônicos e isoxazolínicos aza-bicíclicos de seis membros

Tiossemicarbazonas isoxazolínicas piperidínica 33		Rendimentos (%)
33a - R ₁ : CH ₃	R ₂ : CH ₃	84
33b - R ₁ : CH ₃	R ₂ : H	70
33c - R ₁ : CH ₃	R ₂ : Ph	62
33d - R ₁ : OCH ₃	R ₂ : Ph	52



Esquema 18 – Suposto mecanismo reacional para obtenção das inéditas tiossemicarbazonas isoxazolínicas aza-bicíclicas de seis membros **33**.

As novas tiossemicarbazonas isoxazolínicas aza-bicíclicas de seis membros **33** foram caracterizadas estruturalmente por meio da espectroscopia de RMN (1D e 2D), como também pela identificação dos grupos funcionais através das análises de infravermelho.

As figuras 37 e 39 apresentam a estrutura da tiossemicarbazona isoxazolínica **33a**, como ilustração representativa, contendo todos os sinais de RMN de ^1H e ^{13}C respectivamente. Os sinais diagnósticos do heterobiciclo, aparecem exatamente em 6,11 ppm em RMN de ^1H e 89,9 ppm em RMN de ^{13}C , confirmando a formação do anel 2-isoxazolina aza-bicíclica, os sinais característicos dos hidrogênios metilênicos em 1,58; 1,96 e 3,01; 3,58; confirmam que o núcleo é de seis membros. Ressaltando que, as outras moléculas sintetizadas obtiveram deslocamentos químicos

semelhantes, apenas com as variantes dos substituintes, sendo confirmado a formação do anel 2-isoxazolíneo aza-bicíclico de seis membros em toda a série.

Os deslocamentos químicos em 11,66 ppm (**N - NH**) e 8,32 ppm (**H - N - C = S**) são dos hidrogênios das ligações (**N - H**), eles estão altamente desblindados devido à forte eletronegatividade do átomo de nitrogênio e a ressonância local existente ocasionada pela ligação *pi* (**C = S**), ressaltando que o sinal diagnóstico deste carbono é de extrema importância, pois comprova a formação da função tiossemicarbazona, seu deslocamento químico foi de 177,8 ppm em RMN de ^{13}C . Outro sinal característico das tiossemicarbazonas em RMN de ^1H é a ligação (**CH = N**), com o deslocamento químico em 7,82 ppm. É importante mencionar que, esses deslocamentos principais supracitados demonstraram poucas variações nas demais tiossemicarbazonas sintetizadas. As figuras 38 e 40 apresentam, de forma demonstrativa, os espectros de RMN de ^1H e RMN de ^{13}C , com destaque nos principais sinais diagnósticos da formação da tiossemicarbazona isoxazolínea **33a**.

Para caracterização por RMN de ^{13}C das amostras **33b** e **33c**, foram feitas duas análises, alterando a temperatura de 27 °C para 35 °C, o tempo morto (d1) entre as repetições foi alterado para 0.5s e o tempo da amostra no aparelho foi maior (2:30 h) para cada composto. Essas mudanças foram realizadas porque no primeiro espectro com a temperatura a 27 °C e o tempo aproximado de 2 h, não foi possível verificar o sinal diagnóstico da formação do heterobicíclo (carbonos do anel).

A figura 41 apresenta, como ilustração demonstrativa, o espectro de infravermelho, com destaque para as principais bandas características da tiossemicarbazona isoxazolínea **33a**. A figura 42 exibe os espectros de infravermelho dos novos compostos tiossemicarbazônicos e isoxazolínicos (**33b**, **33c**, **33d**).

A figura 43, apresenta de maneira ilustrativa, o espectro bidimensional de RMN por correlação (HSQC) do composto **33a**, confirmando os acoplamentos ($^1\text{H} - ^{13}\text{C}$) que participam da mesma ligação química ($^1\text{J}_{\text{CH}}$). Uma particularidade interessante, é que nos espectros por correlação (HSQC) não é possível verificar o acoplamento $^1\text{J}_{\text{CH}}$ dos carbonos e dos hidrogênios da junção do anel isoxazolíneo. Essa particularidade é uma característica do heterobicíclo, já que o mesmo não é plano, dificultando a relaxação do spin, por esse motivo os sinais diagnósticos possuem baixa intensidade e não aparecem nos espectros bidimensionais de acoplamento $^1\text{J}_{\text{CH}}$. Outra característica importante, é que o sinal diagnóstico do carbono do heterobicíclo, que possui deslocamento químico em 40 ppm, não aparece nos espectros de RMN de ^{13}C .

nem nos bidimensionais por correlação (HSQC). Isso acontece porque o deslocamento químico de ^{13}C do DMSO- d_6 , solvente o qual os compostos finais são solúveis, é de 39,52 ppm e a multiplicidade do seu sinal é um septeto, logo o deslocamento químico em 40 ppm do carbono do heterobiciclo fica abaixo do sinal de ^{13}C do DMSO- d_6 .

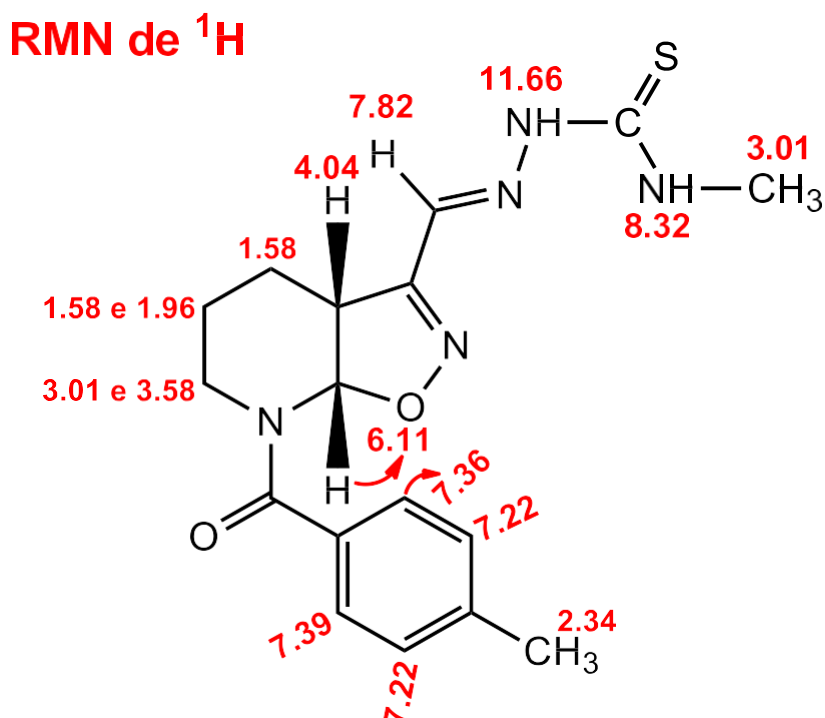


Figura 37 - Dados espectrométricos de RMN de ^1H da tiossemicarbazona isoxazolílica **33a**

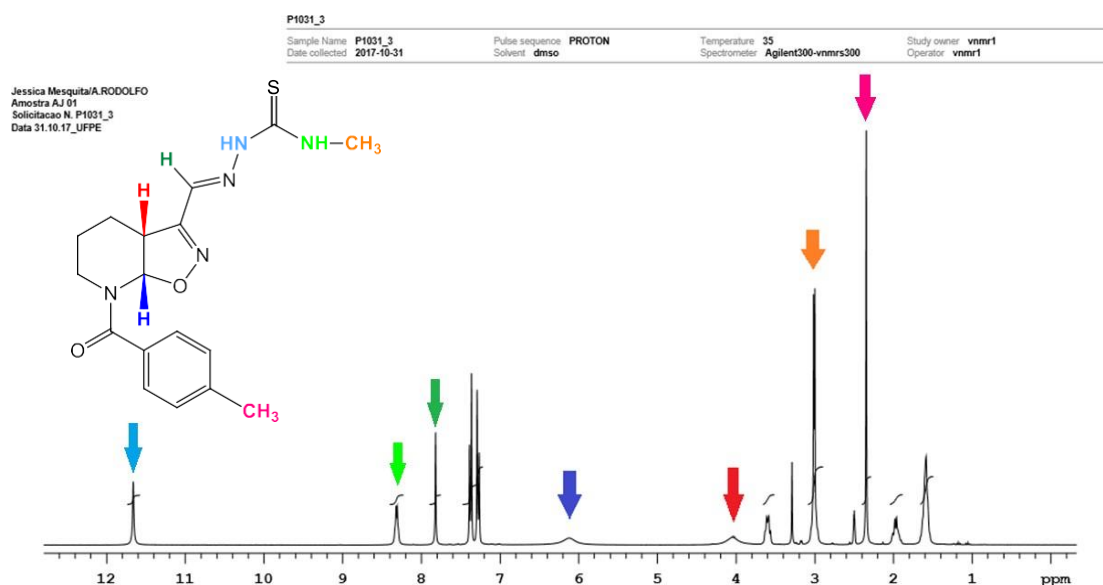


Figura 38 - Espectro de RMN de ^1H da tiossemicarbazona isoxazolílica **33a**

RMN de ^{13}C

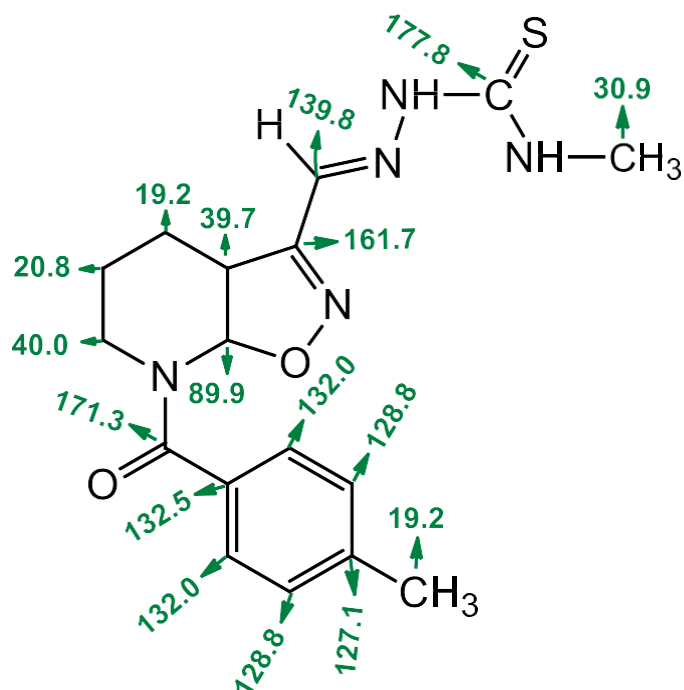


Figura 39 - Dados espectrométricos de RMN de ^{13}C da tiossemicarbazona isoxazolinica **33a**.

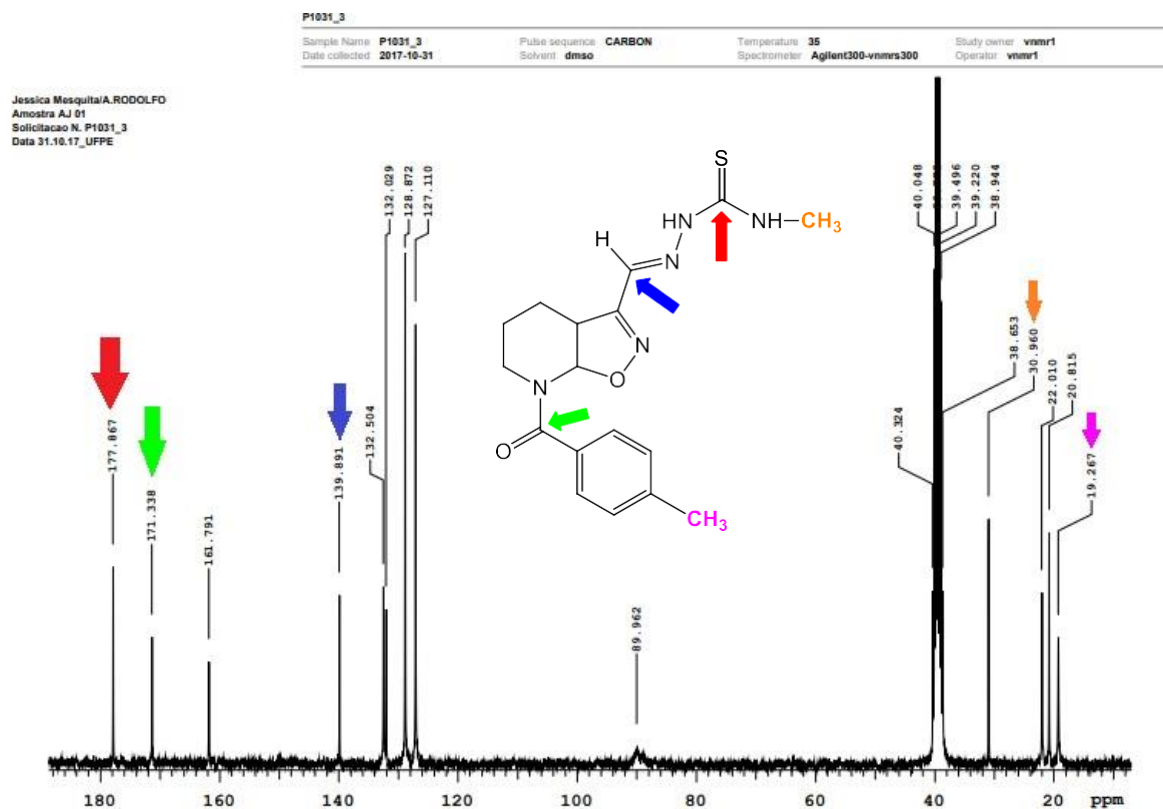


Figura 40 - Espectro de RMN de ^{13}C da tiossemicarbazona isoxazolinica **33a**

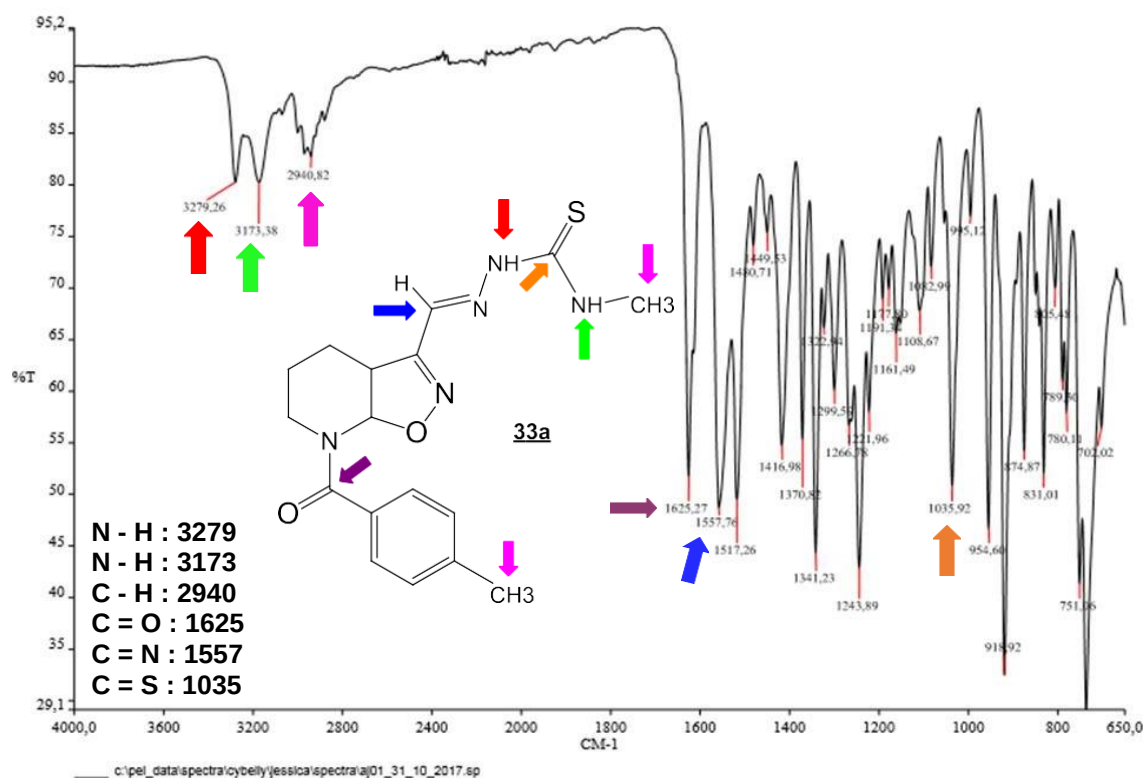


Figura 41 – Espectro ilustrativo de IV-FT da inédita tiossemicarbazona isoxazolílica **33a**.

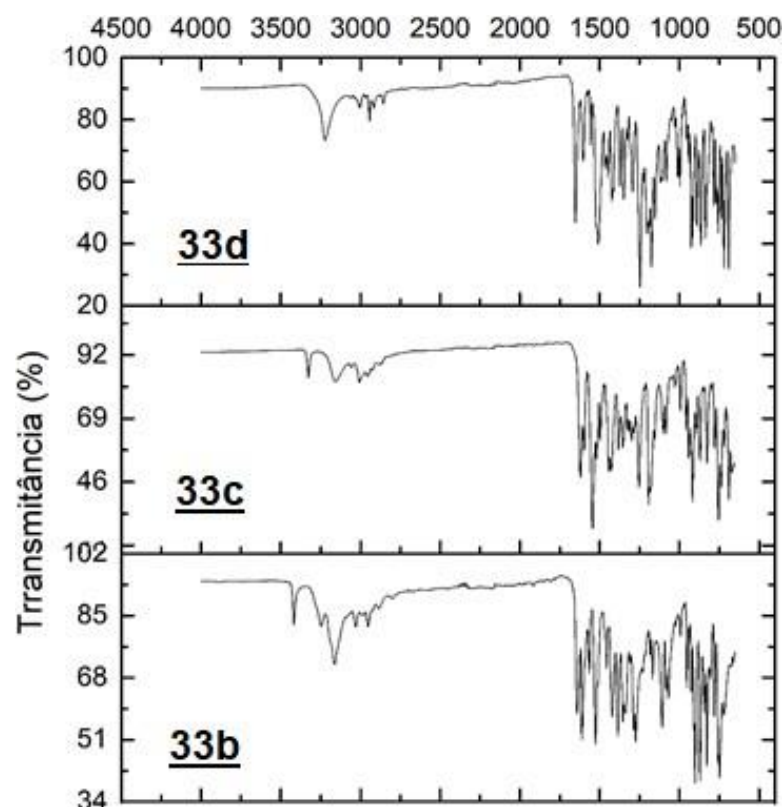


Figura 42 – Espectro ilustrativo de IV-FT das inéditas tiossemicarbazonas isoxazolílicas **33b**, **33c**, **33d**.

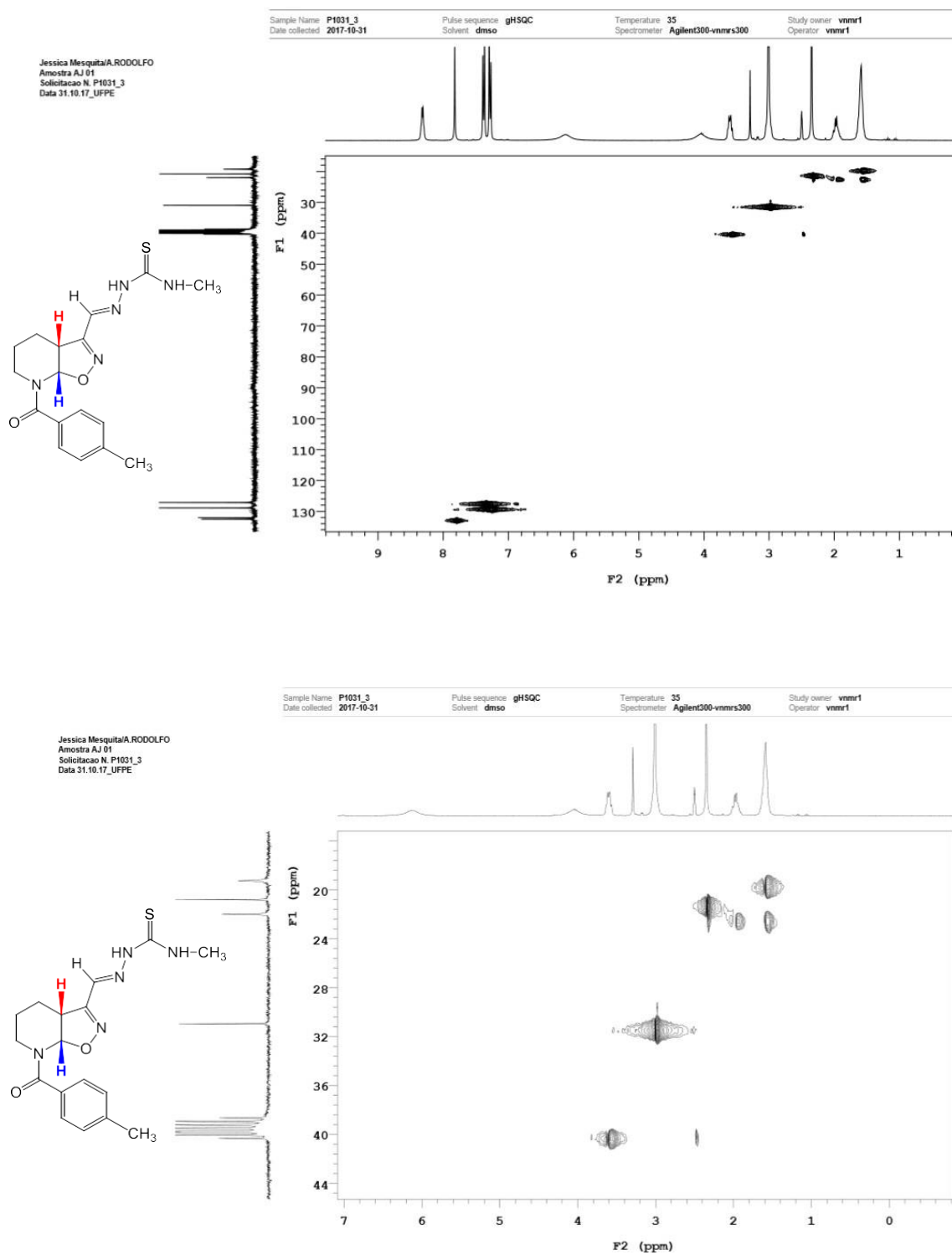


Figura 43 – Espectros de RMN por correlação HSQC, **33a**

5 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

5.1 MATERIAIS E MÉTODOS

Para a síntese das enamidas endocíclicas de 6 membros **29** e dos cicloadutos isoxazolínicos **30**, todas as vidrarias foram secas em estufa a 120 °C por 5 h, visto que se trata de reações anidras pois as moléculas sintetizadas são sensíveis à umidade, devido a esta particularidade, toda reação foi feita sob atmosfera de argônio e todos os solventes utilizados foram tratados e destilados antes do uso.

A trietilamina (TEA) foi tratada com hidreto de cálcio e destilada no dia da reação, o tetrahidrofurano (THF) foi tratado com sódio metálico e benzofenona (indicador) e destilado antes do uso, o etanol utilizado para síntese do trímero da 1-piperideína **28a** foi tratado com Mg/I_2 e destilado no dia do procedimento, o acetato de etila e hexano utilizados nas cromatografias em camada delgada (CCD) e nas cromatografias em coluna *flash* foram destilados e armazenados em frascos de vidro âmbar. As análises através da CCD foram feitas em cromatofolhas de alumínio (gel de sílica 60), contendo indicador para 254 nm. A visualização das manchas foi realizada com lâmpada U.V. λ 254 nm e adsorção do iodo, ou ácido fosfomolibdico (solução 7 % em etanol).

As colunas cromatográficas foram empacotadas com gel de sílica 60 (230 – 400 mesh) e eluidas sob pressão (Flash), ressaltando que os produtos puros com aspecto sólido tiveram seus pontos de fusão aferidos no aparelho FISATON® 431D.

As centrifugações foram realizadas por um Centrifugador Excelsa 2, 205N de 7 rotações – Fanem LTDA. Os produtos sólidos tiveram seu ponto de fusão aferidos em aparelho POLAX WRS – 1.

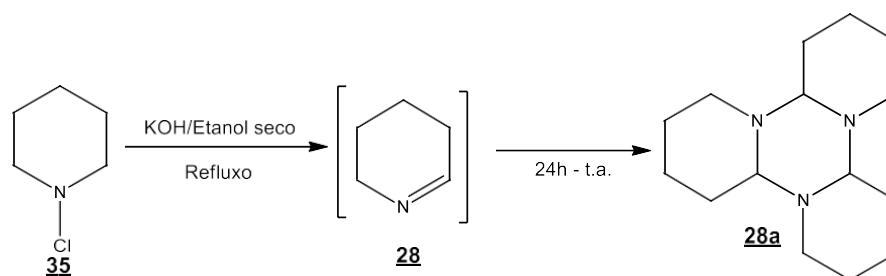
Os espectros de absorção na região do infravermelho foram obtidos utilizando-se o equipamento PerkinElmer® (Spectrum 400), com dispositivo de reflectância total atenuada (ATR) com cristal de Seleneto de Zinco e em aparelhos Bruker IFS 66 (transformada de Fourier), utilizando-se pastilhas ou janelas de KBr. As frequências foram expressas em cm^{-1} .

Os espectros de massas de alta resolução foram obtidos em aparelho Shimadzu LCMS IT/TOF, bomba LC 20AD, Injetor SIL-20 A, tendo como fonte de ionização elétron spray (ESI).

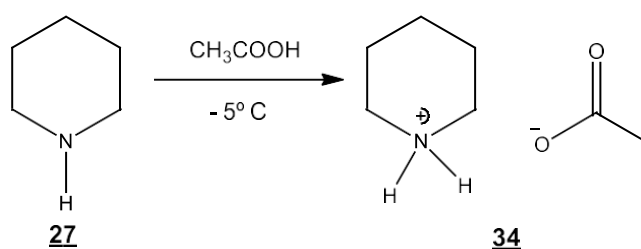
Os espectros de RMN de 1H e ^{13}C foram obtidos nos equipamentos da Varian Unity® 300MHz e Varian Unmrs® 400MHz, que ficam localizados na Central analítica

do Departamento de Química Fundamental (DQF). Os deslocamentos químicos foram expressos em ppm, ressaltando que o padrão interno utilizado para análise de RMN de ^1H é o tetrametilsilano. Os solventes utilizados para as análises de RMN foram o $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$ e o DMSO-d_6 . Os sinais dos espectros de RMN ^1H são designados da seguinte forma: deslocamento químico (ppm), multiplicidade (s = singleto, d = dubleto, dl = dubleto largo, t = tripleto, tl = tripleto largo, q = quarteto, dd = duplo dubleto, dt = duplo tripleto, ddl = duplo dubleto largo, m = multipletto, ml = multipletto largo, sl = sinal largo), constante de acoplamento (Hz) e números de hidrogênios.

5.2 SÍNTESE DO TRÍMERO DA 1-PIPERIDEÍNA 28a



5.2.1 Preparação do acetato de piperidínio 34



Em um balão de 250 mL foram colocados 5 mL de piperidina 27 (51,95 mmol), o meio reacional foi resfriado a -5°C com banho de gelo/ NH_4Cl e agitação constante. Sob forte agitação e sem ultrapassar a temperatura de 0°C , foi adicionado lentamente 2,92 mL (51,95 mmol) de ácido acético glacial, através da pipeta graduada. Periodicamente foi colocado algumas lascas de gelo no meio reacional, sob agitação vigorosa, para completa solubilização do sal formado. Ao término do procedimento foi obtida uma solução aquosa límpida e viscosa, correspondendo ao acetato de piperidínio 34.

5.2.2 Preparação da solução de hipoclorito de cálcio

Foram pesados 61,01 g de hipoclorito de cálcio à 65 % e adicionados a 250 mL de água contidos em um erlenmeyer, este foi envolvido em papel alumínio, para evitar a degradação do hipoclorito pela luz. A solução passou 12 h sob agitação para completa solubilização do mesmo.

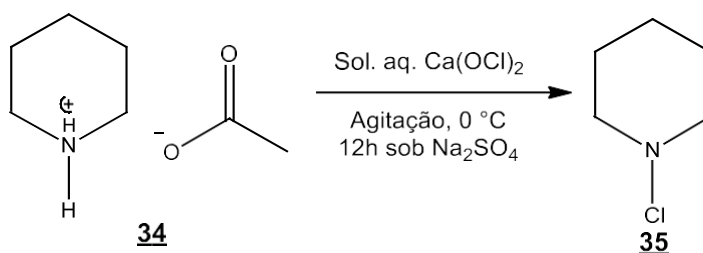
No dia posterior, a solução foi filtrada à vácuo utilizando funil de vidro sinterizado e uma pequena camada de celite, obtendo uma solução límpida de cor levemente amarelada (~150 mL). Esta posteriormente foi submetida à titulação iodométrica para determinação da concentração do hipoclorito de cálcio.

5.2.3 Titulação do hipoclorito de cálcio

Foi adicionado no erlenmeyer 25 mL da solução aquosa à 4% (m/v) de KI, 15 mL da solução aquosa de H_2SO_4 10 % (v/v) e 1 mL da solução de hipoclorito de cálcio respectivamente. A mistura possui coloração vermelho escuro devido à redução do iodeto a iodo (I_2) pelo hipoclorito.

Iniciada a titulação, foi observado que a descoloração da solução ocorre lentamente, isso se dá devido à oxidação do iodo a iodeto pela ação do tiosulfato de sódio 0.1 M, nessa titulação foi gasto 34 mL do agente titulante. Quando a solução atingiu uma cor laranja claro foi adicionado o amido (previamente solubilizado em água, apenas algumas gotas foram utilizadas) e a solução adquiriu uma coloração azul, devido à interação iodo/amido. A titulação foi continuada cujo ponto de virada foi observado quando a coloração passou de azul para incolor. A concentração final do hipoclorito de cálcio nessa titulação foi de 0,85 M.

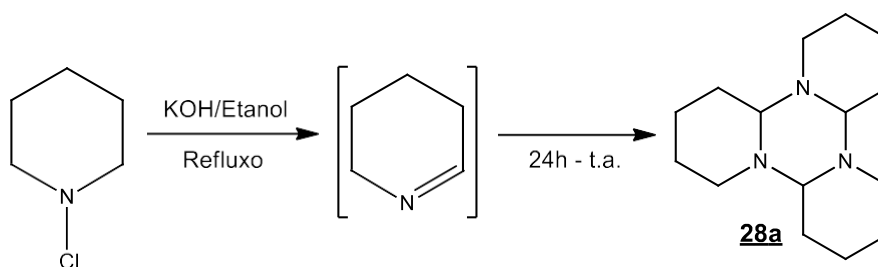
5.2.4 Obtenção da *N*-cloropiperidina **35**



Em um balão foram colocados 69 mL de uma solução 0,85 M de hipoclorito de cálcio (58,44 mmol de $\text{Ca}(\text{OCl})_2$). Em seguida a solução foi resfriada em banho de gelo; sob forte agitação sempre mantendo a temperatura abaixo de 0 °C. A solução de acetato de piperidínio **34**, preparada anteriormente, foi adicionada lentamente via funil de adição, durante 1 h. A solução resultante permaneceu em agitação por 15 min.

Com a adição do acetato de piperidínio **34** na reação ocorre à formação do *N*-cloropiperidina **35** que não é solúvel em água, devido a esta particularidade foi observado à turvação do meio. Em seguida, foi realizada a extração da solução amarela com éter etílico, realizando três lavagens consecutivas de 30 mL. O extrato etéreo foi seco durante a noite com sulfato de sódio anidro e armazenado em geladeira. Concentrou-se o extrato etéreo seco em banho de água (~50 °C) nunca ultrapassando 65 °C. A solução etérea concentrada com volume final aproximado de 50mL foi utilizada na reação subsequente.

5.2.5 Obtenção do trímero da 1-piperideína **28a**



Em um balão de duas bocas, equipado com funil de adição com equalizador de pressão e condensador de refluxo, foram colocados 6,558 g (116,8 mmol) de KOH e 29 mL de etanol seco. Após completa dissolução do KOH em etanol, sob refluxo, foi adicionado lentamente via funil de adição, durante 1:30 h a solução concentrada de *N*-cloropiperidina **35** preparada anteriormente, mantendo sempre a agitação magnética vigorosa. Após o término da adição, a suspensão resultante (amarelo/alaranjada) foi deixada em agitação por mais 1:30h sob refluxo e em seguida sob agitação vigorosa a temperatura ambiente durante 24 h.

No dia seguinte, o KCl foi filtrado em funil de vidro sinterizado e o precipitado foi lavado com etanol. O etanol foi removido em evaporador rotatório, obtendo um líquido oleoso de cor castanha. Para evitar que houvesse perdas do produto, o KCl foi

solubilizado em 60 mL de água e foi extraído com éter etílico (3 x 15 mL). A fase etérea foi seca sob Na₂SO₄.

Posteriormente foi juntado a fase etérea e a aquosa para realização da extração com éter etílico (3 x 15 mL). Em seguida a fase etérea foi seca com sulfato de sódio anidro e após filtração o solvente foi evaporado, onde foi obtido um líquido oleoso de cor castanha que foi solubilizado em 1 mL de acetona. A cristalização foi efetuada à -18 °C (freezer). Os cristais obtidos, ainda congelados, foram lavados com acetona resfriada (abaixo de -20°), após consecutivas lavagens o trímero da 1-piperideína **28a** foi armazenado em frasco âmbar e seco no auto-vácuo. Após este procedimento foi verificado o ponto de fusão (58 - 62 °C), confirmando a formação do produto. Foi obtido 1,42 g de trímero, correspondendo ao rendimento de 38 %.

PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DE **28a**

- Cristais Amarelos
- Ponto de fusão 58 °C – 62 °C (conforme literatura)

DADOS ESPECTROMÉTRICOS DE **28a**

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ, t.a

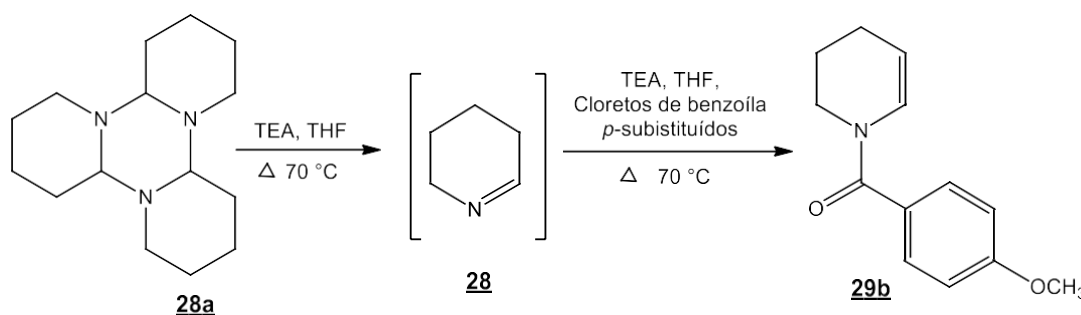
1,28 (m, 3 H); 1,56 (m, 6 H); 1,71 (m, 9H); 2,03 (m, 3 H); 2,79 (dd; 3 H); 3,12 (m, 3 H).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ, t.a

82,0 (CH); 46,4 (CH₂); 29,2 (CH₂); 25,8 (CH₂); 22,3 (CH₂)

5.3 SÍNTESE DAS ENAMIDAS ENDOCÍCLICAS DE SEIS MEMBROS **29**

5.3.1 Síntese da *N*-(4-metoxibenzoil)-2-piperideína **29b**



Em um balão de duas bocas de 100 mL foi adicionado o trímero da 1-piperideína **28a** (1,0281 g; 4,11 mmol), THF (46 mL) e trietilamina (1,15 mL; 8,22 mmol). A esta solução sob refluxo foi adicionado lentamente, com seringa e agulha, o cloreto de *p*-OCH₃ benzoíla **36b** (1,18 mL; 8,27 mmol). Ao término da adição a reação permaneceu em refluxo por mais 3h sendo acompanhada por CCD.

A solução resultante foi filtrada em funil de vidro sinterizado e levada ao rota evaporador para remoção completa do solvente.

O produto foi submetido à cromatografia em coluna “flash” (gel de sílica), acetato/hexano (1:4). Após realização do procedimento de purificação foi obtido um óleo incolor contendo 1,0669 g da enamida *p*-OCH₃ **29b**, correspondendo ao rendimento de 58 %

PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DA ENAMIDA *p*-OCH₃ **29b**

- Óleo incolor
- R_f = 0,47 (AcOEt/hexano 1:1)

DADOS ESPECTROMÉTRICOS DE **29b**

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

1,93 (sl, 2H); 2,11 (m, 2H); 3,80 (sl, 2H); 3,82 (s, 3H); 4,84 e 5,17 (sl, 1H, rotâmeros); 6,52 (sl, 1H); 6,90 (dl, J = 8,7 Hz, 2H); 7,47 (dl, J = 8,7 Hz, 2H).

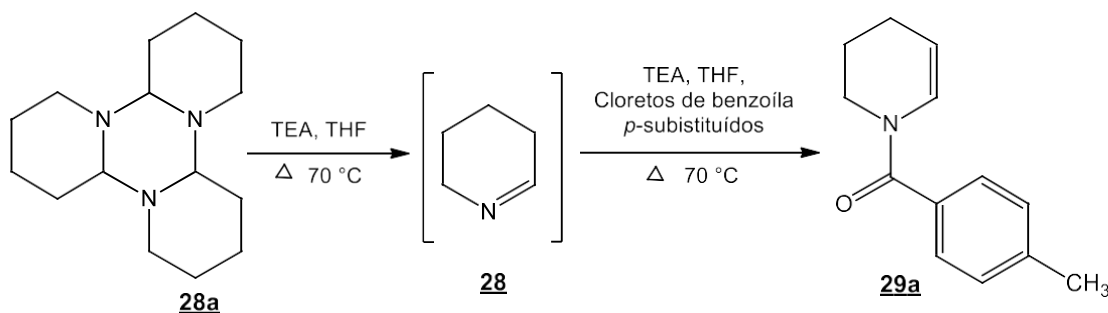
RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ, t.a

21.9 (CH₂); 21.8 (CH₂); 41.2 (CH₂); 55.3 (CH₃); 107.2 (CH); 113.5 (CH); 127.1 (CH); 127.9 (C); 130.3 (CH); 161.1 (C); 169.0 (C=O).

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

3.080, 3.000, 2.930, 2.830, 1.629, 1.510, 1.407, 1.375, 1.253, 1.175, 1.029, 992, 842, 760, 720, 586.

5.3.2 Síntese da *N*-(4-toluilbenzoil)-2-piperideína **29a**



O procedimento desta síntese é semelhante ao (5.3.1). Onde foi utilizado o trímero da 1-piperideína **28a** (1,0032 g; 4,02 mmol), THF (45 mL), trietilamina (1,12 mL; 8,04 mmol), e por fim o cloreto de *p*-toluil benzoíla **36a** (1,15 mL; 8,24 mmol). O processo de purificação foi semelhante ao procedimento (5.3.1), onde o produto foi submetido à cromatografia em coluna “flash” (gel de sílica), acetato/hexano (1:4). Após realização do procedimento de purificação foi obtido um sólido branco em forma de cristal, sendo obtidos 1,8675 g da enamida **29a**, correspondendo ao rendimento de 99%.

PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DA ENAMIDA *p*-CH₃ **29a**

- Cristais brancos
- Ponto de fusão: 41,4 °C – 43 °C
- R_f = 0,60 (AcOEt/hexano 1:1)

DADOS ESPECTROMÉTRICOS DE **29a**

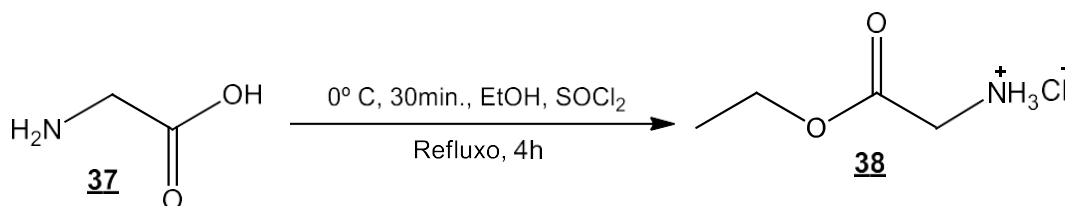
RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ , t.a, presença de rotâmeros.

1,92 (sl, 2H); 2,10 (m, 2H); 2,36 (s, 3H); 3,79 (sl, 2H); 4,81 (sl, 1H); 6,45 (sl, 1H); 7,17 (dl, J = 8,1 Hz, 2H); 7,35 (dl, J = 8,1 Hz, 2H).

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ , t.a

21.3 (CH₃); 21.6 (CH₂); 21.8 (CH₂); 41.0 (CH₂); 107.0 (CH); 127.6 (CH); 128.2 (CH); 128.8 (CH); 128.9 (CH₂); 140.2 (C=O).

5.4 SÍNTESE DO CLORIDRATO DA GLICINA ESTERIFICADA 38

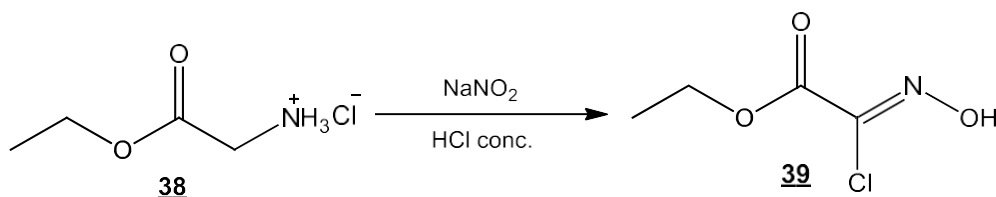


Em um balão de fundo redondo de 500 mL, arrefecido em banho de gelo e equipado com agitação magnética, foi colocado 200 mL de etanol P.A. e com uma pipeta graduada foi adicionado lentamente ao meio reacional o cloreto de tionila [SOCl₂] (9,65 mL; 133 mmol). Em seguida a glicina 37 (10 g; 133 mmol) foi adicionada, após término da adição o banho de gelo foi retirado e a mistura submetida à refluxo por 4 h, sendo importante destacar que a faixa de temperatura para completa solubilização da glicina está entre 74 °C e 78 °C. Após remoção do etanol a glicina esterificada 38 foi lavada consecutivas vezes com éter etílico, por meio da filtração em funil de vidro sinterizado. Esse processo foi utilizado com o propósito de retirar todas as impurezas oriundas da glicina esterificada. O produto obtido foi 18,29 g cujo rendimento foi de 98 %

PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DA GLICINA ESTERIFICADA 38

- Sólido branco amorfo
- Faixa de fusão: 145 °C a 146 °C, conforme literatura.

5.5 SÍNTESE DO CLOROOXIMIDOACETATO DE ETILA 39, PRECURSOR DO N-ÓXIDO DE NITRILA – CEFNO 40



Em um balão de fundo redondo de 250 mL foi pesada a glicina esterificada **38** (18,29 g; 131,03 mmol) que foi solubilizada em 30 mL de água destilada. Foi adicionado HCl conc. (11,33 mL; 369,79 mmol) e uma solução aquosa de NaNO₂ (9,145 g; 132,54 mmol / H₂O = 15,3 mL). Após término da adição, nas mesmas condições descritas anteriormente, foi adicionado mais um equivalente de HCl conc. e de NaNO₂. A adição destes é feita a 0 °C.

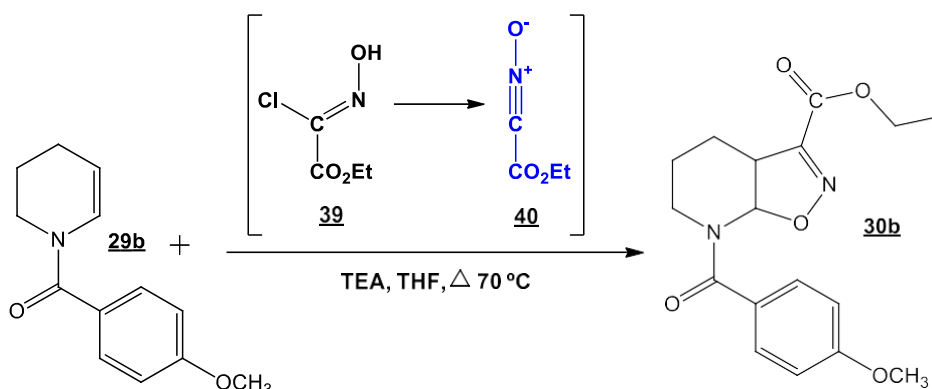
Com o término do segundo equivalente de NaNO₂, a mistura reacional permaneceu em agitação durante 20 min, posteriormente foi realizada a extração com diclorometano (6 x 35 mL), ao término da extração o produto foi seco com Na₂SO₄ anidro. Após total evaporação do solvente foi adicionado hexano gelado, onde foi observado a precipitação do produto, por fim este foi filtrado em funil de vidro sinterizado e armazenado em frasco de vidro âmbar. Obteve-se 11,9485 g do precursor cujo rendimento foi de 65 %.

PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DO CLOROOXIMIDOACETATO DE ETILA **39**

- Sólido branco cristalino
- Faixa de fusão: 75 °C a 80 °C, conforme literatura.

5.6 CICLOADIÇÃO 1,3-DIPOLAR DAS ENAMIDAS ENDOCÍCLICAS **29** COM O CLOROOXIMIDOACETATO DE ETILA **39**

5.6.1 Síntese do éster 7-(4-metoxibenzoila)-3a,4,5,6,7,7a-hexahidroisoxazolo [5,4-b]piridina-3-carboxilato de etila **30b**



Em um balão de duas bocas de 100 mL, foi adicionada a enamida *p*-OCH₃ **30b** (1,0669 g; 4,91 mmol), THF (10 mL) e a trietilamina (1,06 mL; 7,61 mmol). A esta solução sob refluxo, foi adicionada lentamente com seringa e agulha, a solução de clorooximidoacetato de etila **39** (1,04 g; 6,91 mmol / 3 mL de THF). Após terminada a adição, mais um equivalente de trietilamina e de precursor **39** foram adicionados nas mesmas condições descritas anteriormente. Ao término da adição, a reação permaneceu por mais 20 min sob refluxo quando a CCD confirmou a formação do produto. O sal formado (cloreto de trietilamônio) foi filtrado e o solvente foi removido por meio do evaporador rotatório. O produto foi submetido à cromatografia em coluna “flash” (gel de sílica), acetato/hexano (3:7) após realização do procedimento de purificação foi obtido um óleo incolor contendo 0,4385 g do cicloaduto *p*-OCH₃ **30b**, correspondendo a um rendimento de 30 %.

PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DO CICLOADUTO *p*-OCH₃ **30b**

- Óleo incolor
- RF= 0,5 (AcOEt/hexano 1:1)

DADOS ESPECTROMÉTRICOS DE **30b**

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ, t.a

1,36 (t, J = 7,2 Hz, 3H); 1,68 a 1,93 (m, 4H); 3,21 (m, 1H); 3,36 (m, 1H); 3,82 (s, 3H); 4,34 (m, 3H); 6,33 (sl, 1H); 6,92 (dl, J = 9 Hz, 2H); 7,50 (dl, J = 9,0 Hz, 2H).

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ, t.a

14,0 (CH₃); 18,9 (CH₂); 21,7 (CH₂); 39,5 (CH₂); 41,3 (CH); 55,3 (CH₃); 62,1 (CH₂); 91,6 (CH); 113,8 (CH); 126,4 (C); 129,7 (CH); 155,9 (C); 160,0 (C); 161,4 (C=O).

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

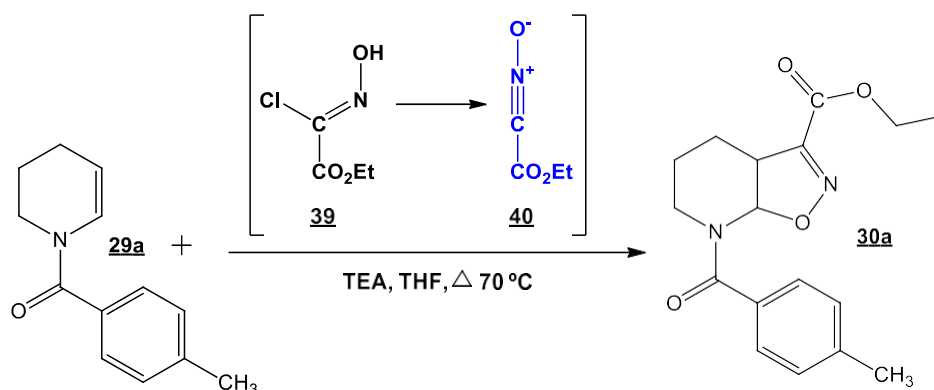
2.958, 1.722, 1.651, 1.606, 1.417, 1.344, 1.251, 1.176, 1.129, 1.024, 921, 843, 763.

E.M – Alta Resolução (m/z). Calculado 332.13722, encontrado 332.12713.

Principais sinais.

77.02489, 107.03699, 135.03258 (100%), 217.09206, 332.12713 (M⁺).

5.6.2 Síntese do éster 7-(4-metilbenzoila)-3a,4,5,6,7,7a-hexahidroisoxazolo [5,4-b]piridina-3-carboxilato de etila **30a**



O procedimento desta síntese é semelhante ao (5.6.1). Foi utilizada a enamida *p*-CH₃ **29a** (1,8675 g; 9,34 mmol), THF (30 mL), trietilamina (2,42 mL; 17,34 mmol) e clorooximidoacetato de etila **39** (2 g; 13,34 mmol). O produto foi submetido à cromatografia em coluna “flash” (gel de sílica), acetato/hexano (3:7). Após realização do procedimento de purificação foi obtido um sólido branco cristalino contendo 1,0305 g do cicloaduto *p*-CH₃ **30a**, correspondendo a um rendimento de 35 %.

PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DO CICLOADUTO *p*-CH₃ **30a**

- Óleo incolor
- RF= 0,58 (AcOEt/hexano 1:1)

DADOS ESPECTROMÉTRICOS DE **30a**

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ, t.a

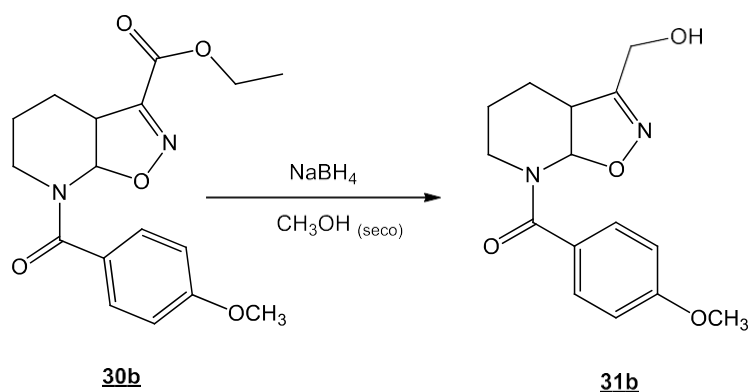
1,34 (t, J = 7,5 Hz, 3H); 1,69 a 1,88 (m, 4H); 2,36 (s, 3H); 3,20 (m, 1H); 4,20 (sl, 1H); 4,31 (m, 3H); 6,28 (sl, 1H); 7,18 (dl, J = 7,8 Hz, 2H); 7,41 (dl, J = 8,4 Hz, 2H).

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ, t.a

13,99 (CH₃); 18,84 (CH₂); 21,31 (CH₃); 21,59 (CH₂); 41,26 (CH); 62,06 (CH₂); 91,0 (CH); 127,55 (CH); 129,0 (CH); 131,4 (C); 140,8 (C); 159,9 (C); 172,3 (C=O).

5.7 SÍNTESE DOS ÁLCOOIS ISOXAZOLÍNICOS 31 (REDUÇÃO DO GRUPAMENTO ÉSTER EM C3)

5.7.1 Síntese do álcool (4-metoxibenzoila)-(3-hidroximetil-3a,4,5,6-tetrahidroisoxazol [5,4-*b*]piridin-7-il-metanona 31b



O éster isoxazolínic **30b** (0,4385 g; 1,32 mmol) foi solubilizado em metanol seco (40 mL). A 0 °C, sob vigorosa agitação, foi adicionado o NaBH₄ (0,20 g; 5,28 mmol). Após completa adição do agente redutor, a solução reacional permaneceu em agitação por aproximadamente uma hora à 0 °C e mais uma hora à t.a. Decorrido este tempo, foi verificado através de CCD o término da reação, sendo importante mencionar que desde a adição do NaBH₄ foi observado a formação do álcool.

Após completo consumo do éster **30b**, todo metanol foi removido e posteriormente foi realizada a extração. Para este procedimento foram utilizados (3 x 10 mL) de acetato de etila e 15 mL de solução aquosa saturada de NaCl. A fase orgânica foi seca sob Na₂SO₄ anidro, e após filtração e remoção do solvente, foi submetido a filtração em coluna “flash” (gel de sílica, AcOEt/Hexano a 2:3). Foi obtido 0,2177 g do álcool *p*-OCH₃ puro **31b**, correspondendo a um rendimento de 54%.

PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DO ÁLCOOL *p*-OCH₃ **31b**

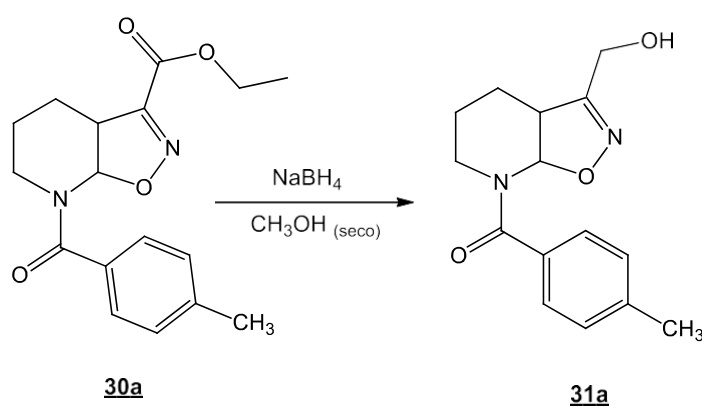
- Sólido branco cristalino
- RF= 0,51 (AcOEt)
- Faixa de fusão: 76 °C – 79 °C

DADOS ESPECTROMÉTRICOS DE **31b**

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

1,71 (m, 4H); 2,90 (sl, 1H); 3,12 (m, 1H); 3,19 (m, 1H); 3,81 (s, 3H); 4,18 (sl, 1H); 4,29 (d; J= 14,4; 1H); 4,37 (d; J= 14,4; 1H); 6,11 (sl, 1H); 6,90 (d; J= 8,4; 2H); 7,52 (d; J= 8,4; 2H); 7,52 (d; J= 8,4; 2H).

5.7.2 Síntese do álcool (4-metilbenzoila)-(3-hidroximetil-3a,4,5,6-tetrahidroisoxazol [5,4-*b*]piridin-7-il-metanona **31a**



O procedimento desta síntese é semelhante ao procedimento (5.7.1). Foi utilizado o éster isoxazolíico **30a** (1,0305 g; 3,25 mmol), metanol seco (98 mL) e NaBH_4 (0,49 g; 13 mmol). Com o término da reação, verificada através da CCD, foi realizada a extração utilizando 25 mL de acetato de etila e 30 mL de solução aquosa saturada de NaCl . O produto bruto foi purificado por filtração em coluna “flash” (gel de sílica, AcOEt/Hexano a 2:3), obtendo 0,6373 g do álcool *p*- CH_3 puro **31a**, correspondendo a um rendimento de 68 %.

PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DO ÁLCOOL *p*- CH_3 **31a**

- Sólido branco cristalino
- RF= 0,56 (AcOEt)
- Faixa de fusão: 105 °C – 108 °C

DADOS ESPECTROMÉTRICOS DE **31a**

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

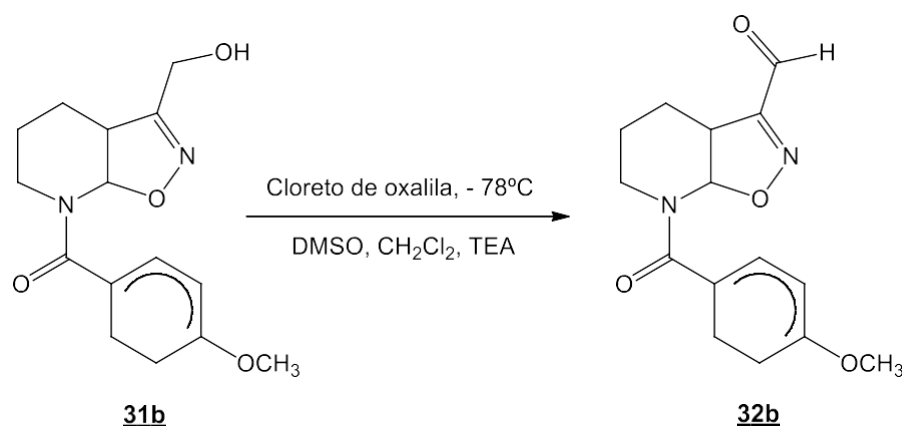
1,68 (m, 4H); 2,34 (s, 3H); 3,15 (m, 2H); 3,19 (sl, 1H); 4,26 (d; J= 14; 2H); 4,30 (d; J= 14,4; 1H); 5,99 (sl, 1H); 7,19 (d; J= 7,6; 2H); 7,41 (d; J= 8; 2H).

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ , t.a

18,85 (CH_3); 20,58 (CH_2); 21,29 (CH_2); 38,33 (CH); 42,57 (CH_2); 57,1 (CH_2); 89,03 (CH); 127,5 (C); 129,01 (CH); 131,67 (CH); 140,68 (C); 162,74 (C=N); 172,54 (C=O).

5.8 SÍNTESE DOS ALDEÍDOS VIA OXIDAÇÃO DE SWERN **32**

5.8.1 Síntese do aldeído (4-metoxibenzoila)-3a,4,5,6,7,7a-hexahydroisoxazole [5,4-b]píridina carbaldeído **32b**



Em um balão de fundo redondo, com atmosfera de argônio, foi adicionado o cloreto de oxalila **42** (0,08 mL; 0,6221 mmol) previamente solubilizado em diclorometano seco (2 mL). Esta solução, sob agitação vigorosa, foi colocada a uma temperatura de -78°C , através do banho de gelo seco e álcool. Durante toda reação a temperatura foi monitorada por um termômetro químico com escala interna de -80°C a $+3^\circ\text{C}$. Após estabilização da temperatura a -70°C , foi adicionado ao meio reacional o DMSO **41** (0,14 mL; 1,9674 mmol) previamente solubilizado em (0,41 mL) de CH_2Cl_2 seco. Após 2 minutos, foi adicionada lentamente, durante 5 minutos, a solução do álcool isoxazolinico *p*- OCH_3 **31b** (0,184 g; 0,6338 mmol), com o término da adição do álcool **31b** a solução reacional foi deixada sob agitação por 15 minutos adicionais. Em seguida, foi adicionada ao meio reacional a trietilamina (0,45 mL;

3,2009 mmol), deixando o meio sob agitação por 5 min adicionais. Foi verificado por CCD o término da reação.

Foi realizada uma extração utilizando CH_2Cl_2 (3 x 15 mL) e água (10 mL). A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro. Foi realizada a purificação do produto bruto por meio da cromatografia em coluna “flash” (gel de sílica, AcOEt/Hexano a 3 : 7), obtendo-se 0,156 g do aldeído puro **32b**, com um rendimento de 85 %.

PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DO *p*-METOXIBENZALDEÍDO **32b**

- Sólido branco cristalino
- RF= 0,48 (AcOEt/hexano 1:1)
- Faixa de fusão: 97,5 °C – 100,5 °C

DADOS ESPECTROMÉTRICOS DE **32b**

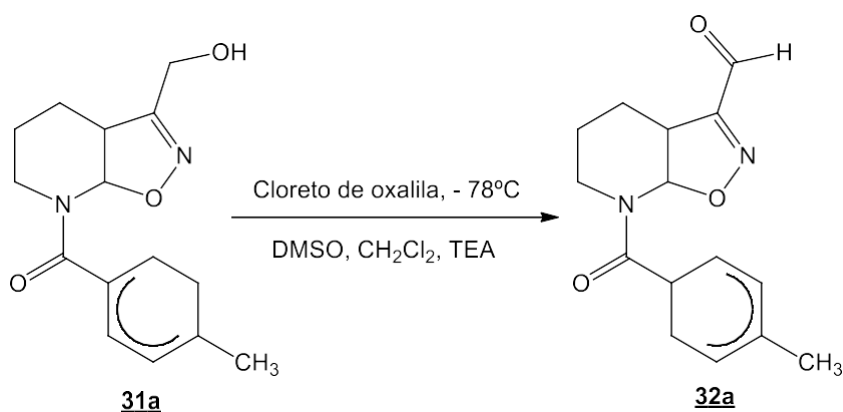
RMN de ^1H (300 MHz; CDCl_3 ; ppm; J (Hz)) δ , t.a.

1,55–1,95 (m, 4H); 3,22 (m, 1H); 3,39 (m, 1H); 3,84 (s, 3H); 4,12 (sl; 1H); 6,42 (sl 1H); 6,93 (d; J= 8,7; 2H); 7,55 (d; J= 8,4; 2H); 9,83 (s, 1H).

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

18,6 (CH_2); 20,8 (CH_2); 39,0 (CH); 40,0 (CH_2); 55,4 (CH_3); 92,3 (CH); 113,8 (CH); 126,3 (C); 129,7 (CH); 161,5 (C=N); 162,6 (C–O); 172,2 (C=O); 185,7 (CHO).

5.8.2 Síntese do aldeído (4-metilbenzoila)-3a,4,5,6,7,7a-hexahydroisoxazole [5,4-b]piridina carbaldeído **32a**



O procedimento é semelhante ao (5.8.1). Os reagentes utilizados foram o cloreto de oxalila **42** (0,28 mL; 3,2675 mmol) previamente solubilizado em diclorometano seco (6 mL); DMSO **41** (0,34 mL; 4,2216 mmol) solubilizado em (0,92 mL) de CH₂Cl₂ seco, álcool *p*-toluol **31a** (0,583 g; 2,14 mmol) e a trietilamina (1,53 mL; 10,91 mmol). O término da reação foi verificado por meio da CCD.

O processo de extração foi semelhante ao (5.8.1). Foi utilizado CH₂Cl₂ (3 x 25 mL) e água (20 mL). A purificação do produto bruto foi feita por meio da cromatografia em coluna “flash” (gel de sílica, AcOEt/Hexano a 3:7), obteve-se 0,4863 g do aldeído **32a** puro, com um rendimento de 83 %.

PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DO *p*-TOLUILBENZALDEÍDO **32a**

- Sólido branco cristalino
- RF= 0,56 (AcOEt/hexano 1:1)
- Faixa de fusão: 113,9 °C – 117,1 °C

DADOS ESPECTROMÉTRICOS DE **32a**

RMN de ¹H (400 MHz; CDCl₃; ppm; J (Hz)) δ, t.a.

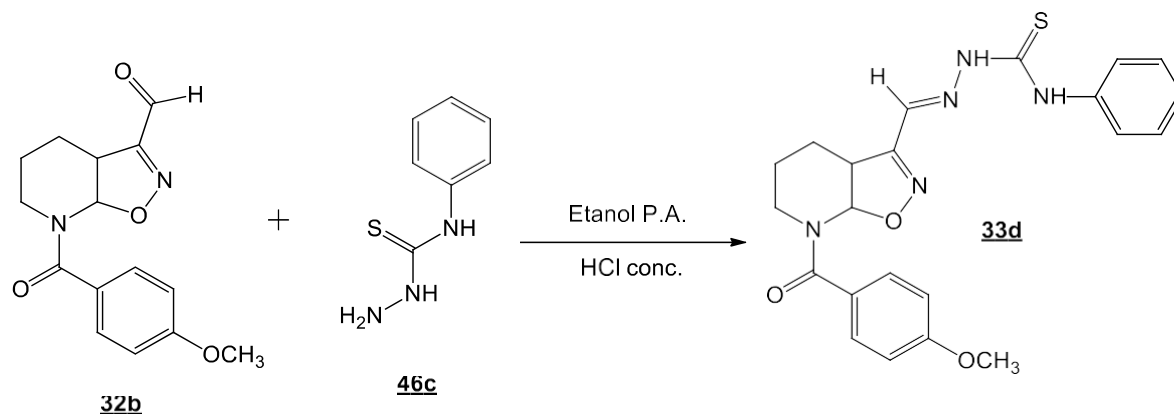
1,53–1,79 (m, 4H); 2,31 (s, 3H); 3,16 (m, 1H); 3,31 (sl, 1H); 4,07 (sl, 1H); 6,27 (sl 1H); 7,17 (d; J= 7,6; 2H); 7,38 (d; J= 8; 2H); 9,75 (s, 1H).

RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃; ppm; J (Hz)) δ, t.a.

18,58 (CH₃); 20,73 (CH₂); 21,63 (CH₂); 39,03 (CH; CH₂); 92,97 (CH); 127,56 (C); 127,5 (C); 129,17 (CH); 131,45 (CH); 140,94 (C); 162,46 (C=N); 172,45 (C=O); 185,61 (H-C=O).

5.9 CONDENSAÇÃO DOS ALDEÍDOS ISOXAZOLÍNICOS **32** COM DIFERENTES TIOSSEMICARBAZIDAS **46**.

5.9.1 Síntese da tiossemicarbazona (4-metoxibenzoila) -**3a,4,5,6,7,7a-hexahydroisoxazole[5,4-*b*]piridin-3-il-metileno-N-fenilhidrazinacarbotoamida **33d****



A um balão foi adicionado o *p*-metoxibenzaldeído **32b** (0,1522 g; 0,5279 mmol) e solubilizado em 6 mL de etanol P.A. Sob agitação, a 4-feniltiossemicarbazida **46c** (0,09 g; 0,5386 mmol) foi adicionada, observa-se mudança na coloração do meio, de levemente branco para levemente amarelo. Em seguida 1 gota de HCl conc. foi adicionada, observando-se completa dissolução do meio e intensa coloração amarela.

Transcorridos 30 min, o meio ainda permaneceu translúcido, sendo que após 1 h e 05 min, o meio começa a turvar. No entanto, havia ainda muito aldeído no meio (por CCD). Após 2 h e 30 min observou-se total consumo do aldeído no meio reacional.

Ao término da reação o etanol foi removido e sucessivas lavagens por centrifugação (12 x 5 mL etanol P.A. / metanol P.A.) foram realizadas. Após processo de purificação, foi detectado por meio da CCD impurezas no produto, por esse motivo foram realizadas sucessivas lavagens por filtração (15 x 10 mL etanol P.A. / metanol P.A.). O Solvente foi removido por meio do evaporador rotatório, obtendo-se um sólido levemente amarelo **33d**, (0,120 g), correspondendo a um rendimento de 52 %.

PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DE **33d**

- Sólido amorfo levemente amarelado
- RF= 0,51 (AcOEt / hexano 3 : 2)
- Faixa de fusão: 207 °C – 208 °C

DADOS ESPECTROMÉTRICOS DE **33d**

RMN de ^1H (300 MHz; DMSO- D_6 ; ppm; J (Hz)) δ , t.a.

1,61 (m, 3H); 2,03 (m, 1H); 3,02 (m, 1H); 3,71 (m, 1H); 3,80 (s, 3H); 4,04 (sl, 1H); 6,21 (sl, 1H); 7,03 (d; J= 8,7; 2H); 7,23 (t; J= 7,5; 1H) 7,48 (t; J= 8,4; 2H); 7,45 (m; 4H); 7,93 (s, 1H); 9,92 (s, 1H); 12,03 (s, 1H).

RMN de ^{13}C (75 MHz; DMSO- D_6 ; ppm; J (Hz)) δ , t.a.

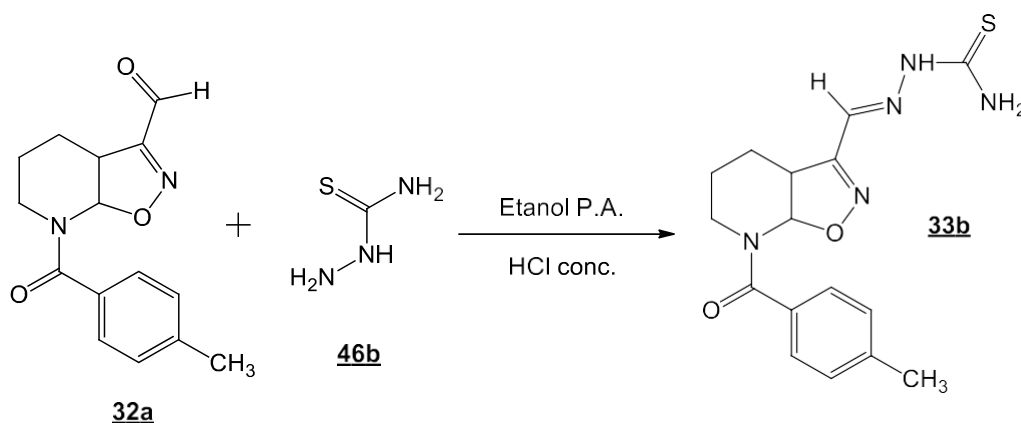
19,3 (CH_2); 22,1 (CH_2); 39,6 (CH); 40,3 (CH_2); 55,2 (CH_3); 90,0 (CH); 113,7 (CH); 125,6 (CH); 125,9 (CH); 126,8 (C); 128,1 (CH); 129,1 (CH); 133,4 (C); 138,6 (C); 160,6 (C); 162 (C); 171,1 (C); 176,5 (C).

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

3222; 3005; 2943; 2914; 2857; 1651; 1602; 1556; 1421; 1174; 939; 736.

HRMS – IT-TOF (electrospray) M^{++1} : 438,1609.

5.9.2 Síntese da tiossemicarbazona (4-metilbenzoila) -**3a,4,5,6,7,7a-hexahidroisoxazole[5,4-*b*]piridin-3-il-metileno-hidrazinacarbotoamida **33b****



O procedimento é semelhante ao (5.9.1). Os reagentes utilizados foram o *p*-toluillbenzaldeído **32a** (0,1523 mg; 0,5592 mmol) previamente solubilizado em (6 mL) de etanol P.A., a tiossemicarbazida **46b** (0,05197 g; 0,5706 mmol) e 1 gota de HCl conc., com 5 minutos após adição do HCl conc. foi verificado a turvação do meio e após 40 minutos foi verificado o completo consumo do aldeído **32a**. O etanol foi removido por meio do evaporador rotatório e a purificação foi semelhante ao (5.9.1). Um sólido branco foi obtido, (0,135 g), correspondendo a um rendimento de 70 %.

PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DE **33b**

- Sólido amorfo branco
- RF= 0,27 (AcOEt/hexano 3:2)
- Faixa de fusão: 228 °C – 232 °C

DADOS ESPECTROMÉTRICOS DE **33b**

RMN de ^1H (300 MHz; DMSO- D_6 ; ppm; J (Hz)) δ , t.a.

1,57 (m, 3H); 1,95 (m, 1H); 2,34 (s, 3H); 3,0 (m, 1H); 3,59 (m, 1H), 4,04 (sl, 1H); 6,09 (sl, 1H); 7,28 (d; J= 7,2; 2H); 7,36 (d; J= 7,2; 2H); 7,81 (s; 2H); 8,41 (s, 1H); 11,63 (s, 1H).

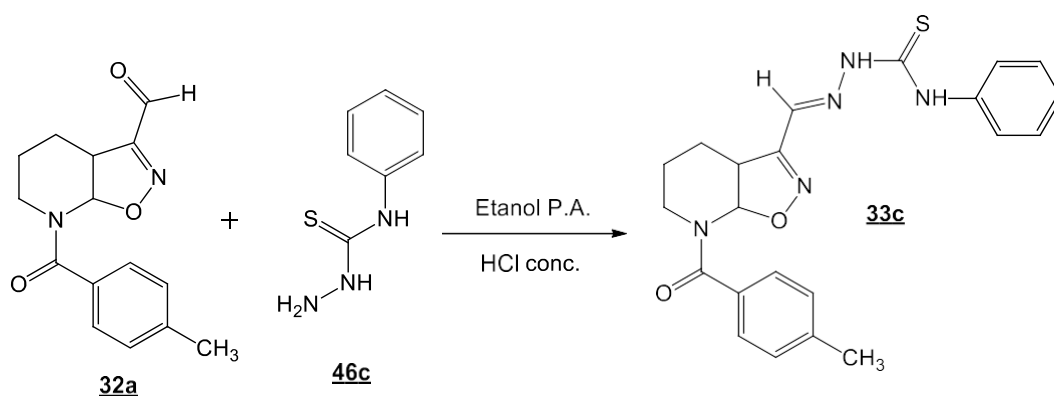
RMN de ^{13}C (75 MHz; DMSO- D_6 ; ppm; J (Hz)) δ , t.a.

19,27 (CH_3); 20,82 (CH_2); 22,05 (CH_2); 39,4 (CH); 40,04 (CH_2); 90,0 (CH); 127,12 (CH); 128,85 (CH); 132,03 (C); 132,93 (CH); 139,89 (C); 161,87 (C); 171,35 (C); 178,4 (C).

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

3417; 3246; 3161; 3029; 2953; 1640; 1610; 1563; 1419; 1168; 1107; 951; 748.

5.9.3 Síntese da tiossemicarbazona (4-metilbenzoila) -3a,4,5,6,7,7a-hexahidroisoxazole[5,4-b]piridin-3-il-metileno-N-fenilhidrazinacarbotioamida **33c**



A um balão foi adicionado a 4-feniltiossemicarbazida **46c** (0,05197 g; 0,5706 mmol), sob vigorosa agitação, adicionou-se 2,5 mL do etanol P.A., em seguida foi

adicionado 2 gotas de HCl conc., observando-se a completa solubilização da tiossemicarbazida. Em seguida, foi adicionado lentamente, o p-toluilbenzaldeído **32a** (0,1523 g; 0,5592 mmol) previamente solubilizado em 5 mL do etanol P.A., observando-se a mudança na coloração do meio, de incolor para amarelo, seguido da turvação do sistema. O término da reação foi verificado através de CCD, o aldeído **32a** foi totalmente consumido após 45 minutos da adição do HCl conc. O etanol foi removido por meio do evaporador rotatório. O processo de purificação foi semelhante ao descrito no item 5.9.1. Foi obtido, (0,1524 g) de **33c**, correspondendo a um rendimento de 62 %.

PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DE **33c**

- Sólido amorfo levemente amarelado
- RF= 0,59 (AcOEt/hexano 3:2)
- Faixa de fusão: 213 °C – 216 °C

DADOS ESPECTROMÉTRICOS DE **33c**

RMN de ^1H (300 MHz; DMSO- D_6 ; ppm; J (Hz) δ , t.a.

1,61 (s, 3H); 2,02 (m, 1H); 2,35 (s, 3H); 3,03 (m, 1H); 3,71 (m, 1H); 4,05 (sl, 1H); 6,14 (sl, 1H); 7,20 – 7,50 (m, 9H); 7,92 (s, 1H); 9,92 (s, 1H); 12,03 (s, 1H).

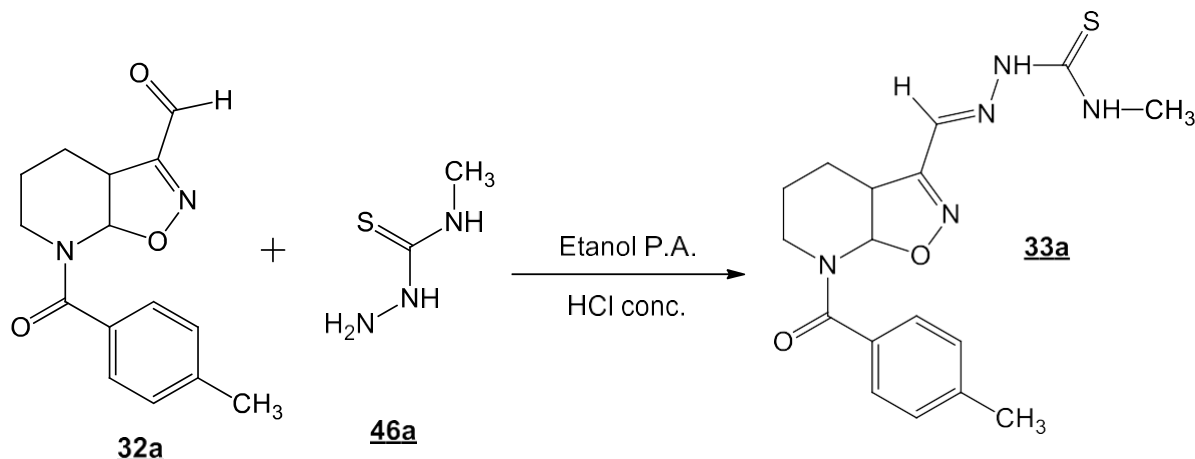
RMN de ^{13}C (75 MHz; DMSO- D_6 ; ppm; J (Hz)) δ , t.a.

19,84 (CH_2); 21,37 (CH_3); 22,65 (CH_2); 39,6 (CH); 40,6 (CH_2); 90,54 (CH); 126,20 (CH); 126,4 (CH); 127,6 (CH); 128,65 (CH); 129,43 (CH); 132,57 (C); 133,89 (C); 139,19 (C); 140,54 (C); 162,5 (C); 171,91 (C); 176,98 (C).

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

3226; 3157; 3006; 1621; 1519; 1426; 1253, 1192; 916; 754.

5.9.4 Síntese da tiossemicarbazona (E)-N-metil-2-((7-(4-metilbenzoila)-3a,4,5,6,7,7a – hexahydroisoxazole[5,4-b]piridin-3-il)metileno) hidrazinacarbotoamida 33a



A síntese desta reação é semelhante ao procedimento (5.9.3). Os reagentes utilizados foram a 4-metil-3-tiossemicarbazida **46a** (0,156 g; 0,5727 mmol) previamente solubilizado em etanol P.A. (2,5 mL), o aldeído *p*-CH₃ (0,1513 g; 0,5556 mmol) e duas gotas de HCl conc. Durante a adição do *p*-toluilbenzaldeído, notou-se a mudança de coloração de incolor para amarelo, após 45 minutos da adição do HCl conc. foi observado o completo consumo do *p*-toluilbenzaldeído. O etanol foi removido por meio do evaporador rotatório e a purificação foi semelhante ao descrito no item 5.9.1. Foi obtido 0,1683 g de **33a**, correspondendo a um rendimento de 84 %.

PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DE 33a

- Sólido amorfo branco
- RF= 0,23 (isopropanol/hexano 1:4)
- Faixa de fusão: 238 °C – 241 °C

DADOS ESPECTROMÉTRICOS DE 33a**RMN de ^1H (300 MHz; DMSO- D_6 ; ppm; J (Hz)) δ , t.a.**

1,58 (m, 3H); 1,98 (m, 1H); 2,34 (s, 3H); 3,0 (s, 4H); 3,58 (m, 1H), 4,04 (sl, 1H); 6,11 (sl, 1H); 7,29 (d; J= 7,8; 2H); 7,36 (d; J= 7,8; 2H); 7,82 (s; 1H); 8,23 (s, 1H); 11,66 (s, 1H).

RMN de ^{13}C (75 MHz; DMSO- D_6 ; ppm; J (Hz)) δ , t.a.

19,27 (CH_3); 20,81 (CH_2); 22,01 (CH_2); 30,9 (CH_3); 39,4 (CH); 40,04 (CH_2); 89,62 (CH); 127,10 (C); 128,87 (CH); 132,02 (CH); 132,50 (C); 139,89 (CH); 161,79 (C); 171,35 (C); 177,4 (C).

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

3279; 3173; 2940; 1625; 1557; 1419; 1341, 1168; 1107; 1035, 918.

6 ATIVIDADES BIOLÓGICAS

6.1 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE

6.1.1 Materiais e Métodos

Os ensaios biológicos foram realizados no Laboratório de Imunogenética do Instituto Aggeu Magalhães – FIOCRUZ – UFPE, coordenados pela Professora Dra. Valéria Pereira Hernandez. Os ensaios foram feitos como sugeridos pela OMS e são testes robustos e de elevada exatidão. Os laboratórios envolvidos apresentam condições de Biossegurança (contenções para NB2) adequadas para execução do trabalho proposto e para trabalho com animais experimentais.

6.1.2 Animais

Foram utilizados camundongos *Mus musculus* das linhagens isogênicas BALB/c e C57Bl/6, machos, com 6-8 semanas de idade, pesando 20 – 30 g e provenientes do biotério de criação do Instituto de Pesquisa Aggeu Magalhães/FIOCRUZ - PE. O protocolo de experimentação animal (processo número 102/2016), utilizado neste trabalho, já foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FIOCRUZ com registro 102/2016.

6.1.3 Obtenção de células esplênicas

Células esplênicas foram obtidas de acordo com Pereira e colaboradores. Após sacrifício do animal em câmara de CO₂, o baço de cada camundongo foi removido em condições assépticas e colocado em tubo Falcon contendo meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) + 1 % de antibiótico. No fluxo vertical, cada baço foi transferido para placa de Petri onde foram macerados utilizando a parte fosca de lâminas de microscopia. As suspensões celulares foram transferidas para tubos Falcon contendo aproximadamente 10mL de meio RPMI + 1 % de antibiótico por baço, centrifugadas a 4 C, 200 x g durante 5 minutos. O sedimento (contendo células) foi ressuspendido em meio RPMI + 1 % de antibiótico + 10 % de soro fetal bovino (SFB). Uma alíquota da

suspensão celular foi corada com azul de trypan para ser quantificada e verificada a viabilidade celular em câmara de Neubauer (PEREIRA, V. R. A, et al., 2001).

6.1.4 Avaliação da atividade tóxica dos compostos em células de camundongos isogênicos

Macrófagos da linhagem Raw 264.7 (10^5 células/ml) foram semeados em placas de 96 poços contendo meio RPMI completo em atmosfera de 5% de CO₂ a 37 °C por 24h. Posteriormente, foram adicionados os compostos em diferentes concentrações (6,25; 12,5; 25; 50; 100; 200 µg/ml), sendo novamente incubados durante 48h. Cada composto foi testado em duplicata. Após esse período, foi adicionado MTT (5 mg/mL em PBS), seguido de nova incubação por 2 h. Foi acrescentado DMSO para dissolução dos cristais de formazan e a absorbância foi lida a 570 nm. O controle negativo da reação foi obtido em poços contendo apenas meio de cultura e células (sem tratamento). Também foi avaliada a atividade da droga de referência benznidazol para atividade antichagásica e a miltafosina na atividade leishmanicida. A partir dos valores de inibição da cultura, foi obtida a CC₅₀ (concentração citotóxica para 50 % das células) de cada composto por regressão linear simples (GraphPad Prism 5.0).

6.2 ATIVIDADE ANTICHAGÁSICA

6.2.1 Cultura de *Trypanosoma cruzi*

6.2.1.1 – Epimastigotas

As culturas de formas epimastigotas DM28c foram crescidas à 28 °C em meio LIT + 1 % de antibiótico + 20 % de SFB. Os repiqueis foram feitos semanalmente.

6.2.1.2 – Tripomastigotas

Após obterem 100% de confluência em cultura, células Vero foram infectadas com 1×10^7 de tripomastigotas (cepa Y) e cultivadas em meio RPMI + 5 % de SFB. Após 7 dias, as células começaram a liberar novos tripomastigotas e novas garrafas de cultura de células Vero foram infectadas.

6.2.2 Avaliação da atividade dos compostos contra *Trypanosoma cruzi*

6.2.2.1 - Frente a epimastigotas

Para determinar o efeito antiproliferativo para formas epimastigotas da cepa DM28c (10^6 parasitas/ml), mantidas em meio LIT + 1 % de antibiótico + 20 % de SFB, foram semeadas em placas de 96 poços a 27 °C, juntamente com diferentes concentrações dos compostos (0,19; 1,56; 6,25; 25; 100 µg/ml) por 96h. Testou-se cada composto em duplicata. O controle negativo da reação foi poços sem tratamento e a droga de referência utilizada como controle positivo foi o benznidazol. Determinou-se a viabilidade parasitária por contagem direta em câmara de Neubauer e, a partir desses valores, obteve-se a IC₅₀ (concentração que inibe o crescimento de 50% de parasitas) por meio de uma regressão linear simples utilizando o “software” Prisma 5.0 Graphpad.

6.2.2.2 - Frente a tripomastigotas

As formas tripomastigotas (cepa Y) foram obtidas a partir da infecção *in vitro* (1×10^7 parasitas) da linhagem de células Vero, após estas obterem confluência em cultura. Para determinar o efeito antiproliferativo para formas tripomastigotas da cepa Y (4×10^6 parasitas/ml), mantidas em meio RPMI + 1 % de antibiótico + 5 % de SFB, foram semeadas em placas de 96 poços a 37 °C, juntamente com diferentes concentrações dos compostos (0,19; 1,56; 6,25; 25; 100 µg/ml) por 24h a atmosfera de 5% de CO₂. Testou-se cada composto em duplicata. Obteve-se como controle negativo da reação poços sem tratamento e a droga de referência utilizada como controle positivo foi o benznidazol. Determinou-se a viabilidade parasitária por contagem direta em câmara de Neubauer e, a partir desses valores, obteve-se a IC₅₀ por meio de uma regressão linear simples utilizando o “software” Prisma 5.0 Graphpad.

6.3 ATIVIDADE LEISHMANICIDA

6.3.1 Cultura de *Leishmania amazonensis* e *Leishmania infantum*

6.3.1.1 – Promastigotas

As formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* (cepa WHOM/00 LTB 0016) e *L. infantum* (cepa MHOM/MA/67/ITMAP-263) foram crescidas a 26 °C em meio Schneider's (Sigma) suplementado com 10 % de soro fetal bovino (meio completo).

6.3.1.2 – Amastigotas

Para avaliação frente a amastigotas, macrófagos RAW 264.7 foram incubados para aderência por 2 h, a 37 °C e atmosfera com 5 % de CO₂. Após essa incubação inicial, foram acrescentadas promastigotas infectivas de *L. amazonensis* ou *L. infantum* na proporção de 8 parasitas / macrófago, por um período de 6 h, a 37 °C e 5 % de CO₂.

6.3.2 Avaliação da atividade dos compostos contra *Leishmania amazonensis* e *Leishmania infantum*

6.3.2.1 - Frente a promastigotas

Formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* (cepa WHOM/00 LTB 0016) e *L. infantum* (cepa MHOM/MA/67/ITMAP-263) foram mantidas a 26 °C em meio Schneider's (Sigma) suplementado com 10 % de soro fetal bovino (meio completo). Parasitas na fase exponencial de crescimento foram utilizados em todos os experimentos.

Para o ensaio de atividade leishmanicida, os parasitas foram contados e diluídas em meio Schneider's (Sigma) completo a 1×10^6 células/mL. Os parasitas foram incubados a 26 °C na presença de diferentes concentrações dos compostos (1,5 a 200 µg / mL) por 72 h. Parasitas incubados apenas com meio de cultura e com Miltefosina foram utilizados como controle negativo e positivo, respectivamente. O

crescimento celular foi avaliado e a IC₅₀ / 72 h foi determinada por análise de regressão. Cada ensaio foi realizado em triplicata.

6.3.2.2 - Frente a amastigotas

Para esta avaliação, macrófagos RAW 264.7 foram distribuídos em placas de 24 poços (3 x 10⁵ células/mL) contendo uma lamínula redonda estéril. Os macrófagos foram incubados para aderência por 2 h, a 37 °C e atmosfera com 5 % de CO₂. Após essa incubação inicial foram acrescentadas promastigotas infectivas de *L. amazonensis* ou *L. infantum* na proporção de 8 parasitas/ macrófago, por um período de 6h, a 37°C e 5% de CO₂. Os parasitas não internalizados foram removidos por lavagem e a cultura foi incubada novamente na presença de diferentes concentrações dos compostos (12,5 a 400 µg / mL) por 24 h, a 37 °C e 5 % de CO₂. A miltefosina foi utilizada como controle positivo, nas mesmas concentrações dos compostos. Após a incubação, as lamínulas contendo a cultura foram lavadas com PBS, coletadas e coradas com kit de coloração Panótico Rápido. A porcentagem de macrófagos infectados, bem como o número de amastigotas/macrófagos foi determinada pela contagem de 100 macrófagos, em duplicata. A atividade leishmanicida dos compostos foi verificada pela diminuição no número de macrófagos infectados e de amastigotas intracelulares nas culturas tratadas em comparação com a cultura controle sem tratamento. Os valores de IC₅₀ foram calculados por análise de regressão utilizando o software GraphPad Prism.

7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1 ATIVIDADE ANTICHAGÁSICA

A atividade dos compostos em macrófagos RAW 264.7 foi avaliada por ensaio de MTT. Todos os compostos testados mostraram maior citotoxicidade em relação ao fármaco padrão utilizado (Benznidazol **2**). Uma particularidade importante dos derivados tiossemicarbazônicos e isoxazolínicos, com relação a citotoxicidade, é que a única diferença entre o composto mais citotóxico **33c** e o menos citotóxico **33d**, em relação ao benznidazol, é apenas o substituinte na porção R₁ (figura 44). Isso possivelmente pode ser explicado devido a presença do heteroátomo no grupamento

p-OCH₃ que modifica a polaridade do mesmo, tornando-o mais polar que o substituinte *p*-CH₃, aumentando assim o poder antiparasitário da molécula.

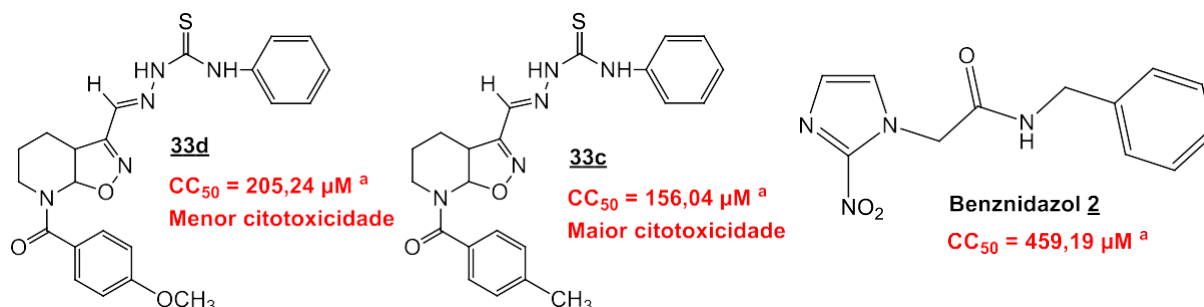


Figura 44 – Derivados tiossemicarbazônicos isoxazolínicos que tiveram a maior e menor citotoxicidade, em relação ao fármaco padrão utilizado (Benznidazol).

Os produtos sintetizados foram ativos contra a forma epimastigota do *T. cruzi*, porém apresentaram concentrações inibitórias acima da droga considerada de escolha benznidazol **2** (tabela 07). A IC₅₀ mais próxima do benznidazol **2** foi a do composto **33c** (**33c** - IC₅₀ = 12,04 μM ; benznidazol **2** - IC₅₀ = 10,52 μM). Apenas a IC₅₀ frente a forma epimastigota do composto **33a** não foi determinada, os dados de atividade para a curva dose-resposta foram adquiridos, mas não foi possível fazer a regressão.

Tabela 07 – Valores de citotoxicidade e IC₅₀ frente a forma epimastigota do *T. cruzi* das tiossemicarbazonas isoxazolínicas

Tiossemicarbazonas isoxazolínicas	Citotoxicidade (CC ₅₀) μM^a	IC ₅₀ epimastigotas μM (cepa DM28c)	Fórmula
33a	186,20	ND	C ₁₇ H ₂₁ N ₅ O ₂ S
33b	163,83	37,12	C ₂₂ H ₂₃ N ₅ O ₂ Sd
33c	156,04	12,04	C ₁₆ H ₁₉ N ₅ O ₂ S
33d	205,24	54,71	C ₂₂ H ₂₃ N ₅ O ₃ S
Benznidazol 2	459,19	10,52	C ₁₂ H ₁₂ N ₄ O ₃

a = citotoxicidade em macrófagos RAW 264.7, MTT foi o método utilizado

Benznidazol = controle utilizado nos ensaios de *Trypanosoma cruzi*

Na avaliação dos compostos contra *T. cruzi* frente a forma tripomastigota, foi verificado que as moléculas finais foram ativas e apresentaram IC₅₀ abaixo do benznidazol **2** (tabela 08). Os derivados híbridos **33c** e **33d**, que tiveram a maior e a menor citotoxicidade respectivamente, possuíram as mais baixas concentrações inibitórias e por consequência uma maior atividade tripanocida frente a forma tripomastigota. Possivelmente, a presença do substituinte arila na porção R₂ dos compostos **33c** e **33d** proporcionou uma maior atividade tripanocida quando comparados com os substituintes **33a** e **33b**, que possuem os grupamentos alquila e tiossemicabazona não substituída respectivamente na porção R₂.

Em um trabalho realizado por Aguirre G. et al., 2005, foi apresentado um estudo quantitativo de relação quantitativa estrutura atividade (QSAR) de novas substâncias antiparasitárias, ele ratificava a importante contribuição dos grupamentos elétron-doadores e elétron-atratores na atividade tripanocida (AGUIRRE G. et al., 2005).

Tabela 08 – Valores de citotoxicidade e IC₅₀ frente a forma tripomastigota do *T. cruzi* das tiossemicarbazonas isoxazolínicas

Tiossemicarbazonas isoxazolínicas	Citotoxicidade (CC ₅₀) µM ^a	IC ₅₀ tripomastigotas µM (Cepa Y)	Fórmula
33a	186,20	22,67	C ₁₇ H ₂₁ N ₅ O ₂ S
33b	163,83	40,04	C ₂₂ H ₂₃ N ₅ O ₂ S
33c	156,04	13,63	C ₁₆ H ₁₉ N ₅ O ₂ S
33d	205,24	12,60	C ₂₂ H ₂₃ N ₅ O ₃ S
Benznidazol 2	459,19	40,96	C ₁₂ H ₁₂ N ₄ O ₃

a = citotoxicidade em macrófagos RAW 264.7, MTT foi o método utilizado

Benznidazol = controle utilizado nos ensaios de *Trypanosoma cruzi*

Não se pode afirmar como estes derivados híbridos tiossemicarbazônicos e isoxazolínicos **33** conseguem inibir o *T. cruzi*, para isso é necessário a expansão da série com posterior estudo de docking. Na literatura, alguns estudos revelam que as tiossemicarbazonas atuam inibindo a cruzaina, proteína responsável pela maioria da atividade proteolítica de todos os estágios de vida do *T. cruzi* (DIAS, I. C. 2009).

7.2 ATIVIDADE LEISHMANICIDA

A atividade dos compostos em macrófagos RAW 264.7 foi avaliada por ensaio de MTT. Todos os compostos testados foram menos citotóxicos que o fármaco padrão utilizado (miltefosina **4**). Sendo importante mencionar que, o composto **33d** teve a menor citotoxicidade e possuiu CC₅₀ semelhante a concentração citotóxica relatada no estudo antichagásico. Outra particularidade, é que o composto **33b**, que possui o grupamento tiossemicarbazona não substituída na porção R₂, possuiu a maior CC₅₀.

Os produtos sintetizados foram ativos contra a forma promastigota da *L. amazonensis* e *L. infantum*. De forma geral, apresentaram concentrações inibitórias maiores que a miltefosina **4** (tabela 09). Apenas o composto **33b** possuiu uma IC₅₀ menor que a miltefosina, porém foi o mais tóxico da série (**33b** - IC₅₀ *L. amazonensis* = 17,69 µM; IC₅₀ *L. infantum* = 27,54 µM; miltefosina **4** - IC₅₀ *L. amazonensis* = 36,31 µM; IC₅₀ *L. infantum* = 53,70 µM).

Tabela 09 - Valores de Citotoxicidade e IC₅₀ sobre a forma promastigota de *L. amazonenses* e *L. infantum* das tiosemicarbazonas isoxazolínicas.

Composto	Citotoxicidade (CC ₅₀) µM ^a	IC ₅₀ (µM) <i>L. amazonenses</i>	IC ₅₀ (µM) <i>L. infantum</i>
33a	113,30	113,95	268,49
33b	81,78	17,69	27,54
33c	142,00	157,54	284,52
33d	250,22	109,93	240,67
Miltefosina 4	56,67	36,31	53,70

Leishmania amazonensis = agente etiológico da leishmaniose tegumentar

Leishmania infantum = agente etiológico da leishmaniose visceral

Na avaliação da atividade leishmanicida frente a forma amastigota, foi verificado que os compostos **33a** e **33d** possuíram as menores IC₅₀ em relação a miltefosina **4**, logo estes derivados híbridos foram os mais ativos (tabela 10). Uma particularidade interessante, é que o composto **33c** possuiu a menor atividade leishmanicida, em contrapartida o derivado híbrido **33d** foi o mais ativo frente a forma amastigota da *L.*

amazonensis e *L. infantum* e o menos citotóxico (figura 45). O que difere esses dois compostos é a apenas o oxigênio contido na porção R₁ da molécula **33d**, possivelmente o efeito indutivo do oxigênio esteja variando a atividade biológica.

Tabela 10 - Valores de Citotoxicidade e IC₅₀ sobre a forma amastigota de *L. amazonenses* e *L. infantum* das tiosemicarbazonas isoxazolínicas

Composto	Citotoxicidade (CC ₅₀) μ M ^a	IC ₅₀ (uM) <i>L. amazonenses</i>	IC ₅₀ (uM) <i>L. infantum</i>
33a	113,30	154,51	110,52
33b	81,78	>948,9	223,90
33c	142,00	>1158,0	616,35
33d	250,22	131,17	67,44
Miltefosina 4	56,67	219,05	220,82

Outro dado interessante, é que os compostos **33b** e **33c** possuíram as mais altas concentrações inibitórias em relação a miltefosina, frente a forma amastigota da *L. amazonenses* e *L. infantum* (figura 45). Na análise comparativa da atividade leishmanicida frente as formas promastigota e amastigota é possível verificar uma grande diferença nos valores de IC₅₀ dos compostos **33b** e **33c**, porém não se pode afirmar o motivo pelo qual as concentrações inibitórias foram tão discrepantes. Também é importante destacar que, o composto **33d** foi o menos citotóxico nas duas atividades biológicas e o mais ativo frente a forma tripomastigota do *T. cruzi* e a forma amastigota da *L. amazonenses* e *L. infantum*.

A escolha dos grupamentos (arila, alquila e tiossemicarbazona não substituída) na porção R₂ teve como objetivo a análise comparativa dos três grupos funcionais com relação aos rendimentos e aos possíveis efeitos eletrônicos nas atividades biológicas. Só com a ampliação da série, estudo de docking, estudo quantitativo de relação estrutura atividade (QSAR), estudo de relação estrutura atividade (SAR) que poderá ser justificado os principais motivos das variações na atividade biológica.

O que se pode comentar é o sucesso destes novos derivados isoxazolínicos aza-bicíclicos de seis membros, que proporcionou interesse para expansão da série, com

o propósito de se obter uma grande diversidade de compostos para um melhor estudo comparativo, tanto no aspecto químico como no biológico.

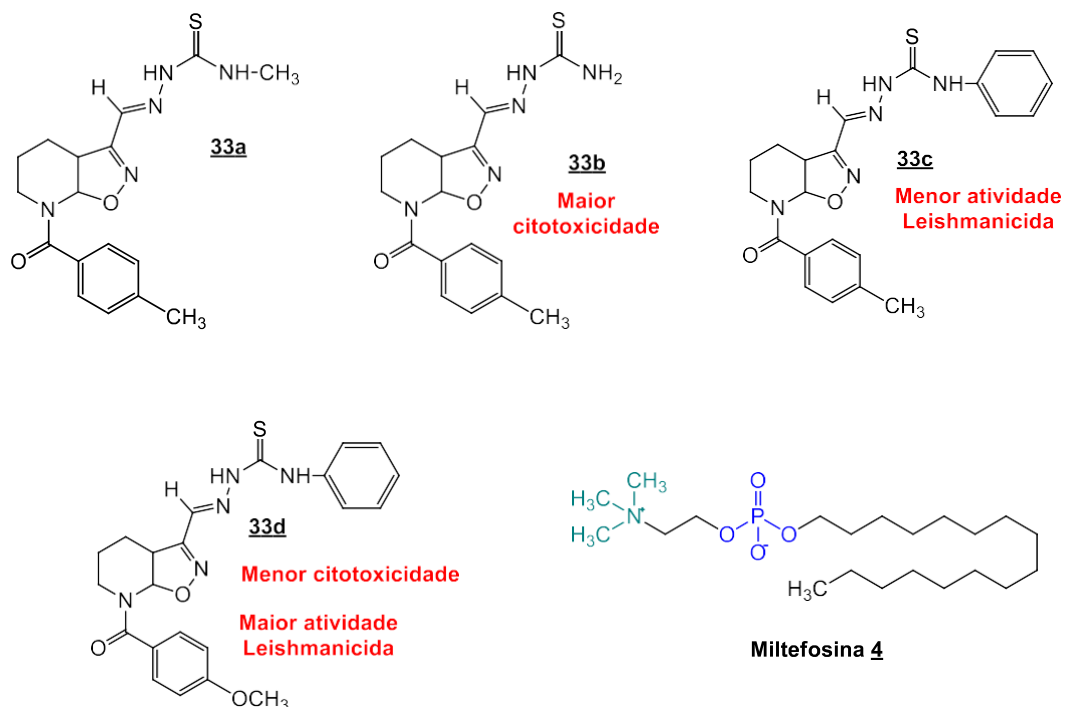


Figura 45 – Ilustração comparativa da citotoxicidade e atividade leishmanicida frente a forma amastigota dos derivados híbridos tiossemicarbazônicos e isoxazolínicos, tendo como padrão a miltefosina.

7.3 PROTEASES DE *Leishmania*

O estudo das proteases de micro-organismos, descritos na literatura, tem demonstrado que estas enzimas desempenham importantes funções na fisiologia do protozoário *Leishmania*, bem como na patologia por eles causada e que a inibição destas enzimas por inibidores específicos pode constituir uma importante estratégia para a produção de potentes agentes leishmanicida (COOMBS G. H.; MOTTRAN J. C., 1997).

As proteases, também conhecidas como peptidases, formam um diversificado e amplo grupo de enzimas que estão presentes em diferentes sistemas biológicos. Essas proteínas que compõem cerca de 2% da massa de todos os organismos multi e unicelulares, possuem um papel de extrema importância nos fenômenos biológicos (MCKERROW J. H. et al., 2008).

As proteases que contribuem para virulência e patogênese de *Leishmania* são as mais diversas. A glicoproteína de 63 kDa (gp63), uma metaloprotease zinco-dependente, é uma das principais moléculas de superfície presente em todas as espécies de *Leishmania*, especialmente em promastigotas, e representa mais de 1% da proteína total do parasito. Esta enzima cliva o componente C3b do Sistema Complemento em C3bi, facilitando assim a fixação da *Leishmania* ao macrófago (JAFFE C. L.; DWYER D. M., 2003) e a ligação às células *natural killer* (células NK) inibindo sua proliferação e facilitando assim a infecção parasitária (LIEKE T., 2008).

A proteína A-2, encontrada principalmente na variação *L. donovani* em sua forma amastigota, é necessária para a sobrevivência do parasita nessa fase. Há indícios que essa proteína, A-2, também atua no sistema imunológico do parasita, deixando-o com resistência ao aumento de temperatura (OLIVIER M., 2005). Já a proteína HASPB está presente na membrana plasmática da fase amastigota e diversos testes com pacientes portadores da forma visceral e cutânea mostraram que essa proteína é imunogênica e tem como função auxiliar o parasita durante a infecção no hospedeiro (MACLEAN L. M., 2012).

Feliciano P. R., Drennan C. L. e Nonato M. C., 2016, descreveram a estrutura de uma enzima importante para o metabolismo do protozoário *Leishmania major*, causador de leishmaniose cutânea. A proteína encontrada na *L. major*, conhecida como fumarato de hidratase, é muito parecida com a existente no *Trypanosoma cruzi* e no *T. brucei*. Esta proteína é responsável por catalisar a conversão reversível de malato em fumarato, metabólitos importantes para a sobrevivência do parasita (FELICIANO P. R., DRENNAN C. L., NONATO M. C., 2016).

Um dos maiores problemas para a comunidade científica no combate contra a leishmaniose se encontra na grande variedade genética do parasita *Leishmania*, além da grande dificuldade de se encontrar marcadores de resistência nos pacientes curados e falta de um sistema semelhante ao natural para uma melhor avaliação (GRADONI L., 2015). Diante do exposto e com os resultados promissores dos novos derivados tiosemicarbazônicos e isoxazolínicos, torna-se imprescindível a ampliação da série para posteriores estudos de acoragem molecular, modelagem molecular comparativa e relação estrutura atividade.

8. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Neste trabalho, foi comprovado a versatilidade química dos heterociclos piperidina[3,2-*d*]-2-isoxazolina, que foram obtidos por meio da reação de cicloadição 1,3-dipolar, entre as enamidas endocíclicas **29** de seis membros e o óxido de carboetoxiformonitrila **40**. Após formação dos novos heterociclos, isoxazolinas piperidínicas **30**, as sínteses dos álcoois **31** e dos aldeídos **32** foram desenvolvidas, seguido da condensação dos aldeídos isoxazolínicos **32** com diferentes tiossemicarbazidas **46**, formando as inéditas tiossemicarbazonas isoxazolínicas **33**.

Os novos intermediários sintetizados (álcool *p*-CH₃ **31a**, *p*-toluilbenzaldeído **32a**) e as novas moléculas híbridas (isoxazolínicas piperidínicas/tiossemicarbazonas **33**) tiveram suas características químicas determinadas e foram caracterizadas por meio da espectroscopia de RMN (1D e 2D) e dos espectros de infravermelho.

Para avaliação da atividade antichagásica, foram utilizados dados de citotoxicidade e da IC₅₀ frente as formas epimastigota e tripomastigota. Todos os compostos testados mostraram maior citotoxicidade em relação ao fármaco padrão utilizado (Benznidazol). As inéditas tiossemicarbazonas isoxazolínicas apresentaram concentrações inibitórias frente a forma tripomastigota abaixo do benznidazol (**21**), sendo consideradas potentes tripanocidas. No entanto, estes compostos apresentaram IC₅₀ frente a forma epimastigota acima do benznidazol (**21**). Foi observado que o composto **33d** apresentou maior atividade tripanocida frente a forma tripomastigota e menor citotoxicidade quando comparado com os demais compostos (**33a**, **33b** e **33c**).

De forma semelhante, foram utilizados dados de citotoxicidade e da IC₅₀ frente as formas promastigotas e amastigotas das *L. amazonensis* e *L. infantum*. Todos os compostos testados mostraram menor citotoxicidade em relação ao fármaco padrão utilizado (miltefosina). Os compostos **33a** e **33d** apresentaram concentrações inibitórias frente a forma amastigota abaixo da miltefosina, sendo consideradas potentes leishmanicidas, sendo importante mencionar que o **33d** também foi o composto menos citotóxico e com maior atividade leishmanicida quando comparado com as demais tiossemicarbazonas isoxazolínicas **33a**, **33b** e **33c**.

Os objetivos pretendidos com relação à parte química e biológica foram executados com êxito e resultados biológicos satisfatórios foram obtidos, quanto à

ação antichagásica e leishmanicida. Diante do exposto, foi comprovado o grande potencial sintético e biológico dos heterociclos isoxazolínicos.

Sendo assim, almeja-se como principal perspectiva a continuidade deste trabalho com o objetivo de explorar ainda mais os estudos químicos e biológicos das moléculas híbridas, isoxazolínicas piperidínicas/tiossemicarbazonas, com a possibilidade de sintetizar novos híbridos para comparar os seus potenciais efeitos antichagásicos e leishmanicida através dos estudos biológicos. Outra perspectiva importante, são os estudos de docking, relação estrutura atividade (SAR), relação quantitativa estrutura atividade e modelagem molecular comparativa, para otimização estrutural dos derivados tiossemicarbazônicos isoxazolínicos.

REFERÊNCIAS

- Aggarwal, N.; Aggarwal, R.; Mishra, P.; Jain, J. S.; Bansal, S. K.; Jha, K. K. Design and Evaluation of Semicarbazones and Thiosemicarbazones as Novel Anticonvulsants. *Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry*. v. 8, p. 26 - 28, 2008.
- Aguirre, G.; Boiani, L.; Cerecetto, H.; Fernández, M.; González, M.; Denicola, A.; Otero, L.; Gambino, D.; Rigol, C.; Olea-Azar, O.; Faundez, M. In vitro activity and mechanism of action against the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* of 5-nitrofuryl containing thiosemicarbazones. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 12, p. 4885 - 4893, 2004.
- Aguirre, G.; Boiani, L.; Boiani, M.; Cerecetto, H.; Maio, R.; González, M.; Porcal, W.; Denicola, A.; Piro, O. E.; Castellano, E. E.; Santanna, C. M. R.; Barreiro E. J. New potent 5-substituted benzofuroxans as inhibitors of *Trypanosoma cruzi* growth: Quantitative structure–activity relationship studies. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 13, p. 6336 - 6346, 2005.
- Almeida, V. M.; Dos Santos, R. J.; Góes A. J. S.; Lima, J. G.; Correia, C. R. D.; De Faria, A. R. Synthesis of newaza-bicyclic 2-isoxazolines by 1,3-dipolar cycloaddition of endocyclic enecarbamates and enamides with nitrile oxides. *Tetrahedron Letters*, v. 50, p. 684 – 687, 2009.
- Almeida V. M. Reações de cicloadição 1,3-dipolar de enecarbamatos e enamidas endocíclicas de 6 membros com o N-óxido de nitrila. Síntese e avaliação das atividades anti-inflamatória e antimicrobiana de derivados isoxazolínicos bicíclicos piperidínicos. Dissertação de Mestrado. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 2003.
- Altıntop, M. D.; Temel, H. E.; Sever, B.; Çiftçi, G. A. and Kaplancıklı, Z. A. Synthesis and Evaluation of New Benzodioxole-Based Thiosemicarbazone Derivatives as Potential Antitumor Agents. *Molecules*, v. 21, p. 1598 – 1616, 2016.
- Alvar, J.; Vélez, I. D.; Bern, C.; Herrero, M.; Desjeux, P.; Cano, J.; Jannin, J.; Den Boer, M. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *PLoS One*, v. 7, 2012.
- Amaral, A. T.; Andrade C. H.; Kümmerle, A. E.; Guido, R. V. C. A evolução da Química Medicinal no Brasil: avanços nos 40 anos da Sociedade Brasileira de Química. *Química Nova*, v. 40, p. 694 – 700, 2017.

Amato, V. S; Tuon, F. F; Siqueira, A. M; Nicodemo, A. C; Neto, V. A. Treatment of Mucosal Leishmaniasis in Latin America: Systematic Review. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 77 (2), p. 266 – 274, 2007.

Aras, R.; Gomes, I.; Veiga, M.; Melo, A. Transmissão vetorial da doença de Chagas em Mulungu do Morro, Nordeste do Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 36, p. 359 – 363, 2003.

Argolo, A. M.; Félix, M.; Pacheco, R.; Costa, J. Doença de Chagas e seus principais Vetores no Brasil. Laboratório de Biodiversidade Entomológica/ Laboratório de Sistemática e Bioquímica, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz. Rio de Janeiro, 2008. DOI: 10.13140/2.1.1578.9449.

Arthur, G.; Bittman, R. The inhibition of cell signaling pathways by antitumor ether-lipids. *Biochem. Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1390, p. 85 - 102, 1998.

Barbosa, L. G. N. Doença de Chagas. *Revista Logos*, v.1, p. 20 - 36, 2009.

Bauer, D. J.; Sadler, P. W. Derivatives of isatin beta-thiosemicarbazone with anti-viral chemotherapeutic activity against ectromelia infection. *Nature Publishing Group*, v. 190, p. 1167 – 1169, 1961.

Barreiro, E. J.; Fraga, C. A. M.; Miranda, A. L. P.; Rodrigues, C. R. *Quim. Nova*, v. 25, p. 129, 2002.

Basappa; Sadashiva, M. P.; Mantelingu, K.; Swamy, S. N.; Rangappa, K. S. Solution-phase Synthesis of Novel 2-isoxazoline Libraries via 1,3-dipolar Cycloaddition and Their Antifungal Properties. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v.11, p. 4539 – 4544, 2003.

Basano, S. A.; Camargo, L. M. A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. *Revista Brasileira de epidemiologia*, v. 7 (3), p. 328 – 337, 2004.

Bates, P. A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *International Journal for Parasitology*, v. 37 (10), p. 1097 – 1106, 2007.

Batista, F. M. A.; Machado, F. F. O. A.; Silva, J. M. O.; Barja, J. M. P. R.; Simioni, A. R. Leishmaniose: Perfil epidemiológico dos casos notificados no estado do Piauí entre 2007 e 2011. *Revista Univap*, v. 20 (35), p. 44 – 55, 2014.

Bastos, M. M.; Boechat, N.; Hoelz, L. V. B.; De Oliveira, A. P. Quimioterapia Antileishmania: Uma Revisão da Literatura. *Revista virtual de química*, v. 8 (6), p. 2072 – 2104, 2016.

Benbrook, D. M.; Madler, M. M.; Spruce, L. W.; Birckbichler, P. J.; Nelson, E. C.; Subramanian, S.; Weerasekare, G. M.; Gale, J. B.; Patterson, M. K.; Wang, B.; Wang, W.; Lu, S.; Rowland, T. C.; Disevestro, P.; Lindamood, C.; Hill, D. L.; Berlin, D., J. Journal of Medicinal Chemistry, v. 40, 1997.

Beraldo, H. Semicarbazonas e tiosemicarbazonas: o amplo perfil farmacológico e usos clínicos. Revista Química Nova, v. 27, p. 461 - 471, 2004.

Bharti, N.; Shailendra; Sangita, S.; Fehmida, N.; Amir, A. New palladium(II) complexes of 5-nitrothiophene-2-carboxaldehyde thiosemicarbazones. synthesis, spectral studies and in vitro anti-amoebic activity. Bioorganic & Medicinal Chemistry, v. 11, n. 13, p. 2923 - 2929, 2003.

Bharti, N.; Husain, K.; Garza, M. T. G.; Vega, D. E. C.; Garza, J. C.; Cardenas, B. D. M.; Naqvi, F. Synthesis and in vitro antiprotozoal activity of 5-nitrothiophene-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone derivatives. Bioorganic & Medicinal Chemistry, v. 12 (23), p. 3475 – 3478, 2002.

Blau, L.; Menegon, R. F.; Trossini, G. H.; Molino, J. V.; Vital, D.G.; Cicarelli, R. M.; Passerini, G.D.; Bosquesi, P.L.; Chin, C. M. Design, synthesis and biological evaluation of new aryl thiosemicarbazone as antichagasic candidates. European Journal of Medicinal Chemistry, v. 67, p. 142 – 151, 2013.

Boletim Epidemiológico, Secretaria de Vigilância em Saúde (MS). ISSN 2358-9450. v. 46, nº 21, 2015.

Bonney, K. M. Chagas disease in the 21st Century: a public health success or an emerging threat? Parasite, v. 21 (11), 2014.

Brasil. Ministério da Saúde. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana. Ed. 2. Brasília, 2007.

Brasil. Ministério da Saúde. Atlas de leishmaniose tegumentar americana: diagnóstico clínico e diferencial. Ed. 2. Brasília, 2006.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar. 2. ed. atual. Brasília : Editora do Ministério da Saúde, 2010.

Britta, E. A.; Scariot, D. B.; Falziroli, H.; Ueda-Nakamura, T., S. C. C.; Filho, B. P. D.; Borsali, R.; Nakamura, C. V. Cell death and ultrastructural alterations in Leishmania amazonenses caused by new compound 4-Nitrobenzaldehyde thiosemicarbazone derived from S-limonene. BMC Microbiology, v. 14, p. 236, 2014.

Brockman, R. W.; Thomson, J. R.; Bell, M. J.; Skipper, H. E. *Cancer Research*, v. 16, p. 167, 1956

Casas, J. S.; Tasende, M. S. G.; Sordo, J.; *Coordination Chemistry Reviews*, v. 209, p. 197 – 261, 2000.

Caputto M. E.; Ciccarelli, A.; Frank, F.; Moglioni, A. G.; Moltrasio, G. Y.; Veja, D.; Lombardo, E.; Finkielstein, L. M. Synthesis and biological evaluation of some novel 1- indanone thiazolylhydrazones as anti-Trypanosoma cruzi agents. *Eur. J. Med. Chem.* v. 55, p. 155-163, 2012.

Carneiro, P. F.; Nascimento, S.B.; Pinto, A.V.; Pinto, M. C. F. R.; Lechuga, G. C.; Santos, D. O.; Dos Santos Júnior, H. M.; Resende, J. A. L. C; Bourguignon, S. C.; Ferreira, V. F. New oxirane derivatives of 1,4-naphthoquinones and their evaluation against T. cruzi epimastigote forms. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 20, p. 4995 – 5000, 2012.

Carvalho, S. A.; Feitosa, L.O.; Soares, M.; Costa, T. E. M. M.; Henriques, M. G.; Salomão, K.; De Castro, S.L.; Kaiser, M.; Brun, R.; Wardell, J. M.; Wardell, S. M. S. V.; Trossini, G. H. G.; Andricopulo, A. D.; Da Silva, E. F.; Fraga, C. A. M. Design and synthesis of new (E)-cinnamic N-acylhydrazones as potent antitrypanosomal agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 55, p. 512 – 521, 2012.

CDC. Ciclo biológico da Leishmania no hospedeiro vertebrado e no inseto vetor. Disponível em: <http://www.abcdamedicina.com.br/leishmaniose-visceral-e-cutanea-clinica-ciclo-de-vida-do-parasita.html>. Acesso em: 23/01/2018

Chandra, S.; Parmar, S.; Kumar Y. Synthesis, spectroscopic, and antimicrobial studies on bivalent zinc and mercury complexes of 2-formylpyridine thiosemicarbazone. *Bioinorganic Chemistry and Applications*, v. 2009, p. 1 – 6, 2009.

Chappuis, F.; Sundar, S.; Hailu, A.; Ghalib, H.; Rijal, S.; Peeling, R.W.; Alvar, J.; Boelaert, M. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nature Reviews Microbiology*, v. 5 (11), p. 873 – 882, 2007. v. 5 (11), p. 873 – 882, 2007.

Chávez-Fumagalli, M.A.; Ribeiro T.G.; Castilho R.O.; Fernandes S.O.; Cardoso V. N.; Coelho, C. S.; Mendonça, D. V.; Soto, M.; Tavares, C. A.; Faraco, A. A., Coelho, E. A. New delivery systems for amphotericin B applied to the improvement of leishmaniasis treatment. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 48 (3), p. 235 – 242, 2015.

Claxton, G. P.; Allen, L.; Grisar, J. M. 2,3,4,5-Tetrahydropyridine Trimer. *Organic Syntheses*, 2003.

Copeland, N. K.; Aronson, N. E. Leishmaniasis: treatment updates and clinical practice guidelines review. *Current Opinion in Infectious Diseases*, v. 28 (5), p. 426 – 437, 2015. v. 28 (5), p. 426 – 437, 2015.

Costa, P.; Pilli, R.; Pinheiro, S.; Vasconcellos, M. Substâncias carboniladas e seus derivados. 1ª ed., Bookman: Porto Alegre/MG, 2003.

Coombs, G. H.; Mottran, J. C. *Parasitology*, v. 114, p. 61 – 80, 1997.

Croft, S. L; Coombs, G. H. Leishmaniasis current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *TRENDS in Parasitology*, Vol.19 (11), 2003.

Cunha, S.; Silva, T.L.; *Tetrahedron Lett.* v. 50, p. 2090-2093, 2009.

Davison, R. N. *Drugs*, v. 56, p. 1009 – 1018, 1998.

Da Silva, R. R.; Ramalho, T. C.; Santos, J. M.; Figueroa-Villar, J. D. Concerning the FERMO concept and Pearson's hard and soft acidbase principle. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 17, p. 223, 2006.

De Almeida, G. C. Síntese e avaliação preliminar da atividade antimicrobiana e antichagásica de novas isoxazolil-aril-semicarbazonas e tiossemicarbazonas, e isoxazolilnitrofurfuril-hidrazonas. Dissertação de Mestrado. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 2010.

Dea-Ayuela, M.A.; Castilho, E.; Gonzalez-Alvarez, M.; Veja, C.; Rolón, M.; Bolás-Fernández, F.; Borrás, J.; González-Rosende, M. E. In vivo and in vitro anti-leishmanial activities of 4-nitro-Npyrimidin-and N-pyrazin-2-ylbenzenesulfonamides, and N2-(4nitrophenyl)-N1-propylglycinamide. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 17, p. 7449 – 7456, 2009.

Delmas, F.; Giogio, C. D.; Robin, M.; Azas, N.; Gasquet, M.; Detang, C.; Costa, M.; Timon-David, P.; Galy, J. P. In vitro activities of position 2 substitution-bearing 6-nitro- and 6-aminobenzothiazoles and their corresponding anthranilic acid derivatives

against *Leishmania infantum* and *Trichomonas vaginalis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 46, p. 2588 – 2594, 2002.

Desjeux, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*, v. 27 p. 305–318, 2004.

Dias J. C. P. Chagas disease: success and challenges. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 22 (5), p. 2020 – 2021, 2006.

Dias J. C. P. Globalização, iniquidade e doença de Chagas. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 11, p. 13-22, 2007.

Dias L. C.; Dessoy M. A.; Silva J. J. N.; Thiemann O. H.; Oliva G.; Andricopulo, A. D. Quimioterapia da doença de Chagas: estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. *Química Nova*, v. 32 (9), p. 2444 – 2457, 2009.

Díaz, D. E; Toranzo, E. G; Castro, J. A; Franke, D. E; Cazzulo, B. M; Cazzulo, J. J. Interaction of Benzimidazole reactive metabolites with nuclear and kinetoplastic DNA, proteins and lipids from *Trypanosoma cruzi*. *Experientia*, v. 44, p. 880 - 881, 1988.

Docampo, R; Moreno, S. N. Free radical metabolites in the mode of action of chemotherapeutic agent and phagocytic cells on *Trypanosoma cruzi*. *Reviews of Infectious Diseases*, v. 6, p. 223 - 238, 1984.

Dos Santos, R. J. Reações de Cicloadição 1,3-Dipolar de Enecarbamatos e Enamidas Endocíclicas de 5 membros com N-Óxido de Nitrila. Síntese e Avaliação da Atividade Antiinflamatória de Derivados Isoxazolínicos Bicíclicos Pirrolidínicos e Antimicrobiana de Enamidas Endocíclicas de 5 membros. Dissertação de Mestrado. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 2003.

Duffy, K. J.; Shaw, A. N.; Delorme, E.; Dillon, S. B.; Erickson-miller, C.; Giampa, L.; Huang, Y.; Keenan, R. M.; Lamb, P.; Liu, N.; Miller, S. G.; Price, A. T.; Rosen, J.; Smith, H.; Wiggall, K. J.; Zhang, L.; Luengo, J. I. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 45, 2002.

Du, X.; Gou, C.; Hansell, E.; Doyle, P. S.; Caffrey, C. R.; Holler, T. P.; Mckerrrow, J. H.; Cohen, F. E. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 45, 2002.

Eue, I.; Zeising, R.; Arndt, D. Alkylphosphocoline-induced production of nitric oxide and tumor necrosis factor alpha by U937 cells. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, v. 12, p. 350-356, 1995.

Feliciano, P.R.; Drennan, C. L.; Nonato, M. C. Crystal structure of an Fe-S cluster-containing fumarate hydratase enzyme from *Leishmania major* reveals a unique protein fold. *CrossMark*, v. 113 (35), p. 1 – 6, 2016.

Fernández, M.; Arce, E. R.; Sarniguet, C.; Morais, T. S.; Tomaz, A. I.; Azar, C. O.; Figueroa, R.; Maya, J. D.; Medeiros, A.; Comini, M.; Garcia, M. H.; Otero, L.; Gambino, D. Novel ruthenium(II) cyclopentadienyl thiosemicarbazone compounds with antiproliferative activity on pathogenic trypanosomatid parasites. *Journal of Inorganic Biochemistry*, v. 153, p. 306 – 314, 2015.

FIOCRUZ - O protozoário: *Trypanosoma cruzi* e seu ciclo evolutivo. Disponível em: http://www.cpqrr.fiocruz.br/informacao_em_saude/CICT/Doenca_de_chagas.htm. Acesso em: 23/10/2017

FIOCRUZ - Doença de Chagas: fases, transmissão e prevenção. Disponível em: <https://www.bio.fiocruz.br/index.php/doenca-de-chagas-sintomas-transmissao-e-prevencao>. Acesso em: 23/10/2017.

FIOCRUZ - A. Formas evolutivas do *Trypanosoma cruzi* B. Hospedeiro vertebrado (mamífero). C. Vetor inseto. (Adaptado de: <http://www.invivo.fiocruz.br/chagas/doen-ciclo-trypanosoma.html>).

Forganholi, J. N.; Zappa, V. Importância da leishmaniose na saúde pública. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*. v. 17, p. 1 – 45, 2011.

French, F. A.; Blanz, Jr. E. J.; *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 9, p. 585, 1966.

Gligorijević, N.; Todorović, T.; Radulović, S.; Sladić, D.; Filipović, N.; Godevac, D.; Jeremić, D.; Andelković, K. Synthesis and characterization of new Pt (II) and Pd (II) complexes with 2-quinolinecarb oxaldehyde sele nosemicarbazone : Cytotoxic activity evaluation of Cd(II), Zn (II), Ni (II), Pt (II) and Pd (II) complexes with heteroaromatic sele nosemicarbazones. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 44, p. 1623 -1629, 2009.

Gomes, A. T. Guanilação de tiouréias empregando micro-ondas na síntese de guanidinas e 5 - aminotetrazóis catalisada por sais de bismuto. Dissertação de Doutorado. Salvador: Universidade Federal da Bahia, 2014.

Gradoni, L. Canine *Leishmania* vaccines: Still a long way to go. *Veterinary Parasitology*, v. 208, p. 94, 2015.

Gucma, M.; Golebiewski, W. M. 1,3 – Dipolar Cycloaddition Reaction of Nitrile Oxides Revisited – Unusual Side Products Characterized by 2D NMR. *J. Heterocyclic Chem.*, v. 51, p. 572 – 578, 2014.

Guerra, J. A. O.; Barbosa, M. G. V.; Loureiro, A. C. S. P.; Coelho, C. P.; Rosa, G. G.; Coelho, L. I. A. C. R. Leishmaniose tegumentar americana em crianças: aspectos epidemiológicos de casos atendidos em Manaus, Amazonas, Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 23 (9), p. 2215 – 2223, 2007.

Gürsoy, A.; Terzioglu, N.; Ötük, G. Synthesis of some new hydrazide-hydrazones, thiosemicarbazides and thiazolidinones as possible antimicrobials. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 32, p. 753 – 758, 1997.

Gurung, P.; Thirumala-Devi K. Innate immunity against Leishmania infections. *Cell. Microbiol.*, v. 17, p. 1286 – 1294, 2015.

Hang, H. C.; Bertozzi, C. R. *Accounts of Chemical Research*, v. 34, p. 727, 2001.

Hamre, D; Bernstein, J; Donovan, R. Activity of p-aminobenzaldehyde, 3-thiosemicarbazone on vaccinia virus in the chick embryo and in the mouse. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, v. 73, p. 275 – 278, 1950.

Hererwaldt, B. L. *Lancet*, v. 354, p. 1191, 1999.

Holla, B. S.; Malini, K. V.; Rao, B. S.; Sarojini, B. K.; Kumari, N. S. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 38, p. 313, 2003.

Ismail, T.; Shafi, S.; Hyder, I.; Sidiq, T.; Khajuria, A.; Alam, S. M.; Halmuthur, M. S. K. Design and Synthesis of Novel 1,2,3-Triazole- and 2-IsoxazolineBased Bis-Heterocycles as Immune Potentiators. *Arch Pharm Chemistry in Life Sciences*, v. 348, p. 796–807, 2015.

Jallapally, A.; Addla, D.; Yogeewari, P.; Sriram, D.; Kantevari, S. 2-Butyl-4-chloroimidazole based substituted piperazine-thiosemicarbazone hybrids as potent inhibitors of *Micobacterium tuberculosis*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. v. 24, p. 5520 – 5524, 2014.

Jaffe, C. L.; Dwyer, D. M. *Parasitology Research*, v. 91, p. 229, 2003.

Jha, T. K; Sundar, S; Thakur, C. P; Bachmann, P; Karbwang, J; Fischer, C; Voss, A; Berman, J. Miltefosine, an oral agent for treatment of Indian visceral leishmaniasis. *New England Journal of Medicine*, v. 341, p. 1795 - 1800, 1999.

Kumar, A. B. V. K.; Sankar, A. R.; Kim, S. H. A. Simples, eficiente síntese one-pot de derivados e sua atividade antimicrobiana. *Journal of Heterocyclic Chemistry*, v. 51, p. 146 – 151, 2014.

Kozikowski, A. P.; Adamczyk, M. *Journal of Organic Chemistry*, vol 48, p. 366 – 372, 1983.

Leovac, V. M.; Jovanović, L. S.; Jevtović, V. S.; Pelosi, G.; Bisceglie, F. Transition metal complexes with thiosemicarbazide-based ligand – Part LV: Synthesis and X-ray structural study of novel Ni(II) complexes with pyridoxal semicarbazone and pyridoxal thiosemicarbazone. *Polyhedron*, v. 26, p. 2971 – 2978, 2007.

Lieke, T.; Nylén, S.; Eidsmo, L.; McMaster, W. R.; Mohammadi, A. M.; Khamesipour, A.; Berg, L.; Akuffo, H. *Clinical & Experimental Immunology*, v.153, p. 221, 2008.

Loranzo, N. B. H.; Weber, K. C.; Honorio, K. M.; Guido, R. V. C.; Andricopulo, A. D.; Silva, A. B. F. Theoretical Models for the Antitrypanosomal Activity of Thiosemicarbazone Derivatives. *International Journal of Quantum Chemistry*, v. 112, p. 3364 – 3370, 2012.

Lucimi, A.; Robledo, S. B.; Gama, V.; Saravia, N. G. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 42, p. 1990 – 1995, 1998.

Lux, H.; Heise, N.; Klenner, T.; Hart, D.; Oppendoes, F.R. Ether-lipid (alkyl-phospholipid) metabolism and the mechanism of action of ether-lipid analogues in *Leishmania*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 111, p. 1 - 8, 2000.

Malafaia, G.; Rodrigues, A. S. L. Centenário do descobrimento da doença de Chagas: desafios e perspectivas. *Revista da sociedade brasileira de medicina Tropical*. v. 43 (5), p. 483 – 485, 2010.

Mancuso, A. J.; Swern, D. *Synthesis*, p. 165-185, 1981.

Marzochi, M. C. A.; Coutinho, S. G.; Souza, W. J.; Amendoeira, M.R. Leishmaniose Visceral (Calazar). *Jornal Brasileiro de Medicina*, v. 41, n. 5, p. 61-84, 1981.

McConville, M. J.; Handman, E. The molecular basis of *Leishmania* pathogenesis. *International Journal for Parasitology*, v. 10, p. 1047 – 1051, 2007.

Mckerrrow, J.H., Rosenthal, P.J., Swenerton, R., Doyle, P. Development of protease inhibitors for protozoan infections. *Current Opinion in Infectious Diseases*, v. 21 (6), p. 668 – 672, 2008.

- Mellado, O. G., Cortes, E. C. Preparation of 5-r1-2[(n-r2)furfurylidene; thiophenyliden]semicarbazones and thiosemicarbazones as a drug for the treatment of Chagas disease. *Mex. Pat. Appl.*, v. 22, 2009.
- Melo, J. O. F.; Donnici, C. L.; Augusti, R.; Ferreira, V. F.; Souza, M. C. B. V.; Ferreira, M. L. G.; Cunha, A. C. 1,2,3-triazolic heterocycles: history, preparations, applications and pharmacological activities. *Revista Química Nova*, vol. 29 (3), p. 569 - 579, 2006.
- Menezes, D. R.; Calvet, C. M.; Rodrigues, G. C.; Pereira, M. C. S.; Almeida, I. R.; Aguiar, A. P.; Supurang, C. T.; Vermelho, A. B. Hydroxamic acid derivatives: a promising scaffold for rational compound optimization in Chagas disease. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. p. 964 - 973, 2015.
- Macleon, L. M.; O'toole, P. J.; Stark, M.; Marrison, J.; Seelenmeyer, C.; Nickel, W.; Smith, D. F. Trafficking and release of Leishmania metacyclic HASPB on macrophage invasion. *Cellular Microbiology*, v. 14, p. 740, 2012.
- Mishra, R. C.; Tewari, N.; Verma, S. S.; Tripathi, R. P.; Kumar, M.; Shukla, P. K. Diastereoselective Synthesis and Antifungal Activity of Glycosyl Isoxazolines. *Journal of Carbohydrate Chemistry*. v. 23, p. 353 - 374, 2004.
- Moncayo, A.; Silveira, A. C. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 104, p.17 - 30, 2009.
- Nepali, K.; Sharma, S.; Sharma, M.; Bedi, P. M. S.; Dhar, K. L. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 77, p. 422, 2014.
- Olliaro, P.L.; Bryceson, A. D. M. Practical progress and new drugs for changing patterns of leishmaniasis. *Parasitology Today*, v. 9, p. 323 - 328, 1993.
- Oliveira, M. F.; Nagao-Dias, A. T.; Pontes, V. M. O.; Júnior, A. S. S.; Coelho, H. L. L.; Coelho, I. C. B. Tratamento Etiológico da Doença de Chagas no Brasil. *Revista de Patologia Tropical*, v. 37, p. 209 - 228, 2008.
- Oliveira, L. F.; Schubach, A. O.; Martins, M. M.; Passos, S. L.; Oliveira, R. V.; Marzochi, M. C.; Andrade, C. A. Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the New World. *Acta Tropica*, v. 118 (2), p. 87 – 96, 2011.
- Olivier, M.; Gregory, D. J.; Forget, G. Subversion Mechanisms by Which Leishmania Parasites Can Escape the Host Immune Response: a Signaling Point of View. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 18, p. 293, 2005.

OMS (World Health Organization) - Disponível em <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>. Acesso em 20 de janeiro de 2018.

Organic Syntheses, Coll. Vol. 6, p.271, 1988.

O'sullivan, D. G.; Sadler, P. W.; Webley, C.; Chemotherapia. v. 7, p. 17, 1963.

Pahontu, E.; Paraschivescu C.; Ilies, D. C.; Poirier, D.; Oprean, C.; Păunescu V.; Gulea, A.; Rosu T.; Bratu O. Synthesis and Characterization of Novel Cu(II), Pd(II) and Pt(II) Complexes with 8-Ethyl-2-hydroxytricyclo(7.3.1.0(2,7))tridecan-13-onethiosemicarbazone: Antimicrobial and in Vitro Antiproliferative Activity. *Molecules*, v. 21, p. 674 – 691, 2016.

Palace-Berl, F.; Jorge, S. D.; Pasqualoto, K. F. M.; Ferreira, A. K.; Maria, D. A.; Zorzi, R. R.; Bortolozzo, L. D.; Lindoso, J. A. L.; Tavares, L. C. 5-Nitro-2-furfuriliden derivatives as potential anti-Trypanosoma cruzi agents: design, synthesis, bioactivity evaluation, cytotoxicity and exploratory data analysis. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 21, p. 5395 – 5406, 2013.

Panico, R.; Powell, W. H.; Richer, J. C. eds.; IUPAC – Nomenclature of organic compounds; Blackwell: London, 1993.

Pandeya, S. N.; Sriram, D.; Nath, G.; Declercq, E. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 9, p. 25, 1999.

Papadopoulou, M. V.; Bloomera, W. D.; Rosenzweig, H. S.; Kaiser, M.; Chatelaine, E.; Jean-Robert, L. Novel 3-nitro-1H-1,2,4-triazole-based piperazines and 2- amino-1,3-benzothiazoles as antichagasic agentes. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 21 (21), p. 1 – 20, 2013.

Papastaikoudi, T. S., Tsotinis, A., Raptopoulou, C., Sambani, C., Thomou, H. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 30, p. 107, 1995.

Paula, C. D. R.; Sampaio, J. H. D.; Cardoso, D. R.; Sampaio, R. N. R. Estudo comparativo da eficácia de isotionato de pentamidina administrada em três doses durante uma semana e de N-metil-glucamina 20mgSbV/kg/dia durante 20 dias para o tratamento da forma cutânea da leishmaniose tegumentar americana. *Revista da sociedade brasileira de medicina tropical*, v. 36 (3), p. 365 – 371, 2003.

Pavli, A.; Maltezou, H.C. Leishmaniasis, an emerging infection in travelers. *International Journal of Infectious Diseases*, v. 14, p. 1032 – 1039, 2010.

Pereira, D. H.; La Porta, F. A.; Santiago, R. T.; Garcia, D. R.; Ramalho, T. C. Novas Perspectivas sobre o Papel dos Orbitais Moleculares de Fronteira no Estudo Da

Reatividade Química: Uma Revisão. Revista Virtual de Química. v. 8 (2), p. 425 – 453, 2016.

Pereira, V. R. A.; Lorena, V. M. B.; Nakazawa, M.; Luna, C. F.; Silva, E. D.; Ferreira, A. G. P.; Krieger, M. A.; Goldenberg, S.; Soares, M. B. P.; Coutinho, E. M.; Correa-Oliveira, R.; Gomes, Y. W. Humoral and cellular immune responses in BALB/c and C57BL/6 mice immunized with cytoplasmic (CRA) and flagellar (FRA) recombinant repetitive antigens, in acute experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Parasitology Research*, v. 96, p. 154 – 161, 2001.

Polak, A.; Richle, R. Mode of action of the 2- nitroimidazol derivative benznidazole. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, v. 72, p. 45 - 54, 1978.

Prajapati, S. K.; Shrivastava, S.; Bihade, U.; Gupta, A. K.; Naidu, V. G. M.; Banerjee, U. C.; Babu B. Synthesis and biological evaluation of novel Δ^2 - isoxazoline fused cyclopentane derivatives as potential antimicrobial and anticancer agents. *Medicinal Chemistry Communications*, v. 6. p. 839 – 845. 2015.

Ramsey, J. M.; Elizondo-Cano, M.; Sanchez-González, G.; PeñaNieves, A.; Figueroa-Lara, A. Opportunity Cost for Early Treatment of Chagas Disease in Mexico. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 8, p. 1 – 8, 2014.

Requena-Méndez, A.; Aldasoro, E.; Lazzari, E.; Sicuri, E.; Brown, M.; Moore, D. A. Prevalence of Chagas disease in Latin-American migrants living in Europe: a systematic review and meta-analysis. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 9 (2), 2015.

Reis, S. L. G. B.; Almeida V. M.; De Almeida G. C.; Boaviagem K. M.; Mendes, C. C. D. B.; De Faria A. R.; Góes A. J. S.; Magalhães, L. R.; Da Silva, T, G. Síntese e Avaliação Preliminar da Atividade Antinociceptiva de Novas Isoxazolilaril-hidrazonas. *Revista Química Nova*, v. 34 (1), p. 76-81, 2011.

Rigol, C.; Olea-Azara, C.; Mendizábal, F.; Otero, L.; Gambinoc, D.; González, M.; Cerecettod, H. Electrochemical and ESR study of 5-nitrofuryl-containing thiosemicarbazones antiprotozoal drugs. *ScienceDirect*. v. 61, p. 2933 – 2938, 2005.

Rouf, A.; Sahin, E.; Tanyeli, C. Divergent synthesis of polysubstituted isoxazoles, isoxazoline N-oxides, and dihydroisoxazoles by a one-pot cascade reaction. *Tetrahedron*, v. 73, p. 331 – 337, 2017.

Rodriguez, E. C.; Marcaurelle, L. A.; Bertozzi, C. R. *The Journal of Organic Chemistry*, v. 63, 1998.

Robledo-O’Ryan, N.; Matos, M. J.; Vazquez-Rodriguez, S.; Santana, L.; Uriarte, E.; Moncada-Basualto; Mura, F.; Lapier, M.; Maya, J. D.; Olea-Azar, C. Synthesis, antioxidant and antichagasic properties of a selected series of hydroxy-3-arylcoumarins. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 25, p. 621 – 632, 2017.

Sacks, D.; Noben-Trauth, N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nature Reviews Immunology*, v. 2, p. 845 – 858, 2002.

Safa, O.; Partin, S.; Mathew, A.M.; Bibby, M.C. Morphological and immunological observations on the effects of hexadecylphosphocoline (HPC) in nude mice bearing MT-1 breast cancer xenografts. *Anticancer Research*, v. 17, p. 37-43, 1997.

Sereno, D.; Hozmuller, P.; Mangot, I.; Curry, G.; Quaissi, A.; Lemesre, J.P. Antimonial-mediated DNA fragmentation in *Leishmania infantum* amastigotes. *Antimicrob. Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 45, p. 2064-2069, 2001.

Silveira, C. A. N; Castillo, E.; Castro, C. Avaliação do tratamento específico para o *Trypanosoma cruzi* em crianças, na evolução da fase indeterminada. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 33, p. 191 - 196, 2000.

Solomons, G.; Fryhle, C.; Química orgânica, 7ª ed., LTC – Livros técnicos científicos Ed. S. A: Rio de Janeiro/RJ, vol. 2, 2002.

Saha, A.K; Mukherjee, J; Bhaduri, A. Mechanism of action of amphotericin B on *Leishmania donovani* promastigotes. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 19, p. 195 - 200, 1986.

Sarodnick, G.; Heydenreich, M.; Linker, T.; Kleinpeter, E.; *Tetrahedron*, v. 59, p. 6311, 2003.

Silva, A. C.; Santos, T. A. R.; Silva, I. V. B.; Oliveira, M. V. G.; Moreira, D. R. M.; Leite, A. C. L.; Pereira, V. R. A. Aryl thiosemicarbazones: In vitro and immunomodulatory activities against *L. amazonensis*. *Experimental Parasitology*, v. 177, p. 57 – 65, 2017,

Silva B. V., Silva B. N. M. Thio- and Semicarbazones: Hope in the Search for Treatment of Leishmaniasis and Chagas Disease. *Medicinal Chemistry*, v. 13, p. 110-126, 2017.

Solomons, G.; Fryhle, C.; Química orgânica, 7ª ed., LTC – Livros técnicos científicos Ed. S. A: Rio de Janeiro/RJ, vol. 2, 2002.

Somogly, L. Reactions of flavonoid thiosemicarbazones under acetylating conditions. *Tetrahedron*, v. 47, p. 9305 - 9316, 1991.

Stoppani, A. O. M. Quimioterapia de La enfermedad de Chagas. MEDICINA (Buenos Aires), v. 59, p. 147-165, 1999.

Subhashree G. R.; Haribabu, J.; Saranya, S.; Yuvaraj, P.; Anantha, D. K.; Karvembu, R.; Gayathri, D. In vitro antioxidant, antiinflammatory and in silico molecular docking studies of thiosemicarbazones. Journal of Molecular Structure. v. 1145, p. 160 - 169, 2017.

Sundar, S.; Chakravarty J. Leishmaniasis: an update of current pharmacotherapy. Expert Opin Pharmacother, v. 14 (1), p. 53 – 63, 2013.

Tenório, R. P.; Góes, A. J. S.; De Lima, J. G.; De Faria, A. R.; Alves, A. J.; Aquino, T. M. Tiossemicarbazonas: Métodos de Obtenção, Aplicações Sintéticas e Importância Biológica. Revista Química Nova, v. 28, p. 1030-1037, 2005.

Triandafillidi I.; Christoforos G. K. Green Organocatalytic Synthesis of Isoxazolines via a One-Pot Oxidation of Allyloximes. Organic Letters. v. 19, p. 106-109, 2016.

Trossini, G. H. G.; Malvezzi, A.; Amaral, A.; Rangel-Yagui, C. O.; Izidoro, M. A.; Cezari, M. H.; Juliano, L.; Chin, C. M.; Menezes, C. M.; Ferreira, E. I. Cruzain inhibition by hydroxymethylnitrofurazone and nitrofurazone: investigation of a new target in Trypanosoma cruzi. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, v. 25, ed. 1, p. 62 – 67, 2010.

Türkkan, E.; Sayin, U.; Erbilin, N.; Pehlivanoglu, S.; Erdogan, G.; Tasdermi, H. U.; Guler, A. O. S. L.; Akgemci, E. G. Journal of Organometallic Chemistry. v. 831, p. 23 – 35, 2017.

Unger, C.; Damenz, W.; Fleer, E.A.; Kim, D.J.; Breiser, A.; Hilgard, P.; Engel, J.; Nagel, G.; Eibl, H. Hexadecylphosphocoline, a new ether-lipid analog. Studies on the antineoplastic activity in vitro and in vivo. Acta Oncologica, v. 28, p. 213-217, 1989.

Urbina J. A. Parasitological cure of Chagas disease: is it possible? Is it relevant?. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 94 (1), p. 349-355, 1999.

Urbina, J. A. Lipid biosynthesis pathway as chemotherapeutic targets in kinetoplastid parasites. Parasitology, v. 114, p. 91-99, 1997.

Urbina J. A. Chemotherapy of Chagas disease. Current Pharmaceutical Design, v. 9, p. 287-295, 2002.

Urbina, J.A.; Docampo, R. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. TRENDS in Parasitology, v. 19 (11), p. 495 - 501, 2003.

Veronesi, R.; Focaccia, R. Tratado de Infectologia. 2 edição. Atheneu, São Paulo, 2002.

Viegas-Junior, C.; Danuello, A.; Bolzani, V. S.; Barreiro, E. J.; Fraga, C. A. M. Molecular Hybridization: A Useful Tool in the Design of New Drug Prototypes. *Current Medicinal Chemistry*, v. 14, p. 1829 - 1852, 2007.

Vital, D. G.; Damasceno, F.; Rapado, L. N.; Silber, A. M.; Vilella, F. S.; Ferreira, R. S.; Maltarollo, V. G; Trossini, G. H. G. Application of bioisosterism in design of the semicarbazone derivatives: A theoretical and experimental study. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. v. 35, p. 1244 – 1259, 2016.

Wang, Y.; Gu, W.; Shanb, Y.; Liub, F.; Xu, X.; Yangc, Y.; Zhanga, Q.; Zhanga, Y.; Kuanga, H.; Wanga, Z.; Wang, S. Design, synthesis and anticancer activity of novel nopinone-based thiosemicarbazone derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 27, p. 2360 – 2363, 2017.

Weinstock, L. T.; Cheng, C. C. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 22, p. 594, 1979.

Wermuth, C. G.; Wermuth, C. G. *The Practice of Medicinal Chemistry*, 3 ed.; Elsevier Ltd., 2008.

Werneck, G. L., Expansão geográfica da leishmaniose visceral no Brasil/ Geographic spread of visceral leishmaniasis in Brazil. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 26 (4), p. 644 - 645, 2010.

WHO. TDR Disease Reference Group on Chagas Disease Human African Trypanosomiasis and Leishmaniasis. Research priorities for Chagas disease, human African trypanosomiasis and leishmaniasis. World Health Organization, 2012.

WHO. Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases: second WHO report in neglected tropical diseases. Geneva: World Health Organization; 2013.

WHO. Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. v. 90 (6), p. 33 – 43, 2015.

WHO (World Health Organization). Global report for research on infectious diseases of poverty, 2012.

World Health Organization. Leishmaniasis. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>. Última revisão: Abril 2017. Acesso em: 10 janeiro 2018.

Weekly epidemiological record Relevé épidémiologique hebdomadaire. Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates, v. 90 (6), p. 33 – 44, 2015.

Zaki, Y. H.; Sayed, A. R.; Elroby, S. A. Regioselectivity of 1,3-dipolar cycloadditions and antimicrobial activity of isoxazoline, pyrrolo[3,4-d] isoxazole-4,6-diones, pyrazolo[3,4-d]pyridazines and pyrazolo[1,5-a]pyrimidines. Chemistry Central Journal, p. 1 – 13, 2016.

ANEXO A – ESPECTRO DE RMN DE ^1H 300 MHz, 30a

O solvente utilizado nos intermediários (30a e 31a) para as análises de RMN de ^1H e ^{13}C foi o CDCl_3 (Clorofórmio deuterado)

Q0202_1

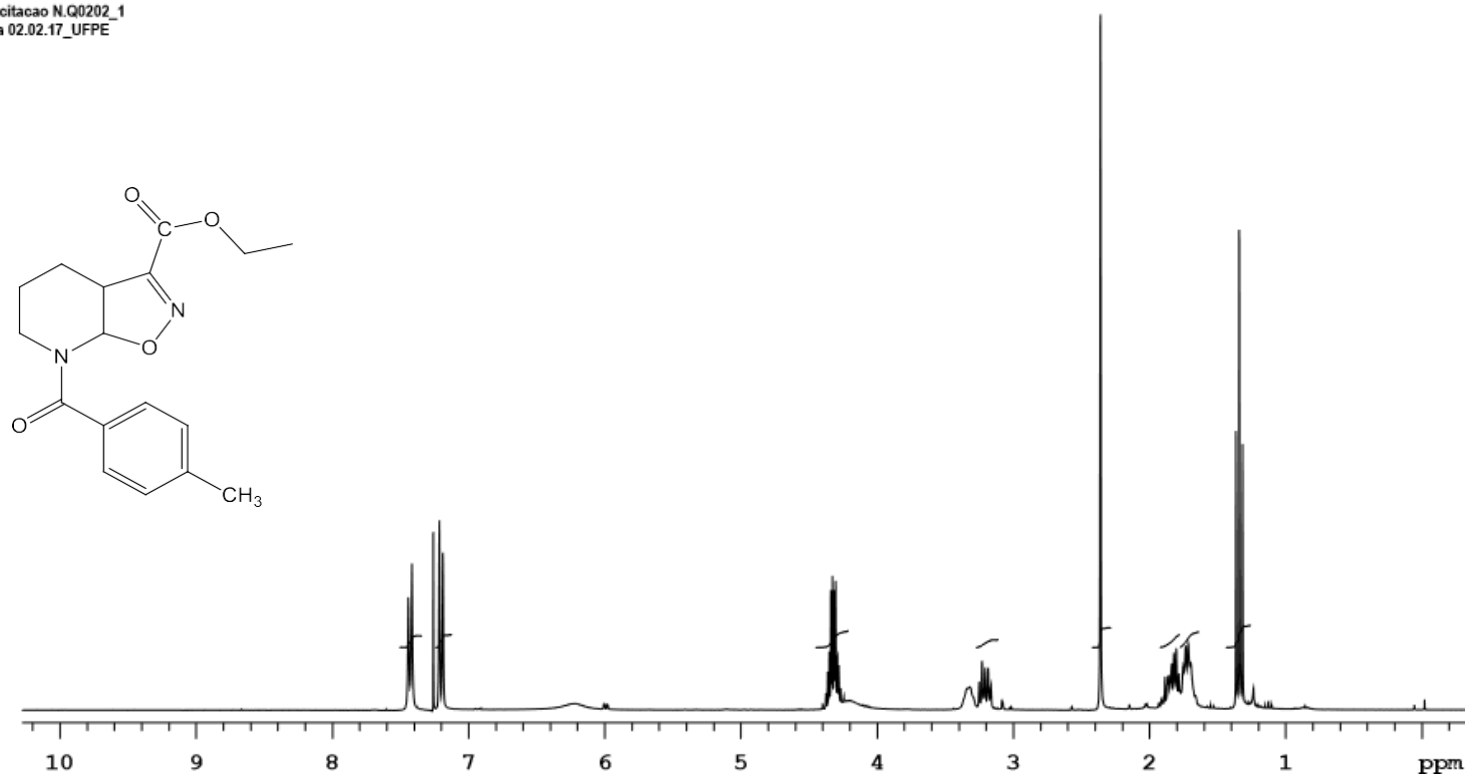
Sample Name Q0202_1
Date collected 2018-02-02

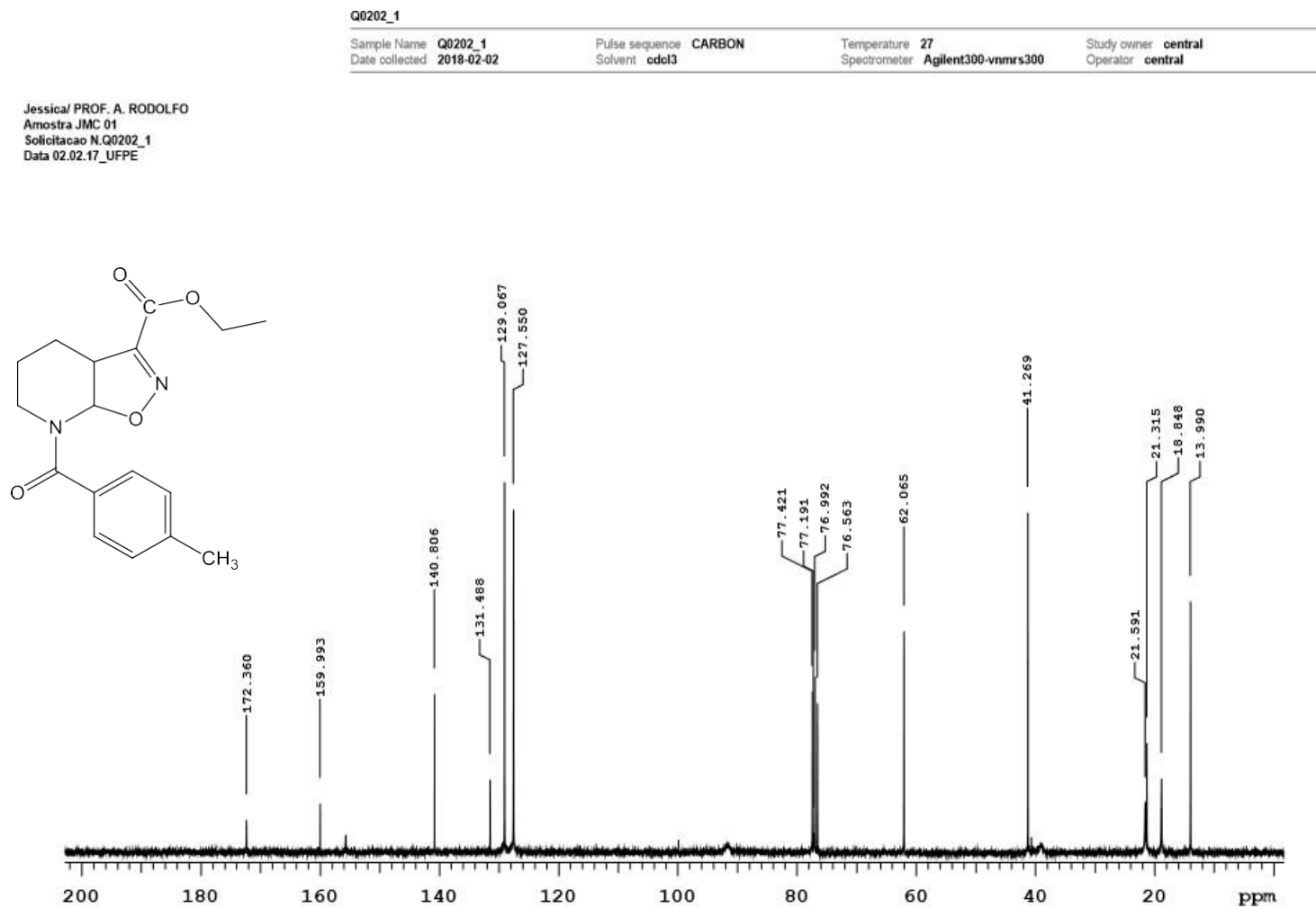
Pulse sequence PROTON
Solvent cdcl3

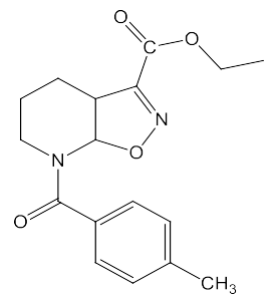
Temperature 27
Spectrometer Agilent300-vnmrs300

Study owner central
Operator central

Jessica/ PROF. A. RODOLFO
Amostra JMC 01
Solicitacao N.Q0202_1
Data 02.02.17_UFPE



ANEXO B – ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C 75 MHz, 30a

ANEXO C – DEPT ^{13}C , 30a

Q0202_1

Sample Name Q0202_1
Date collected 2018-02-02Pulse sequence DEPT
Solvent cdcl3Temperature 27
Spectrometer Agilent300-vnmrs300Study owner central
Operator central

CH3 carbons



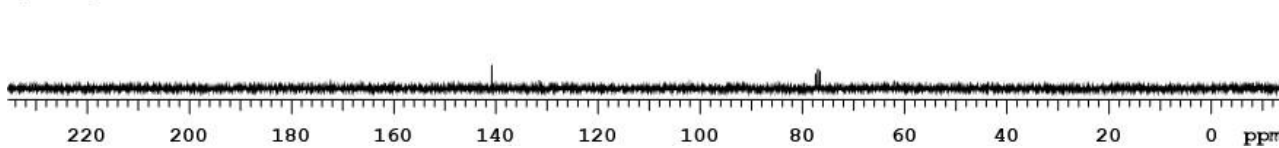
CH2 carbons

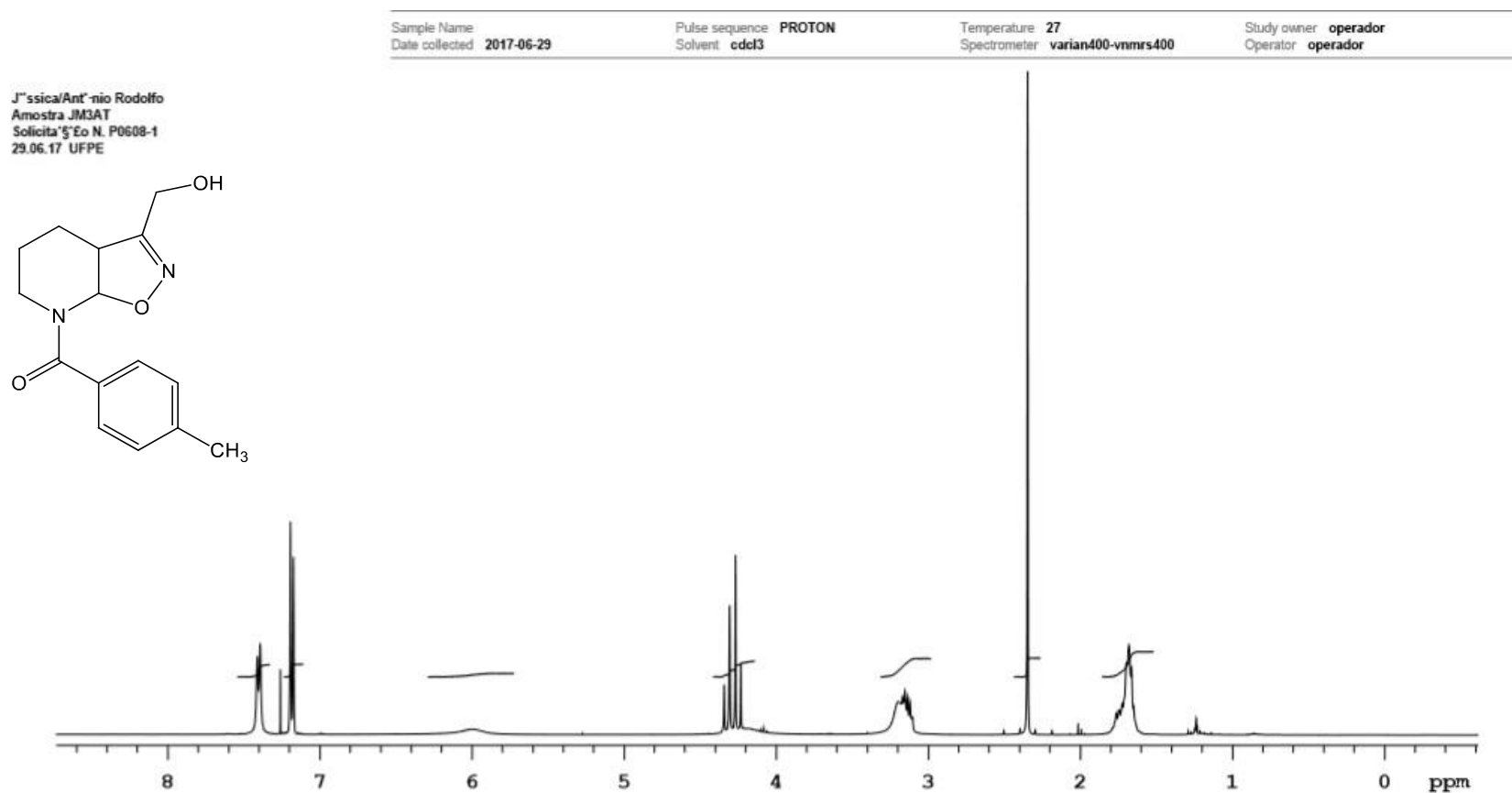


CH carbons



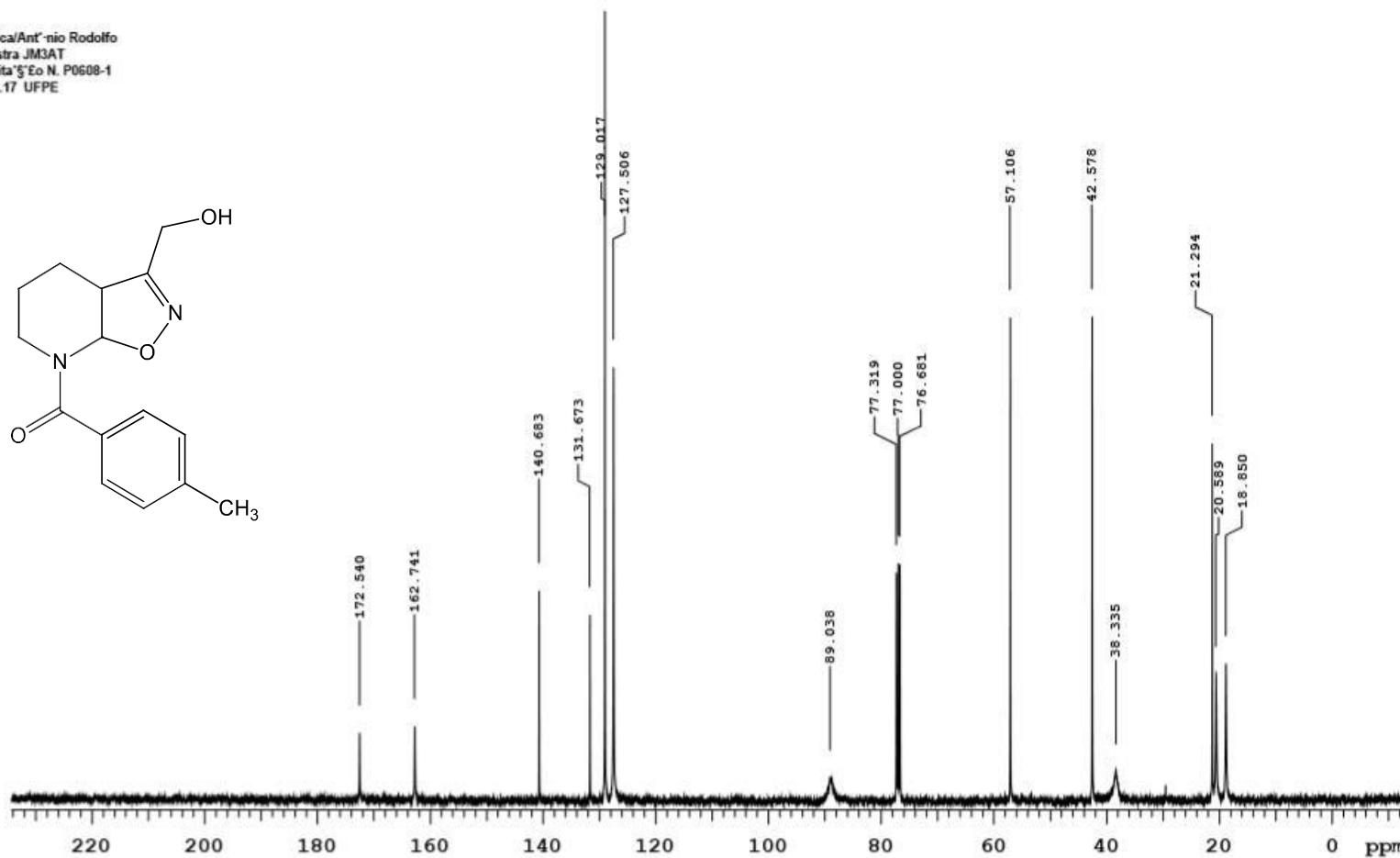
quaternary carbons

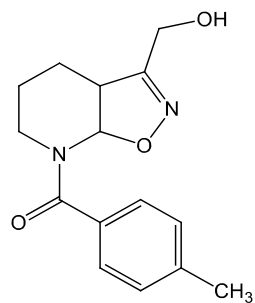


APÊNDICE A – ESPECTRO DE RMN DE ^1H 300 MHz, 31a

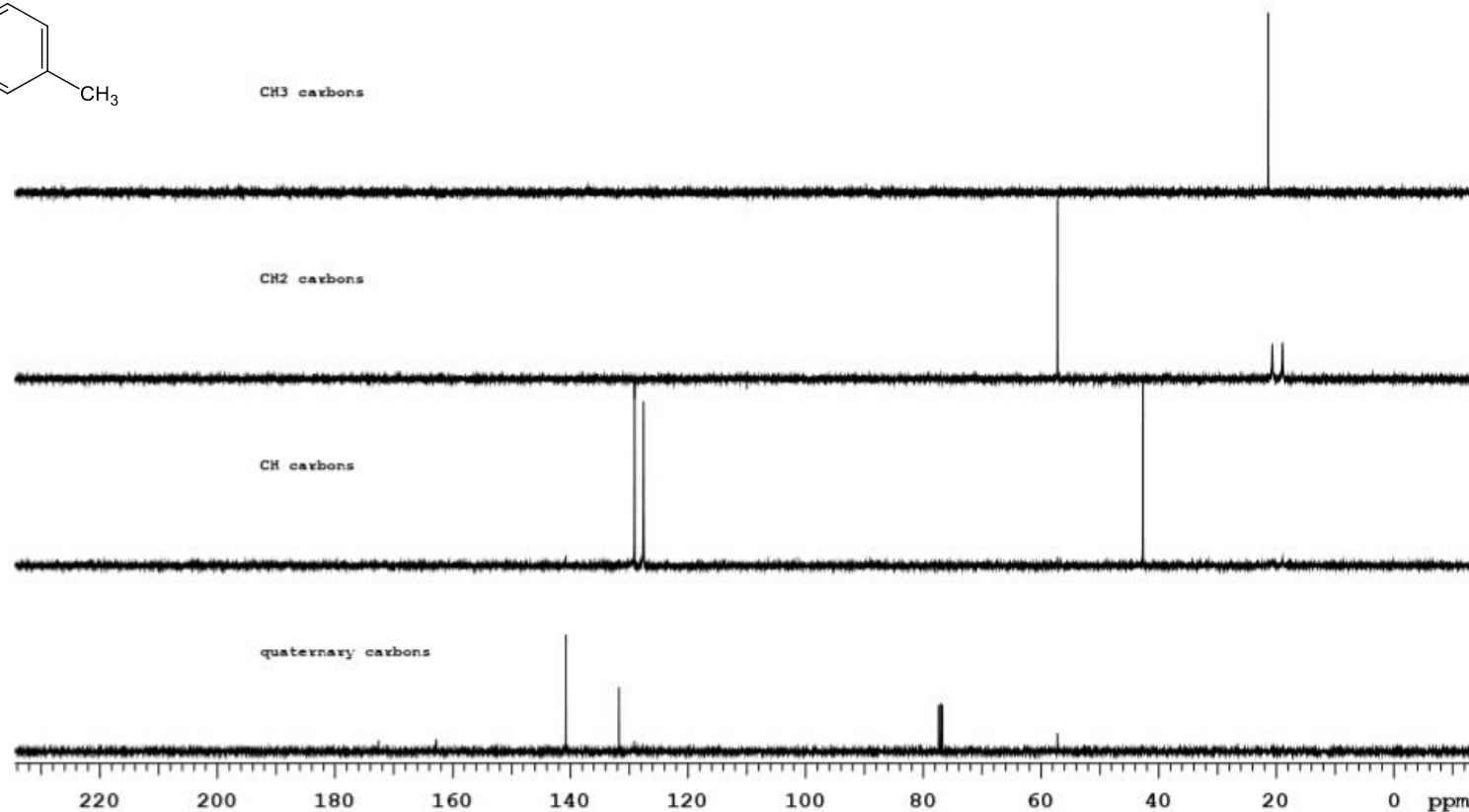
APÊNDICE B – ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C 75 MHz, 31a

J"ssica/Ant"nio Rodolfo
Amostra JM3AT
Solicita"o N. P0608-1
29.06.17 UFPE



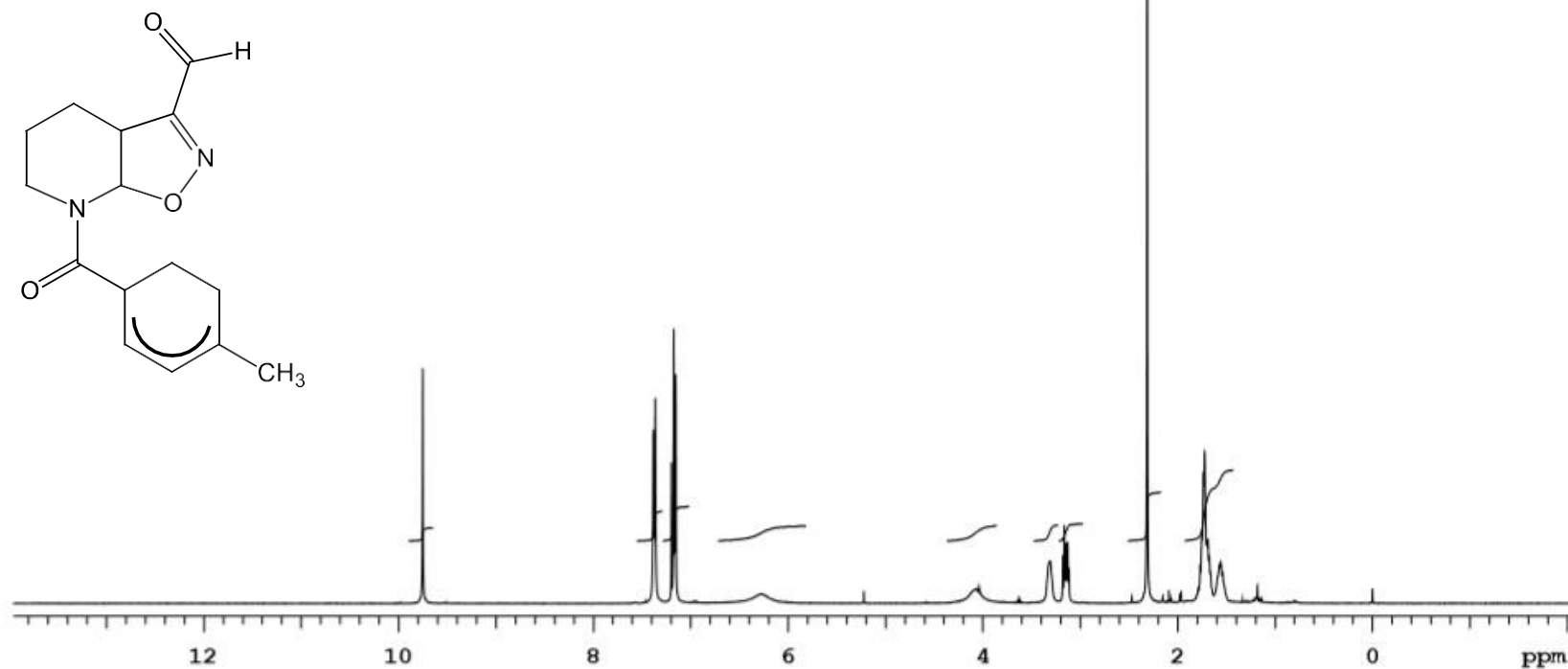
APÊNDICE C – DEPT ^{13}C , 31a

Sample Name	Pulse sequence	DEPT	Temperature	27	Study owner	operator	
Date collected	2017-06-29	Solvent	cdcl3	Spectrometer	varian400-vnmrs400	Operator	operator



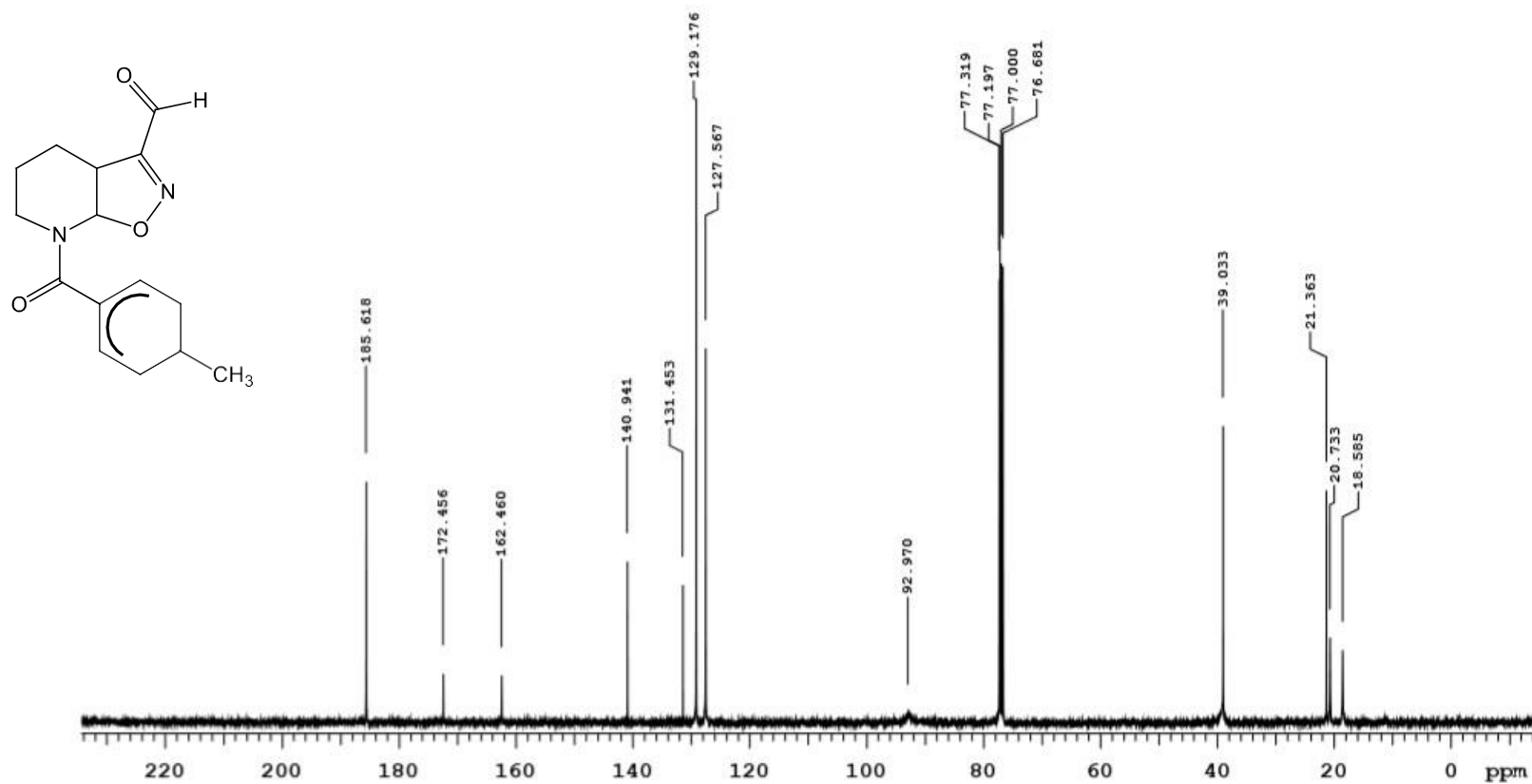
APÊNDICE D – ESPECTRO DE RMN DE ^1H 400 MHz, 32a

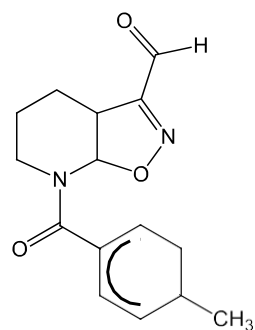
J"ssica/Antonio Rodolfo
Amostra JMO1D
Solicitacao N. P0627-133
Data 10.07.17_UFPE



APÊNDICE E – ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C 100 MHz, 32a

J"ssica/Antonio Rodolfo
Amostra JMO1D
Solicitacao N. P0627-133
Data 10.07.17_UFPE



APÊNDICE E – DEPT ^{13}C , 32a

p5mmautoX_calib

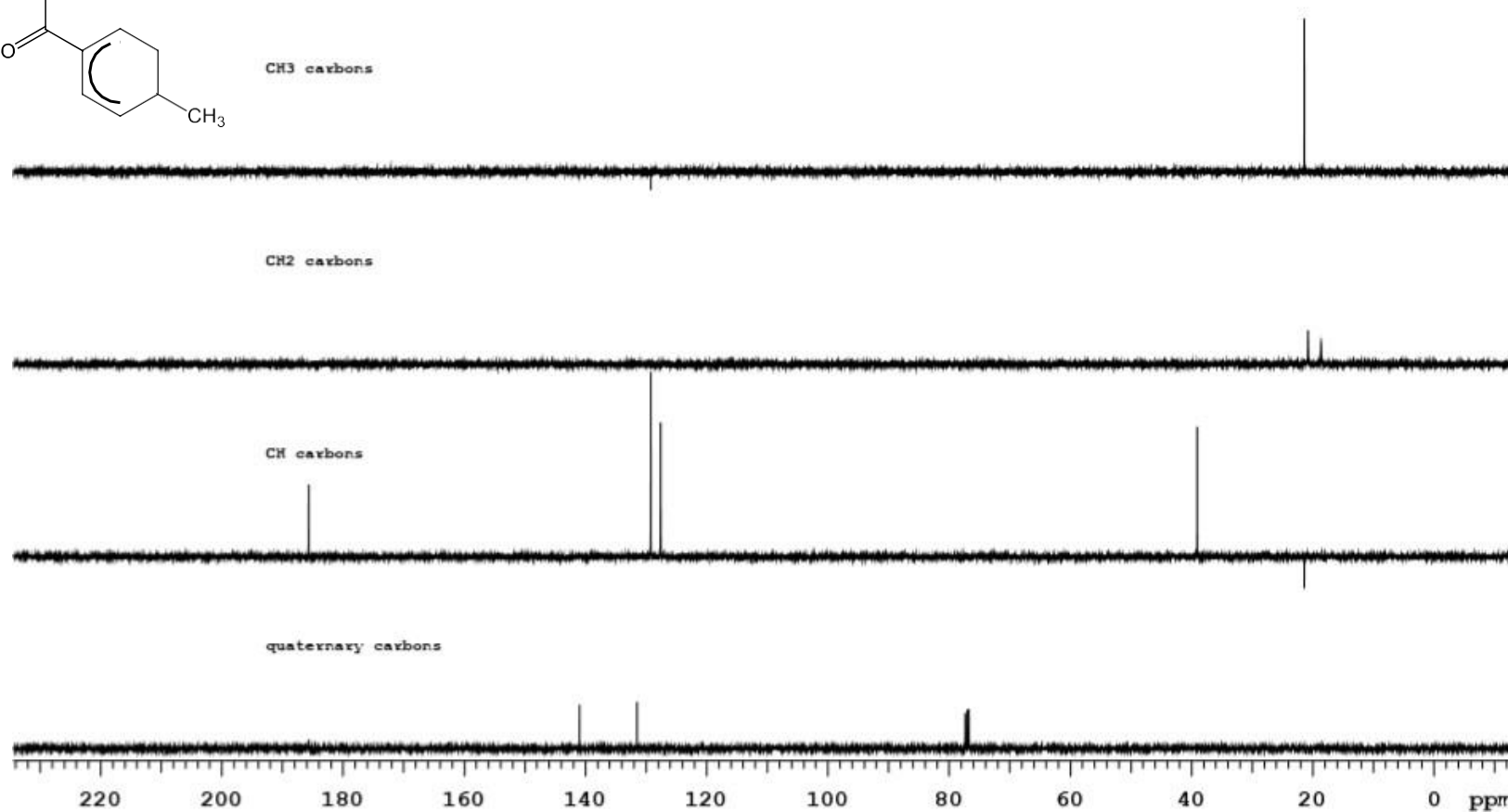
Sample Name p5mmautoX_calib
Date collected 2017-07-10Pulse sequence DEPT
Solvent cdcl3Temperature 27
Spectrometer varian400-vnmrs400Study owner vnmr1
Operator operador

CH3 carbons

CH2 carbons

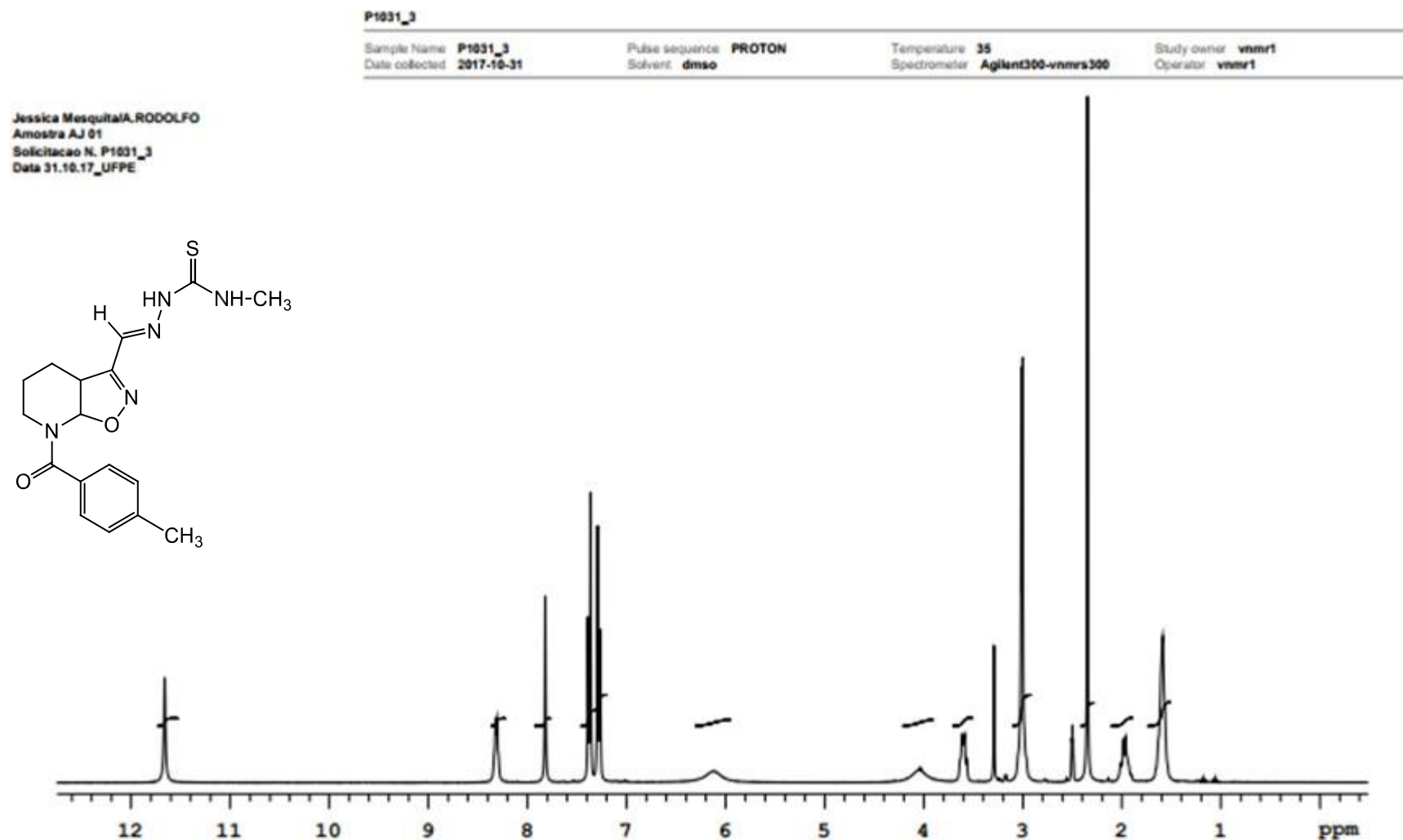
CH carbons

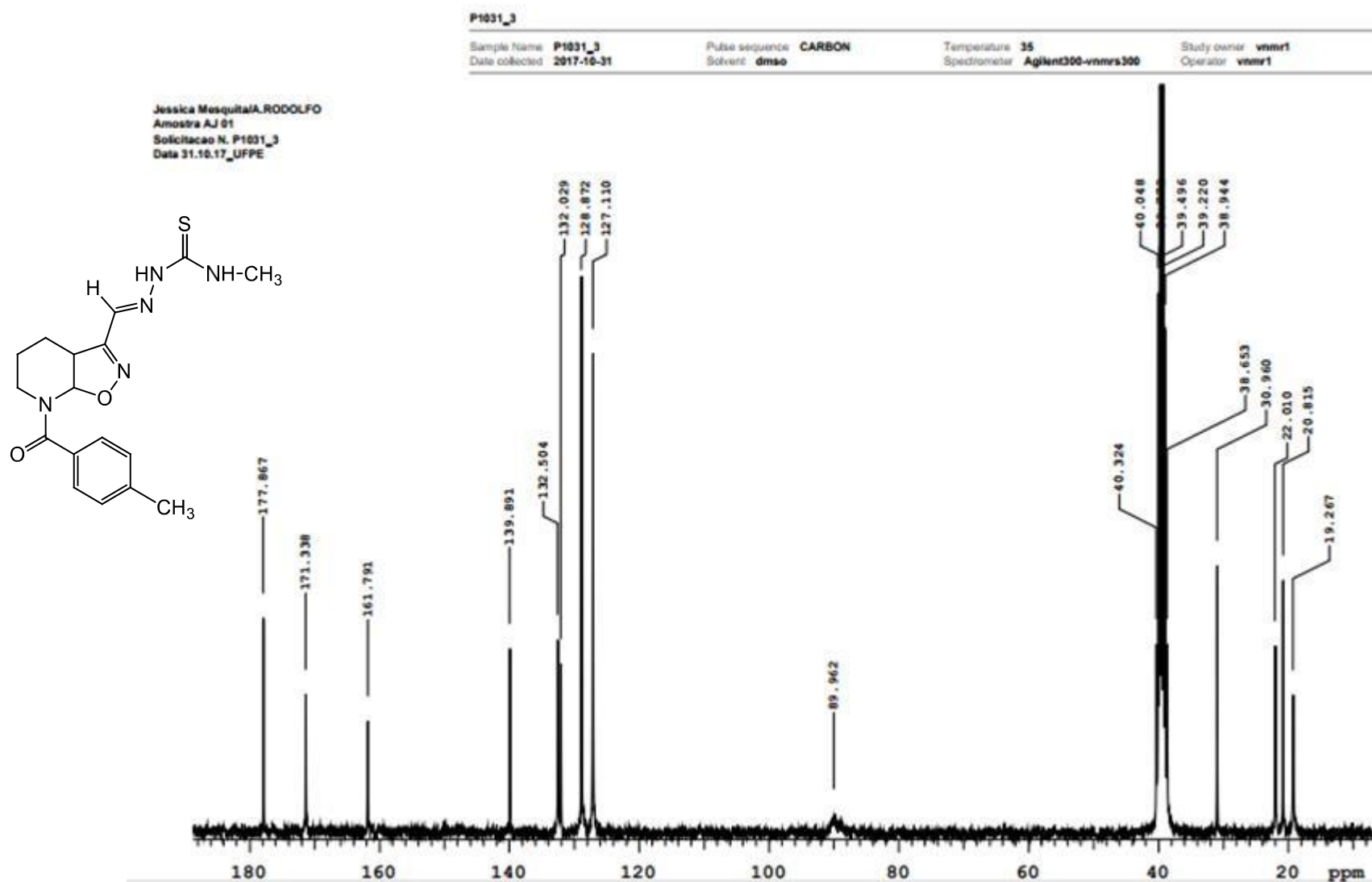
quaternary carbons

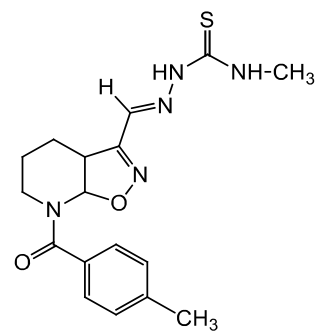


APÊNDICE G – ESPECTRO DE RMN DE ^1H 300 MHz, 33a

O solvente utilizado nos compostos finais para as análises de RMN, 1D e 2D, foi o $\text{C}_2\text{D}_6\text{OS}$ (DMSO – d_6)



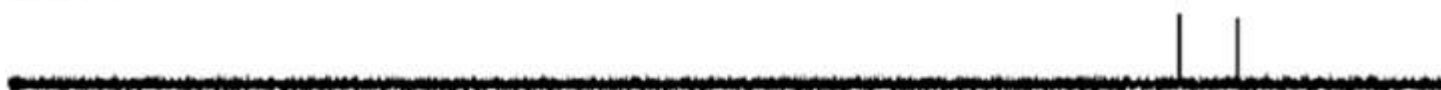
APÊNDICE H – ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C 75 MHz, 33a

APÊNDICE I – DEPT ^{13}C , 33a

P1031_3

Sample Name	P1031_3	Pulse sequence	DEPT	Temperature	35	Study owner	vnmr1
Date collected	2017-10-31	Solvent	dms	Spectrometer	Agilent300-vnmr300	Operator	vnmr1

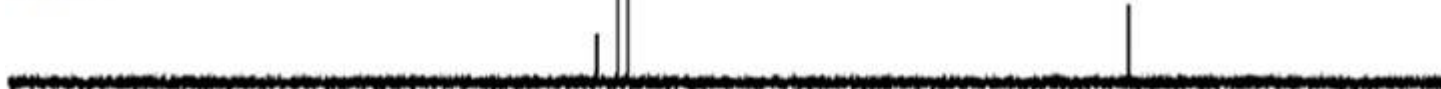
CH3 carbons



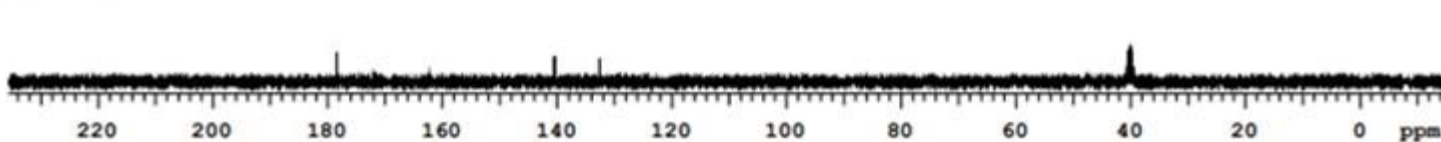
CH2 carbons

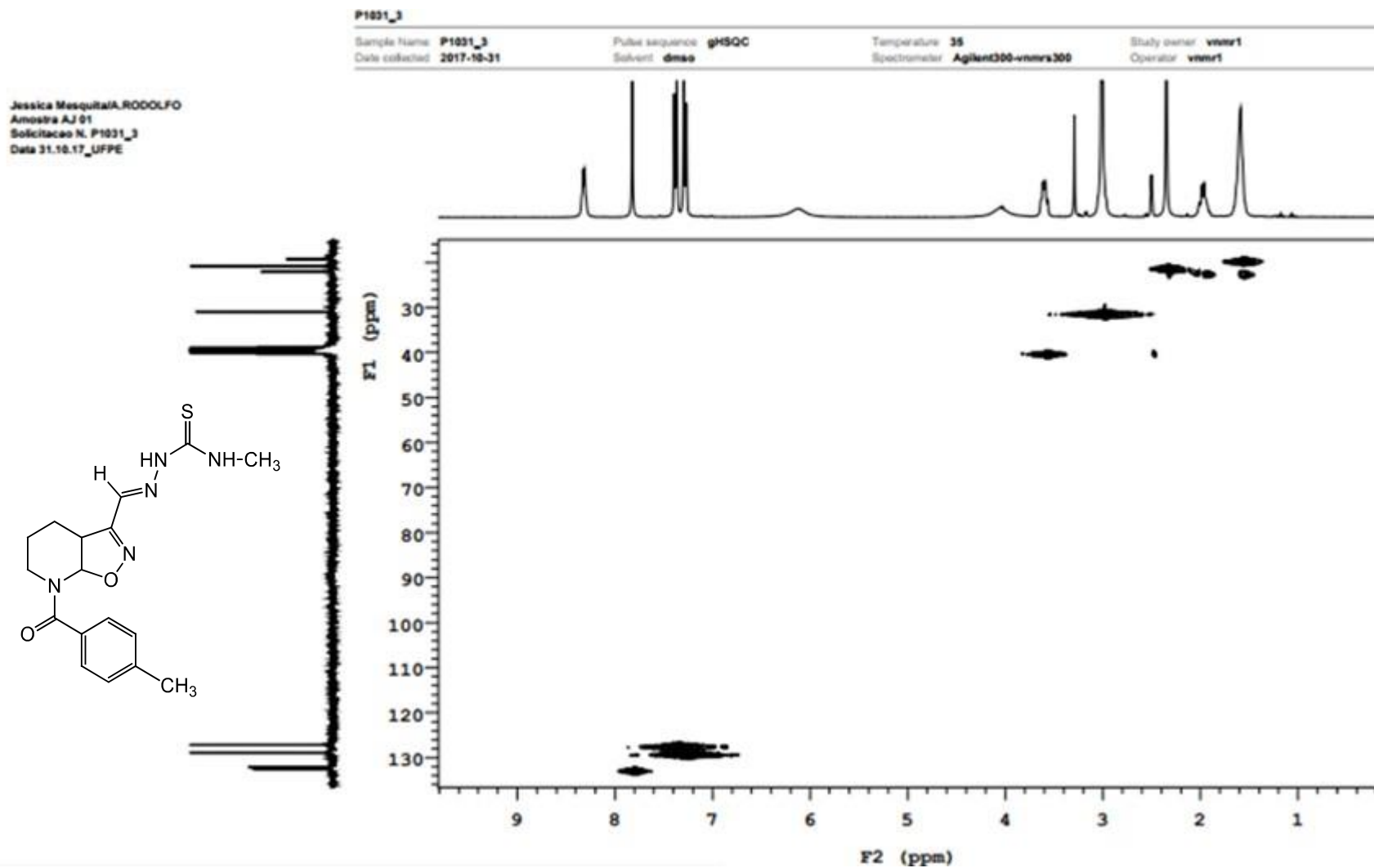


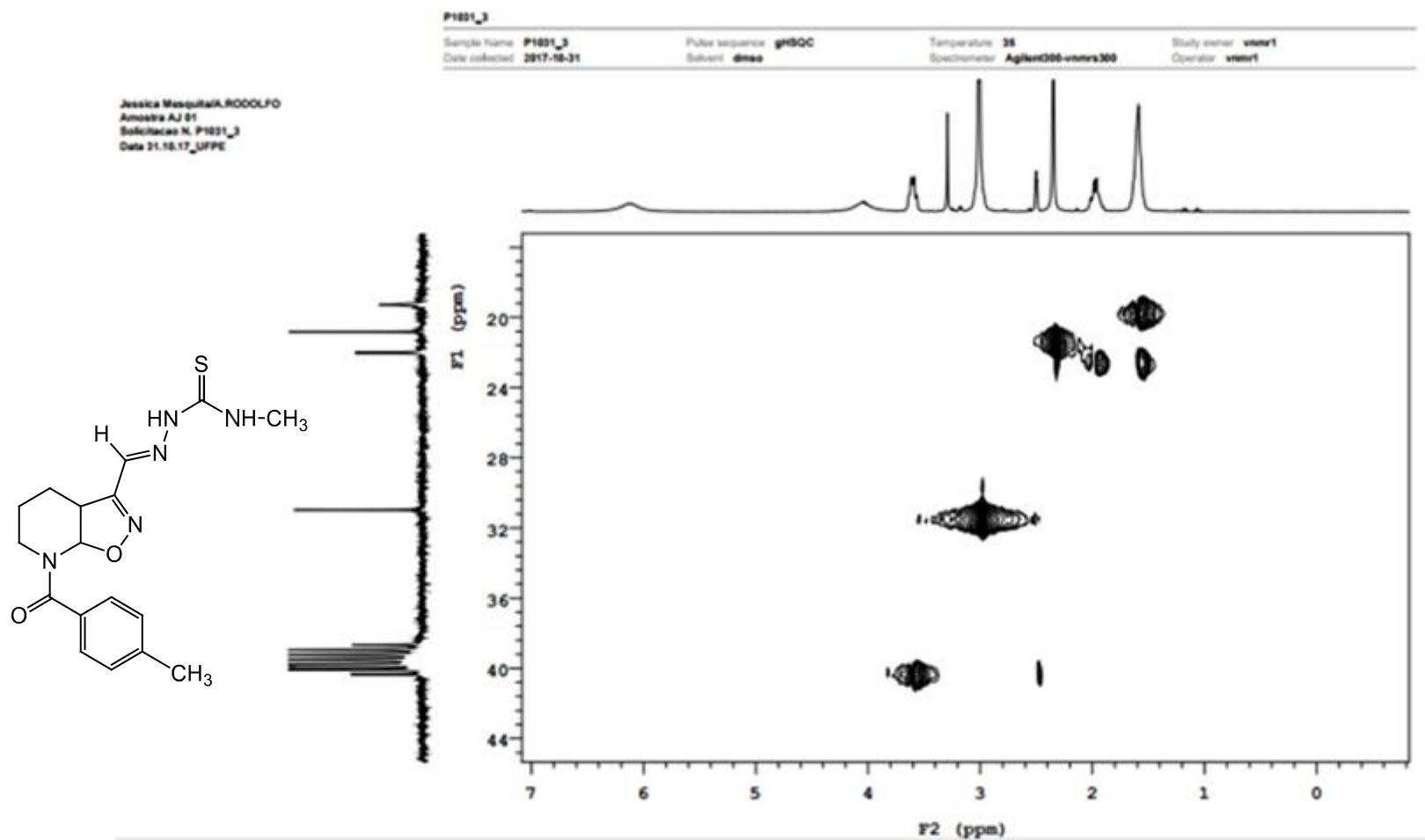
CH carbons

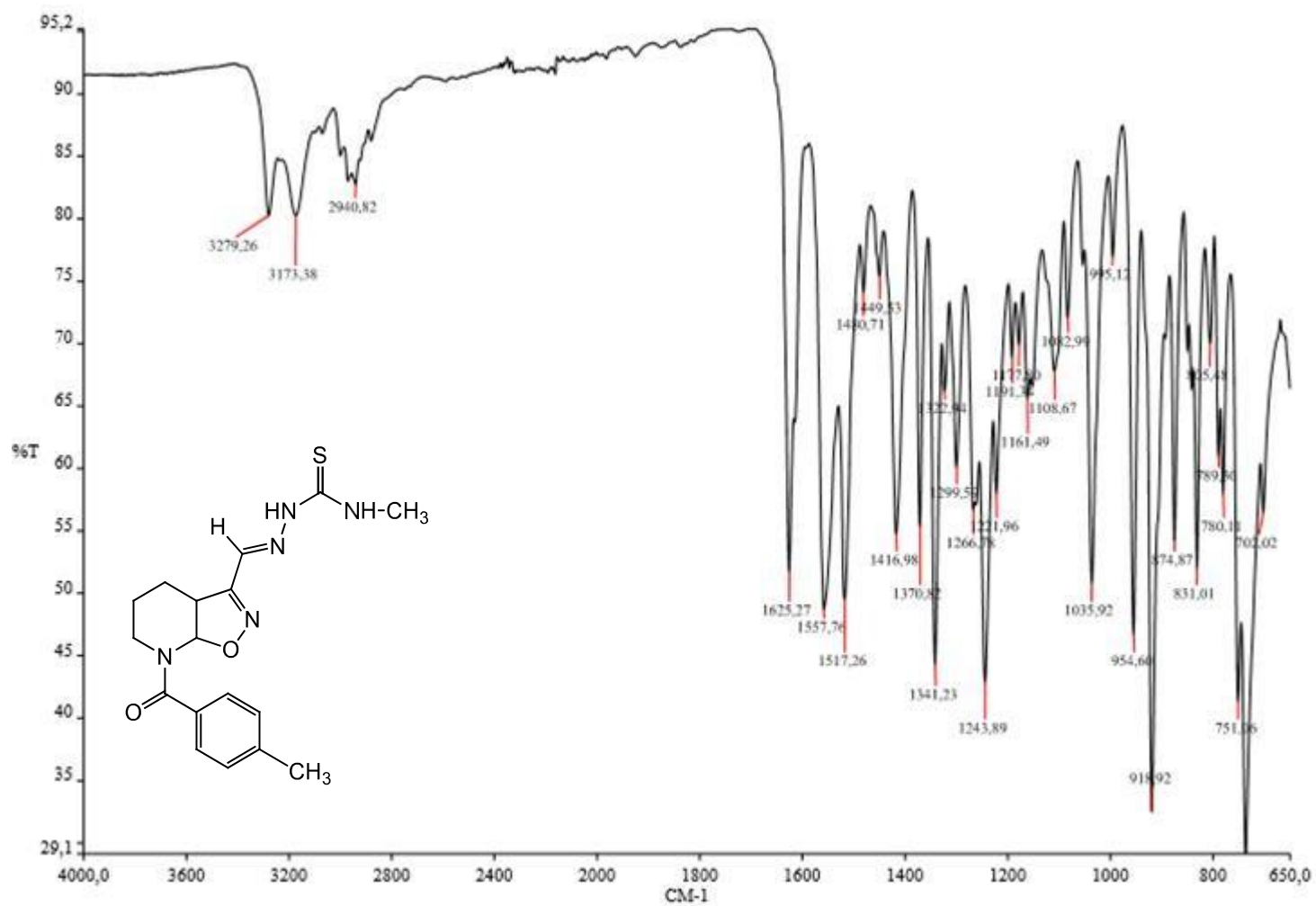


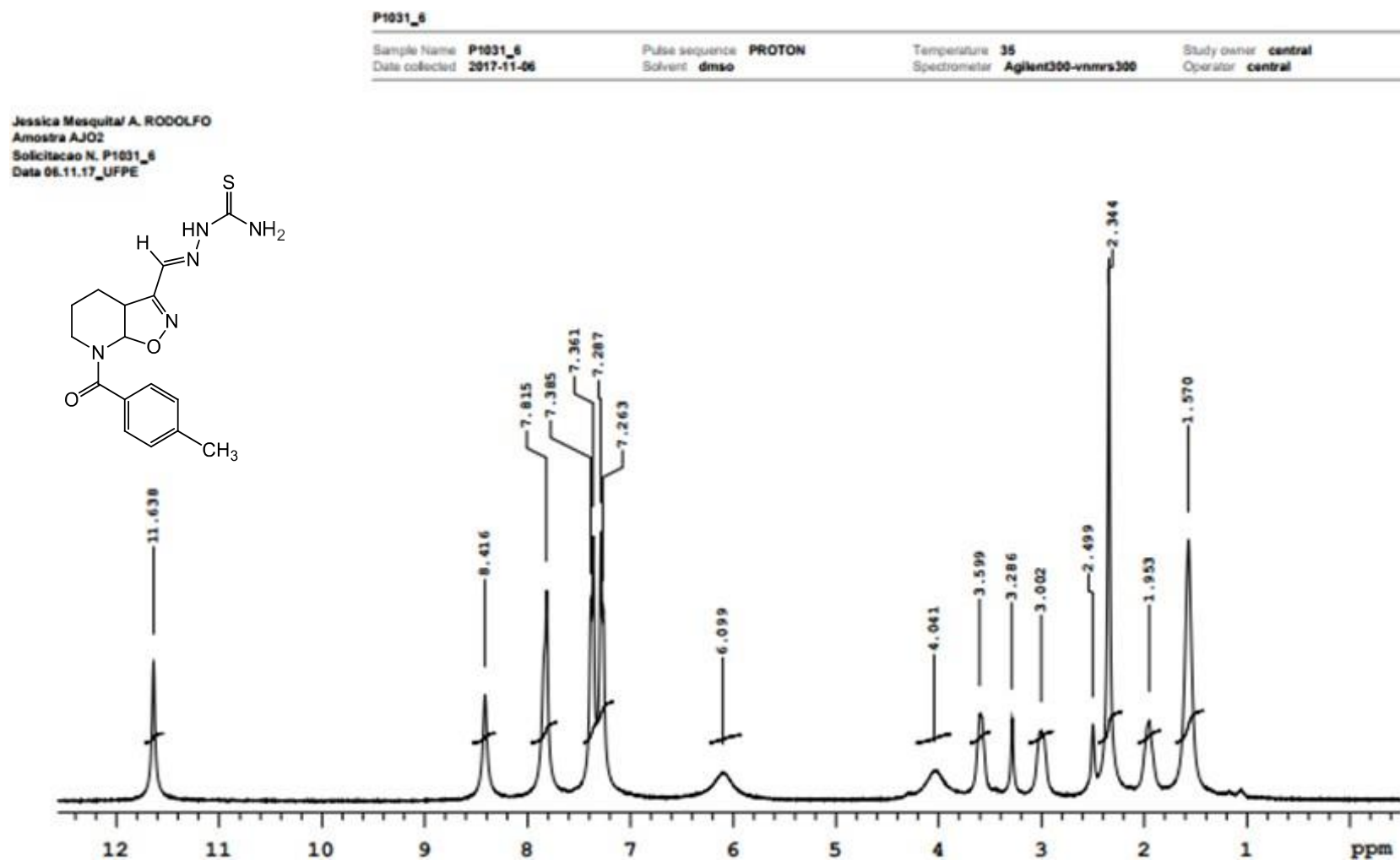
quaternary carbons

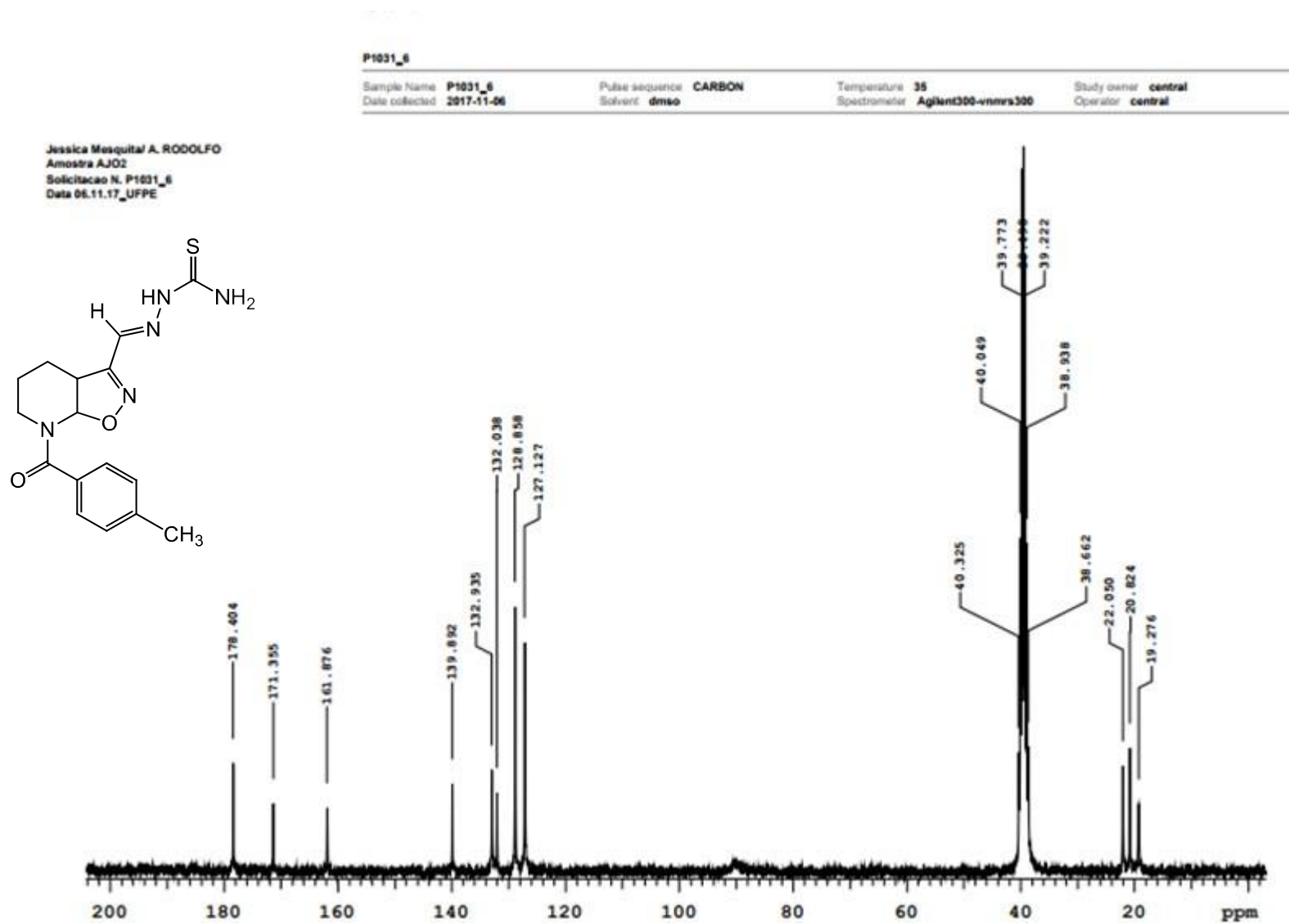


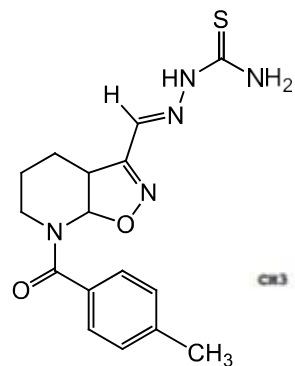
APÊNDICE J – ESPECTRO DE RMN POR CORRELAÇÃO HSQC, 33a

APÊNDICE L – ESPECTRO DE RMN POR CORRELAÇÃO HSQC, 33a

APÊNDICE M – ESPECTRO DE INFRAVERMELHO, 33a

APÊNDICE N – ESPECTRO DE RMN DE ^1H 300 MHz, 33b

APÊNDICE Q – ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C 75 MHz, 33b

APÊNDICE P – DEPT ^{13}C , 33b

P1031_6

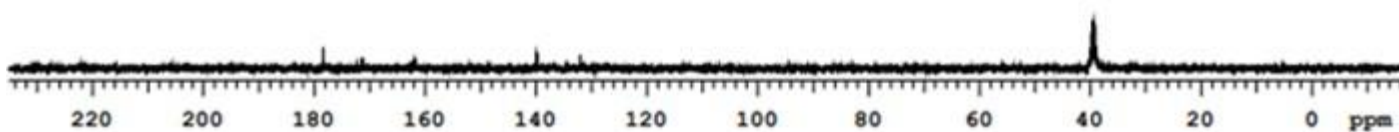
Sample Name: P1031_6
Date collected: 2017-11-06Pulse sequence: DEPT
Solvent: dmsdTemperature: 35
Spectrometer: Agilent300-nmr300Study owner: central
Operator: central

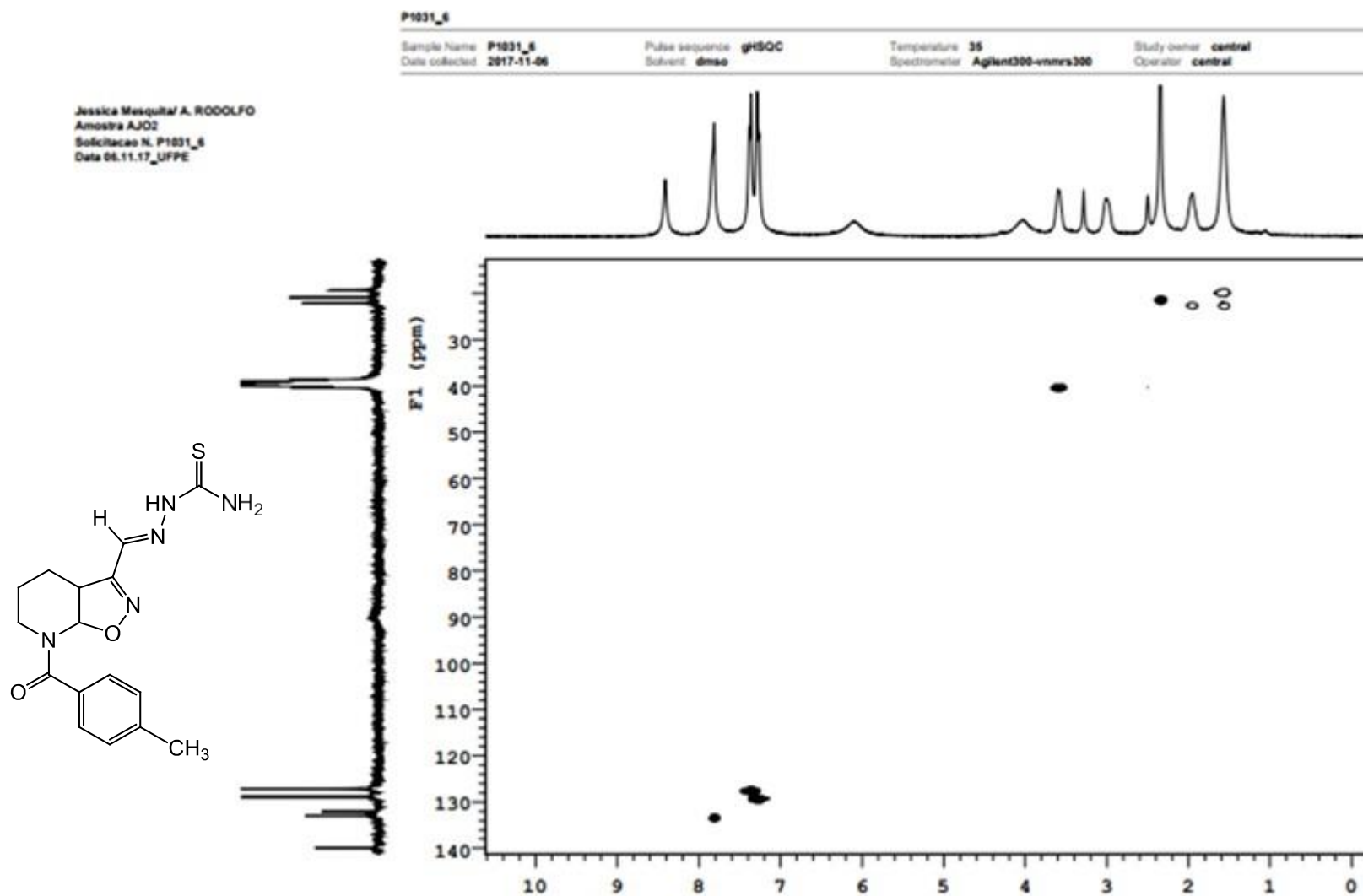
CH3 carbons

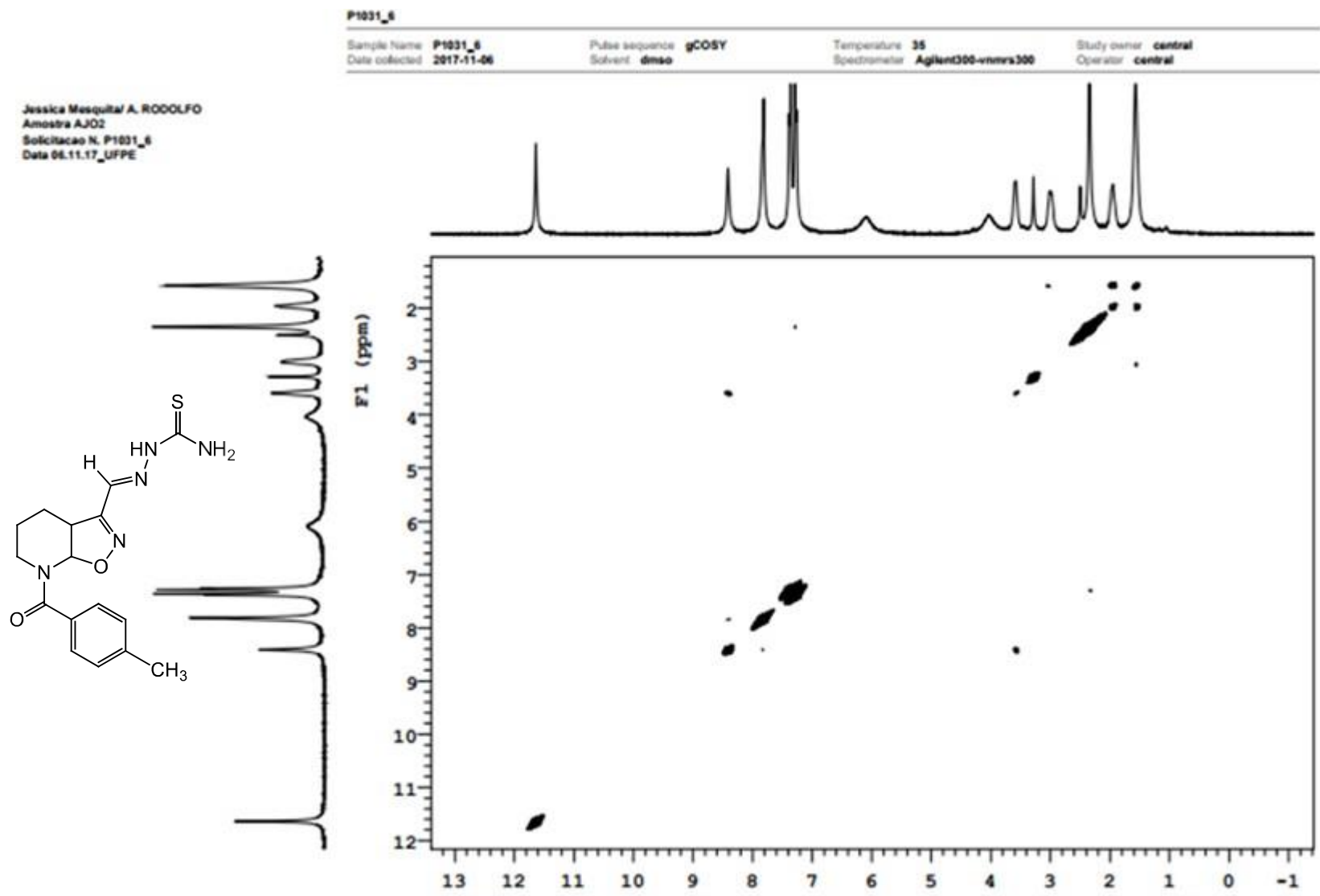
CH2 carbons

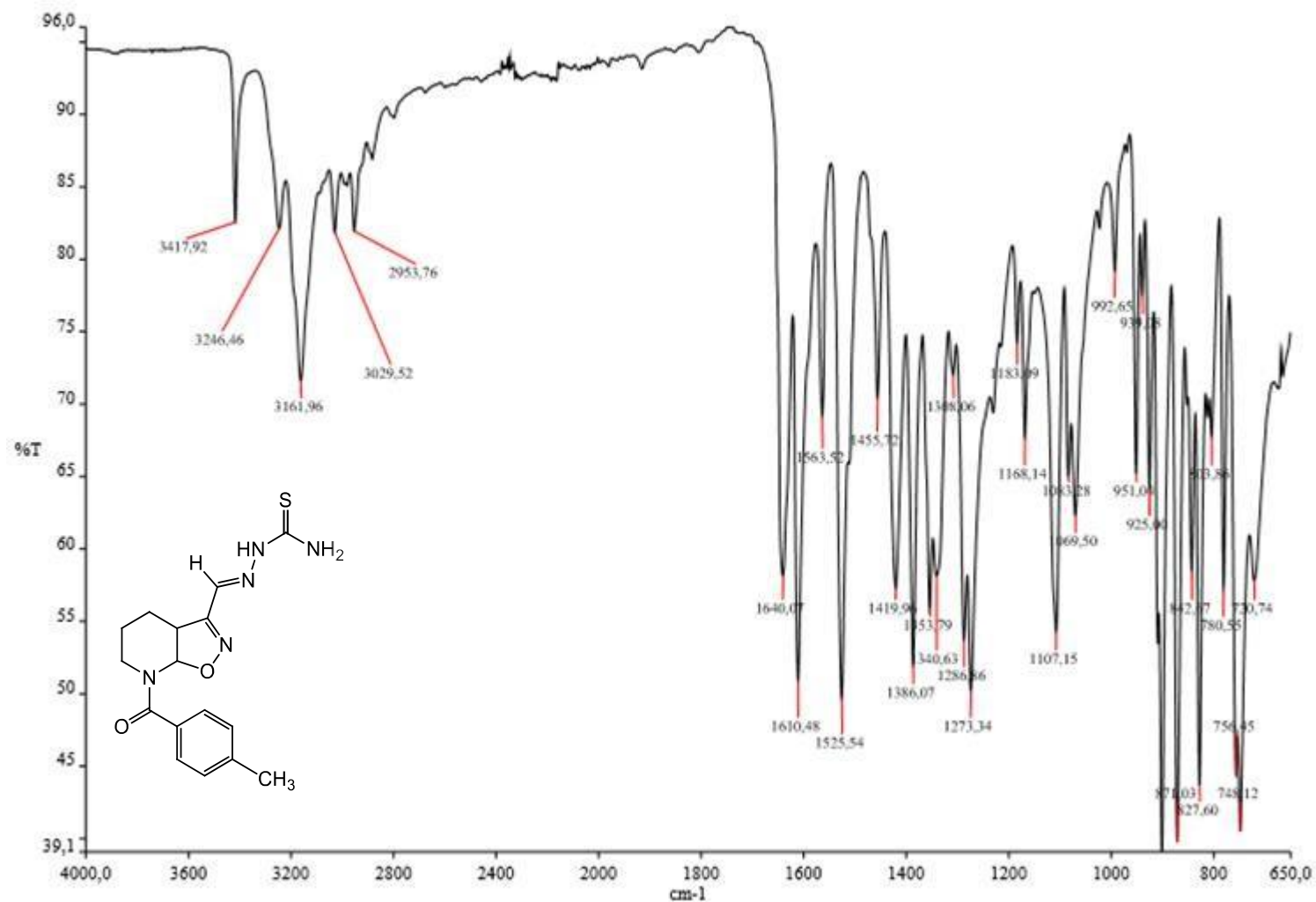
CH carbons

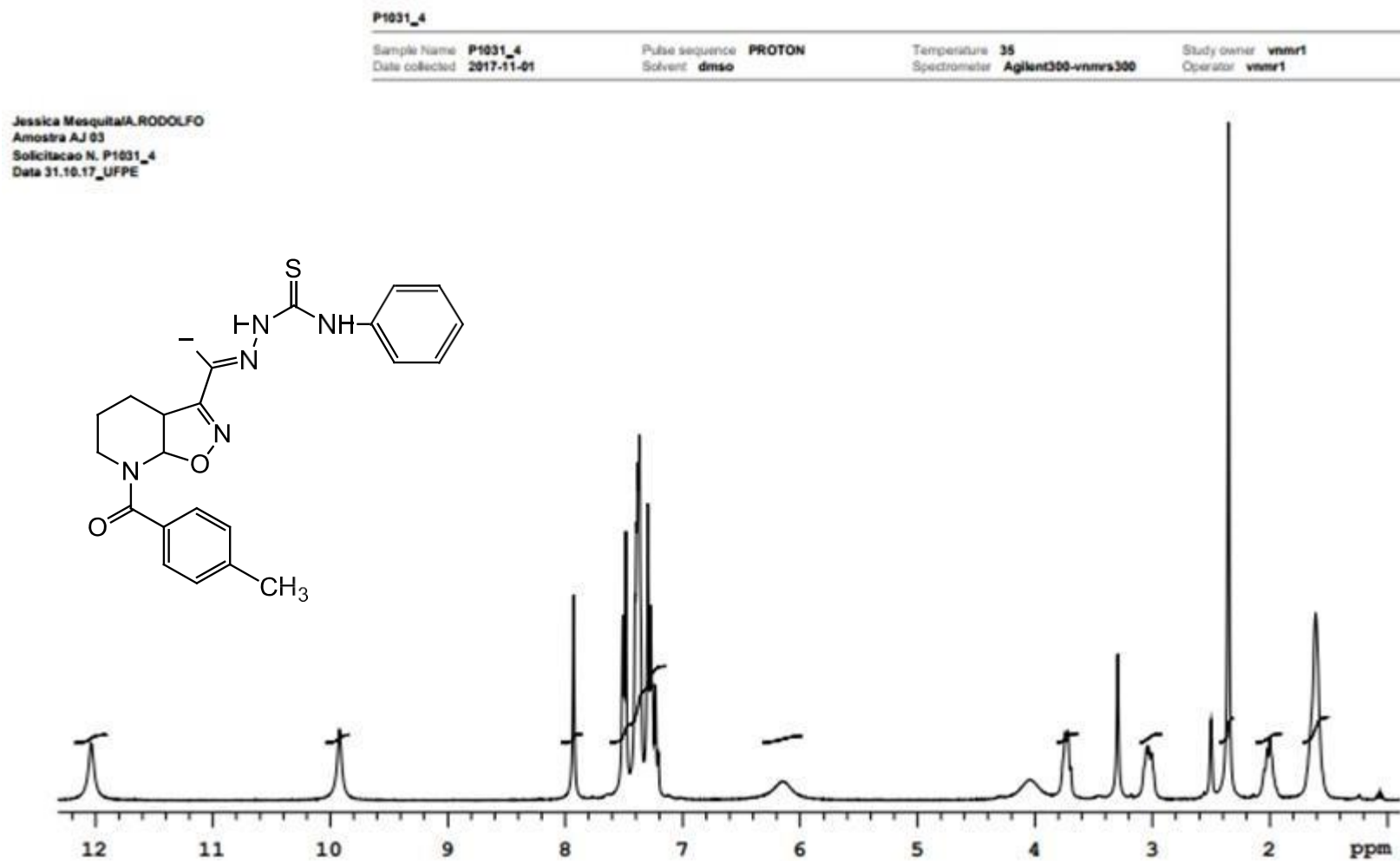
quaternary carbons

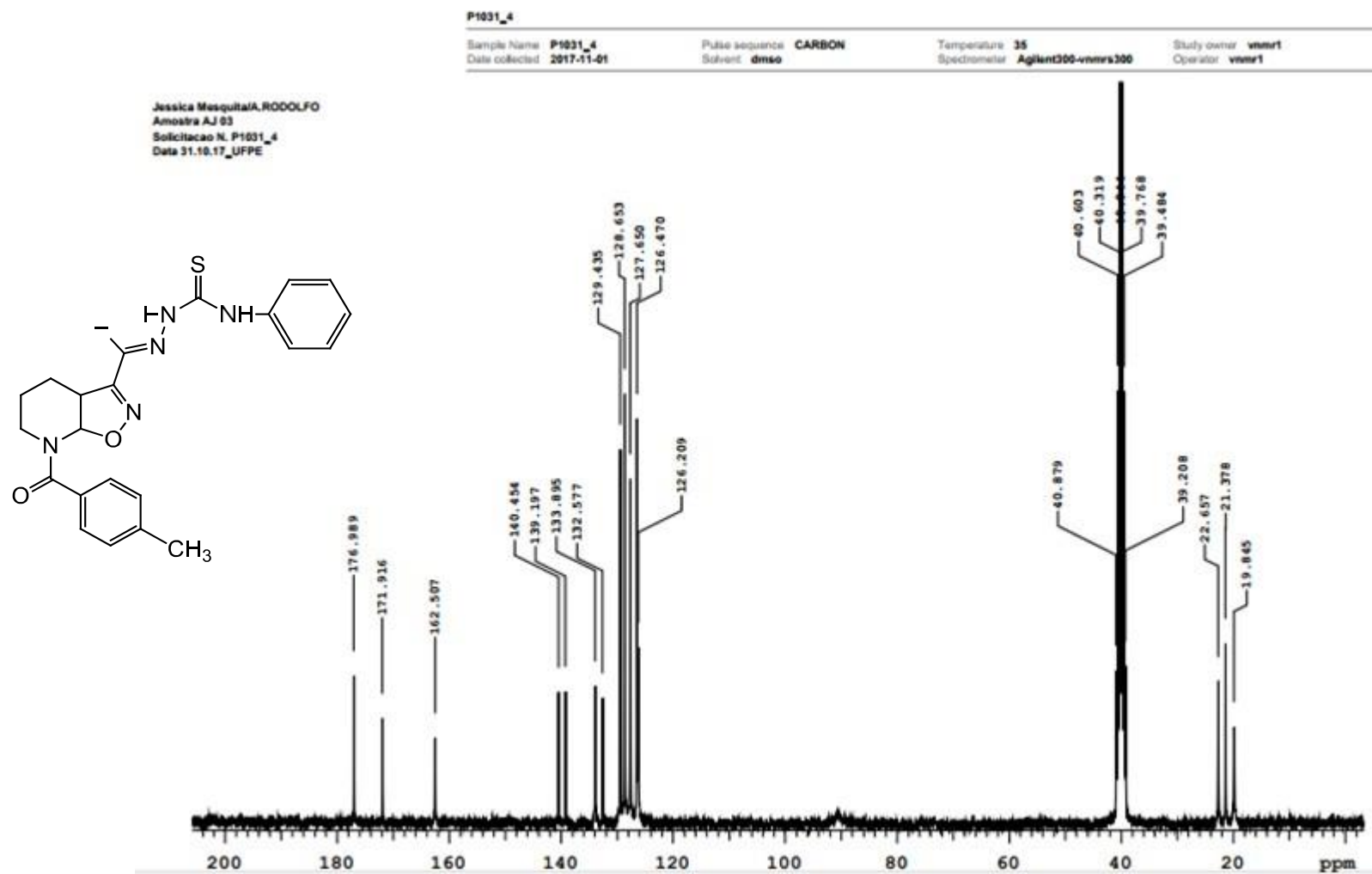


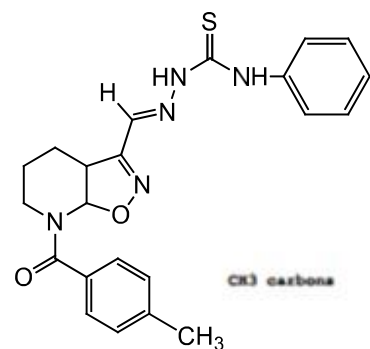
APÊNDICE Q – ESPECTRO DE RMN POR CORRELAÇÃO HSQC, 33b

APÊNDICE R – RMN DE ^1H E ESPECTRO BIDIMENSIONAL COSY, 33b

APÊNDICE S – ESPECTRO DE INFRAVERMELHO, **33b**

APÊNDICE I – ESPECTRO DE RMN DE ^1H 300 MHz, 33c

APÊNDICE U – ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C 75 MHz, 33c

APÊNDICE V – DEPT ^{13}C , 33c

P1051_4

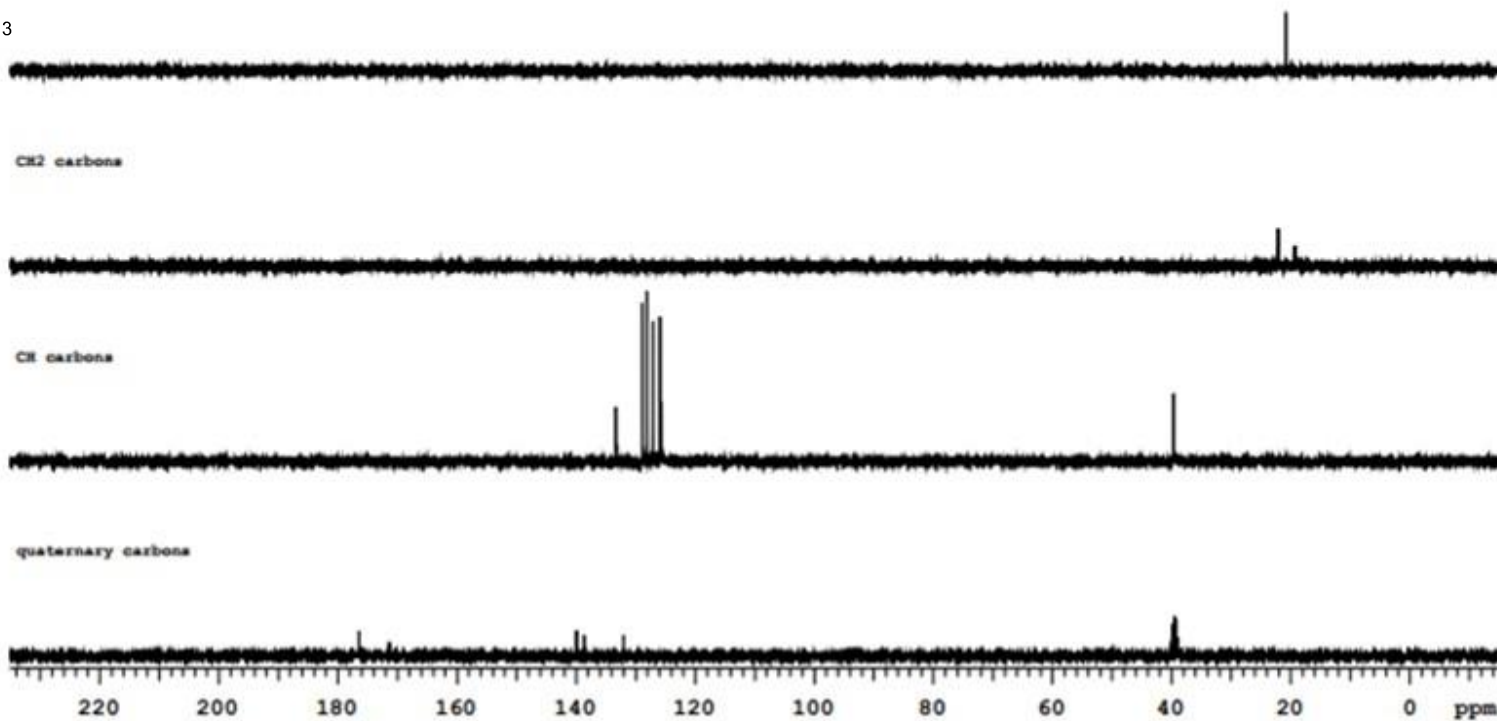
Sample Name: P1051_4
Date collected: 2017-11-01Pulse sequence: DCPT
Solvent: dmsdTemperature: 95
Spectrometer: Agilent300-nmr300Study owner: vnmr1
Operator: vnmr1

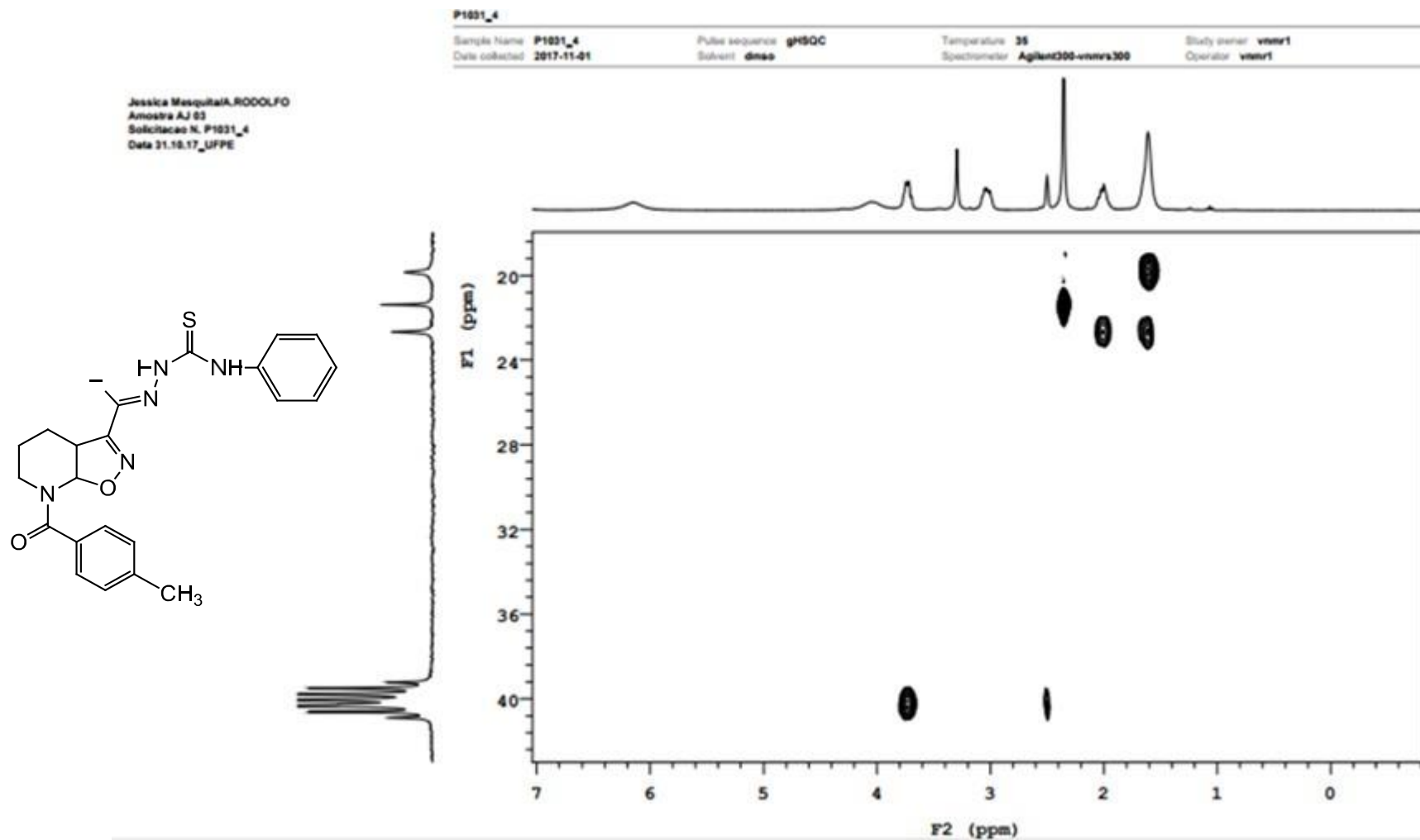
CH3 carbons

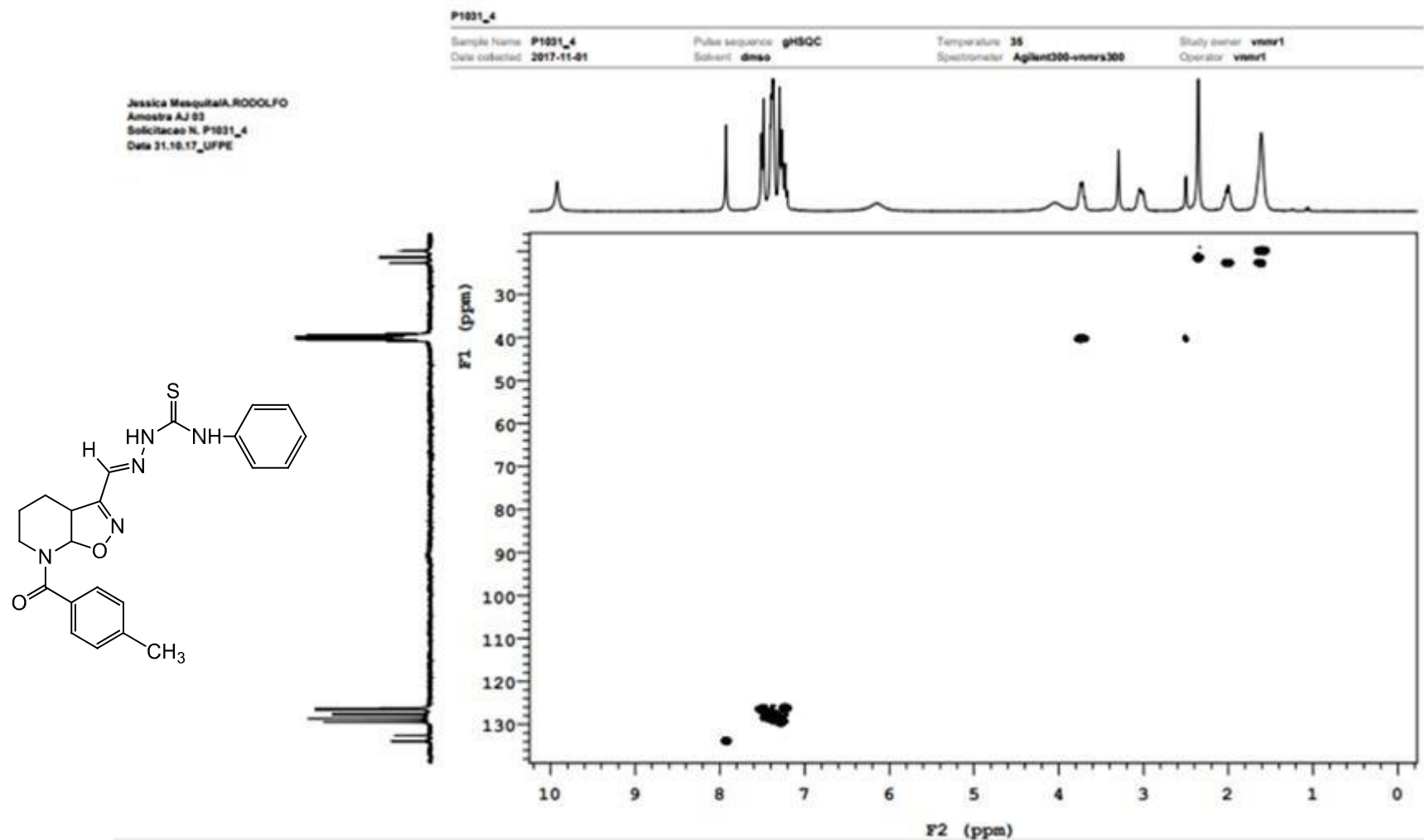
CH2 carbons

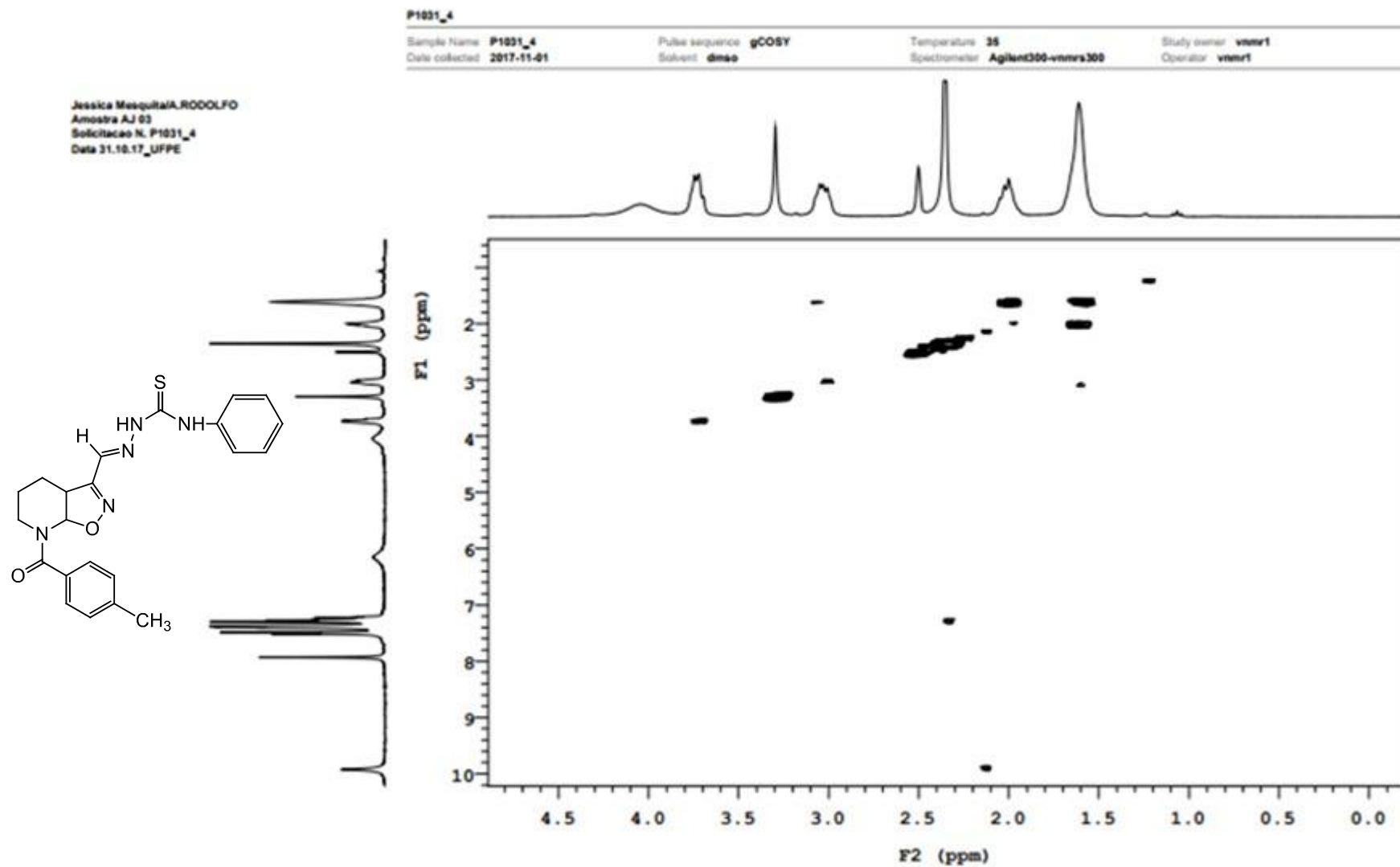
CH carbons

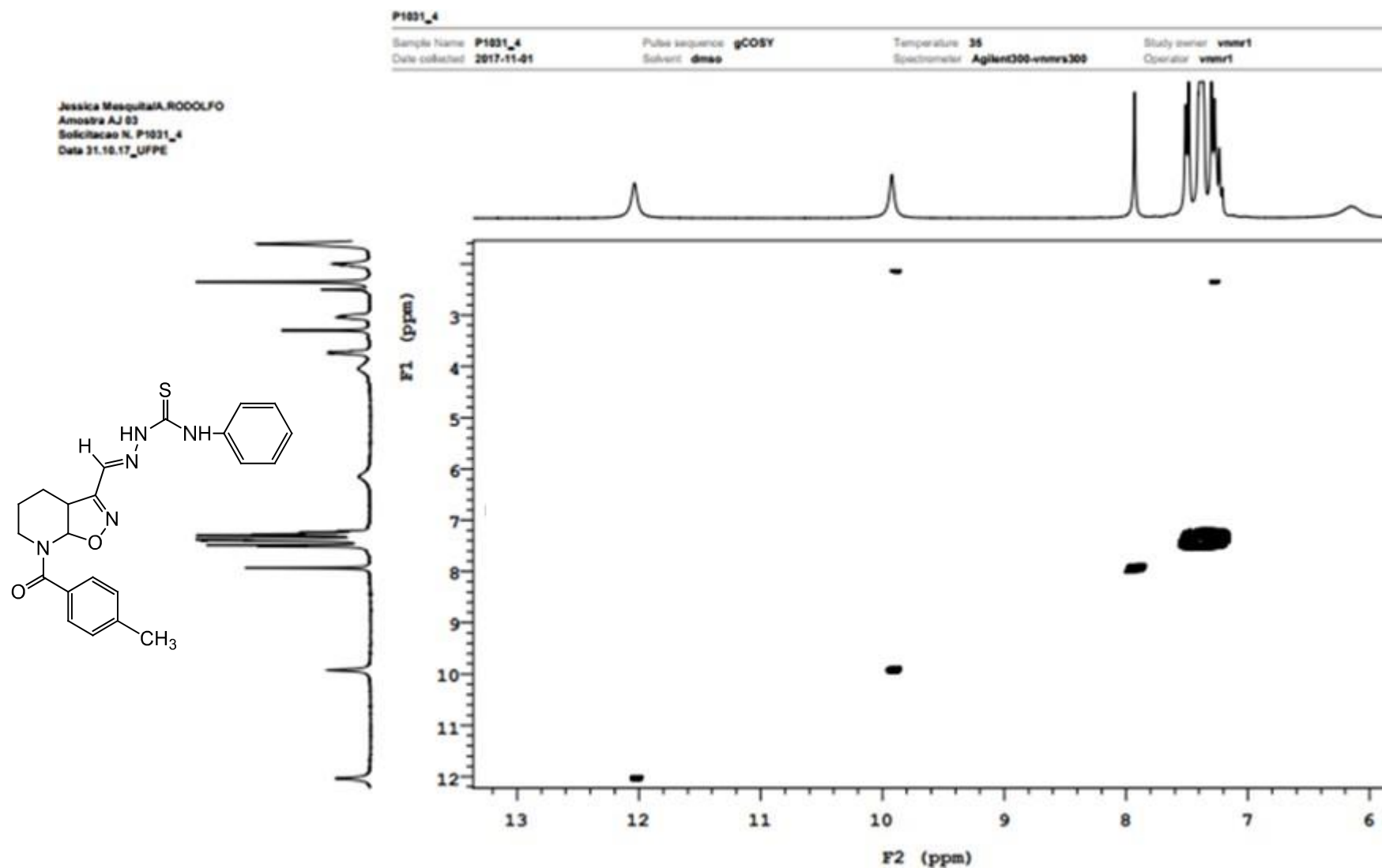
quaternary carbons

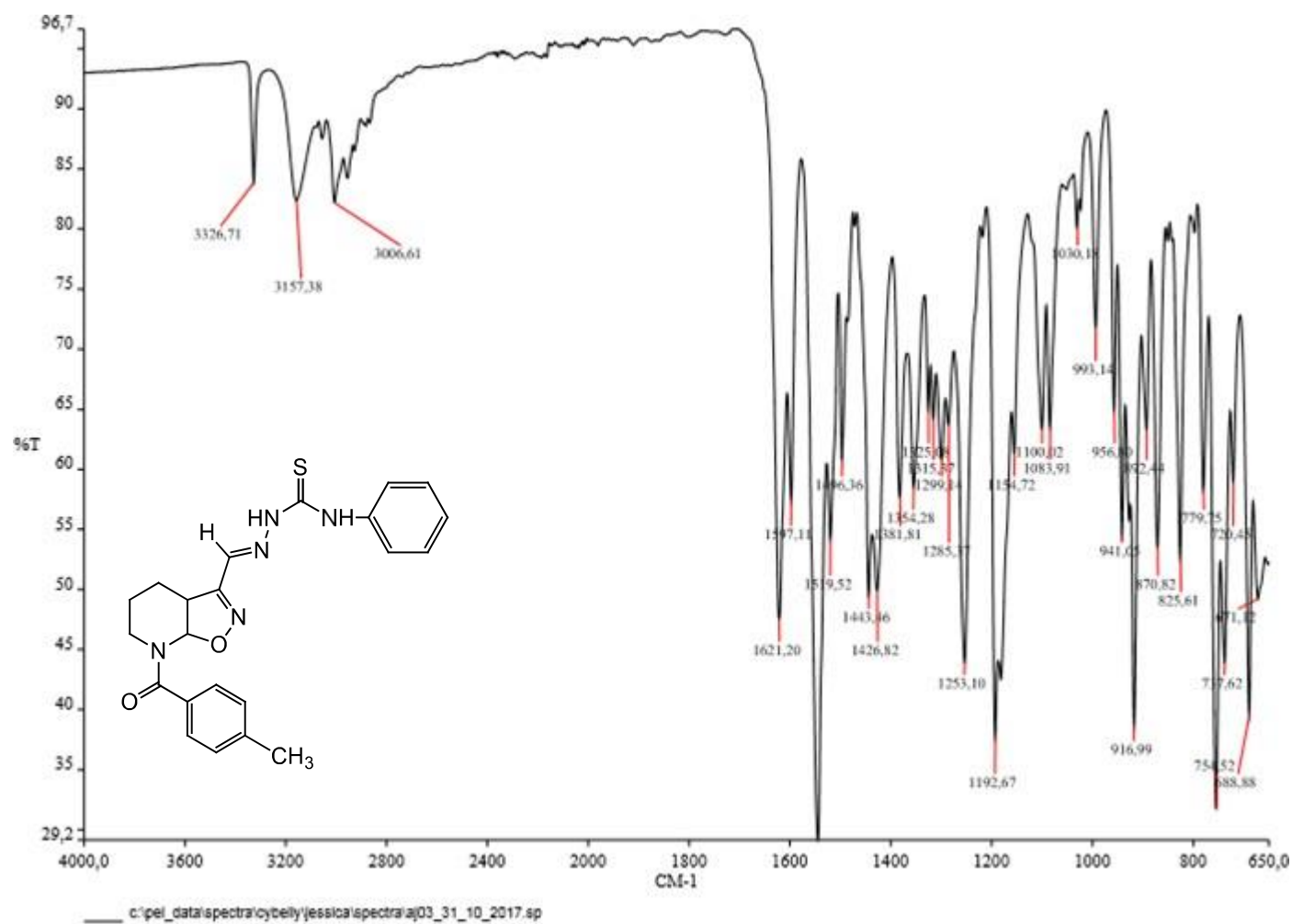


APÊNDICE X – ESPECTRO DE RMN POR CORRELAÇÃO HSQC, 33c

APÊNDICE Z – ESPECTRO DE RMN POR CORRELAÇÃO HSQC, 33c

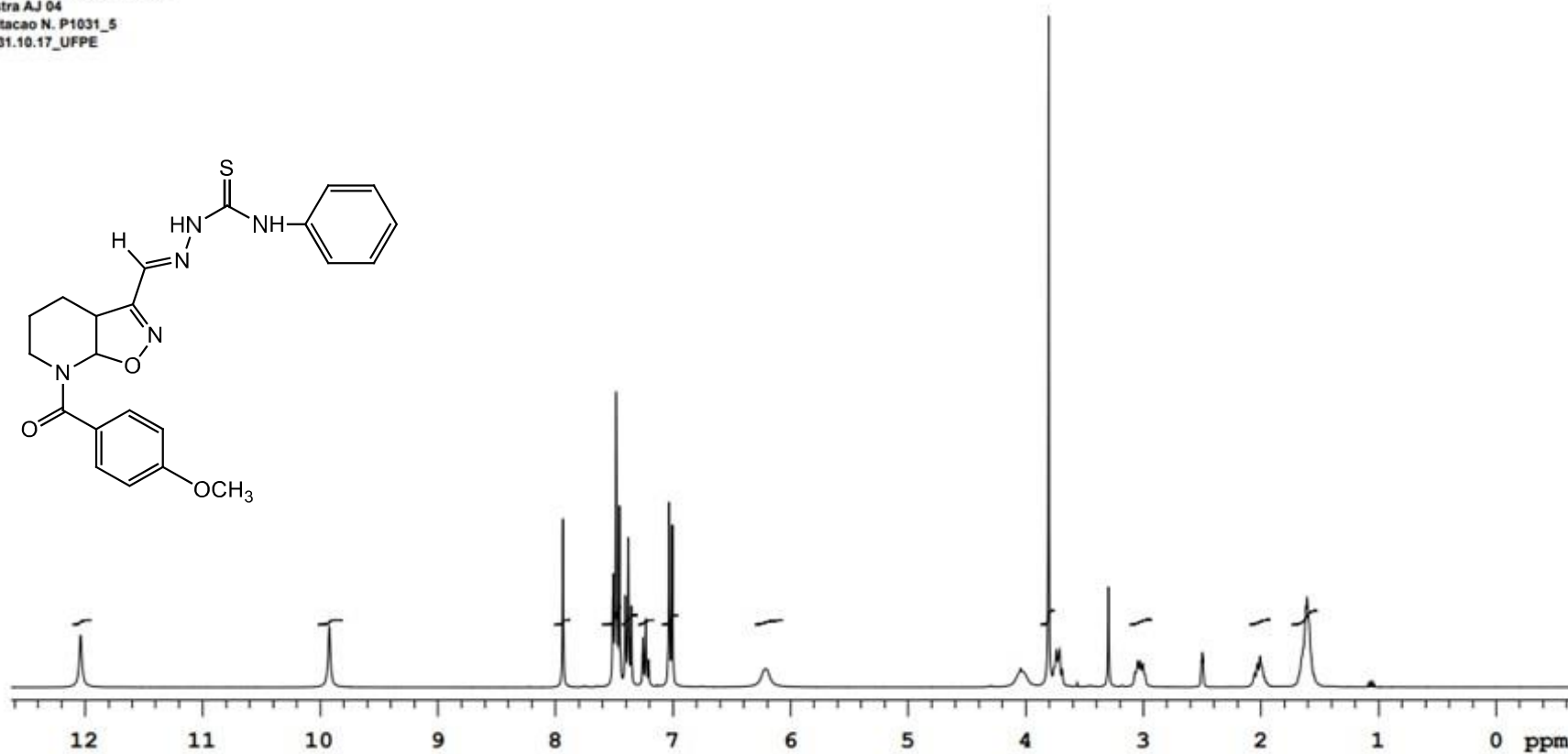
APÊNDICE AA – RMN DE ^1H E ESPECTRO BIDIMENSIONAL COSY, 33c

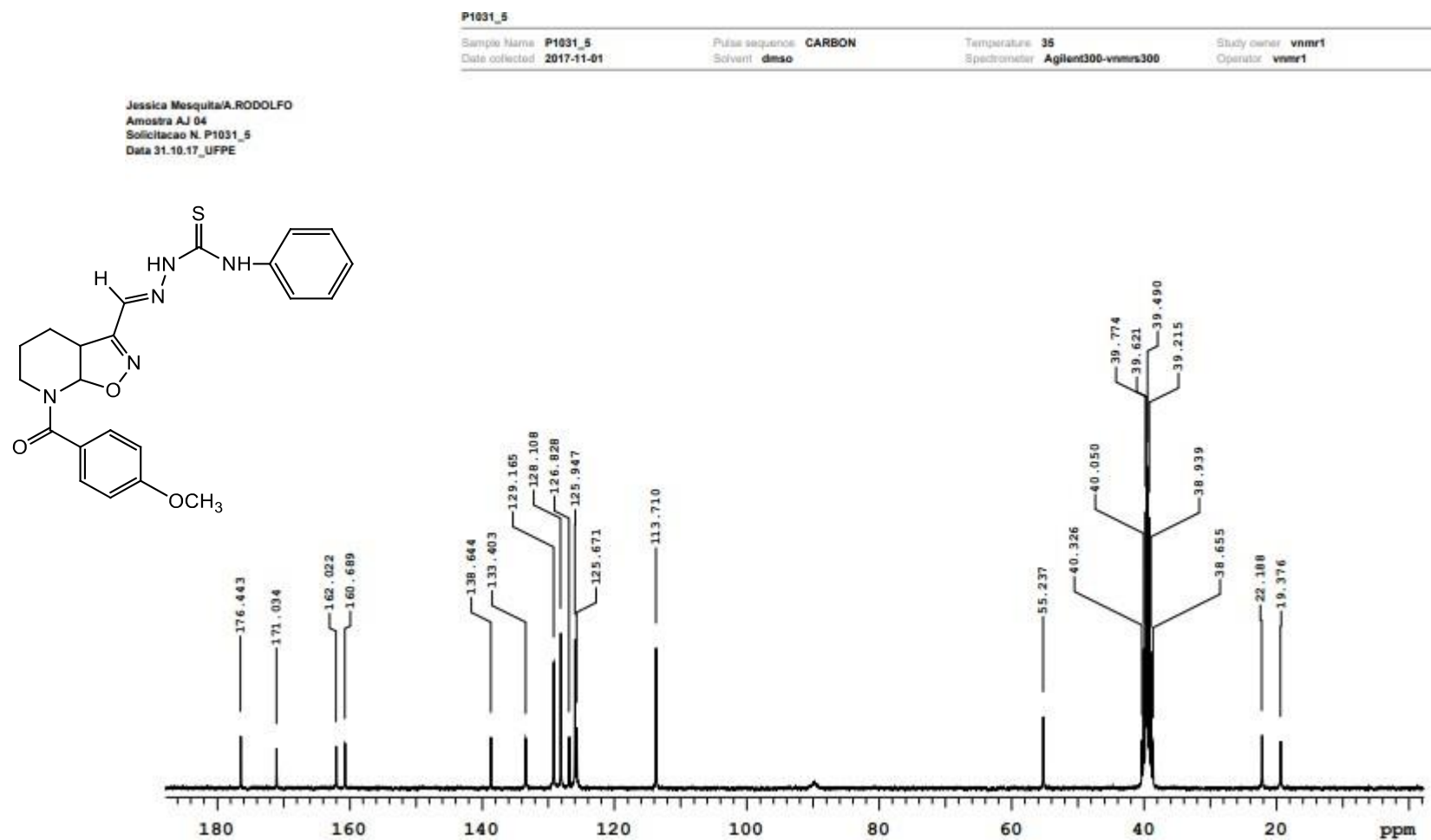
APÊNDICE AB – RMN DE ^1H E ESPECTRO BIDIMENSIONAL COSY, 33c

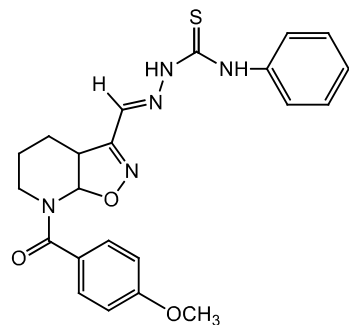
APÊNDICE AC – ESPECTRO DE INFRAVERMELHO, **33c**

APÊNDICE AD – ESPECTRO DE RMN DE ^1H 300 MHz, 33d

P1031_5

Sample Name **P1031_5**
Date collected **2017-11-01**Pulse sequence **PROTON**
Solvent **dms**Temperature **35**
Spectrometer **Agilent300-vnmrs300**Study owner **vnmr1**
Operator **vnmr1**Jessica Mesquita/A.RODOLFO
Amostra AJ 04
Solicitacao N. P1031_5
Data 31.10.17_UFPE

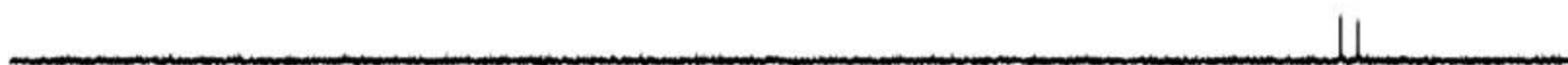
APÊNDICE AE – ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C 75 MHz, 33d

APÊNDICE AE – DEPT de ^{13}C , 33d

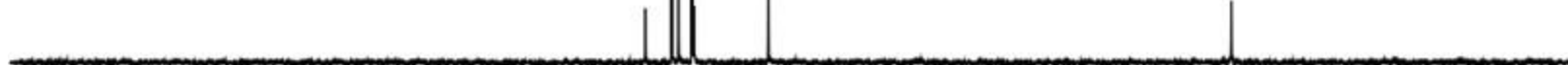
CH3 carbons



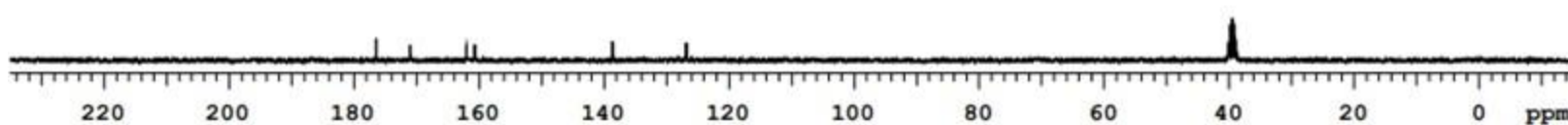
CH2 carbons



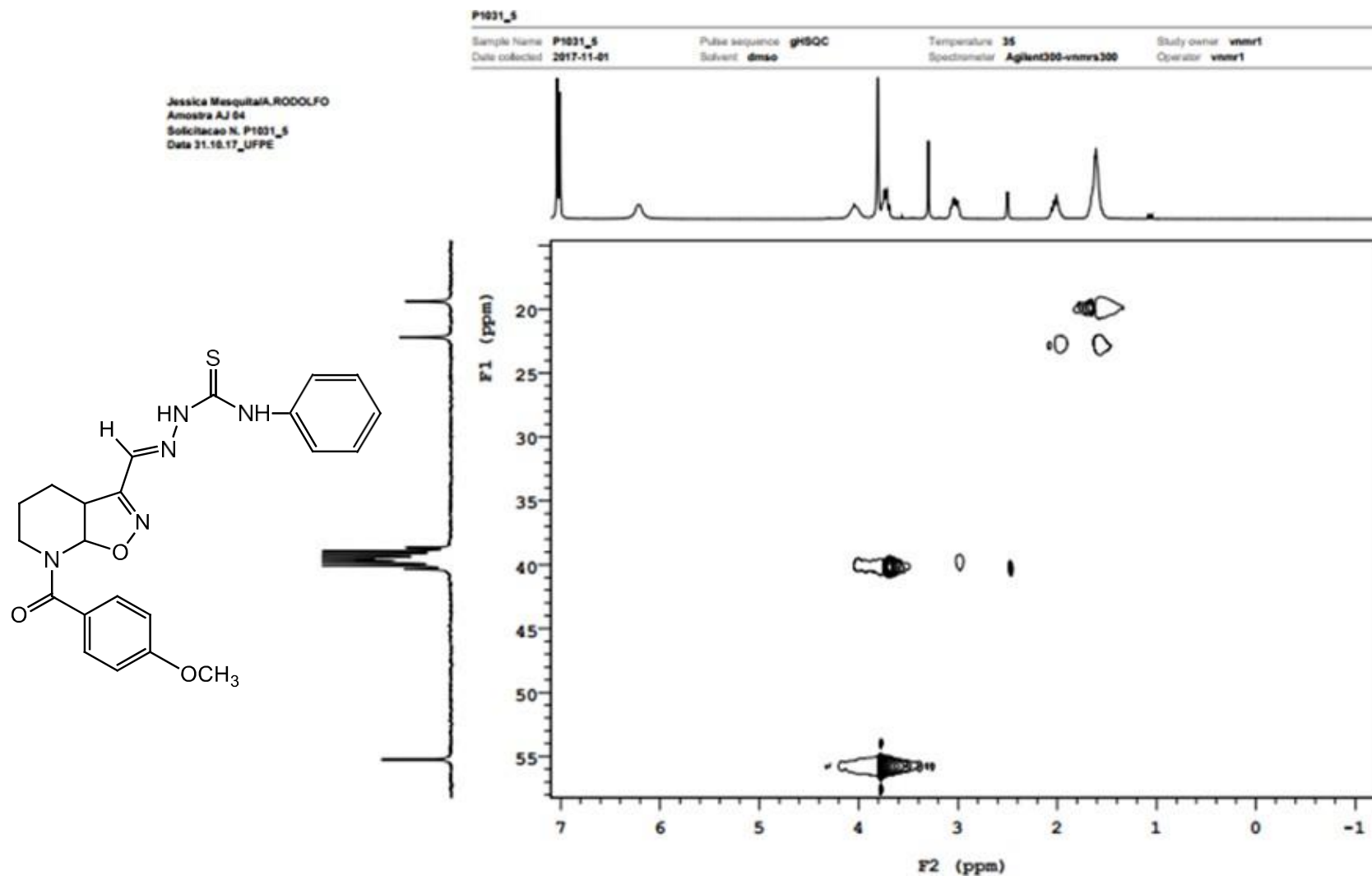
CH carbons



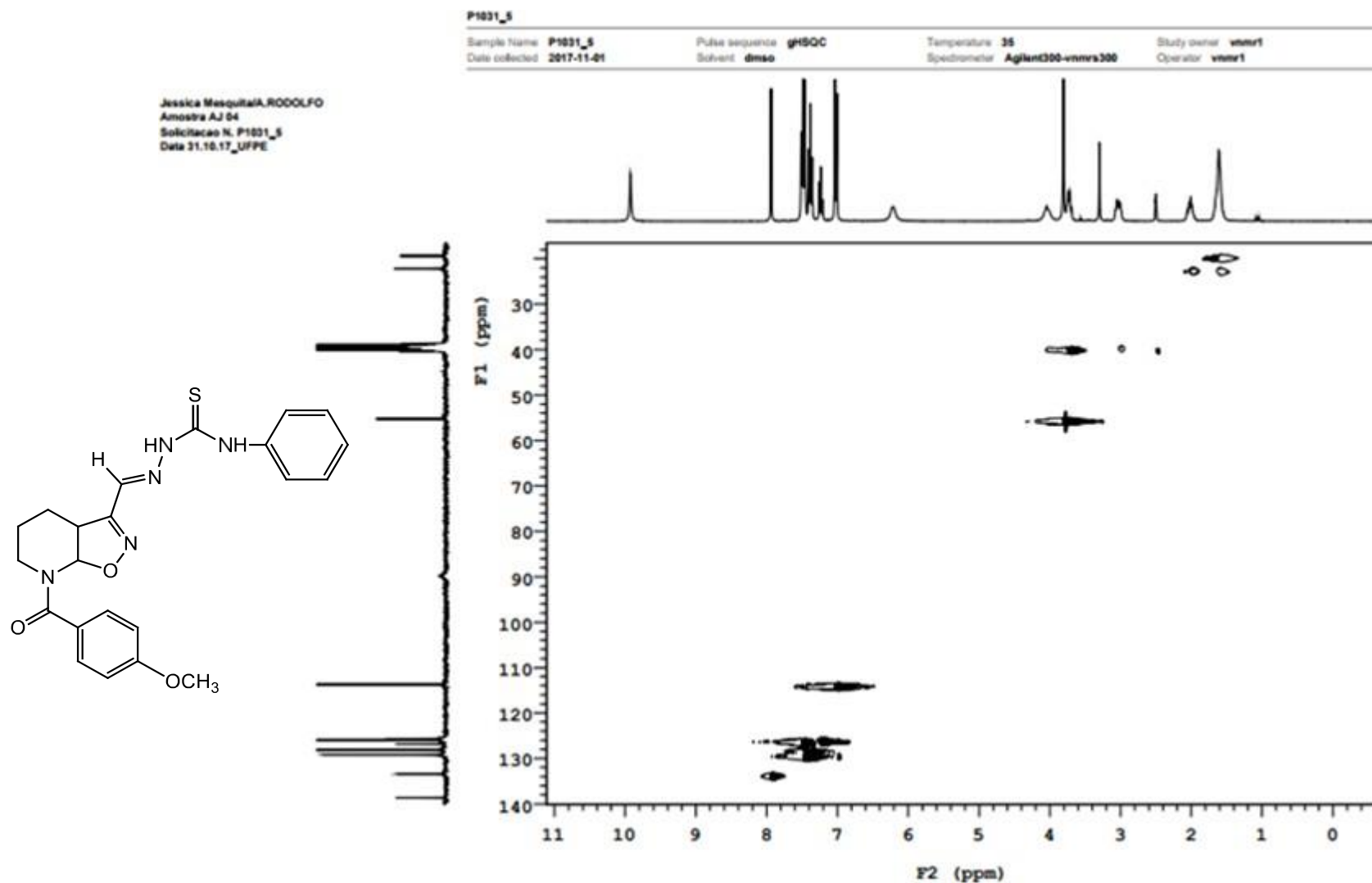
quaternary carbons

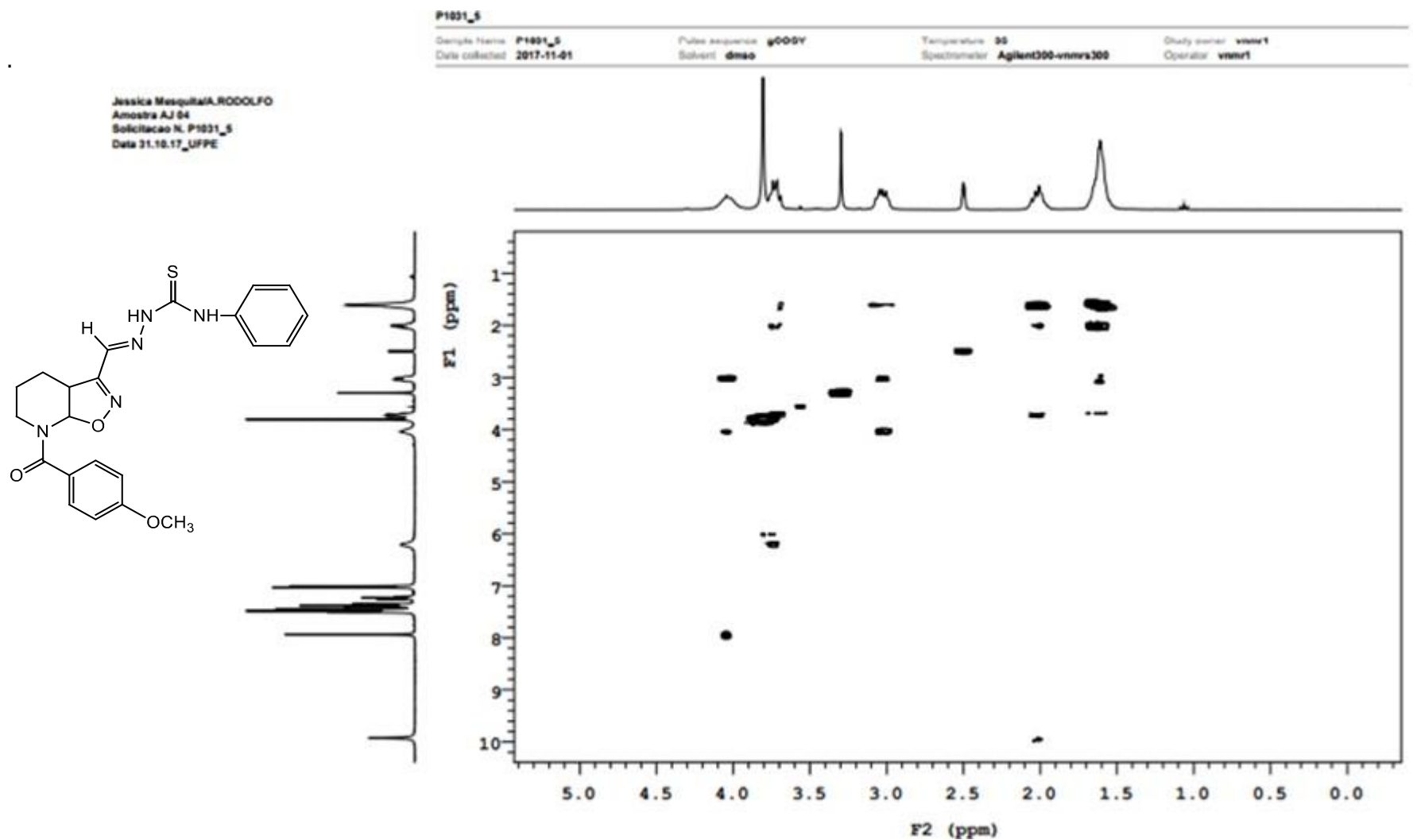


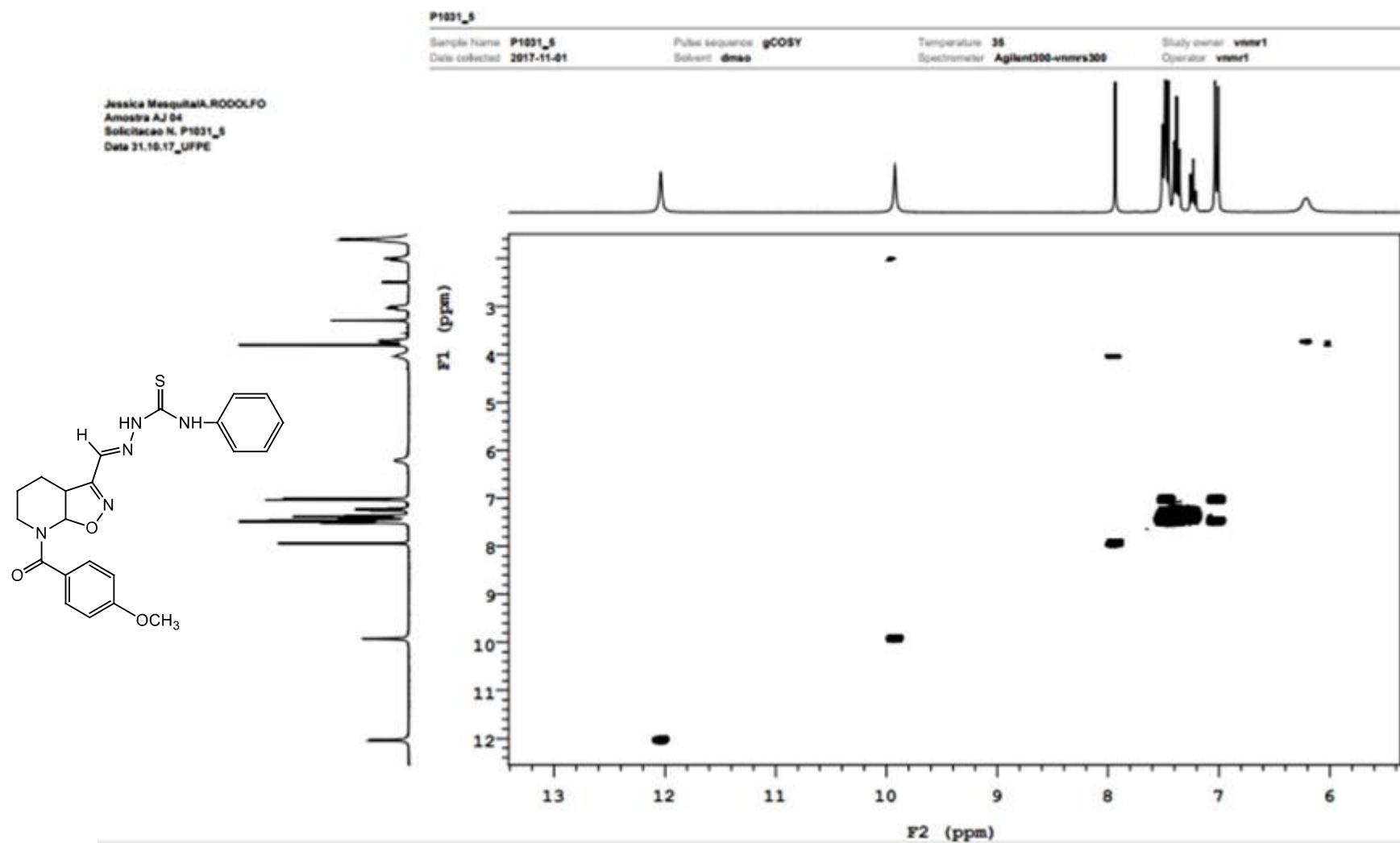
APÊNDICE AG – ESPECTRO DE RMN POR CORRELAÇÃO HSQC, 33d



APÊNDICE AH – ESPECTRO DE RMN POR CORRELAÇÃO HSQC, 33d



APÊNDICE A – RMN DE ^1H E ESPECTRO BIDIMENSIONAL COSY, 33d

APÊNDICE AJ – RMN DE ^1H E ESPECTRO BIDIMENSIONAL COSY, 33d

APÊNDICE AL – ESPECTRO DE INFRAVERMELHO, 33d