



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
UNIVERSITÉ DE NANTES  
ÉCOLE DOCTORALE BIOLOGIE-SANTE UBL  
U.F.R. DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES  
INSTITUT DE RECHERCHE EN SANTE 2

FELIPE NEVES COUTINHO

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES CITOTÓXICA E ANTIPARASITÁRIAS  
DE NOVOS DERIVADOS HÍBRIDOS ISOXAZOLINA AZA-BICÍCLICA/TIAZOL E  
DERIVADOS DI-ARIL ISOXAZÓIS**

RECIFE  
2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
UNIVERSITÉ DE NANTES  
ÉCOLE DOCTORALE BIOLOGIE-SANTE UBL  
U.F.R. DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES  
INSTITUT DE RECHERCHE EN SANTE 2

FELIPE NEVES COUTINHO

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES CITOTÓXICA E ANTIPARASITÁRIAS  
DE NOVOS DERIVADOS HÍBRIDOS ISOXAZOLINA AZA-BICÍCLICA/TIAZOL E  
DERIVADOS DI-ARIL ISOXAZÓIS**

Prof<sup>ª</sup>. Dra. TERESINHA GONÇALVES DA  
SILVA  
Orientadora  
Prof. Dr. ANTÔNIO RODOLFO DE FARIA  
Co-Orientador  
Prof. Dr. PASCAL MARCHAND  
Co-Orientador

RECIFE  
2022

.Catalogação de Publicação na Fonte. UFPE - Biblioteca Central

Coutinho, Felipe Neves.

Síntese e avaliação das atividades citotóxica e antiparasitárias de novos derivados híbridos isoxazolina azabicíclica/tiazol e derivados di-aril isoxazóis / Felipe Neves Coutinho. - Recife, 2022.

398f.: il.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2022.

Orientação: Teresinha Gonçalves da Silva.

Coorientação: Antônio Rodolfo de Faria.

Coorientação: Pascal Marchand.

1. 2-isoxazolina; 2. Isoxazol; 3. Tiazol; 4. Anticâncer; 5. Leishmaniose; 6. Trypanosoma cruzi. I. Silva, Teresinha Gonçalves da. II. Faria, Antônio Rodolfo de. III. Marchand, Pascal. IV. Título.

UFPE-Biblioteca Central

FELIPE NEVES COUTINHO

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES CITOTÓXICA E ANTIPARASITÁRIAS  
DE NOVOS DERIVADOS HÍBRIDOS ISOXAZOLINA AZA-BICÍCLICA/TIAZOL E  
DERIVADOS DI-ARIL ISOXAZÓIS**

Aprovada em: 27/06/2022

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Ronaldo Nascimento de Oliveira (Presidente)  
Universidade Federal Rural de Pernambuco

---

Prof. Dr. Maria da Conceição Ferreira de Oliveira (Examinador Externo)  
Universidade Federal do Ceará

---

Prof. Alexandra Dassonville-Klimpt (Examinador Externo)  
Université de Picardie Jules Verne

---

Prof. Christian Cavé (Examinador Externo)  
Université Paris-Saclay

## DEDICATÓRIA

Ao que molda o homem para que este viva uma vida plena, sem prisões, mágoas, dores ou medos. Semelhante a um oleiro, que ao vaso pode quebrar e refazer de acordo com sua molda, sendo ele nova criação e faz isso pelo seu amor constante, assim como um pai ama seu filho. Que criou os céus, a terra e o mar e tudo que neles há. Ainda que não o vejamos, sua presença é real. O melhor amigo, em todas as horas. Dedico este trabalho ao Deus todo poderoso, a Ele seja a honra, a glória e o louvor.

## AGRADECIMENTOS

À minha mãe Nadja, por me apoiar em todo momento e por amor incondicional que me levou a chegar até aqui, sem seu esforço e dedicação nada disso seria possível mãe, obrigado. Agradeço ao meu irmão João e toda minha família.

À professora Teresinha Gonçalves da Silva do pela orientação e apoio no aqui no Brasil e na França, apoiando meu crescimento pessoal e profissional. Por toda garra e esforço empenhados para o estabelecimento da cooperação internacional.

Ao professor Antônio Rodolfo de Faria, por abrir as portas do laboratório e confiar a mim a execução deste trabalho, me acompanhando em cada fase, participando sempre nas discussões e me abrindo o horizonte do conhecimento. Por ser um exemplo a ser seguido em todas as áreas, tanto profissional quanto pessoal. Muito obrigado, por tudo professor!

Ao professor Pascal Marchand, por me receber em seu país e laboratório dando todo apoio e suporte necessário e sempre se preocupando com o bem-estar e o sucesso das atividades. Pelo empenho nas pesquisas e por todas as oportunidades concedidas.

À toda equipe do LASOF. À Jéssica (*in memoriam*), Eduarda e Marlene, por me apoiarem no doutorado e na ida para Nantes, em especial a Marlene por ter sido a pioneira e em tudo orientar na viagem e pelo constante desejo em querer ajudar e se preocupar com todos.

À Mylena Lira, pelo suporte no laboratório e amizade, me ajudando até o último momento no doutorado e dando apoio nas dificuldades, me ajudando nos planejamentos e execução dos trabalhos, além da honra de me introduzir no seu ciclo familiar e de amigos. Pelas compras aleatórias, conversas e orações, obrigado, My! Agradeço também a Bruna, Dênis e Lucas Lima por todo apoio nessa reta final pelo cotidiano no laboratório e pelas conversas constantes e aos ICs Agamenon e Lucas Nascimento que juntos fizeram desse laboratório uma grande família, mesmo com a pandemia do COVID19.

À Marie-René, por todo apoio em Nantes. À Jérôme, Pierre e Eduardo, por sempre serem uma equipe comigo no laboratório IICiMed e pela amizade e a todos os membros desse laboratório. Aos amigos que encontrei em Nantes: Heloïse, Ema, Rodrigo, Sandra, Bianca, Julissa, Eduardo, Keroline, Natasha e todos os amigos da Maison des Chercheurs Étrangers. Além de todos da igreja Boisière.

À professora Nelly Caetano, por ter me aceitado em seu laboratório me abrindo como aluno de Iniciação Científica.

A todos os meus amigos e família da igreja, em especial, Jefferson Vaz, pela amizade, conversas, apoio e motivação, os quais me ajudaram a seguir neste doutorado. A Osiane pelas orações, apoio e por ser um referencial de mulher cristã e amiga. Também à Jonatha Vaz, Eduardo e Ana, Rebeca, Kerla e Ivan por orarem por mim e por todo apoio e carinho.

Ao CNPq e a PROPESQ pela concessão da bolsa e pelo financiamento dos materiais de pesquisa. Ao convênio CAPES-COFECUB por me permitir o estágio no exterior.

Ao professor Ricardo Oliveira e as técnicas Abner e Eliete da Central Analítica do DQF, pelas análises de RMN. Ao professor Pedro Rolim do Laboratório de Tecnologia em Medicamentos – LTM, pelas análises (IV-FT). À professora Valéria Hernandes e ao pós-doutorando Policarpo, do Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular do Departamento de Imunologia do Instituto Ageu Magalhães/FIOCRUZ, pelas análises antiparasitárias. Ao professor Tiago Aquino do Núcleo de Análises e Pesquisa em RMN –NAPRMN, pelas análises de RMN mono e bidimensionais.

A todos os funcionários e professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas e outros programas.

À todos que contribuíram direta ou indiretamente.

## RESUMO

Os isoxazóis e derivados são heterocíclicos de grande relevância na química medicinal, por apresentarem atividades como anti-inflamatória, anticâncer e antiparasitária, além de estarem presentes em fármacos comerciais. Outro heterociclo de grande interesse é o tiazol, o qual tem demonstrado importantes atividades anticâncer e leishmanicida, sendo estas atividades potencializadas por grupamentos hidrazonas e hidrazidas gerados na formação do tiazol. Em nosso grupo de pesquisa, LASOF, o núcleo 2-isoxazolina aza-bicíclica foi desenvolvido, tendo sido aplicado na obtenção de vários derivados, dentre os quais a 2-isoxazolina/hidrazona tem apresentado atividade antichagásica promissora. Dentro da cooperação CAPES/COFECUB, o grupo de pesquisa IICiMed – IRS2, da Universidade de Nantes, possui grande expertise na síntese de compostos heterocíclicos inibidores da enzima *LmCK1*, um excelente alvo na pesquisa da atividade leishmanicida. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi a síntese, elucidação e avaliação das atividades citotóxica e antiparasitária dos novos híbridos 2-isoxazolina-aza-biciclo/tiazol e o dos novos compostos heterocíclicos diaril-isoxazóis. A metodologia de síntese aplicada para a obtenção dos híbridos foi a cicloadição 1,3 dipolar entre óxidos de nitrila CEFNO (dipolo) com distintas enamidas endocíclicas (dipolarófilo) e posterior ciclização de tiossemicarbazonas para formação do núcleo tiazol. Para a formação do núcleo diaril-isoxazol, foi realizada a cicloadição 1,3-dipolar do CEFNO com acetilenos, assim como a ciclização de  $\beta$ -ceto-enol com hidróxido de amônio, sendo esta a que possibilitou a formação do composto final, com modificações no éster em C3 para a obtenção de derivados aminados. Portanto, duas séries distintas foram sintetizadas neste trabalho, novos híbridos 2-isoxazolina-aza-biciclo/tiazol, 11 compostos, e os novos compostos heterocíclicos diaril-isoxazol, 12 compostos, foram sintetizados e elucidados por espectroscopia (RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , FT-IR e massas) e suas características físico-químicas foram determinadas. Na avaliação da atividade anticancerígena, dentre os 11 compostos híbridos sintetizados, dois compostos se destacaram contra as células NCI-H292 (carcinoma pulmonar) e Jukart com  $\text{CI}_{50}$  próximo à doxorrubicina. Atividade leishmanicida foi alcançada contra *L. amazonensis* e *L. infantum*, demonstrando um composto com IS superior à miltefosina, contra a forma promastigota de *L. amazonensis*. Anti-*T. cruzi* foi mais promissor, onde a maioria dos compostos apresentou excelente atividade com recomendação para avaliação *in vivo* dos 4 compostos testados.

Palavras-chave: 2-isoxazolina. Isoxazol. Tiazol. Anticâncer. Leishmaniose. *Trypanosoma cruzi*.

## ABSTRACT

.Isoxazoles and derivatives are heterocyclics of great relevance in medicinal chemistry, as they have activities such as anti-inflammatory, anticancer and antiparasitic, and in commercial drugs. Another heterocycle of great interest is thiazole, which has shown important anticancer and leishmanicidal activities, and these activities are potentiated by hydrazones and hydrazides, generated in the formation of thiazole nucleus. In our Research Group (LASOF), the 2-isoxazoline aza-bicyclic nucleus was developed having been applied to obtain several derivatives, among which 2-isoxazoline/ hydrazone has shown promising antichagasic activity. Within the CAPES / COFECUB cooperation, the research group IICiMed - IRS2, from the University of Nantes, has great expertise in the synthesis of heterocyclic compounds that inhibit the enzyme *LmCK1*, an excellent target in the research of leishmanicidal activity. Therefore, the objective of this work was the synthesis, elucidation and evaluation of cytotoxic and antiparasitic activities of new 2-isoxazoline-aza-bicyclic/thiazole hybrids and that of the new diaryl-isoxazole heterocyclic compound. The methodology of synthesis applied to obtain the hybrids was cycloaddition 1,3 dipolar between nitrile oxides CEFNO (dipole) with different endocyclic enamides (dipolarophil) and subsequent cyclization of thiosemicarbazones to form the thiazole nucleus. For the formation of the diaryl-isoxazole nucleus, the 1,3-dipolar cycloaddition of CEFNO with acetylenes was performed, as well as the cyclization of  $\beta$ -keto-enol with ammonium hydroxide, which enabled the formation of the final compound with modifications to the C3 ester to obtain amino derivatives. Therefore, two distinct series were synthesized in this work, new 2-isoxazoline-aza-bicycle/thiazole hybrids and the new diaryl-isoxazole heterocyclic compounds were synthesized and elucidated by spectroscopy ( $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR, FT-IR and masses) and their physicochemical characteristics were determined. In the assay of cytotoxic activity, two compounds stood out against NCI-H292 and Jukart cells with an  $\text{IC}_{50}$  close to doxorubicin. The leishmanicidal activity against *L. amazonensis* and *L. infantum*, demonstrating a compound with an SI higher than miltefosine, against the promastigote form of *L. amazonensis*. Anti-*T. cruzi* activity was more promising, where most compounds showed an excellent activity with a recommendation for *in vivo* evaluation of 4 compounds tested.

Keywords: 2-isoxazoline. Isoxazole. Thiazole. Anticancer. Leishmaniasis. *Trypanosoma cruzi*.

## RÉSUMÉ

Les isoxazoles et leurs dérivés sont des hétérocycliques d'une grande importance en chimie médicinale, car ils ont des activités anti-inflammatoires, anticancéreuses et antiparasitaires, en plus d'être présents dans les médicaments commerciaux. Un autre hétérocycle de grand intérêt est le thiazole, qui a montré d'importantes activités anticancéreuses et leishmanicides, ces activités étant potentialisées par les groupements hydrazone et hydrazide générés lors de la formation du thiazole. Dans notre groupe de recherche (LASOF), le noyau 2-isoxazoline aza-bicyclique a été développé après avoir été appliqué pour obtenir plusieurs dérivés, parmi lesquels la 2-isoxazoline / hydrazone a montré une activité antischistosomique prometteuse. Au sein de la coopération CAPES/COFECUB, le groupe de recherche IICiMed - IRS2, de l'Université de Nantes, possède une grande expertise dans la synthèse de composés hétérocycliques inhibiteurs de l'enzyme *LmCK1*, excellente cible dans la recherche de l'activité leishmanicide. Par conséquent, l'objectif de ce travail était la synthèse, l'élucidation et l'évaluation des activités cytotoxique et antiparasitaire, des nouveaux hybrides 2-isoxazoline-aza-bicyclique/thiazole et celui des nouveaux composés hétérocycliques diaryl-isoxazole. La méthodologie de synthèse appliquée pour obtenir les hybrides était la cycloaddition 1,3-dipolaire entre les oxydes de nitrile CEFNO (dipôle) avec différents énammides endocycliques (dipolarophiles) et la cyclisation postérieure des thiosemicarbazones pour former le noyau thiazole. Pour la formation du noyau diaryl-isoxazole, la cycloaddition 1,3-dipolaire de CEFNO avec des acétylènes a été réalisée, ainsi que la cyclisation du  $\beta$ -céto-énol avec de l'hydroxyde d'ammonium, ce qui a permis la formation du composé final, avec des modifications de l'ester C3 pour obtenir des dérivés aminés. Par conséquent, deux séries distinctes ont été synthétisées dans ce travail, de nouveaux hybrides 2-isoxazoline-aza-bicyclique/thiazole et les nouveaux composés hétérocycliques diaryl-isoxazole ont été synthétisés et élucidés par spectroscopie (RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$ , FT-IR et masses) et leurs caractéristiques physicochimiques ont été déterminées. Dans l'évaluation de l'activité cytotoxique, deux composés se sont démarqués contre les cellules NCI-H292 et Jurkat avec une  $\text{CI}_{50}$  proche de la doxorubicine. Une activité leishmanicide a été réalisée contre *L. amazonensis* et *L. infantum*, mettant en évidence un composé au IS supérieur à la miltefosine, contre la forme promastigote de *L. amazonensis*. Les activités anti-*T. cruzi* étaient plus prometteuses, où la plupart des composés ont montré une excellente activité avec une recommandation pour l'évaluation *in vivo* de 4 composés testés.

Mots clés: 2-isoxazoline. Thiazoles. Isoxazole. Anticancer. Leishmaniose. *Trypanosoma cruzi*.

## LISTA DE ESQUEMAS

|                                                                                                                                                                                                                                   |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Esquema 1. Esquema de reação da síntese de compostos 1,2,4-oxadiazolina diarílicos <b>8</b> a partir de iminas diariladas <b>5</b> e cloroximidoacetato de etila <b>6</b> (precursor de nitrila <i>N</i> -óxido <b>7</b> ). ..... | 33 |
| Esquema 2. Síntese de nitrofurano isoxazóis <b>22a-b</b> .....                                                                                                                                                                    | 48 |
| Esquema 3. Síntese de derivados de 3-nitro e 3-amino isoxazóis .....                                                                                                                                                              | 50 |
| Esquema 4. Síntese do sistema de bi-heterocíclicos de 1,2,3-triazol-isoxazolina <b>33a-g</b> . .....                                                                                                                              | 51 |
| Esquema 5. Síntese de híbridos tetrahydroquinolina-isoxazolina <b>37</b> .....                                                                                                                                                    | 52 |
| Esquema 6. Síntese de híbridos tetrahydroquinolina-isoxazolina <b>36</b> .....                                                                                                                                                    | 54 |
| Esquema 7. Síntese de bis-tiazóis <b>54</b> .....                                                                                                                                                                                 | 57 |
| Esquema 8. Síntese da 2-piridinatiosemicarbazona <b>58</b> .....                                                                                                                                                                  | 58 |
| Esquema 9. Síntese de compostos 1,2,4-triazol contendo porções hidrazona-hidrazida <b>68</b> derivados do naproxeno <b>65</b> . .....                                                                                             | 61 |
| Esquema 10. Síntese de bis-indolina-2-ona-3-hidrazona <b>69</b> e bis-indolina-2-ona-3-hidrazida <b>70</b> . .....                                                                                                                | 63 |
| Esquema 11. Síntese dos tiocroman-4-onas acil-hidrazidas <b>75</b> . .....                                                                                                                                                        | 64 |
| Esquema 12. Retrossíntese proposta para izoxazolina/tiazol <b>4</b> . .....                                                                                                                                                       | 67 |
| Esquema 13. Síntese da série desenvolvida no Brasil, molécula aza-bicíclica de isoxazolina <b>80</b> para cicloadição. ....                                                                                                       | 68 |
| Esquema 14. Obtenção dos híbridos de derivados aza-bicíclicos da 2-isoxazolina / tiazol com espaçador hidrazona <b>4</b> .....                                                                                                    | 69 |
| Esquema 15. Síntese do trímero da $\Delta^1$ -pirrolina <b>78</b> . .....                                                                                                                                                         | 70 |
| Esquema 16. Trimerização da $\Delta^1$ -pirrolina <b>77</b> : formação do trímero <b>78</b> à temperatura ambiente. ....                                                                                                          | 71 |
| Esquema 17. Síntese das enamidas endocíclicas <b>79a-f</b> .....                                                                                                                                                                  | 71 |
| Esquema 18. Mecanismo reacional de formação das <i>N</i> -acil-2-enamidas <b>79</b> . ....                                                                                                                                        | 72 |
| Esquema 19. Síntese do cloridrato de glicina esterificada <b>85</b> .....                                                                                                                                                         | 73 |

|                                                                                                                                               |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Esquema 20. Mecanismo da síntese do cloridrato de glicina esterificada <b>85</b> .                                                            | 74  |
| Esquema 21. Síntese do clorooximidoacetato de etila <b>7</b> , precursor do <i>N</i> -Óxido de Nitrila – CEFNO <b>8</b> .                     | 75  |
| Esquema 22. Síntese dos ésteres de isoxazolinas <b>rac-80a-f</b> .                                                                            | 75  |
| Esquema 23. Mecanismo de formação dos <i>N</i> -óxidos de nitrila <b>8</b> .                                                                  | 77  |
| Esquema 24. Síntese do álcool isoxazolícnico <b>rac-81</b> .                                                                                  | 79  |
| Esquema 25. Síntese do aldeído isoxazolícnico <b>rac-82</b> .                                                                                 | 81  |
| Esquema 26. Mecanismo da reação de Swern, oxidação dos álcoois isoxazolícnicos aos respectivos aldeídos isoxazolícnicos.                      | 82  |
| Esquema 27. Síntese da tiossemicarbazona isoxazolícnica <b>rac-83</b> .                                                                       | 83  |
| Esquema 28. Mecanismo da adição nucleofílica para formação das tiossemicarbazonas isoxazolícnicas aos respectivos aldeídos isoxazolícnicos.   | 84  |
| Esquema 29. Síntese da tiazol/isoxazolícnica com espaçador hidrazona <b>rac-4</b> .                                                           | 88  |
| Esquema 30. Mecanismo da síntese do tiazol de Hantzsch para a formação dos híbridos tiazóis/isoxazolícnicos <b>4</b> com espaçador hidrazona. | 89  |
| Esquema 31. Retrossíntese proposta dos diaril-isoxazóis <b>10</b> e <b>11</b> .                                                               | 138 |
| Esquema 32. Reagentes e condições para síntese dos diaril-isoxazóis.                                                                          | 139 |
| Esquema 33. Síntese dos diaril-isoxazóis até o composto <b>90</b> .                                                                           | 140 |
| Esquema 34. Síntese do composto <b>96</b> via cicloadição.                                                                                    | 142 |
| Esquema 35. Síntese da 4-(trimetilsilil)etnilpiridina <b>88</b> .                                                                             | 143 |
| Esquema 36. Ciclo catalítico da reação de acoplamento de Sonogashira                                                                          | 144 |
| Esquema 37. Síntese da 4-etnilpiridina <b>89</b> .                                                                                            | 145 |
| Esquema 38. Síntese da 4-((4-fluorofenil)etnil)piridina <b>90</b>                                                                             | 145 |
| Esquema 39. Síntese do sistema orto-diaril-isoxazol                                                                                           | 146 |
| Esquema 40. Síntese do cicloaduto fenil-isoxazol <b>91</b> .                                                                                  | 147 |
| Esquema 41. Mecanismo de reação proposto para o catalisador Cu (I) de cicloadição 1,3-dipolar entre NOs e alcinos.                            | 148 |
| Esquema 42. Halogenação em C-4 <b>92</b> .                                                                                                    | 149 |
| Esquema 43. Testes para obter moléculas com o <i>scaffold</i> diaril-isoxazol <b>10</b>                                                       | 151 |
| Esquema 44. Síntese do diaril-isoxazol via ciclização $\beta$ -ceto-enol.                                                                     | 153 |
| Esquema 45. Obtenção do isoxazol a partir da acetilpiridina, via ciclização.                                                                  | 153 |
| Esquema 46. Obtenção do isoxazol a partir da 4-fluoro-acetofenona, via ciclização                                                             | 154 |

|                                                                                              |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Esquema 47. Obtenção do $\beta$ -ceto-enol partir da 4-fluoro-acetofenona <b>100</b> .....   | 155 |
| Esquema 48. Mecanismo de obtenção do $\beta$ -ceto-enol .....                                | 156 |
| Esquema 49. Obtenção do isoxazol a partir da 4-fluoro-acetofenona, via ciclização .....      | 156 |
| Esquema 50. Condensação da dicetona com hidroxilamina para formação do núcleo isoxazol ..... | 157 |
| Esquema 51. Halogenação em C-4 .....                                                         | 158 |
| Esquema 52. Acoplamento de Suzuki para formação do diaril-isoxazol <b>5</b> .....            | 159 |
| Esquema 53. Ciclo catalítico da reação de acoplamento Suzuki-Miyaura .....                   | 160 |
| Esquema 54. Síntese do álcool isoxazólico <b>103</b> .....                                   | 161 |
| Esquema 55. Síntese do mesilato isoxazólico <b>104</b> .....                                 | 162 |
| Esquema 56. Mecanismo da reação de formação do mesilato isoxazólico <b>104</b> .....         | 162 |
| Esquema 57. Síntese do diaril-isoxazol com amina terciária <b>105a-k</b> .....               | 163 |
| Esquema 58. Mecanismo $S_N2$ para formação do produto final <b>105a-k</b> .....              | 163 |
| Esquema 59. Tentativas de obtenção direta do isoxazol .....                                  | 166 |

## LISTE DES SCHÉMAS

### (RÉSUMÉ)

|                                                                                                                                                                                                                                                  |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Schéma 1. Schéma réactionnel de la synthèse de 1,2,4-oxadiazoline diaryles <b>8</b> à partir de l'imines diarylées <b>5</b> et de 2-chloro-2-(hydroxyimino)acétate d'éthyle <b>6</b> (précurseur du <i>N</i> -oxyde de nitrile <b>7</b> ). ..... | 209 |
| Schéma 2. Synthèse des isoxazoles nitrofuranes <b>22a-b</b> .....                                                                                                                                                                                | 224 |
| Schéma 3. Synthèse de dérivés 3-nitroisoxazoles et isoxazole 3-aminés. ....                                                                                                                                                                      | 226 |
| Schéma 4. Synthèse du système bi-hétérocyclique du 1,2,3-triazole-isoxazoline <b>33a-g</b> .....                                                                                                                                                 | 227 |
| Schéma 5. Tétrahydroquinoline-isoxazoline <b>37</b> hybrides. ....                                                                                                                                                                               | 228 |
| Schéma 6. Synthèse d'acides hydroxamiques <b>42a-g</b> .....                                                                                                                                                                                     | 230 |
| Schéma 7. Synthèse des bis-thiazoles <b>54</b> .....                                                                                                                                                                                             | 233 |
| Schéma 8. Synthèse des dérivés thiazoles <b>58</b> .....                                                                                                                                                                                         | 234 |
| Schéma 9. Synthèse de composés 1,2,4-triazole contenant l'hydrazone-hydrazide <b>68</b> dérivés du naproxène <b>65</b> . ....                                                                                                                    | 237 |
| Schéma 10. Synthèse de bis-indoline-2-one-3-hydrazone <b>69</b> et de bis-indoline-2-one-3-hydrazide <b>70</b> . ....                                                                                                                            | 239 |
| Schéma 11. La synthèse de thiochroman-4-ones acylhydrazides. ....                                                                                                                                                                                | 240 |
| Schéma 12. Rétrosynthèse proposée pour l'isoxazoline/thiazole. ....                                                                                                                                                                              | 242 |
| Schéma 13. Synthèse de la série développée au Brésil, molécule aza-bicyclique d'isoxazoline <b>80</b> pour la cycloaddition. ....                                                                                                                | 243 |
| Schéma 14. Obtention des hybrides de dérivés aza-bicycliques du 2-isoxazoline/thiazole avec espaceur hydrazone <b>4</b> .....                                                                                                                    | 244 |
| Schéma 15. Synthèse du trimère de la 1-pyrroline <b>78</b> . ....                                                                                                                                                                                | 244 |
| Schéma 16. Trimérisation de $\Delta^1$ -pyrroline <b>77</b> : formation du trimer <b>78</b> à température ambiante. ....                                                                                                                         | 245 |
| Schéma 17. Synthèse d'enamides endocycliques <b>79a-e</b> .....                                                                                                                                                                                  | 245 |
| Schéma 18. Mécanisme réactionnel de formation de <i>N</i> -acyl-2-enamides <b>79</b> . ....                                                                                                                                                      | 246 |
| Schéma 19. Synthèse de chlorhydrate de glycine estérifié <b>85</b> .....                                                                                                                                                                         | 247 |
| Schéma 20. Mécanisme de synthèse du chlorhydrate de glycine estérifié <b>85</b> . ....                                                                                                                                                           | 248 |

|                                                                                                                                                    |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Schéma 21. Synthèse du chlorooxymidoacétate d'éthyle <b>7</b> , précurseur de l'oxyde de <i>N</i> -nitrile - CEFNO <b>8</b> .....                  | 249 |
| Schéma 22. Synthèse des isoxazolines aza-bicyclique <b>rac-80a-f</b> .....                                                                         | 249 |
| Schéma 23. Mécanisme de formation des oxydes de <i>N</i> -nitrile <b>8</b> .....                                                                   | 251 |
| Schéma 24. Synthèse de l'alcool isoxazoline <b>rac-81</b> .....                                                                                    | 254 |
| Schéma 25. Synthèse de l'aldéhyde isoxazolinique <b>rac-82</b> .....                                                                               | 255 |
| Schéma 27. Synthèse de l'isoxazoline thiosemicarbazone <b>rac-83</b> .....                                                                         | 258 |
| Schéma 28. Mécanisme d'addition nucléophile pour la formation de thiosemicarbazones isoxazoliniques aux aldéhydes isoxazoliniques respectifs. .... | 260 |
| Schéma 29. Synthèse de 2-isoxazoline/thiazole avec l'espaceur hydrazone <b>rac-4</b> .....                                                         | 264 |
| Schéma 30. Le mécanisme de synthèse du thiazole de Hantzsch pour la formation d'hybrides thiazole/isoxazoliniques avec espaceur d'hydrazone. ....  | 265 |
| Schéma 31. Rétrosynthèse proposée des diaryl-isoxazoles <b>10</b> et <b>11</b> .....                                                               | 271 |
| Schéma 32. Réactifs et conditions pour la synthèse des diaryl-isoxazoles. ....                                                                     | 272 |
| Schéma 33. Synthèse de diaryl-isoxazoles jusqu'au composé <b>90</b> .....                                                                          | 273 |
| Schéma 34. Synthèse du composé <b>96</b> par cycloaddition. ....                                                                                   | 275 |
| Schéma 35. Synthèse de la 4-(triméthylsilyl)éthynylpyridine <b>88</b> .....                                                                        | 276 |
| Schéma 36. Cycle catalytique de la réaction de couplage Sonogashira .....                                                                          | 277 |
| Schéma 37. Synthèse de la 4-éthynylpyridine <b>89</b> .....                                                                                        | 278 |
| Schéma 38. Synthèse de 4-[(4-fluorophényl)éthynyl]pyridine <b>90</b> .....                                                                         | 278 |
| Schéma 39. Synthèse du système ortho-diphényl-isoxazole .....                                                                                      | 279 |
| Schéma 40. Synthèse du cycle phényl-isoxazole <b>91</b> .....                                                                                      | 280 |
| Schéma 41. Mécanisme de réaction proposé pour le catalyseur Cu(I) de la cycloaddition 1,3-dipolaire entre les NO et les alcynes. ....              | 281 |
| Schéma 42. Halogénéation en C-4 du composé <b>91</b> .....                                                                                         | 282 |
| Schéma 43. Essais pour obtenir des molécules avec scaffold diaryl-isoxazole <b>10</b> .....                                                        | 284 |
| Schéma 44. Obtention de diaryl-isoxazole par cyclisation $\beta$ -céto-ester. ....                                                                 | 285 |
| Schéma 45. Obtention de l'isoxazole à partir de l'acétylpyridine, par cyclisation. ....                                                            | 285 |
| Schéma 46. Obtention de l'isoxazole à partir de la 4-fluoro-acétophénone, par cyclisation .....                                                    | 286 |
| Schéma 47. Obtention de $\beta$ -céto-énol à partir de 4-fluoro-acétophénone. ....                                                                 | 287 |
| Schéma 48. Mécanisme d'obtention du $\beta$ -céto-énol .....                                                                                       | 288 |

|                                                                                                         |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Schéma 49. Obtention de l'isoxazole à partir de la 4-fluoro-acétophénone, par cyclisation .....         | 288 |
| Schéma 50. Condensation de la diketone avec l'hydroxylamine pour la formation du noyau d'isoxazole..... | 289 |
| Schéma 51. Halogénéation en C-4.....                                                                    | 291 |
| Schéma 52. Couplage Suzuki pour la formation du diaryl-isoxazole <b>5</b> .....                         | 291 |
| Schéma 53. Cycle catalytique de la réaction de couplage Suzuki-Miyaura .....                            | 292 |
| Schéma 54. Synthèse de l'alcool isoxazolique <b>103</b> .....                                           | 293 |
| Schéma 55. Synthèse du mésylate d'isoxazole <b>104</b> .....                                            | 293 |
| Schéma 56. Mécanisme de formation du mésylate d'isoxazole <b>104</b> .....                              | 294 |
| Schéma 57. Synthèse du diaryl-isoxazole avec l'amine tertiaire <b>105a-k</b> .....                      | 294 |
| Schéma 58. Mécanisme S <sub>N</sub> 2 pour la formation du produit final <b>105a-k</b> .....            | 295 |

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                 |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1. Estruturas químicas de moléculas contendo o anel 2-isoxazolina-azabícclico com atividade antichagásica e leishmanicida. ....          | 32 |
| Figura 2. Estrutura geral dos híbridos 2-isoxazolina-azabícclica/tiazol inéditos, com espaçador hidrazona <b>4</b> . ....                       | 33 |
| Figura 3. Estrutura das moléculas <b>9</b> e <b>CTN1122</b> e estrutura geral das novas moléculas diaril isoxazóis <b>10</b> e <b>11</b> . .... | 34 |
| Figura 4. Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> spp. Adaptado de “Centers for Disease Control and Prevention” ....                                 | 38 |
| Figura 5. Estruturas químicas dos principais medicamentos utilizados no tratamento da leishmaniose. ....                                        | 38 |
| Figura 6. O ciclo de vida do <i>Trypanossoma cruzi</i> . Adaptado: Adaptado de “Centers for Disease Control and Prevention” ....                | 41 |
| Figura 7. Estruturas químicas dos principais medicamentos utilizados no tratamento da doença de Chagas (DC). ....                               | 42 |
| Figura 8. Expressão do gene proto-oncogene e do gene supressor tumoral em células normais e em células cancerosas. ....                         | 44 |
| Figura 9. Estruturas químicas de alguns antineoplásicos de acordo com sua função farmacológica na célula. ....                                  | 46 |
| Figura 10. Estruturas químicas básicas dos núcleos isoxazol, isoxazolina e isoxazolidina. ....                                                  | 47 |
| Figura 11. Fármacos comerciais contendo o núcleo isoxazol (azul), isoxazolina (vermelho) e isoxazolidina (verde). ....                          | 48 |
| Figura 12. Estruturas químicas de isoxazóis e $\Delta^2$ -isoxazolininas antitumorais ligadas a estrutura de sacarina. ....                     | 49 |
| Figura 13. Estruturas químicas dos derivados de 3-nitro e 3-amino-isoxazóis com atividade leishmanicida. ....                                   | 50 |
| Figura 14. Estruturas químicas das moléculas <b>31a</b> e <b>34a</b> e suas atividade citotóxicas contra células HT-1080. ....                  | 52 |

|                                                                                                                                                                                           |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 15. Estruturas químicas dos híbridos tetrahydroquinolina-isoxazolina <b>37a</b> , <b>35i</b> e <b>37h</b> e seus valores de CC <sub>50</sub> , frente à células tumorais. ....     | 53 |
| Figura 16. Estrutura química de um hidroxamato- $\alpha$ -2-isoxazolíico <b>42g</b> e os valores de sua atividade antitripanossoma. ....                                                  | 55 |
| Figura 17. Representação estrutural do tiazol. ....                                                                                                                                       | 55 |
| Figura 18. Estruturas químicas de fármacos comerciais contendo o núcleo tiazol e suas respectivas propriedades farmacológicas. ....                                                       | 56 |
| Figura 19. Estruturas químicas dos bis-tiazóis <b>52</b> , <b>54a</b> e seus valores frente a atividade citotóxica, contra linhagem MCF-7. ....                                           | 58 |
| Figura 20. Estruturas químicas dos derivados tiazóis com espaçador hidrazona <b>58a</b> , <b>58b</b> e <b>58d</b> com valores de SI para atividade leishmanicida. ....                    | 59 |
| Figura 21. Representação estrutural dos grupamentos hidrazona e hidrazida. ....                                                                                                           | 60 |
| Figura 22. Estruturas químicas de princípios ativos de fármacos comerciais contendo os grupamentos hidrazona e hidrazida. ....                                                            | 60 |
| Figura 23. Estruturas químicas dos derivados do (S)-naproxeno <b>68a</b> , <b>68m</b> e <b>68d</b> contendo porções hidrazida-hidrazonas e respectivos valores de CI <sub>50</sub> . .... | 62 |
| Figura 24. Estruturas químicas de acil-hidrazonas com atividade antileishmania. ....                                                                                                      | 65 |
| Figura 25. Formação do Dímero <i>N</i> -óxido de nitrila <b>8</b> representada pela teoria dos Orbitais Moleculares de Fronteira (OMF). ....                                              | 76 |
| Figura 26. Mecanismo proposto de cicloadição 1,3-dipolar entre enamidas endocíclicas ou enecarbamatos e <i>N</i> -óxido de nitrila CEFNO. ....                                            | 78 |
| Figura 27. Dados espectrométricos de RMN de <sup>1</sup> H 600 MHz da tiossemicarbazona isoxazolíica <b>rac-83d</b> . ....                                                                | 86 |
| Figura 28. Dados espectrométricos de RMN de <sup>13</sup> C 150 MHz da tiossemicarbazona isoxazolíica <b>rac-83d</b> . ....                                                               | 86 |
| Figura 29. Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ; 600 MHz) da tiossemicarbazona isoxazolíica <b>rac-83a</b> . ....                                              | 87 |
| Figura 30. Espectro de RMN de <sup>13</sup> C (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ; 150 MHz) da tiossemicarbazona isoxazolíica <b>rac-83a</b> . ....                                             | 87 |
| Figura 31. Estrutura do híbrido isoxazolíico <b>rac-4j</b> com numeração atribuída. ....                                                                                                  | 91 |
| Figura 32. Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ; 600 MHz) do híbrido isoxazolina/tiazol <b>rac-4j</b> . ....                                                   | 92 |

|                                                                                                                                |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figura 33. Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ ( $\text{DMSO-}d_6$ ; 150 MHz) do híbrido isoxazolina/tiazol <b>rac-4j</b> ..... | 93  |
| Figura 34. Espectro do Infravermelho (IV-FT-ATR) do Híbrido isoxazolina/tiazol <b>rac-4j</b> .....                             | 94  |
| Figura 35. Espectro de RMN HMBC 400 MHz do composto isoxazol <b>91</b> .....                                                   | 149 |
| Figura 36. Rendimentos dos isoxazóis-éster halogenados com diferentes substituintes. ....                                      | 150 |
| Figura 37. Espectro de RMN HMBC ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) do composto isoxazol <b>101</b> . ....                            | 158 |
| Figura 38. Espectro de RMN $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) do composto isoxazol <b>105a</b> ....                     | 165 |

## LISTE DES FIGURES

### (RÉSUMÉ)

|                                                                                                                                                                   |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figure 1. Structures chimiques des molécules contenant le cycle 2-isoxazoline-azabicyclique à activité anti- <i>T. cruzi</i> et leishmanicide .....               | 208 |
| Figure 2. Structure générale des hybrides 2-isoxazoline-azabicyclique/thiazole inédits avec espaceur hydrazone <b>4</b> . ....                                    | 209 |
| Figure 3. Structure des molécules modèles <b>9</b> et <b>CTN1122</b> et structure générale des nouvelles molécules diarylisoxazoles <b>10</b> et <b>11</b> . .... | 210 |
| Figure 4. Le cycle de vie de <i>Leishmania</i> spp. Adapté : Adapté de « Centers for Disease Control and Prevention » .....                                       | 213 |
| Figure 5. Les principaux médicaments utilisés dans le traitement de la leishmaniose. ....                                                                         | 214 |
| Figure 6. Le cycle de vie de <i>Trypanosoma cruzi</i> . Adapté : Adapté de « Centers for Disease Control and Prevention » .....                                   | 216 |
| Figure 7. Les principaux médicaments utilisés dans le traitement de la maladie de Chagas (MC) .....                                                               | 218 |
| Figure 8. Expression du gène proto-oncogène et du gène suppresseur de tumeur dans les cellules normales et les cellules cancéreuses. ....                         | 219 |
| Figure 9. Certains antinéoplasiques selon leur fonction pharmacologique dans la cellule. ....                                                                     | 222 |
| Figure 10. Structure de base de l'isoxazole, des isoxazolines et de l'isoxazolidine .....                                                                         | 223 |
| Figure 11. Médicaments commerciaux contenant le noyau isoxazole (bleu), isoxazoline (rouge) et isoxazolidine (vert). ....                                         | 223 |
| Figure 12. Série d'isoxazoles et d'isoxazolines $\Delta^2$ -antitumorales liées à la structure de la saccharine. ....                                             | 225 |
| Figure 13. Structures chimiques de dérivés de 3-nitro et 3-amino-isoxazole à activité leishmanicide. ....                                                         | 226 |
| Figure 14. Activité cytotoxique contre les cellules HT-1080 du composé <b>31a</b> et de son précurseur <b>34a</b> . ....                                          | 227 |

|                                                                                                                                                                                                  |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figure 15. Structures chimiques des hybrides tétrahydroquinoléine-isoxazoline <b>37a</b> , <b>35i</b> et <b>37h</b> et leurs valeurs CC <sub>50</sub> contre les cellules tumorales .....        | 229 |
| Figure 16. Structure chimique d'une hydroxamate- $\Delta^2$ -isoxazoline <b>42g</b> et valeurs de son activité antitrypanosomique. ....                                                          | 231 |
| Figure 17. Représentation du thiazole .....                                                                                                                                                      | 231 |
| Figure 18. Médicaments commerciaux contenant le noyau thiazole. ....                                                                                                                             | 232 |
| Figure 19. Structures chimiques des bis-thiazoles <b>52</b> , <b>54a</b> et leurs valeurs par rapport à l'activité cytotoxique, contre la lignée MCF-7. ....                                     | 233 |
| Figure 20. Structures chimiques des dérivés de thiazoles à espacement hydrazone <b>58a</b> , <b>58b</b> et <b>58d</b> avec les valeurs IS pour l'activité leishmanicide. ....                    | 235 |
| Figure 21. Représentation des groupes hydrazone et hydrazide .....                                                                                                                               | 235 |
| Figure 22. Médicaments commerciaux contenant des groupes hydrazone et hydrazide. ....                                                                                                            | 236 |
| Figure 23. Structures chimiques des dérivés du (S)-naproxène <b>68a</b> , <b>68m</b> et <b>68d</b> contenant des portions d'hydrazide-hydrazone et valeurs de Cl <sub>50</sub> respectives. .... | 238 |
| Figure 24. Acyl-hydrazones avec activité antileishmania. ....                                                                                                                                    | 240 |
| Figure 25. Formation de le dimère du nitrile N-oxyde <b>8</b> représentée par la théorie des Orbitales Moléculaires Frontières (OMF) .....                                                       | 250 |
| Figure 26. Mécanisme de cycloaddition 1,3-dipolaire proposé entre enamides ou enecarbamates endocycliques et nitrile N-oxyde CEFNO. ....                                                         | 252 |
| Figure 27. Données spectrométriques RMN de <sup>1</sup> H 600 MHz de l'isoxazoline thiosemicarbazone <b>rac-83d</b> . ....                                                                       | 262 |
| Figure 28. Données spectrométriques RMN de <sup>13</sup> C 150 MHz de l'isoxazoline thiosemicarbazone <b>rac-83d</b> . ....                                                                      | 262 |
| Figure 29. Spectre RMN <sup>1</sup> H (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ; 600 MHz) de l'isoxazoline thiosemicarbazone <b>rac-83d</b> .....                                                            | 263 |
| Figure 30. Spectre RMN de <sup>13</sup> C (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ; 150 MHz) de l'isoxazoline thiosemicarbazone <b>rac-83d</b> .....                                                        | 263 |
| Figure 31. Structure de l'hybride isoxazoline <b>rac-4j</b> avec numérotation attribuée. ...                                                                                                     | 267 |
| Figure 32. Spectre RMN de <sup>1</sup> H (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ; 600 MHz ) d'hybride isoxazoline/thiazole <b>rac-4j</b> .....                                                             | 268 |
| Figure 33. Spectre RMN <sup>13</sup> C (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ; 150 MHz) de d'hybride isoxazoline/thiazole <b>rac-4j</b> .....                                                             | 268 |

|                                                                                                            |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figure 34. Spectre infrarouge de d'hybride isoxazoline/thiazole <b>rac-4j</b> .....                        | 269 |
| Figure 35. Spectre de RMN HMBC 400 MHz du composé isoxazole <b>91</b> .....                                | 282 |
| Figure 36. Rendements d'isoxazoles halogénés avec différents substituants. ....                            | 283 |
| Figure 37. Spectre RMN HMBC (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz) du composé isoxazole <b>101</b> ....             | 290 |
| Figure 38. Spectre RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz) du composé isoxazole <b>105a</b> ..... | 296 |

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                     |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Tabela 1. Rendimentos das enamidas <b>79a-f</b> sintetizadas. ....                                                                                                                                                                                                                  | 72  |
| Tabela 2. Rendimentos dos cicloadutos sintetizados. ....                                                                                                                                                                                                                            | 77  |
| Tabela 3. Rendimentos dos álcoois isoxazolínicos sintetizados. ....                                                                                                                                                                                                                 | 80  |
| Tabela 4. Rendimentos dos aldeídos isoxazolínicos sintetizados. ....                                                                                                                                                                                                                | 82  |
| Tabela 5. Rendimentos das tiossemicarbazonas isoxazolínicas sintetizadas. ....                                                                                                                                                                                                      | 85  |
| Tabela 6. Rendimento do híbrido tiazol/isoxazolina – hidrazona. ....                                                                                                                                                                                                                | 90  |
| Tabela 7. Rendimentos dos diaril-isoxazóis sintetizados. ....                                                                                                                                                                                                                       | 164 |
| Tabela 8. Atividade leishmanicida <i>in vitro</i> (CI <sub>50</sub> ) da série difenil-isoxazol ( <b>105a-105k</b> ) e respectiva citotóxicidade (CI <sub>50</sub> ) e índice de seletividade (IS). ....                                                                            | 197 |
| Tabela 9. Atividade antichagásica (CI <sub>50</sub> ) <i>in vitro</i> da série diaril-isoxazol ( <b>105a-105k</b> ) e respectiva citotoxicidade (CC <sub>50</sub> ) e índice de seletividade (IS).....                                                                              | 199 |
| Tabela 10. Atividade antichagásica (CI <sub>50</sub> ) <i>in vitro</i> da série isoxazolina aza-bicíclica ( <b>4a-4k</b> ) e respectiva citotoxicidade (CC <sub>50</sub> ) e índice de seletividade (IS).....                                                                       | 200 |
| Tabela 11. Atividade citotóxica dos compostos <b>4a-4k</b> e <b>83a-83f</b> , frente a células cancerígenas e célula normal representados em inibição de crescimento percentual. Os valores representam o percentual de inibição do crescimento celular com 72 h de incubação. .... | 203 |

## LISTE DES TABLEAUX

### (RÉSUMÉ)

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Tableau 1. Rendements des enamides <b>79a-f</b> synthétisés.....                                                                                                                                                                                                                                    | 246 |
| Tableau 2. Rendements des cyclo-adduits synthétisés.....                                                                                                                                                                                                                                            | 251 |
| Tableau 3. Rendements de l'alcools synthétisés.....                                                                                                                                                                                                                                                 | 255 |
| Tableau 4. Rendements d'aldéhydes synthétisés.....                                                                                                                                                                                                                                                  | 257 |
| Tableau 5. Rendements des thiossemicarbazones synthétisées.....                                                                                                                                                                                                                                     | 260 |
| Tableau 6. Rendement de l'hybride thiazole/isoxazoline - hydrazone.....                                                                                                                                                                                                                             | 266 |
| Tableau 7. Rendements des diaryl-isoxazoles synthétisés.....                                                                                                                                                                                                                                        | 295 |
| Tableau 8. Activité <i>in vitro</i> leishmanicide (CI <sub>50</sub> ) de la série diaryl-isoxazole <b>105a-105k</b> et sa cytotoxicité (CI <sub>50</sub> ) et son indice de sélectivité (IS). ....                                                                                                  | 303 |
| Tableau 9. Activité anti- <i>T. cruzi</i> (CI <sub>50</sub> ) <i>in vitro</i> de la série diaryl-isoxazole ( <b>105a-105k</b> ) et sa cytotoxicité (CC <sub>50</sub> ) et son indice de sélectivité (IS).....                                                                                       | 304 |
| Tableau 10. Activité anti- <i>T.cruzi</i> (CI <sub>50</sub> ) <i>in vitro</i> de la série des isoxazolines aza-bicycliques ( <b>4a-4k</b> ) et de sa cytotoxicité (CC <sub>50</sub> ) et de son indice de sélectivité (IS).306                                                                      |     |
| Tableau 11. L'activité cytotoxique des composés <b>4a-4k</b> et <b>83a-83f</b> , contre les cellules normales et cancéreuses représentée en pourcentage d'inhibition de la croissance. Les valeurs représentent le pourcentage d'inhibition de la croissance cellulaire avec 72 h d'incubation..... | 308 |

## LISTA DE SIGLAS

|            |                                                                              |
|------------|------------------------------------------------------------------------------|
| ATR        | Reflectância Total Atenuada                                                  |
| CCD        | Cromatografia em Camada Delgada                                              |
| CDC        | Centro de Controle de Doenças e Prevenção                                    |
| CEFNO      | Óxido de Carboetoxiformonitrila                                              |
| CC         | Concentração Citotóxica                                                      |
| CI         | Concentração Inibitória                                                      |
| CMSPH      | Células Mononucleares do Sangue Periférico Humano                            |
| DC         | Doença de Chagas                                                             |
| DIBAL-H    | Hidreto de Diisobutil-alumínio ( <i>Diisobutylaluminium hydride</i> )        |
| DMF        | Dimetilformamida                                                             |
| DMSO       | Dimetilsulfóxido                                                             |
| INCA       | Instituto Nacional de Câncer                                                 |
| HMBC       | <i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>                               |
| HOMO       | Orbital Molecular Ocupado de Maior Energia                                   |
| HSQC       | <i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>                                |
| I.V. – ATR | Infravermelho de Reflectância Total Atenuada                                 |
| I.V. – FT  | Infravermelho Transformada de Fourier                                        |
| LIHMDS     | Bis(trimetilsilil)amida de lítio ( <i>Lithium bis(trimethylsilyl)amide</i> ) |
| LC         | Leishmaniose cutânea                                                         |
| LMC        | Leishmaniose muco-cutânea                                                    |
| LT         | Leishmaniose tegumentar                                                      |
| LUMO       | Orbital Molecular Não-Ocupado de Menor Energia                               |
| LV         | Leishmaniose visceral                                                        |
| MTT        | Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol2-il)-2,5-difeniltetrazólico                  |
| OMS        | Organização Mundial de Saúde                                                 |
| PBS        | <i>Phosphate Buffered Saline</i>                                             |
| PF         | Ponto de Fusão                                                               |
| Rf         | Fator de retenção                                                            |
| RMN        | Ressonância Magnética Nuclear                                                |

|      |                                        |
|------|----------------------------------------|
| RPMI | <i>Roswell Park Memorial Institute</i> |
| TEA  | Trietilamina                           |
| THF  | Tetraidrofurano                        |
| TSC  | Tiossemicarbazona                      |
| UV   | Ultravioleta                           |
| WHO  | <i>World Health Organization</i>       |

## SUMÁRIO

|                                                                                                                         |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1.INTRODUÇÃO .....                                                                                                      | 31 |
| 2.REVISÃO DE LITERATURA .....                                                                                           | 36 |
| 2.1. Leishmaniose .....                                                                                                 | 36 |
| 2.2. <i>Tripanossoma cruzi</i> .....                                                                                    | 40 |
| 2.3. Câncer .....                                                                                                       | 43 |
| 2.4. Isoxazóis (isoxazol e seus derivados) .....                                                                        | 47 |
| 2.4.1. Isoxazol .....                                                                                                   | 48 |
| 2.4.2. Isoxazolina .....                                                                                                | 51 |
| 2.5. Tiazol .....                                                                                                       | 55 |
| 2.6. Hidrazona e Hidrazidas .....                                                                                       | 59 |
| 3.CAPÍTULO 1 – Parte química - Série □ <sup>2</sup> -isoxazolina aza-bicíclica .....                                    | 65 |
| 3.1.Objetivos .....                                                                                                     | 65 |
| 3.1.1.Objetivo Geral .....                                                                                              | 65 |
| 3.1.2.Objetivos Específicos .....                                                                                       | 65 |
| 3.2.Estratégia Sintética .....                                                                                          | 67 |
| 3.2.1.Parte química .....                                                                                               | 67 |
| 3.3.Resultados e Discussão .....                                                                                        | 70 |
| 3.3.1.Síntese do trímero da Δ <sup>1</sup> -pirrolina <b>78</b> .....                                                   | 70 |
| 3.3.2. Síntese das enamidas <b>79</b> .....                                                                             | 71 |
| 3.3.3.Síntese do cloridrato de glicina esterificada <b>85</b> .....                                                     | 73 |
| 3.3.4.Síntese do clorooximidoacetato de etila <b>7</b> , precursor do <i>N</i> -Óxido de Nitrila – CEFNO <b>8</b> ..... | 74 |
| 3.3.5.Síntese racêmica dos cicloadutos isoxazolínicos <b>rac-80</b> .....                                               | 75 |
| 3.3.6.Síntese dos álcoois isoxazolínicos <b>rac-81</b> .....                                                            | 79 |
| 3.3.7.Síntese dos aldeídos isoxazolínicos <b>rac-82</b> .....                                                           | 80 |

|                                                                                                                                      |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3.3.8. Síntese das tiossemicarbazonas <b>rac-83</b> .....                                                                            | 83  |
| 3.3.9. Síntese do híbrido tiazol/isoxazolina – hidrazona .....                                                                       | 88  |
| 3.4. Procedimentos Experimentais .....                                                                                               | 95  |
| 3.4.1. Síntese do trímero da $\Delta^1$ -pirrolina <b>78</b> .....                                                                   | 97  |
| 3.4.2. Síntese das enamidas endocíclicas <b>79a-f</b> .....                                                                          | 98  |
| 3.4.3 Síntese da glicina esterificada <b>85</b> .....                                                                                | 103 |
| 3.4.4. Síntese do clorooximidoacetato de etila <b>7</b> (precursor do CEFNO) .....                                                   | 104 |
| 3.4.5. Cicloadição 1,3-dipolar das Enamidas endocíclicas <b>80a-c</b> com o óxido de carboetoxiformonitrila (CEFNO) <b>8</b> . ..... | 105 |
| 3.4.6. Síntese dos álcoois isoxazolínicos <b>81a-e</b> . .....                                                                       | 110 |
| 3.4.7. Síntese dos aldeídos isoxazolínicos <b>82a-f</b> via Swern .....                                                              | 115 |
| 3.4.8. Síntese das tiossemicarbazonas isoxazolínicas <b>83a-e</b> . .....                                                            | 120 |
| 3.4.9. Síntese do híbrido isoxazolínicos <b>4</b> . .....                                                                            | 126 |
| 4. CAPÍTULO 2 – Parte química - Série diaril-isoxazol .....                                                                          | 137 |
| 4.4. Objetivos .....                                                                                                                 | 137 |
| 4.4.1. Objetivo Geral .....                                                                                                          | 137 |
| 4.4.2. Objetivos Específicos .....                                                                                                   | 137 |
| 4.5. Estratégia Sintética .....                                                                                                      | 138 |
| 4.6. Resultados e Discussão .....                                                                                                    | 140 |
| 4.6.1. Síntese via cicloadição .....                                                                                                 | 140 |
| 4.6.2. Síntese via ciclização .....                                                                                                  | 152 |
| 4.6.3. Reações alternativas ciclização direta para formação do núcleo isoxazol. ....                                                 | 166 |
| 4.7. Procedimentos Experimentais .....                                                                                               | 167 |
| 4.7.1. Síntese da 4-((trimetilsilil)etnil)piridina <b>88</b> .....                                                                   | 168 |
| 4.7.2. Síntese da 4-etnilpiridina <b>89</b> .....                                                                                    | 169 |
| 4.7.3. Síntese da 5-(4-piridina)isoxazol-3- etil carboxilato <b>91</b> .....                                                         | 170 |

|                                                                                                                          |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 4.7.4. Síntese da (Z)-etil 2-hidróxi-4-oxo-4-(4-piridina)-but-2-enoato <b>98</b> .....                                   | 171 |
| 4.7.5 - Síntese da ((4-fluorofenil)etnil)trimetilsilano .....                                                            | 172 |
| 4.7.6 - Síntese da 1-etnil-4-fluorobenzeno .....                                                                         | 173 |
| 4.7.7 - Síntese da (Z)-etil 4-(4-fluorofenil)-2-hidróxi-4-oxobut-2-enoato <b>100</b> ....                                | 174 |
| 4.7.8 - Síntese da 5-(4-fluorofenil)isoxazol-3-etil carboxilato <b>101</b> .....                                         | 175 |
| 4.7.9 - Síntese da 5-(4-fluorofenil)-4-iodoisoxazol-3-etil carboxilato <b>102</b> .....                                  | 176 |
| 4.7.10 - Síntese da 5-(4-fluorofenil)-4-(piridin-4-il)isoxazol-3-etil carboxilato <b>11</b><br>.....                     | 177 |
| 4.7.11 - Síntese da (5-(4-fluorofenil)-4-(piridin-4-il)isoxazol-3-il) metanol <b>103</b> ..                              | 178 |
| 4.7.12 - Síntese da (5- (4-fluorofenil) -4- (piridin-4-il) isoxazol-3-il) metil sulfato de metila <b>104</b> .....       | 179 |
| 4.7.13 - Síntese da 1- (5- (4-fluorofenil) -4- (piridin-4-il) isoxazol-3-il) -N, N-dimetilmatanamina <b>105a</b> .....   | 180 |
| 4.7.14 - Síntese da N-((5-(4-fluorofenil)-4-(piridin-4-il)isoxazol-3-il)metanamina <b>105b</b> .....                     | 181 |
| 4.7.15 - Síntese da N-((5-(4-fluorofenil)-4-(piridin-4-il)isoxazol-3-il)-N-metilmetanamina <b>105c</b> .....             | 182 |
| 4.7.16 - Síntese da N-((5-(4-fluorofenil)-4-(piridina-4-il)isoxazol-3-il)metil)etanamina <b>105d</b> .....               | 183 |
| 4.7.17. Síntese da N-((5-(4-fluorofenil)-piridinadin-4-il)isoxazol-3-il)metiridinpan-1-amina <b>105e</b> .....           | 184 |
| 4.7.18 - Síntese da 4-((5-(4-fluorofenil)-4-(piridin-4-il)isoxazol-3-il)metil)morfolina <b>105f</b> .....                | 185 |
| 4.7.19 - Síntese da 5-(4-fluorofenil)-3-((4-metilpiperazin-1-il)metil)-4-(piridin-4-il)isoxazol <b>105g</b> .....        | 186 |
| 4.7.20 - Síntese da 5-(4-fluorofenil)-3-(piperazin-1-ilmetil)-4-(piridin-4-il)isoxazol <b>105h</b> .....                 | 187 |
| 4.7.21 - Síntese da 2-(4-((5-(4-fluorofenil)-4-(piridin-4-il)isoxazol-3-il)metil)piperazin-1-il)etanol <b>105i</b> ..... | 188 |

|                                                                                                                                       |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 4.7.22. Síntese da 5(4-((5-(4-fluorofenil)-4-(piridin-4-il)isoxazol-3-il)metil)piperidin-1-il)metanol <b>105j</b> .....               | 189 |
| 4.7.23 - Síntese da 5-(4-fluorofenil)-3-(piperidin-1-il-metil)-4-(piridin-4-il)isoxazol <b>105k</b> .....                             | 190 |
| 5.CAPÍTULO 3 – Avaliação do potencial biológico das moléculas .....                                                                   | 191 |
| 5.1 Objetivos .....                                                                                                                   | 191 |
| 5.1.1 Objetivo Geral .....                                                                                                            | 191 |
| 5.1.2. Objetivos Específicos .....                                                                                                    | 191 |
| 5.2. Metodologia .....                                                                                                                | 192 |
| 5.2.1. Avaliação da atividade anti- <i>Leishmania</i> .....                                                                           | 192 |
| 5.2.2. Citotoxicidade .....                                                                                                           | 193 |
| 5.2.3. Os ensaios <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> para identificação de compostos com atividade anti- <i>Trypanosoma cruzi</i> ..... | 194 |
| 5.2.4. Atividade Citotóxica em células tumorais .....                                                                                 | 196 |
| 5.3.Resultados e discussão .....                                                                                                      | 197 |
| 5.3.1.Atividade leishmanicida e de citotoxicidade .....                                                                               | 197 |
| 5.3.2.Atividade <i>T. cruzi</i> e citotoxicidade .....                                                                                | 198 |
| 5.3.3.Citotoxicidade .....                                                                                                            | 202 |
| 6.CONCLUSÃO .....                                                                                                                     | 205 |
| 7. ARTIGO PUBLICADO .....                                                                                                             | 207 |
| 1.INTRODUCTION .....                                                                                                                  | 207 |
| 2.REVUE DE LA LITTÉRATURE .....                                                                                                       | 211 |
| 2.1.Leishmaniose .....                                                                                                                | 211 |
| 2.2. <i>Trypanosoma cruzi</i> .....                                                                                                   | 215 |
| 2.3.Cancer .....                                                                                                                      | 218 |
| 2.4.Isoxazoles (isoxazole et ses dérivés) .....                                                                                       | 222 |
| 2.4.1.Isoxazole .....                                                                                                                 | 224 |
| 2.4.2.Isoxazoline .....                                                                                                               | 226 |

|                                                                                                                              |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 2.5.Thiazole .....                                                                                                           | 231 |
| 2.6.Hydrazone et hydrazides .....                                                                                            | 235 |
| 3.CHAPITRE 1 - Partie chimique - Série $\Delta^2$ -isoxazoline aza-bicyclique .....                                          | 241 |
| 3.1.Objectifs .....                                                                                                          | 241 |
| 3.1.1.Objectif général .....                                                                                                 | 241 |
| 3.1.2.Objectifs spécifiques .....                                                                                            | 241 |
| 3.2. Stratégie Synthétique .....                                                                                             | 242 |
| 3.2.1.Partie chimique .....                                                                                                  | 242 |
| 3.3.Résultats et discussion .....                                                                                            | 244 |
| 3.3.1.Synthèse du trimère $\Delta^1$ -pyrroline <b>78</b> .....                                                              | 244 |
| 3.3.2.Synthèse des enamides <b>79</b> .....                                                                                  | 245 |
| 3.3.3.Synthèse du chlorhydrate de glycine estérifié <b>85</b> .....                                                          | 247 |
| 3.3.4.Synthèse du chlorooxymidoacétate d'éthyle <b>7</b> , précurseur de l'oxyde de <i>N</i> -nitrile - CEFNO <b>8</b> ..... | 248 |
| 3.3.5.Synthèse racémique des cycloadducs isoxazoliniques <b>rac-80</b> .....                                                 | 249 |
| 3.3.6.Synthèse de l'alcool <b>rac-81</b> .....                                                                               | 254 |
| 3.3.7.Synthèse d'aldéhydes isoxazoliniques <b>rac-82</b> .....                                                               | 255 |
| 3.3.8.Synthèse de thiosemicarbazones <b>rac-83</b> .....                                                                     | 258 |
| 3.3.9.Synthèse de l'hybride thiazole/isoxazoline - hydrazone .....                                                           | 264 |
| 4.CHAPITRE 2 - Partie chimique - Série diaryl-isoxazole .....                                                                | 270 |
| 4.1.Objectifs .....                                                                                                          | 270 |
| 4.1.1.Objectif général .....                                                                                                 | 270 |
| 4.1.2.Objectifs spécifiques .....                                                                                            | 270 |
| 4.2. Stratégie synthétique .....                                                                                             | 271 |
| 4.2.1.Rétrosynthèse des diaryl-isoxazoles <b>10</b> et <b>11</b> .....                                                       | 271 |
| 4.2.2.Voie synthétique .....                                                                                                 | 272 |
| 4.2.2.1.Synthesis via cycloaddition .....                                                                                    | 272 |

|                                                                                                                                      |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 4.3.Résultats et discussion .....                                                                                                    | 273 |
| 4.3.1.Synthesis via cycloaddition .....                                                                                              | 273 |
| 4.3.2.Synthèse par la cyclisation .....                                                                                              | 285 |
| 5.CHAPITRE 3 - Évaluation du potentiel biologique des molécules .....                                                                | 297 |
| 5.1.Objectifs .....                                                                                                                  | 297 |
| 5.1.1.Objectif général .....                                                                                                         | 297 |
| 5.1.2.Objectifs spécifiques. ....                                                                                                    | 297 |
| 5.2.Méthodologie .....                                                                                                               | 298 |
| 5.2.1.Évaluation de l'activité anti- <i>Leishmania</i> .....                                                                         | 298 |
| 5.2.2.Cytotoxicité .....                                                                                                             | 299 |
| 5.2.3. Essais <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> pour l'identification de composés avec activité anti- <i>Trypanosoma cruzi</i> ..... | 300 |
| 5.2.4. Activité cytotoxique sur les cellules tumorales .....                                                                         | 302 |
| 5.3.Résultats et discussion .....                                                                                                    | 302 |
| 5.3.1.Activité leishmanicide et cytotoxicité .....                                                                                   | 302 |
| 5.3.2.Activité anti- <i>T. cruzi</i> et cytotoxicité .....                                                                           | 304 |
| 5.3.3. L'activité cytotoxique contre les cellules tumorales .....                                                                    | 308 |
| 6.CONCLUSIONS .....                                                                                                                  | 310 |
| 7. ARTICLE PUBLIÉ .....                                                                                                              | 312 |
| REFERÊNCIAS .....                                                                                                                    | 313 |

## 1.INTRODUÇÃO

A obtenção de novos medicamentos tem contribuído para o desenvolvimento científico nas ciências farmacêuticas e médicas. Os estudos galênicos iniciais, dirigidos por alquimistas e boticários, foram sementes do que hoje são os frutos das grandes descobertas e dos aprimoramentos tecnológicos em cosméticos, medicamentos e vacinas. (SNELL, 2019)

Nas ciências farmacêuticas, a química medicinal se destaca na obtenção e modulação de novos fármacos, dentre as ferramentas presentes nela tem-se a hibridização molecular, a qual tem por função a união de distintos grupos farmacofóricos em uma única molécula, no intuito de diminuir toxicidades conhecidas e potencializar o efeito farmacológico de compostos candidatos a fármacos (GONTIJO *et al.*, 2020).

Dentre os núcleos químicos de conhecida atividade biológica, pode-se destacar o isoxazol e a isoxazolina, os quais têm apresentado atividades como a anti-inflamatória, anticâncer e antiparasitária, além de estarem presentes em fármacos comerciais (GONÇALVES *et al.*, 2020; BARMADÉ *et al.*, 2016).

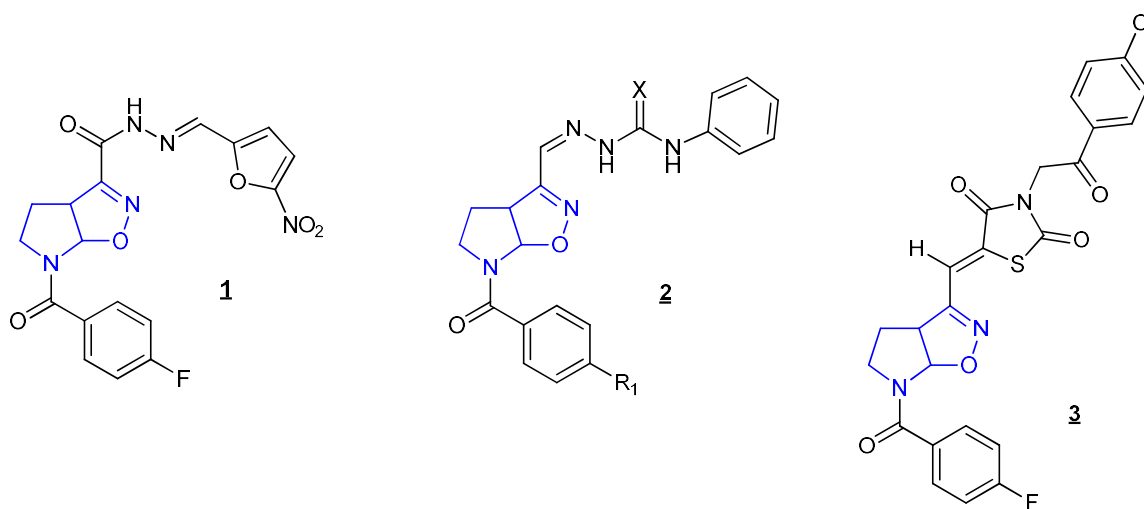
Outro núcleo de grande interesse é o tiazol, o qual apresenta pronunciada atividade antiparasitária, antimicrobiana e anticâncer (SCHADICH *et al.*, 2020; ZOU *et al.*, 2021; BERA *et al.*, 2021). Além dos núcleos, a presença dos espaçadores hidrazida e hidrazona entre os núcleos farmacofóricos, é ressaltada em diversas pesquisas como grupamentos de importância nas atividades biológicas, como a atividade anticâncer (ZEBBICHE *et al.*, 2020; UMAPATHI *et al.*, 2020) e leishmanicida (SILVA *et al.*, 2020).

Em nosso Grupo de Pesquisa (LASOF), derivados isoxazolínicos foram obtidos, na forma de hidrazonas **1** (ALMEIDA, 2010), semicarbazonas e tiossemicarbazonas **2** (ALMEIDA *et al.*, 2009; REIS *et al.*, 2011) e tiazolidina-dionas (ALMEIDA, 2010) (figura 1). O núcleo isoxazolínico de cinco membros (2-isoxazolina aza-bicíclica) foi desenvolvido em nosso laboratório, tendo sido aplicado na obtenção de vários derivados, incluindo os citados acima, que foram submetidos à avaliação da atividade antichagásica (resultados ainda não publicados) (ALMEIDA, 2010).

Os resultados mais expressivos no estudo de Almeida, 2010, foi da nitrofurfuril-hidrazona **1**, que despontou como antichágasico mais potente de ambas as séries conta a forma epimastigota do *T. cruzi*, demonstrando uma citototoxicidade de 60,19  $\mu\text{M}$  e uma  $\text{Cl}_{50}$  de 2,81  $\mu\text{M}$ , valor superior ao benznidazol (6,02  $\mu\text{M}$ ).

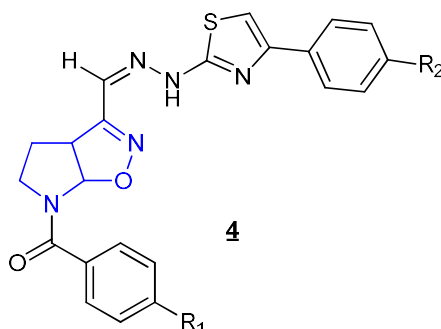
Já no estudo mais recente realizado por De Araújo, 2019, a séria tiazolidina-2,4-diona apresentou resultados antichagásicos mais promissores, dentre os eles a tiazolidina-diona **3** (figura 1) apresentou uma  $\text{Cl}_{50}$  de 2,50  $\mu\text{M}$  frente a forma epimastigota, o qual também apresentou atividade leishmanicida contra a forma promastigota da *L. amazonensis* e *L. infantum*, a saber  $\text{Cl}_{50}$  de 7,33  $\mu\text{M}$  e  $\text{Cl}_{50}$  de 5,81  $\mu\text{M}$  respectivamente, superiores a miltefosina ( $\text{Cl}_{50}$  de 15,82  $\mu\text{M}$  e  $\text{Cl}_{50}$  de 18,00  $\mu\text{M}$  respectivamente) (DE ARAÚJO, 2019). Os resultados ainda não foram publicados, uma vez que, após realização de ensaios mais específicos, poderão ser submetidos a pedido de patente.

Figura 1. Estruturas químicas de moléculas contendo o anel 2-isoxazolina-azabíclico com atividade antichagásica e leishmanicida.



A tiazolidina-diona **3** (figura 1), é um derivado do núcleo tiazol, sendo este de grande importância na química medicinal por suas atividades biológicas, além de estar presente em diversos medicamentos comerciais (RAM *et al.*, 2019). Desta maneira, foi proposta a síntese de híbridos 2-isoxazolina/tiazol inéditos, utilizando espaçadores de função hidazona, representados na estrutura **4** (figura 2) como uma série química inédita, para o estudo realizado no Brasil.

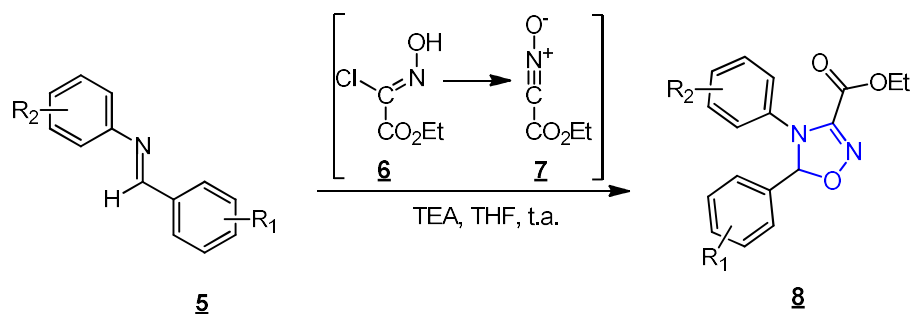
Figura 2. Estrutura geral dos híbridos 2-isoxazolina-azabícclica/tiazol inéditos, com espaçador hidrazona **4**.



Este doutorado foi desenvolvido em regime de co-tutela, numa cooperação com a Universidade de Nantes/França, sob orientação do Prof. Pascal Marchand (EA1155 – IICiMed, École Doctorale Biologie et Santé) com a Universidade Federal de Pernambuco, sob a orientação do Prof. Antônio Rodolfo de Faria (Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica) e da Profa. Teresinha Gonçalves Silva (Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas). O projeto foi financiado pelo programa CAPES-COFECUB e o aluno de doutorado permaneceu um ano na cidade de Nantes.

No Laboratório de Síntese Orgânica Aplicada a Fármacos - LASOF/ Brasil, foi desenvolvido o projeto de síntese de análogos dos Coxibes para avaliação biológica antiinflamatória e anticâncer (COUTINHO, 2018). O núcleo utilizado foi a oxadiazolina **8** obtida por reação de cicloadição 1,3-dipolar utilizando o cloroximidoacetato de etila **7** (sintetizado pelo grupo de pesquisa) e diariliminas **6** (esquema 1).

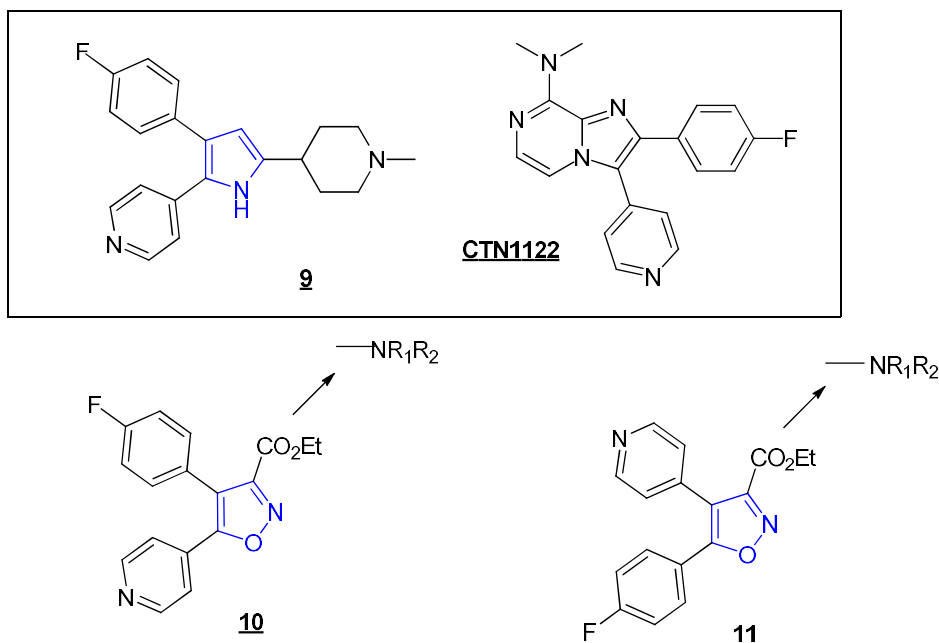
Esquema 1. Esquema de reação da síntese de compostos 1,2,4-oxadiazolina diarílicos **8** a partir de iminas diariladas **5** e cloroximidoacetato de etila **6** (precursor de nitrila *N*-óxido **7**).



Nos trabalhos apresentados por Allocco (2006) e Marchand (2015), sistemas *orto*-diaril com pirrol **9** e imidazo [1,2-*a*]pirazina **10** (Figura 3) apresentaram uma expressiva atividade leishmanicida frente a enzima caseína quinase 1 (CK1), presente na *Leishmania major* (LmCK1). Dentre os resultados, se destacam os valores LmCK1  $\text{CI}_{50}$  de 7nM e de 0,52  $\mu\text{M}$ , respectivamente (ALLOCCO *et al.*, 2006; MARCHAND *et al.*, 2015).

Pelo que foi demonstrado anteriormente e também com a expertise do grupo de pesquisa co-liderado pelo Prof. Pascal Marchand, na síntese de moléculas heterocíclicas com finalidade antiparasitária (MARCHAND *et al.*, 2015), foi proposto o projeto de supervisão conjunta de doutorado, tornando possível projetar a síntese de novas moléculas com o diaril-isoxazol **10** e **11** com propriedades antileishmania e por fim, poder comparar com os resultados que serão fornecidos entre as moléculas sintetizadas tanto em Nantes quanto em Recife (Figura 3).

Figura 3. Estrutura das moléculas **9** e **CTN1122** e estrutura geral das novas moléculas diaril isoxazóis **10** e **11**.



A leishmaniose é uma doença parasitária negligenciada, causada pelos parasitas *Leishmania* spp. e que em todo o mundo afeta cerca de 1 milhão de pessoas. Essa doença acomete mais de 3.500 pessoas/ano só no Brasil e atualmente possui uma terapêutica medicamentosa limitada, sem vacina humana disponível (LUZ *et al.*, 2018; WHO, 2021).

Outra doença negligenciada é a doença de Chagas (DC), a qual possui o parasita *Trypanossoma cruzi* como agente etiológico. A DC afeta mais de 6 milhões de pessoas em todo o mundo, sendo endêmica nos países em desenvolvimento, possuindo como únicas alternativas terapêuticas o benznidazol e o nifurtimox, eficazes apenas na fase aguda da doença, além de terem elevada toxicidade, tornando aquela um alvo necessário para pesquisa de novos fármacos (DNDi, 2022; PITASSE-SANTOS *et al.*, 2017).

Outra enfermidade de grande incidência a nível mundial e de grande desafio terapêutico é o câncer. O câncer é a denominação de mais de 100 doenças caracterizadas pelo crescimento desordenado de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se para outras regiões do corpo e tem origem multifatorial e fatores de riscos como o tabagismo e o consumo de álcool (INCA, 2020). Atualmente um número limitado de drogas é utilizado na quimioterapia, as quais

apresentam muitas vezes efeitos secundários não desejáveis, observando-se ainda o desenvolvimento de resistência a esses agentes (NHI, 2020).

Diante dos dados apresentados acima, este trabalho se empenha na síntese de inéditas moléculas com potenciais atividades antiparasitárias e anticâncer, baseado na expertise dos laboratórios em questão e dos dados apresentados na literatura. Distintas séries contendo o núcleo isoxazol e o híbrido isoxazolina-azabícclo/tiazol serão sintetizadas e após confirmadas suas estruturas serão submetidas ao estudo *docking* molecular e às atividades leishmanicida e citotóxicas.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Leishmaniose

A leishmaniose é considerada uma doença tropical negligenciada, assim como a doença de Chagas, filariose, dengue e malária. Ela é uma doença parasitária causada pelo protozoário flagelado do gênero *Leishmania*, e sua transmissão se dá quando o hospedeiro vertebrado (o cão ou o humano) é picado pela fêmea do flebótomo infectado, a qual inocula os parasitas em sua corrente sanguínea (FIOCRUZ, 2013).

A leishmaniose está presente em 98 países e é classificada dentre as dez principais doenças tropicais negligenciadas em todo o planeta, com mais de 12 milhões de pessoas infectadas. Há 0,9 a 1,6 milhões de novos casos a cada ano, entre 20.000 e 30.000 mortes e 350 milhões de pessoas em risco de infecção. O Brasil encontra-se entre os dez países com o número de casos mais alto no mundo, em 2020, foram reportados 16.432 novos casos de infecção (PAHO, 2021).

Existem mais de 20 espécies de *Leishmania*, as quais manifestam três formas clínicas principais da doença, que diferem de acordo com o parasita responsável pela infecção (REITHINGER *et al.*, 2007):

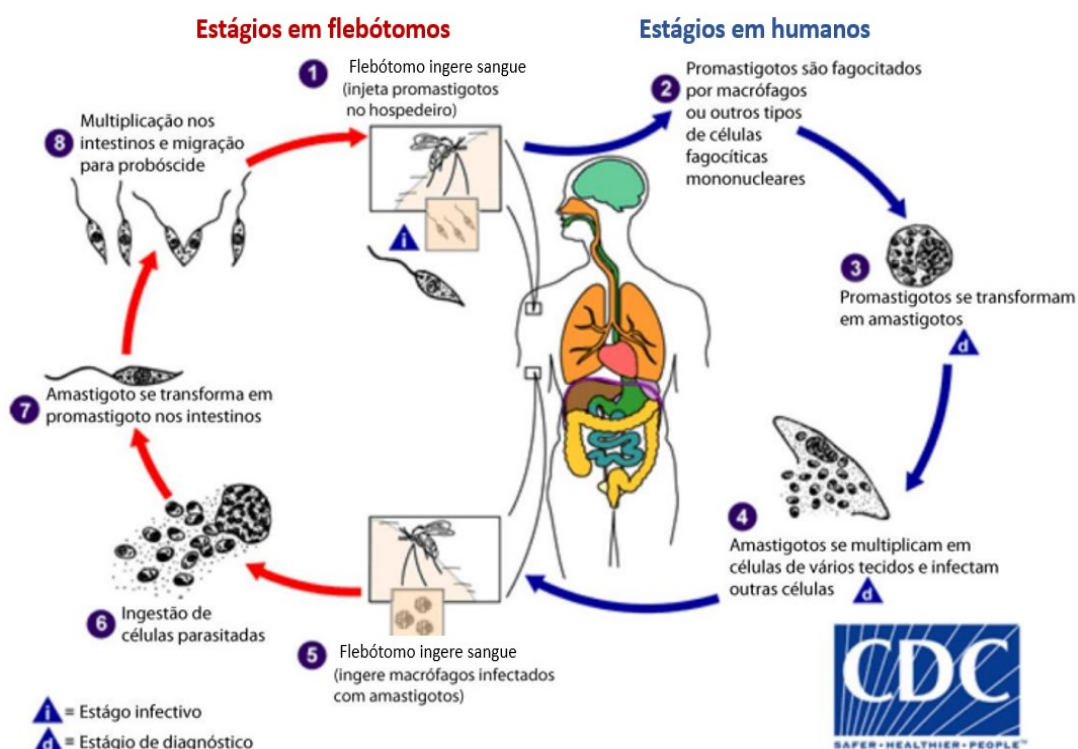
- Leishmaniose visceral (LV, também conhecida como kala-azar): este é o tipo mais mortal de leishmaniose com 90% de letalidade, que é causado pelas espécies *Leishmania donovani* e *L. infantum/L. chagasi*. Os sintomas mais comuns são: febre irregular, perda de peso, hepatoesplenomegalia e anemia. Em 2016, cerca de 90% dos casos dessa doença estavam concentrados no Brasil, Etiópia, Índia, Bangladesh, Sudão e Sudão do Sul (MOHEBALI *et al.*, 2020; PAHO, 2021).

- Leishmaniose cutânea (LC): é a forma mais comum da doença. As espécies de *Leishmania* mais comuns que causam LC no Velho Mundo são *L. major*, *L. infantum* e *L. tropica* e no Novo Mundo esta doença é causada por *L. amazonensis*, *L. chagasi*, *L. mexicana*, *L. naiffi*, *L. braziliensis* e *L. guyanensis*. É caracterizada por lesões cutâneas, incluindo úlceras, deixando cicatrizes permanentes. O número total de 90% de todos os casos de LC ocorre apenas em sete países: Afeganistão, Argélia, Brasil, Irã, Peru, Arábia Saudita e Síria. No Brasil a LC representa mais de 90% dos casos. (LIMA, 2017; VRIES; REEDIJK; SCHALLIG, 2015)

- Leishmaniose cutâneo-mucosa (LCM): Na maioria dos casos, a LCM resulta de LC de evolução crônica e curada sem tratamento ou com tratamento inadequado. É causada principalmente por *L. braziliensis*, mas também por *L. panamensis*, *L. guyanensis*, *L. amazonensis* e *L. major*. Tem como características lesões que atingem a orofaringe, comprometendo o septo cartilaginoso e demais áreas associadas, a qual é causada por uma forte resposta imunopatológica. Cerca de 90% dos casos estão no Brasil, Bolívia e Peru. No Brasil, 3 a 6% dos casos de leishmaniose apresentam a LCM, no entanto, em alguns municípios endêmicos, essa proporção pode ser superior a 25% (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018; LIMA, 2017).

O ciclo de vida de *Leishmania* spp. tem dois estágios, um no hospedeiro vertebrado e outro no hospedeiro invertebrado, e o parasita tem duas formas: promastigota (flagelado) e amastigota (não flagelado) apresentado na Figura 4.

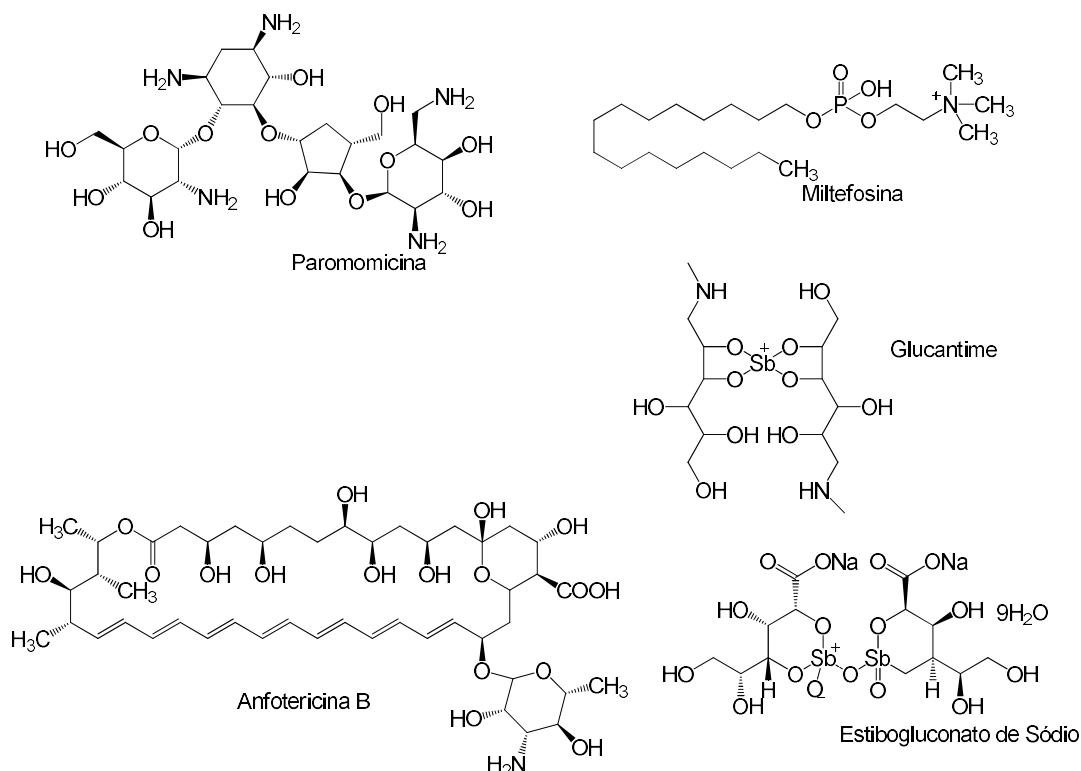
Figura 4. Ciclo de vida de *Leishmania* spp. Adaptado de “Centers for Disease Control and Prevention”



Fonte: (<https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>)

O diagnóstico da doença é feito a partir de exames clínicos, parasitológicos e imunológicos. Atualmente, os medicamentos existentes para o tratamento desta doença crônica são principalmente parenterais, têm muitos efeitos colaterais, além de parasitas resistentes a eles. Os principais medicamentos utilizados no tratamento da leishmaniose são os antimoniais pentavalentes, anfotericina B, miltefosina, pentamidina e paromomicina. Atualmente não há vacina (Figura 5) (GHORBANI; FARHOUDI, 2017).

Figura 5. Estruturas químicas dos principais medicamentos utilizados no tratamento da leishmaniose.



Fonte: Autor

Esses tratamentos geram reações adversas muito graves, como efeitos teratogênicos e cardiotoxicos, além de aumento da resistência atribuída ao seu uso. Os tratamentos atuais são, portanto, tóxicos, caros ou levam à resistência do parasita, portanto, há uma necessidade urgente de novos medicamentos.

Nesse contexto, o trabalho preliminar da equipe do IICiMed (*Cibles et Médicaments des Infections et de l'Immunité*) identificou a serina-treonina quinase de *Leishmania* spp., Caseína quinase 1 (*LmCK1*), como um alvo parasitário potencial (BAZIN *et al.*, 2021; MARCHAND *et al.*, 2015).

A caseína quinase 1 está presente em todas as células eucarióticas e foi recentemente descrita em vários organismos protozoários. Em *Leishmania* spp., duas ecocinases excretadas constitutivamente foram caracterizadas bioquimicamente e foram determinadas como tendo atividades semelhantes a CK1 (RACHIDI *et al.*, 2013).

Vários estudos têm mostrado que essa enzima desempenha um papel importante nas vias de sinalização biológica em parasitas (DURIEU *et al.*, 2016; RACHIDI *et al.*, 2013; MARHADOUR *et al.*, 2012). Assim, a avaliação biológica

envolvendo a enzima *LmCK1* é uma excelente escolha na busca por um novo fármaco antiparasitário.

## 2.2. *Trypanossoma cruzi*

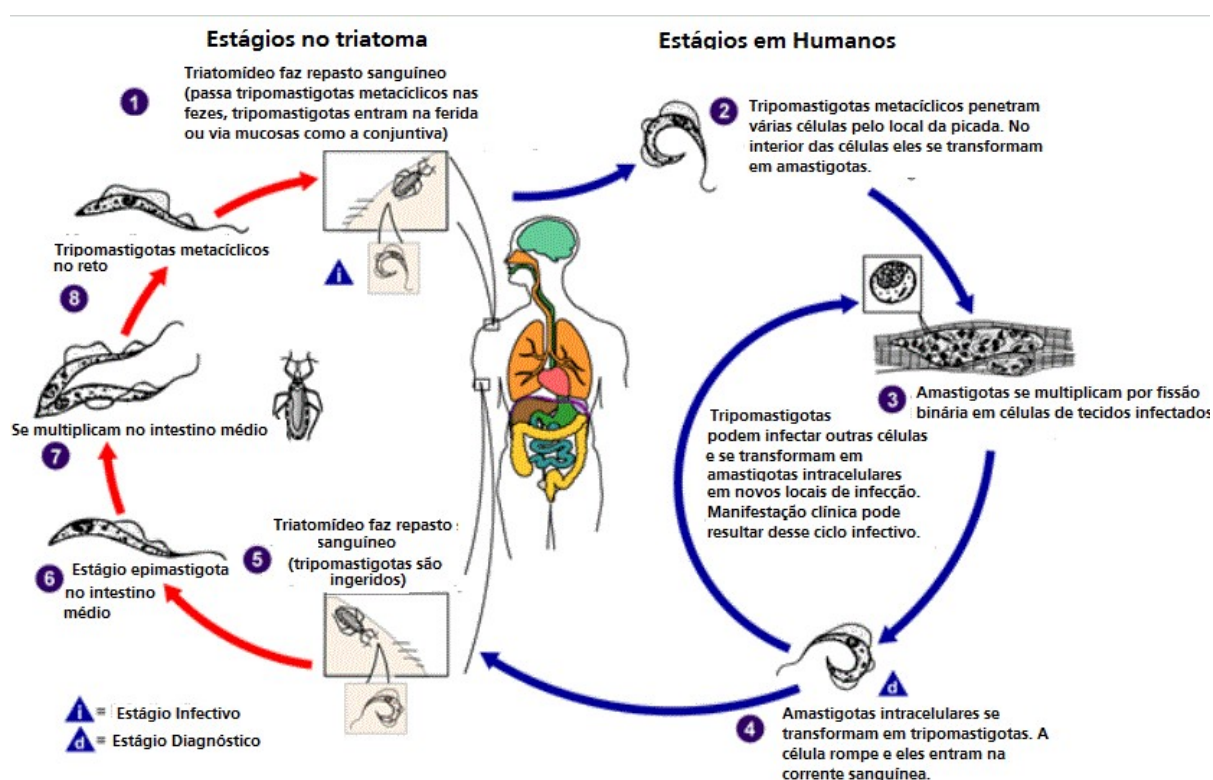
A doença de Chagas (DC) é outra doença parasitária causada pelo cinetoplastídeo hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* e sua transmissão se dá quando o inseto hematófago, conhecido popularmente como barbeiro. Este alimenta-se de sangue do hospedeiro vertebrado e elimina o parasita pelas fezes em sua forma tripomastigotas, próximo do local da picada, infectando-o (FIOCRUZ, 2017).

Foi descrita pela primeira vez pelo pesquisador brasileiro Carlos Chagas, em 1909, enquanto este trabalhava no controle de uma epidemia de malária, conhecida como paludismo. No trabalho que Chagas realizou, ele mesmo descreveu o ciclo de vida, meio de transmissão, etiologia, formas clínicas e epidemiologia da nova doença descoberta, o que lhe rendeu duas indicações ao Nobel de medicina da época. A doença também é conhecida como tripanossomíase americana, visto que a tripanossomíase se refere a uma enfermidade causada por protozoários do gênero *Trypanosoma*, sendo o epíteto *T. cruzi* uma homenagem ao pesquisador Oswaldo Cruz (CUNHA; CUNHA, 2021; LEWINSOHN, 1979).

Por ser endêmica de países em desenvolvimento e ter como única alternativa terapêutica o benznidazol, eficaz apenas na fase aguda da doença e de elevada toxicidade, a DC é reconhecida como uma doença negligenciada. Ela é endêmica em 21 países da América Latina, porém presente em países da América do Norte, Europa, Japão e Austrália, afetando cerca de 6 milhões de pessoas em todo mundo, portadores da fase crônica da doença (PAHO, 2022; DNDi, 2022). No Brasil, estima-se que 1 a 4,6 milhões de pessoas estejam infectadas, com uma média de 4 mil óbitos a cada ano, sendo registradas 1746 mortes em 2020. No entanto, este número pode ser maior, principalmente devido ao número de casos sem registro durante o período de pandemia da COVID-19, além da falta de conhecimento da doença e, consequentemente, pouco diagnóstico e notificação desta (BRASIL. Ministério da Saúde, 2022; MSF, 2020; SANTOS *et al.*, 2020)

O ciclo de vida do *T. cruzi* tem dois estágios, um no hospedeiro vertebrado (o humano) e outro no hospedeiro invertebrado (o triatomíneo), e o parasita tem três formas: tripomastigota (flagelado) o qual pode ser circulante ou metacíclico, amastigota (não flagelado) e epimastigota (flagelado) apresentado na Figura 6. Os tripomastigotas metacíclicos são encontrados nas fezes e urina do inseto vetor e os tripomastigotas circulantes no sangue de mamíferos, ambos são formas não replicativas e infectantes. Já os epimastigotas estão presentes no tubo digestivo do inseto vetor, enquanto os amastigotas são observados no interior das células de mamíferos, ambos como formas replicativas (FIOCRUZ, 2017).

Figura 6. O ciclo de vida do *Trypanossoma cruzi*. Adaptado: Adaptado de “Centers for Disease Control and Prevention”



Fonte: (<https://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>)

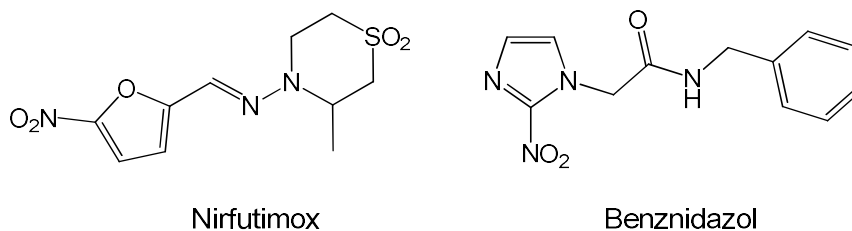
Durante a fase no hospedeiro invertebrado, as formas epimastigota, presentes no intestino posterior, diferenciam-se em tripomastigotas metacíclicos (um processo conhecido como metaciclogênese) os quais, eliminados pelas fezes e urina do inseto vetor, são capazes de infectar o hospedeiro vertebrado. O

parasita não penetra a pele intacta, somente infectando o hospedeiro via mucosa ou ferimentos na pele. Nos mamíferos, os parasitos em sua forma tripomastigosta, penetram e se desenvolvem no interior das células próximas ao local de inoculação, onde se diferenciam em amastigotas intracelulares. As amastigotas se multiplicam por fissão binária e se diferenciam em tripomastigotas sendo liberados no sangue circulante após o rompimento das células do hospedeiro, podendo as formas tripomastigotas circulantes reinfectarem outras células reiniciando o ciclo. Caso o triatomíneo se alimente do sangue infectado do hospedeiro mamífero, as formas tripomastigotas são ingeridas pelo inseto e após alguns dias, os parasitas se transformam em epimastigotas, se dividindo por fissão binária em seu intestino, os quais migram para o reto do parasita e se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos podendo assim serem eliminadas pelas fezes e urina (CUNHA; CUNHA, 2021; CDC, 2019).

A DC possui uma fase aguda e uma fase crônica. A fase aguda ocorre imediatamente após a infecção e pode durar algumas semanas ou meses e durante esta fase, os parasitas estão circulantes na corrente sanguínea. A sintomatologia desta fase é geralmente leve ou até mesmo assintomática, apresentando febre, inchaço ao redor do local da inoculação ou inchaço avermelhado das pálpebras, conhecido como sinal de Romaña. Durante a fase crônica, após décadas, os parasitas ficam interiorizados em células cardíacas e do músculo digestivo levando a distúrbios cardíacos e digestivos (megacólon e megaesôfago), neurológicos ou mistos (CDC, 2019; WHO, 2022).

O diagnóstico da DC pode ser realizado por microscopia, na fase aguda da doença, enquanto na fase crônica é realizado por pesquisa imunológica. Os dois principais fármacos utilizados para o tratamento são benznidazol (medicamento de primeira escolha) ou o nifurtimox (que não está disponível no Brasil) e tem uma duração média de 60 dias (Figura 7). Estes fármacos são mais efetivos fase aguda da doença, e quando a pessoa infectada recebe o tratamento adequado nesta fase, tem aproximadamente 100% de chance de cura (MSF, 2022).

Figura 7. Estruturas químicas dos principais medicamentos utilizados no tratamento da doença de Chagas (DC).



Fonte: Autor

Ambos causam efeitos adversos, com baixa eficácia do tratamento durante a fase crônica, além de uma resistência do parasita a estes. O benznidazol por ter dose terapêutica mais elevada, causa efeitos tóxicos bem mais acentuados, e frequentes, como astenia, dor muscular, náuseas e distúrbios na hematopoiese. O nirfutimox apresenta efeitos semelhantes, porém com menor intensidade e frequência, como anorexia, distúrbios psíquicos, epigastralgia, irritabilidade e neurite periférica sensitiva (SILVA J *et al.*, 2014).

Deste modo, há uma urgência pela descoberta de fármacos mais eficazes, uma vez que tratamentos atuais são tóxicos, limitados a fase aguda e levam à resistência do parasita.

### 2.3. Câncer

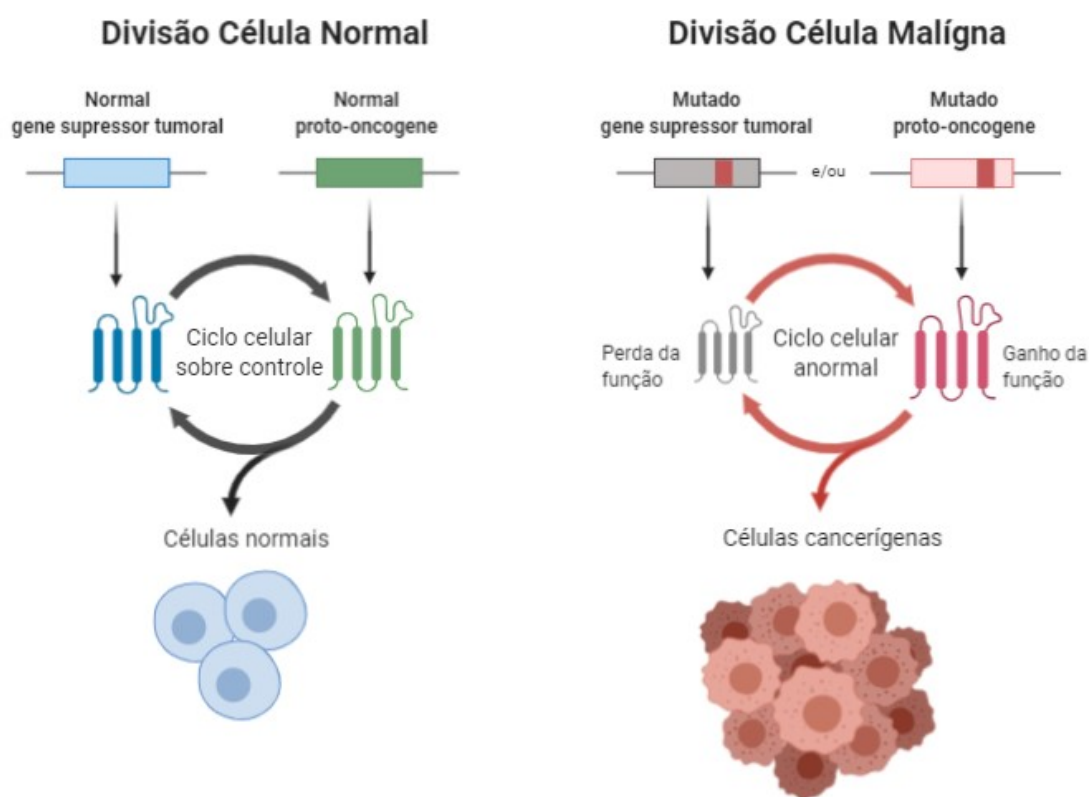
Câncer é o nome dado a uma coleção de doenças relacionadas, que abrange mais de 100 diferentes tipos de doenças malignas, as quais têm em comum o crescimento descontrolado de células anormais. Em todos os tipos de câncer, as células começam a se dividir sem parar e se espalhar para os tecidos adjacentes ou órgãos a distância, podendo se infiltrar em tecidos (sanguíneo, cerebral, ósseo, pulmonar, etc.) saudáveis do corpo, destruindo-os. Também é conhecido como neoplasia e contrasta com os tumores benignos, pois estes últimos não se disseminam (INCA, 2020; NIH, 2015).

A oncogênese (o processo fisiopatológico do câncer) ocorre devido a uma desordem genética, a qual pode ocorrer por exposição a fatores de risco como exposição a radiações ionizantes ou radiações solares, tabagismo, álcool, exposição prolongada a agentes químico ou herança genética (PLUMMER *et al.*, 2016; INCA, 2020).

Todo ciclo de vida celular é regulado por genes, os quais codificam cada uma das proteínas envolvidas no ciclo celular. No controle positivo do ciclo, induzindo ou

estimulando a progressão deste, há os **proto-oncogenes**, os quais após sofrerem mutações se tornarão oncogenes, cuja ação permitirá ganho de função à célula mutante. No controle negativo do ciclo celular estão os genes **supressores tumorais**, que atuam bloqueando ou protegendo o ciclo, e as mutações neste grupo de genes se manifestam pela sua falta de ação contra a célula oncogênica (Figura 8). Logo, mutações nestes genes podem levar à desregulação deste ciclo (WARD, 2002).

Figura 8. Expressão do gene proto-oncogene e do gene supressor tumoral em células normais e em células cancerosas.



Fonte: <https://app.biorender.com/biorender-templates>. Adaptado

Além das alterações no ciclo de vida, podem ocorrer alterações nos genes que controlam o tempo de vida ou programam a morte celular, como os genes de **reparo do DNA** e os genes envolvidos no processo da **apoptose** (processo que provê rápida eliminação de células desnecessárias ou perigosas ao organismo). Resistindo a apoptose, muitos tumores sobrevivem e se desenvolvem, como

resultado, se acumulam no organismo e utilizando o oxigênio e os nutrientes de células saudáveis (LIVINGSTON, 2001).

Quando se dividem rapidamente, estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores, os quais podem migrar pela corrente sanguínea ou pelos gânglios linfáticos e se instalar em outros órgãos, substituindo o tecido saudável pelo tumoral. Esse processo de disseminação do câncer é denominado metástase (FARES *et al.*, 2020).

Os diferentes tipos de câncer correspondem aos vários tipos de células do corpo. Quando começam em tecidos epiteliais, como pele ou mucosas, são denominados carcinomas. Se o ponto de partida são os tecidos conjuntivos, como osso, músculo ou cartilagem, são chamados sarcomas (SMITH; DUEBER; ALLISON, 2020).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, o câncer é a segunda doença mais mortal no mundo. Em 2020 houve mais de 19 milhões de novos casos e 9,95 milhões de mortes, sendo o tipo de câncer mais mortal o de pulmão, com mais de 1,79 milhões de mortes em todas as idades e em ambos os sexos (IARC, 2020). O câncer de pulmão é o mais mortal entre os homens. Entre as mulheres, o de mama é o mais frequente. Os cinco tipos mais comuns de câncer que matam homens são, em ordem de frequência, câncer de pulmão, câncer de estômago, câncer de fígado, câncer colorretal e câncer de esôfago. Os cinco cânceres mais comuns que matam mulheres são, em ordem de frequência, câncer de mama, câncer de pulmão, câncer de estômago, câncer colorretal e câncer cervical (IARC, 2020; WHO, 2018).

No Brasil, o câncer também é a segunda doença mais mortal, tendo mais de 600 mil casos e mais de 224 mil mortes em 2020. O câncer de mama foi o mais prevalente entre as mulheres nos anos de 2018 e 2020. Já entre os homens, o de próstata foi o mais prevalente em 2020, sendo o de traqueia, brônquio e pulmões o mais prevalente em 2018 (INCA, 2020).

O tratamento do câncer é realizado empregando-se três principais modalidades: a quimioterapia, radioterapia e cirurgia. A escolha depende da suscetibilidade dos tumores a cada uma das modalidades terapêuticas e à melhor sequência de sua administração, podendo ser administradas em conjunto.

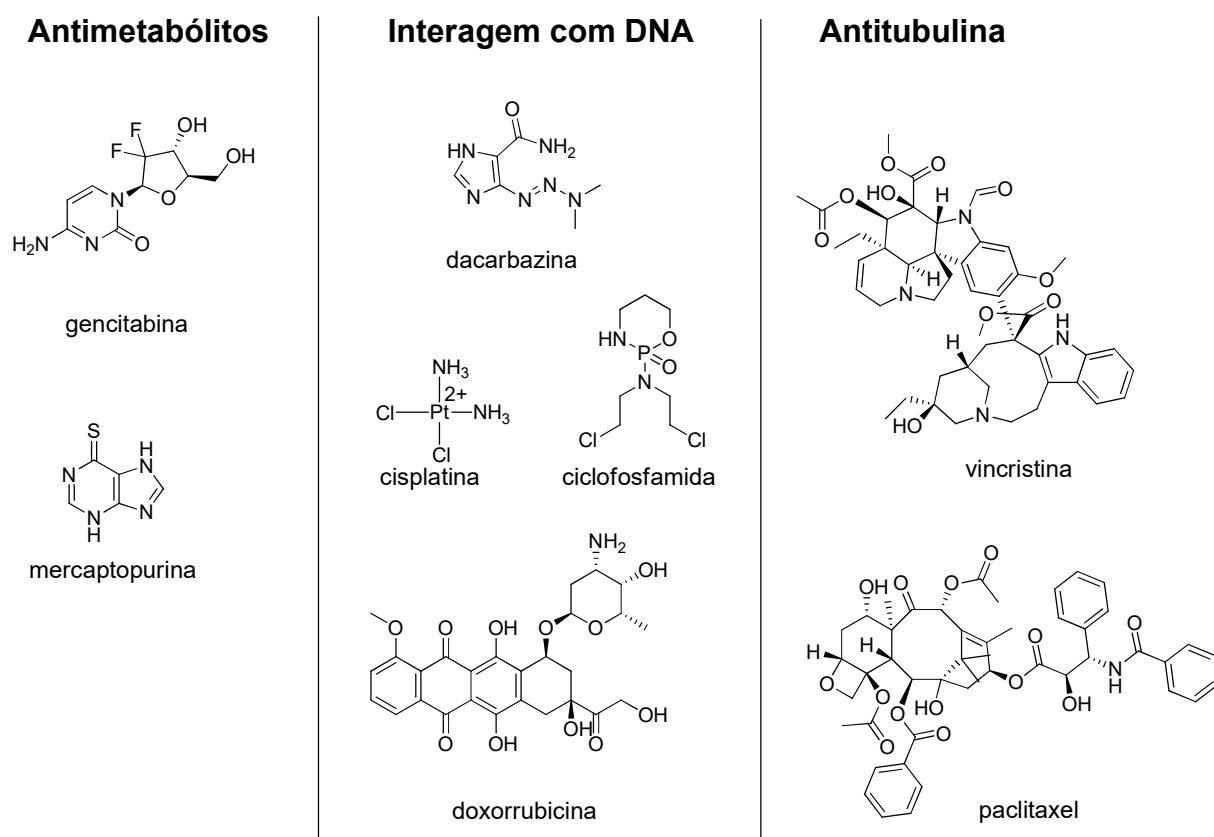
Atualmente, poucas são as neoplasias malignas tratadas com apenas uma destas modalidades (BRACCI *et al.*, 2013).

A quimioterapia utiliza de medicamentos denominados antineoplásicos, administrados em intervalos regulares, que variam de acordo com os esquemas terapêuticos. Entretanto, estes agentes podem impactar não apenas as células tumorais, mas também as células normais do hospedeiro e, conseqüentemente, seu sistema imune (BRACCI *et al.*, 2013) (SWIFT; GOLSTEYN, 2014).

Três famílias diferentes de drogas antineoplásicas convencionais (Figura 9) podem ser distinguidas de acordo com sua ação no DNA (GUICHARD *et al.*, 2017) (NUSSBAUMER *et al.*, 2011):

- 1) Moléculas que atuam na síntese de DNA (antimetabólitos);
- 2) Moléculas com ação direta sobre o DNA (agentes alquilantes, agentes de ligação cruzada, agentes intercalantes e inibidores da topoisomerase);
- 3) Moléculas com ação na mitose (agentes antitubulina).

Figura 9. Estruturas químicas de alguns antineoplásicos de acordo com sua função farmacológica na célula.

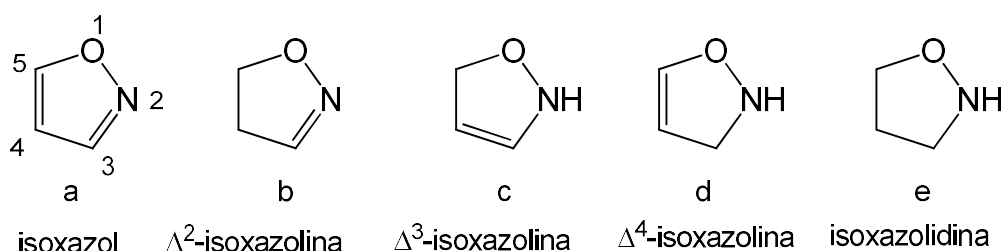


Fonte: Autor

## 2.4. Isoxazóis (isoxazol e seus derivados)

Os isoxazóis são compostos heterocíclicos de cinco membros, os quais desempenham um papel significativo no campo da química medicinal. Possuem três átomos de carbono e um átomo de oxigênio vicinal a outro de nitrogênio, podendo ser classificados como isoxazol, isoxazolina e isoxadiazolidina, dependendo da insaturação presente no anel. Quando insaturado, heterociclo aromático, é chamado de isoxazol (a), sendo parcialmente saturado os análogos são chamados de isoxazolininas (b-d) e completamente saturado é a isoxazolidina (e) (Figura 10) (CHIKKULA; S., 2017).

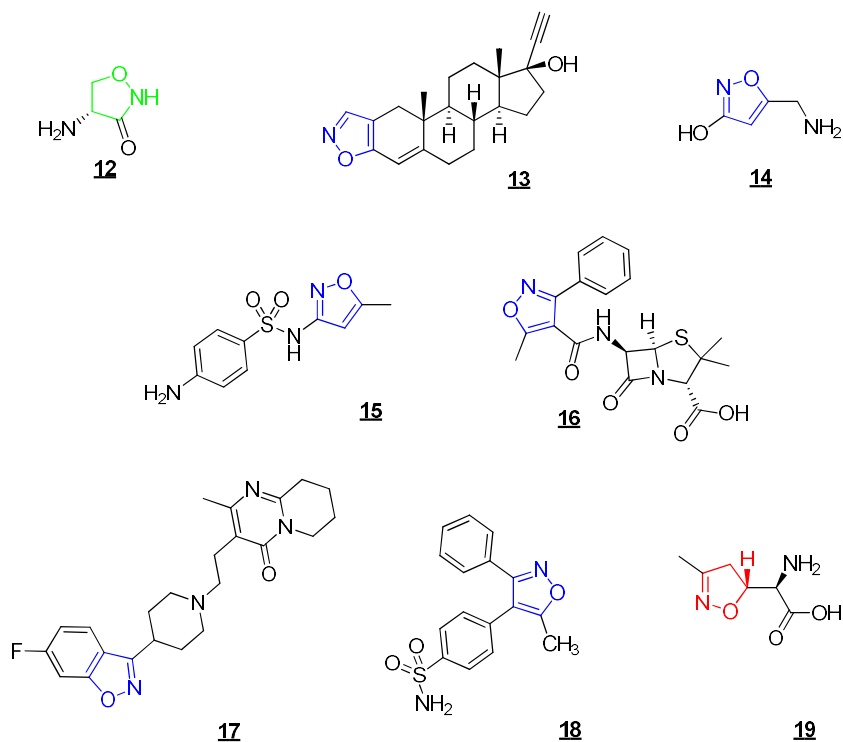
Figura 10. Estruturas químicas básicas dos núcleos isoxazol, isoxazolina e isoxazolidina.



Fonte: Autor

Os núcleos de interesse neste trabalho, o isoxazol e o  $\Delta^2$ -isoxazolinina, possuem destaque quanto suas atividades farmacológicas, estando presente em alguns produtos naturais (Figura 11), como no caso do antibiótico antitubercular e antilepra cicloserina **12** (A DESJARDINS *et al.*, 2016), esteróis como o danazol **13** (MCKINNEY *et al.*, 2013) e o muscimol **14** isolado da *Amanita muscaria* (MICHELOT; MELENDEZ-HOWELL, 2003). Podem ser obtidos sinteticamente por reações de ciclização e de cicloadição, as quais originam compostos com atividade anti-inflamatória (BANOGLU *et al.*, 2016), imunossupressora (ZIMECKI *et al.*, 2018) anticâncer, antimicrobiana e antioxidante (SHAIK *et al.*, 2020). Além disto, os núcleos isoxazol e isoxazolinina estão presentes em medicamentos como os antibióticos sulfametoxazol **15** e oxacilina **16**, o antipsicótico risperidona **17**, o inibidor seletivo da COX-2, o valdecoxibe **18** e o acivicina **19**, o qual possui atividade antitumoral e leishmanicida (Figura 11) (AGRAWAL; MISHRA, 2018).

Figura 11. Fármacos comerciais contendo o núcleo isoxazol (azul), isoxazolina (vermelho) e isoxazolidina (verde).

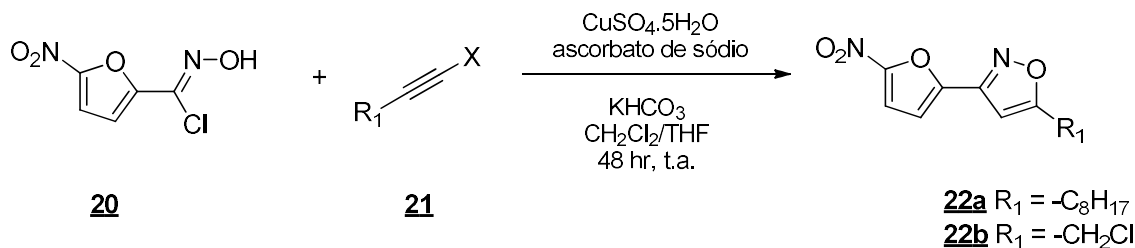


Fonte: Autor

#### 2.4.1. Isoxazol

Em um trabalho realizado por Trefzger *et al.* (2019), uma série de nitrofurano isoxazóis foi sintetizada utilizando  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  e ácido ascórbico e testada sua atividade leishmanicida, a qual mostrou que os compostos substituídos por cloroalquil eram ativos para o promastigota e amastigota formas, enfatizando a atividade do composto **22a** que apresentou  $\text{CI}_{50} = 0,6 \mu\text{M}$  e  $\text{IS} = 5,2$  contra as formas amastigotas. Na série alquilada, o composto **22b** se destaca com  $\text{CI}_{50}$  de  $8,5 \mu\text{M}$  e  $\text{IS}$  de  $8,0$  para as formas amastigotas (Esquema 2) (TREFZGER *et al.*, 2019).

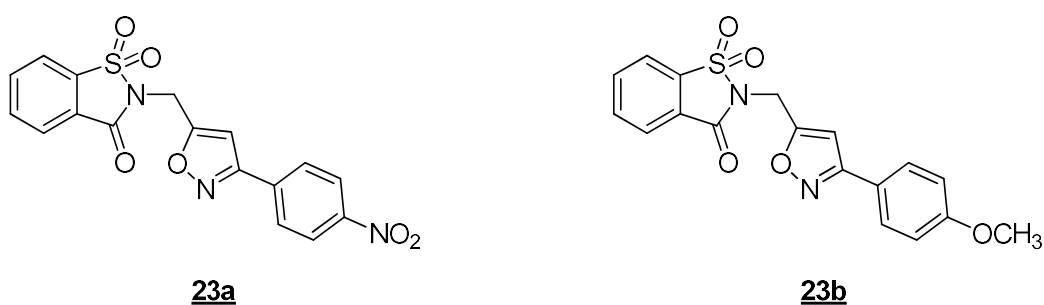
Esquema 2. Síntese de nitrofurano isoxazóis **22a-b**



Neste trabalho também foi avaliada a atividade antifúngica, na qual o composto **22b** foi ativo contra todas as cepas de *Cândida* testadas, com uma concentração inibitória mínima (MIC) para *C. krusei* e *C. glabrata* de 35,5  $\mu\text{M}$  e 17,5  $\mu\text{M}$ , respectivamente, inferior ao fluconazol.

Em um estudo de avaliação antitumoral, séries de isoxazóis e  $\Delta^2$ -isoxazolidinas ligadas a estrutura sacarina (Figura 12), apresentaram uma potente atividade inibidora de anidrases carbônicas humanas (hCAs), sendo seletivas contra hCAs IX e XII (proteínas de membrana superexpressas na hipóxia tumoral, sendo a hCA IX ausente em tecidos saudáveis). Neste estudo, as estruturas **23a** e **23b** foram as mais potentes inibidoras hCAs IX e XII, em concentrações nanomolares, além de não exibirem efeito citotóxico de até 200  $\mu\text{M}$  em fibroblastos humanos. (D'ASCENZIO *et al.*, 2020)

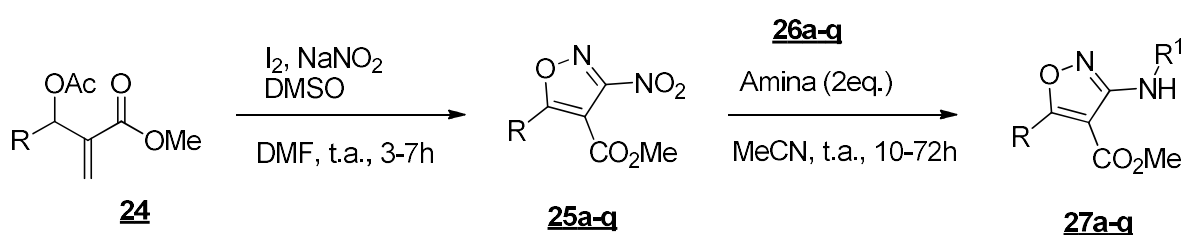
Figura 12. Estruturas químicas de isoxazóis e  $\Delta^2$ -isoxazolidinas antitumorais ligadas a estrutura de sacarina.



O composto **23b** (figura 12) atuou como quimiossensibilizador em combinação com doses subtóxicas de doxorubicina no teste *in vitro* contra a linhagem celular MCF7 de câncer de mama, sendo aquele um coadjuvante na atividade antitumoral, considerando a elevada cardiotoxicidade da doxorubicina em níveis terapêuticos. (D'ASCENZIO *et al.*, 2020)

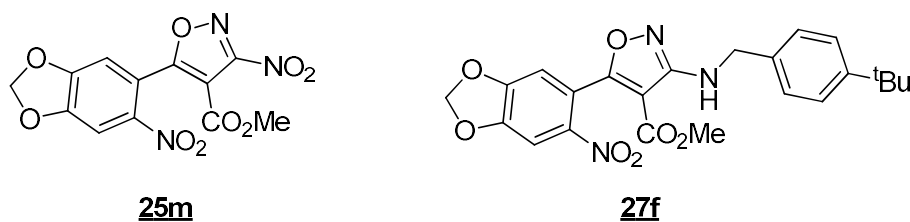
A atividade leishmanicida de uma série de derivados de 3-nitro e 3-amino-isoxazol foi realizada por Mukhopadhyay *et al.* (2020), tanto *in vitro* quanto *in vivo*, contra protozoários da *Leishmania donovani*. Os derivados 3-nitroisoxazóis **24a-q** foram obtidos pela ciclização de acetatos de Morita–Baylis–Hillman (MBH) substituídos na presença de NaNO<sub>2</sub> e iodo molecular, enquanto os 3-aminoisoxazóis **25a-j** foram obtidos pela condensação com aminas substituídas (Esquema 3) (MUKHOPADHYAY *et al.*, 2020).

Esquema 3. Síntese de derivados de 3-nitro e 3-amino isoxazóis .



No ensaio *in vitro*, os 3-nitroisoxazóis apresentaram em sua maioria, uma Cl<sub>50</sub> entre 0,34 µM e 2,72 µM, frente a forma promastigota da *L. donovani*, sendo equipotentes ou melhores do que ao do fármaco de referência testado, a miltefosina (Cl<sub>50</sub> = 2.52 µM). O composto **25m** (R = 6-NO<sub>2</sub>-3,4-OCH<sub>2</sub>O-C<sub>6</sub>H<sub>2</sub>) apresentou um Cl<sub>50</sub> = 0,67 µM e um SI = 6.51, valor superior ao da miltefosina (SI = 5.76 ), sendo este submetido ao teste *in vivo* e apresentando um crescimento percentual de 48% para 66% de inibição da carga parasitária, após o 7º dia para o 28º dia de tratamento por via oral. Dentre os 3-aminoisoxazóis o **27f** (R = 6-NO<sub>2</sub>-3,4-OCH<sub>2</sub>O-C<sub>6</sub>H<sub>2</sub>; R<sup>1</sup> = CH<sub>2</sub>-(4-<sup>t</sup>Bu-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>) ) apresentou um Cl<sub>50</sub> = 0,54 µM e SI = 14 para a forma amastigota, *in vitro* contra *L. donovani* e uma inibição percentual de 12,7% no 28º dia após o tratamento *in vivo*. (MUKHOPADHYAY *et al.*, 2020) (Figura 13)

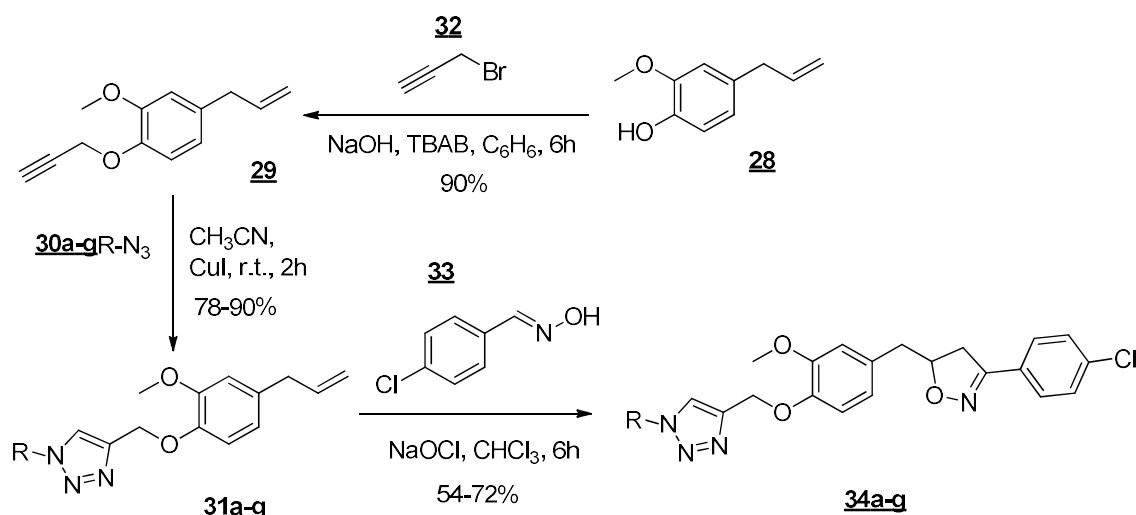
Figura 13. Estruturas químicas dos derivados de 3-nitro e 3-amino-isoxazóis com atividade leishmanicida.



### 2.4.2. Isoxazolina

Em um estudo conduzido por Taia *et al.* (2020), uma série de 1,2,3-triazol- $\Delta^2$ -isoxazolininas **34** foram sintetizadas (esquema 4) por cicloadição 1,3-dipolar e demonstraram atividade antiproliferativa contra diferentes linhagens celulares (TAIA *et al.*, 2020). Para a síntese do sistema de bi-heterocíclicos de 1,2,3-triazol-isoxazolina **32a-g**, o alquil-eugenol **28**, obtido por uma reação de O-alkilação do eugenol **29**, foi submetido a uma reação de cicloadição 1,3-dipolar com azidas **30** substituídas, dando origem aos monocicloadutos **31a-g**. Estes foram submetidos a outras reações de cicloadição 1,3-dipolar, tendo por dipolo o 4-cloro-benzaldoxima e a porção alqueno terminal dos monocicloadutos **31** como dipolarófilo, dando origem aos bi-heterocíclicos de 1,2,3-triazol-  $\Delta^2$ -isoxazolina **34a-g**. As análises espectroscópicas por RMN NOESY e HMBC dos compostos **31** e **34** revelaram regioseletividade na formação destes (Esquema 4).

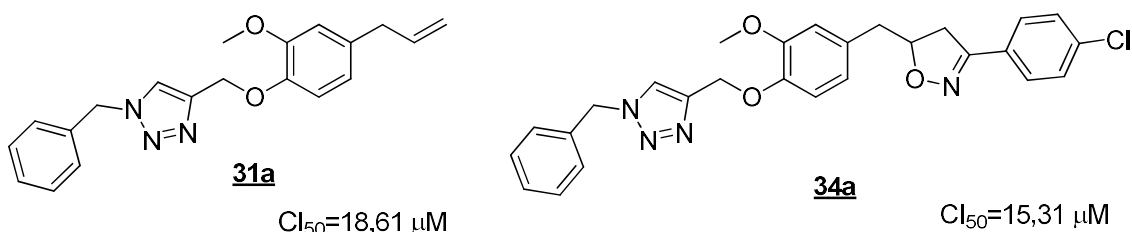
Esquema 4. Síntese do sistema de bi-heterocíclicos de 1,2,3-triazol-isoxazolina **33a-g**.



Os compostos **31a-g** e **34a-g** foram testados para a atividade citotóxica *in vitro* contra as linhagens celulares de fibrossarcoma HT-1080, carcinoma pulmonar A549, e de carcinoma de mama MCF-7 e MDA-MB-231. A maioria das moléculas

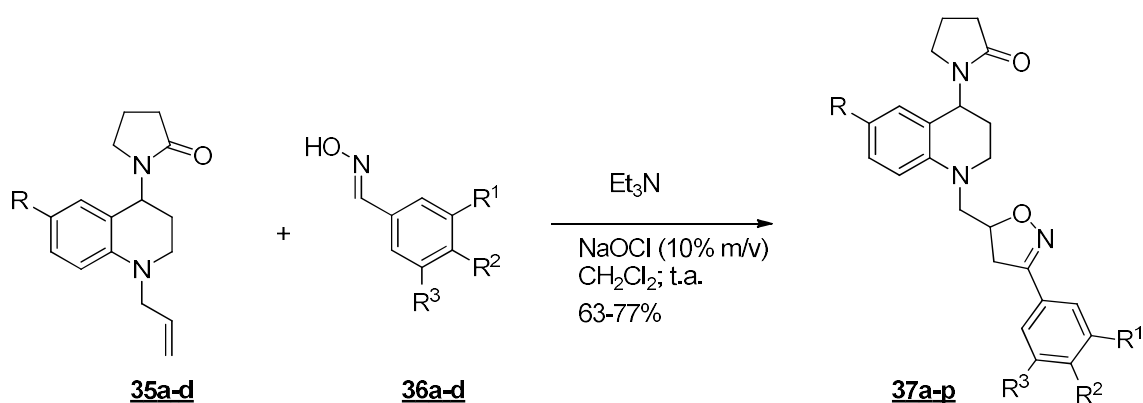
testadas exibiu efeitos inibidores do crescimento médio em todas as linhagens de células tumorais com valores de  $Cl_{50}$  variando de 15 a 45  $\mu M$ . O mais potente foi o bis-heterocíclo **34a**, com uma  $Cl_{50} = 15,31 \mu M$  frente a linhagem de fibrossarcoma HT-1080, enquanto seu precursor monocicloaduto **31a** apresentou uma  $IC_{50} = 18,61 \mu M$ , apresentando um acréscimo na atividade anticâncer para esta linhagem, sugerindo um efeito aditivo do anel isoxazolina (Figura 14).

Figura 14. Estruturas químicas das moléculas **31a** e **34a** e suas atividade citotóxicas contra células HT-1080.



Uma série de híbridos tetrahydroquinolina-isoxazolina **37a-p** (Esquema 5) também foi sintetizada via reação de cicloadição 1,3-dipolar a partir do *N*-alil-tetrahydroquinolonas **35a-d** e respectivas aldoximas **36a-d** com rendimentos moderados a bons (63-77%) (BERNAL *et al.*, 2020).

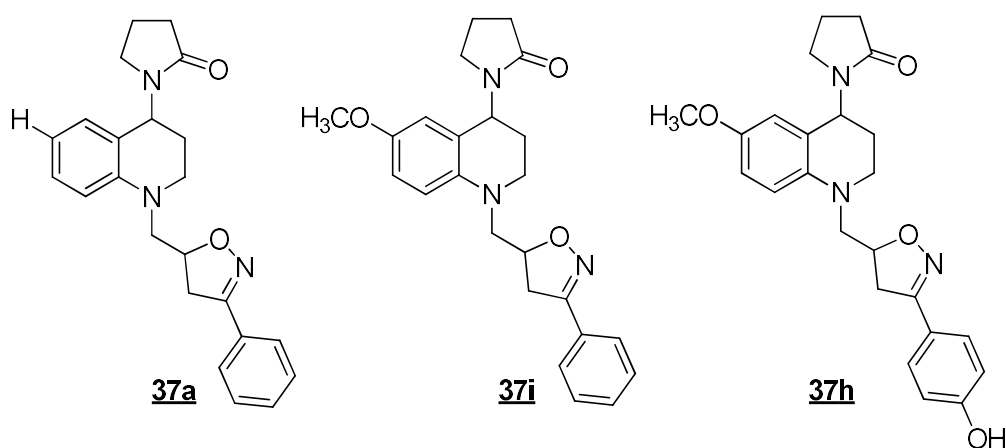
Esquema 5. Síntese de híbridos tetrahydroquinolina-isoxazolina **37**



Para a avaliação *in vitro* da atividade anticâncer, foram utilizadas linhagens celulares de adenocarcinoma de mama humano (MCF-7), carcinoma de fígado

humano (HepG2), adenocarcinoma de pulmão humano (A549), cervical câncer (HeLa) e melanoma murino (B16F10). Os compostos **37a** (CC<sub>50</sub> = 11,37 µM, SI = 5,1) e **37i** (CC<sub>50</sub> = 21,95 µM, SI > 4,6) (Figura 15) mostraram as melhores atividades anticâncer contra células de melanoma murino (B16F10) com seletividade considerável. O Composto **37h** mostrou a melhor atividade anticâncer em células de câncer cervical (HeLa) (CC<sub>50</sub> = 10,21 µM, SI = 4,1), e foi ligeiramente mais ativo do que a oxaliplatina (CC<sub>50</sub> = 14,30 µM, SI = 3,60), medicamento de referência.

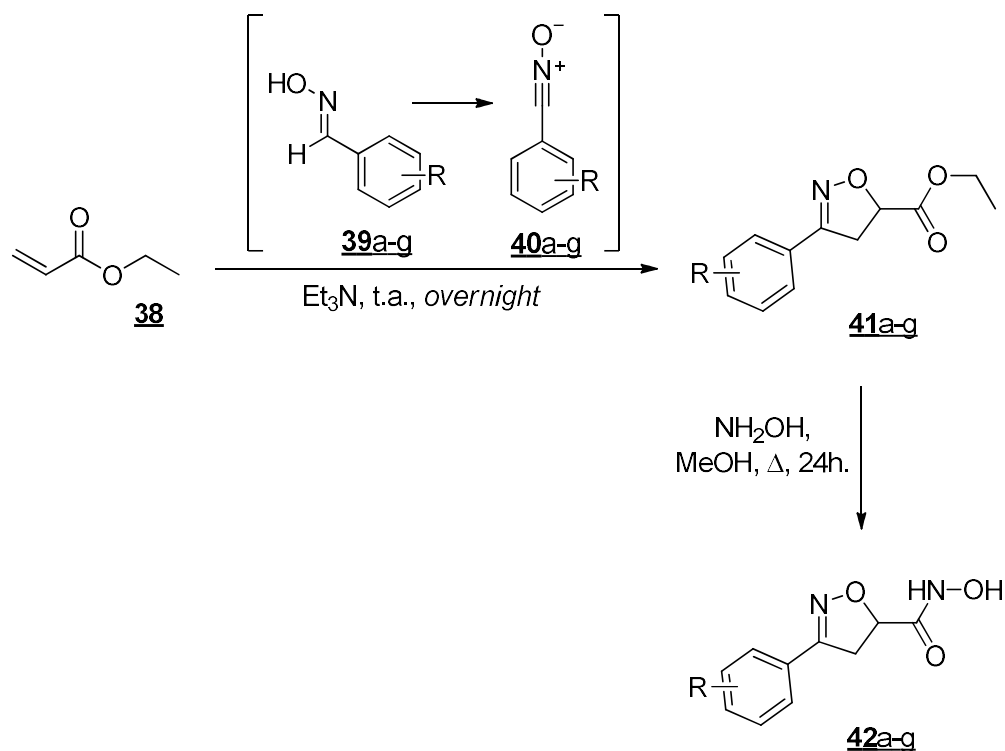
Figura 15. Estruturas químicas dos híbridos tetrahydroquinolina-isoxazolina **37a**, **35i** e **37h** e seus valores de CC<sub>50</sub>, frente à células tumorais.



(CC<sub>50</sub> = 11,37 µM, SI = 5,1)    (CC<sub>50</sub> = 21,95 µM, SI > 4,6)    (CC<sub>50</sub> = 10,21 µM, SI = 4,1)

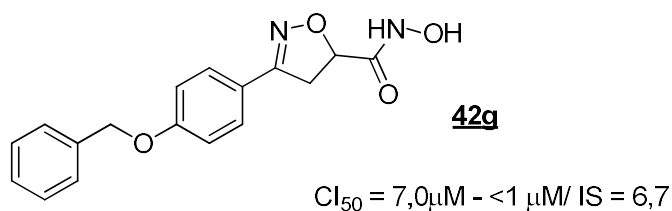
O trabalho relatado por Rodrigues *et al.* (2013) apresentou uma série de  $\Delta^2$ -isoxazolininas incorporando frações de hidroxamato **42a-g**, que atuam como inibidores eficazes da anidrase carbônica (CA) do *T. cruzi* (TcCA).

A síntese ocorreu por cicloadição 1,3-dipolar entre ácidos hidroxâmicos substituídos **39a-g**, como dipolo e o acrilato de etila **38** como o dipolarófilo, formando os cicloadutos isoxazolínicos éster **41a-g**, os quais, após permanecerem em refluxo com hidroxilamina durante 24h, formaram o sistema 3-aryl-4,5-dihidroisoxazol 5-carboxílico-hidroxâmico **42a-g** (Esquema 6).

Esquema 6. Síntese de híbridos tetrahydroquinolina-isoxazolina **36**

Os compostos da série **41** e **42** (Figura 16) tiveram a atividade citotóxica antitriponossoma *in vitro* contra a forma epimastigotas do parasita *T. cruzi*. ensaiada, sendo o composto **41g** o que apresentou melhores valores de  $\text{IC}_{50}$  frente a forma epimastigota, em distintas concentrações do composto (valores de  $\text{IC}_{50}$  de 7,0 a  $<1 \mu\text{M}$ ). O índice de seletividade (SI) foi de 6,7 e não apresentou nenhuma citotoxicidade para células de macrófagos humanos. Dados preliminares *in vivo* demonstraram que **42g** pode atingir duas proteínas que são importantes para o ciclo de vida do parasita:  $\alpha$ -carbônico anidrase (TcCA) e as metaloproteínases, levando a uma poderosa inibição do crescimento *in vivo* e uma diminuição substancial da parasitemia em camundongos infectados com *T.cruzi*. Todos os ratos tratados com este composto sobreviveram, além de ter sido mais eficaz do que o benznidazol, droga referência usada nesse teste (RODRIGUES *et al.*, 2013).

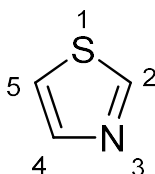
Figura 16. Estrutura química de um hidroxamato- $\Delta^2$ -isoxazolinico **42g** e os valores de sua atividade antitripanossoma.



## 2.5. Tiazol

O tiazol (Figura 17), também denominado 1,3-tiazol, é um anel heteroaromático de cinco membros, contendo um átomo de enxofre e um átomo de nitrogênio do tipo piridina na posição 3 deste cíclico. É uma estrutura planar e sua aromaticidade é proveniente da deslocalização de um dos pares de elétrons de enxofre através do anel (RAM *et al.*, 2019).

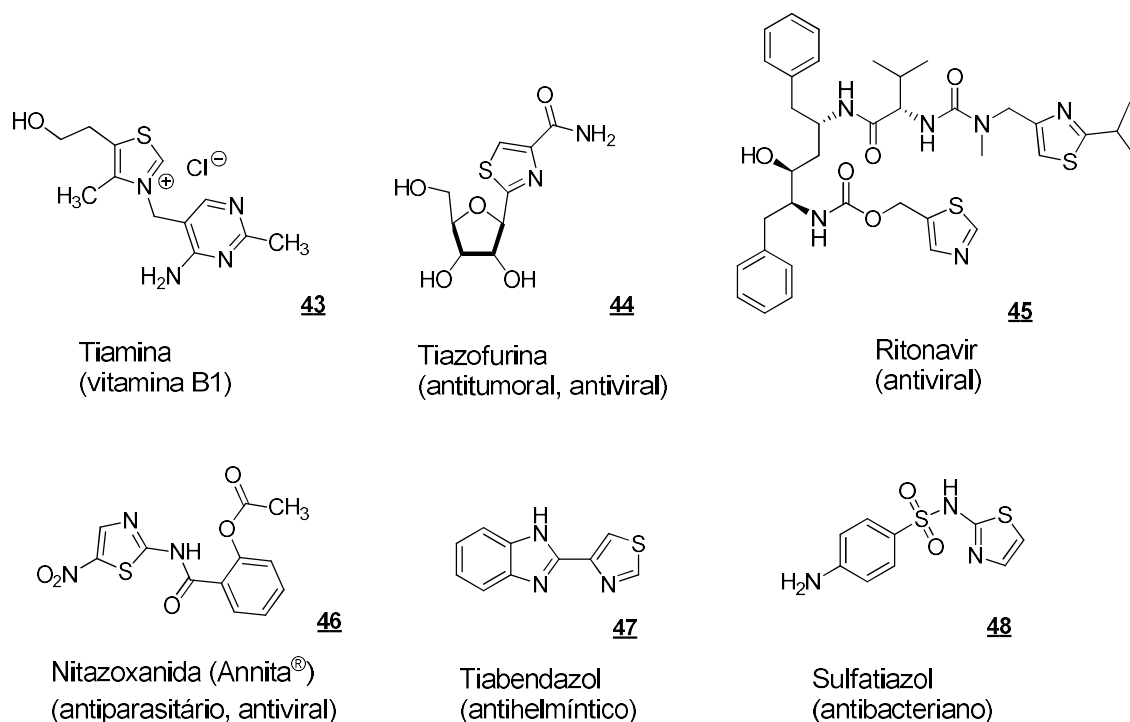
Figura 17. Representação estrutural do tiazol



Fonte: Autor

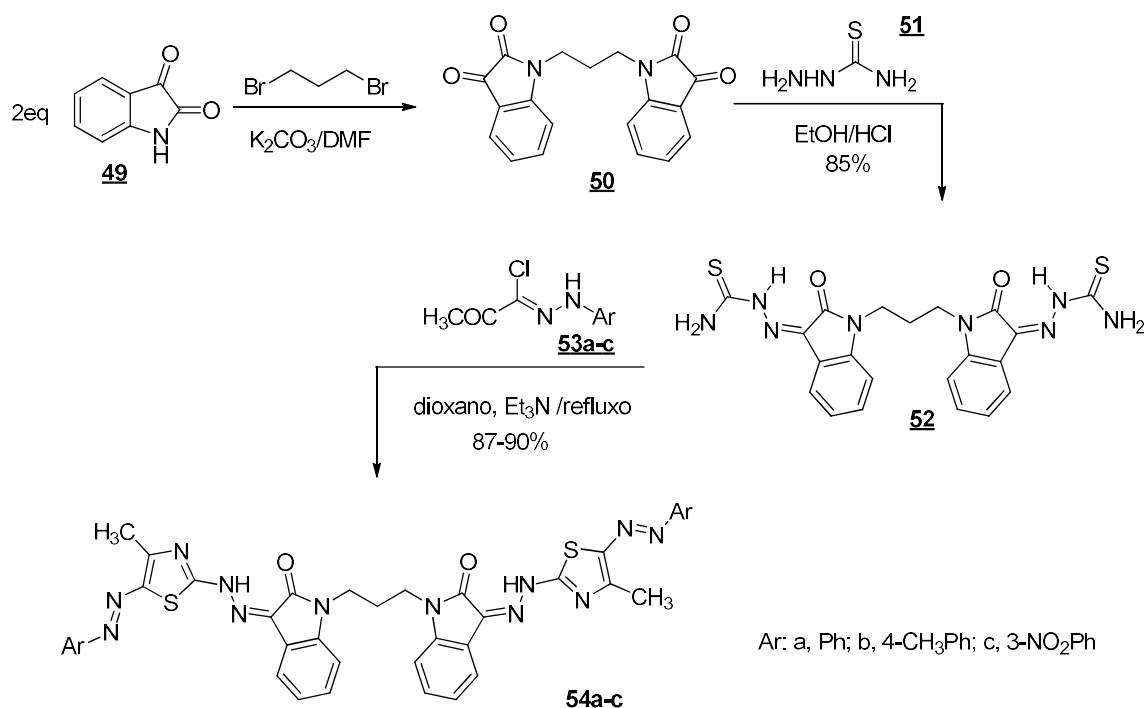
O anel tiazol tem atividade farmacológica, estando presente em compostos de origem natural, como o caso da tiamina **43**, também conhecido como vitamina B1, a qual possui um anel tiazol ligado a 2-metilpirimidina-4-amina como sal cloridrato. Diversos fármacos comerciais contêm este núcleo, podem ser citados como a tiazofurina **44** (antitumoral, antiviral), o ritonavir **45** (antiviral), a nitazoxanida **46** (antiparasitário, antiviral), o tiabendazol **47** (antihelmíntico) e o sulfatiazol **48** (antibacteriano) (Figura 18) (RAM *et al.*, 2019; SOUZA, 2005).

Figura 18. Estruturas químicas de fármacos comerciais contendo o núcleo tiazol e suas respectivas propriedades farmacológicas.



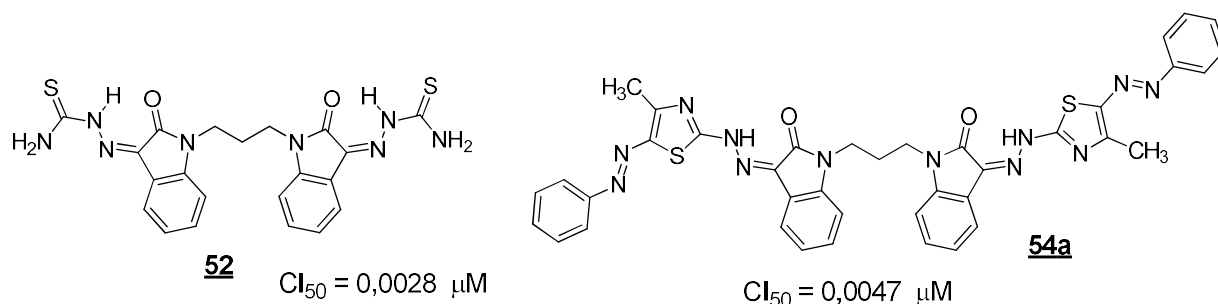
Fonte: Autor

Uma série de bis-tiazóis **55a-c** foi sintetizada pela condensação do derivado de bis-tiossemicarbazona **53** com halogenetos de hidrazonila **54a-c** (ALTHAGAFI *et al.*, 2018). Nesta síntese, o bis-indolina-2,3-diona **51** foi preparada por tratamento de isatina **49** com 1,3-dibromopropano **50** em dimetilformamida com agitação à temperatura ambiente na presença de quantidade catalítica de carbonato de potássio. A fim de explorar a utilidade do bis-indolina-2,3-dione **51** na síntese do *scaffold*, este foi condensado com tiosemicarbazida **52** em etanol na presença de quantidade catalítica de HCl sob refluxo por 6 h proporcionou o bis-tiossemicarbazona **53** correspondente, com 85% de rendimento. Os derivados de arilazotiazol **55a-c** foram sintetizados em uma reação de *one pot* de bis-tiossemicarbazida **53** com cloretos de 2-oxo-N-arilpropano-hidrazonoil **54a-c** na presença de trietilamina (Esquema 7). Os derivados de tiazol **55a-c** foram obtidos com rendimentos elevados (ALTHAGAFI *et al.*, 2018).

Esquema 7. Síntese de bis-tiazóis **54**

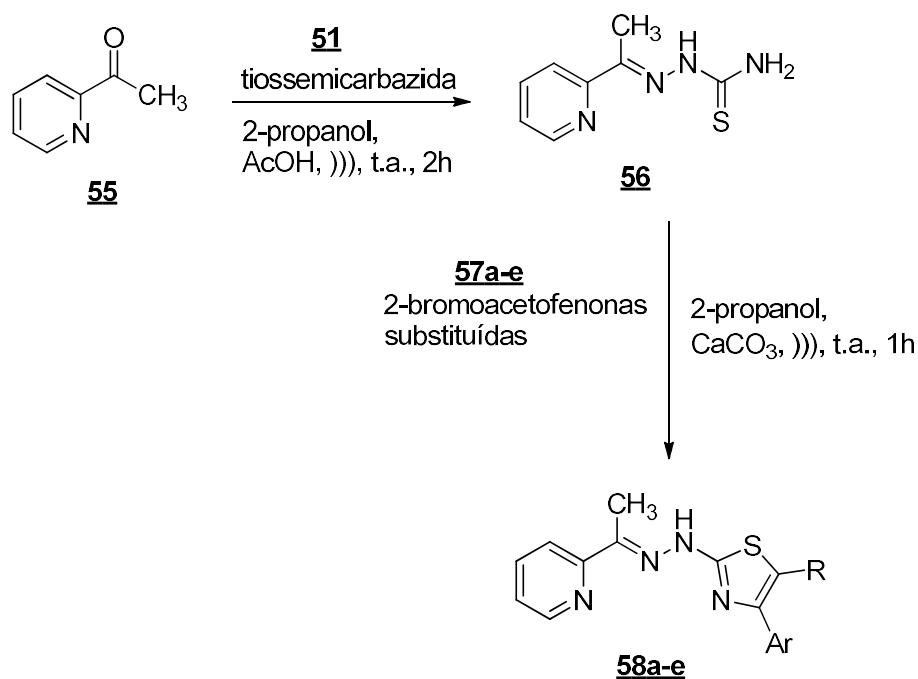
A atividade citotóxica dos derivados produzidos foi avaliada contra a linhagem celular MCF-7 (célula de câncer de mama). A atividade antitumoral dos compostos **50**, **52**, **54a-c** (Figura 19) foi avaliada *in vitro*, onde os compostos, **52** e **54a** apresentam maior atividade de  $IC_{50}$  0,0028  $\mu M$  e 0,0047  $\mu M$ , respectivamente, apresentando maior potência em relação a droga de referência (doxorrubicina  $IC_{50}$  = 1,2001  $\mu M$ ), além de destacar a função do grupo tiossemicarbazona na molécula. Da mesma forma, as observações coletadas de **54b** e **54c** mostraram atividade anticâncer moderada, mas aceitável com  $CI_{50}$  em 2,3807  $\mu M$  e 2,1020  $\mu M$ , respectivamente (ALTHAGAFI *et al.*, 2018).

Figura 19. Estruturas químicas dos bis-tiazóis **52**, **54a** e seus valores frente a atividade citotóxica, contra linhagem MCF-7.



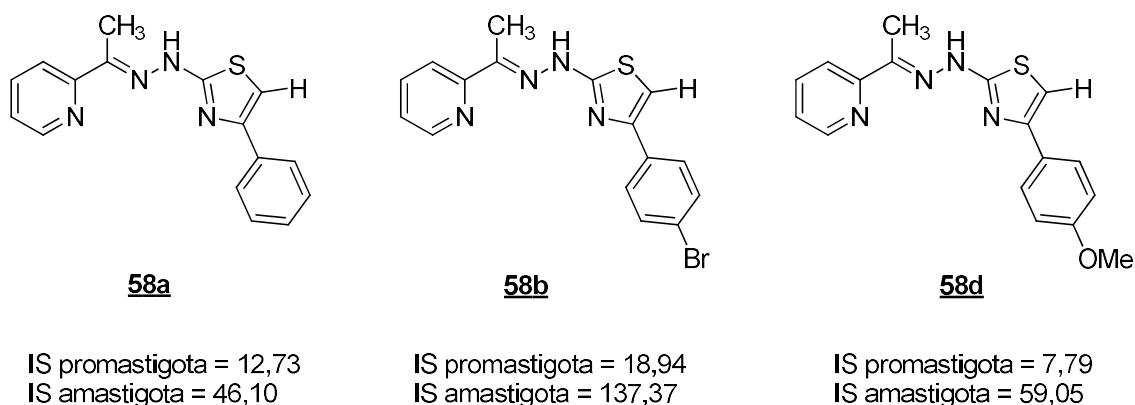
Em estudo recente elaborado por Oliveira *et al.* (2020), tiazopiridinas foram submetidas a avaliação leishmanicida contra *L. infantum* (OLIVEIRA *et al.*, 2020). A síntese da 2-piridinatossemicarbazona **55** ocorreu pela condensação da 2-acetilpiridina **56** com tiossemicarbazida **51**, a qual, na etapa seguinte reagiu com 2-bromoacetocetonas substituídas **57a-e**, formando assim os derivados tiazóis com espaçador hidrazona **58a-e** (Esquema 8).

Esquema 8. Síntese da 2-piridinatossemicarbazona **58**



Os resultados da atividade leishmanicida *in vitro* foram promissores para os compostos **58a** ( $Cl_{50}$  = 3,57  $\mu$ M ; IS = 12,73) , **58b** ( $Cl_{50}$  = 3,12  $\mu$ M ; IS = 18,94) e **58d** ( $Cl_{50}$  = 4,44  $\mu$ M; IS = 7,79), frente a forma promastigota, sendo estes selecionados para serem testados frente a forma amastigota, apresentando os seguintes resultados **58a** ( $Cl_{50}$  = 0,99  $\mu$ M ; IS = 46,10) , **58b** ( $Cl_{50}$  = 0,43  $\mu$ M ; IS = 137,37) e **58d** ( $Cl_{50}$  = 0,59  $\mu$ M ; IS = 59,05). Neste estudo, formas celulares promastigotas foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV), e quando em contato com o composto **58b** na concentração de  $Cl_{50}$ , apresentaram perda do volume celular com enrugamento intenso da membrana celular, com ausência de detritos celulares ou danos aparentes na membrana, sugerindo uma morte por apoptose (OLIVEIRA *et al.*, 2020) (Figura 12).

Figura 20. Estruturas químicas dos derivados tiazóis com espaçador hidrazona **58a**, **58b** e **58d** com valores de SI para atividade leishmanicida.

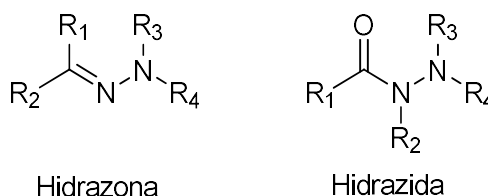


## 2.6. Hidrazona e Hidrazidas

As hidrazonas e hidrazidas (Figura 21) constituem uma classe importante de compostos que contém o grupo azometino ( $-NH-N=CH-$ ), sendo conectado com o grupo carbonil quando hidrazida (POPIOIEK *et al.*, 2016). Estas agem como espaçadores entre o arilo e o anel e a ligação N-N tem sido destacada como função chave em vários agentes bioativos, que é responsável por suas diferentes aplicações farmacêuticas e torna possível a síntese de diferentes *scaffolds* heterocíclicos. As hidrazonas são obtidas pela condensação de hidrazinas com

cetonas ou aldeídos, e quando com ésteres, formam as hidrazidas (MOHAREB *et al.*, 2010).

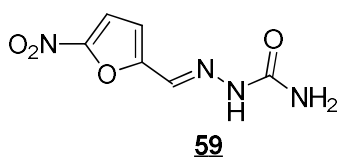
Figura 21. Representação estrutural dos grupamentos hidrazona e hidrazida.



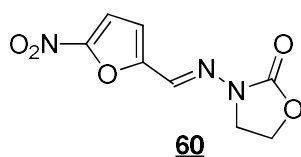
Fonte: autor

As hidrazonas e as hidrazidas têm apresentado propriedades farmacológicas como analgésica, antifúngica, antibacteriana, antiviral, anti-inflamatória, anticâncer e leishmanicida (AMIM *et al.*, 2015; BARMAN *et al.*, 2014; LINDGREN *et al.*, 2014; RAJ *et al.*, 2007; WANG *et al.*, 2017). Além disso, medicamentos como os antimicrobianos nitrofurazona **59**, furazolidona **60**, nitrofurantoína **61** e isoniazida **62**, assim como o vaso dilatador hidralazida **63** e o hemostático carbazocrome **64** (Figura 22) são conhecidos por conterem a porção hidrazida-hidrazona (POPIOŁEK *et al.*, 2016) (THOTA *et al.*, 2018).

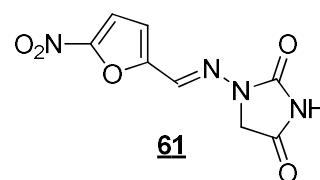
Figura 22. Estruturas químicas de princípios ativos de fármacos comerciais contendo os grupamentos hidrazona e hidrazida.



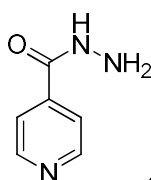
Nitrofurazona  
(antimicrobiano)



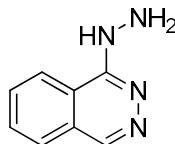
Furazolidona  
(antimicrobiano)



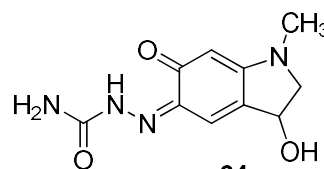
Nitrofurantoína  
(antimicrobiano)



Isoniazida  
(tuberculostático)



Hidralazina  
(vasodilatador)

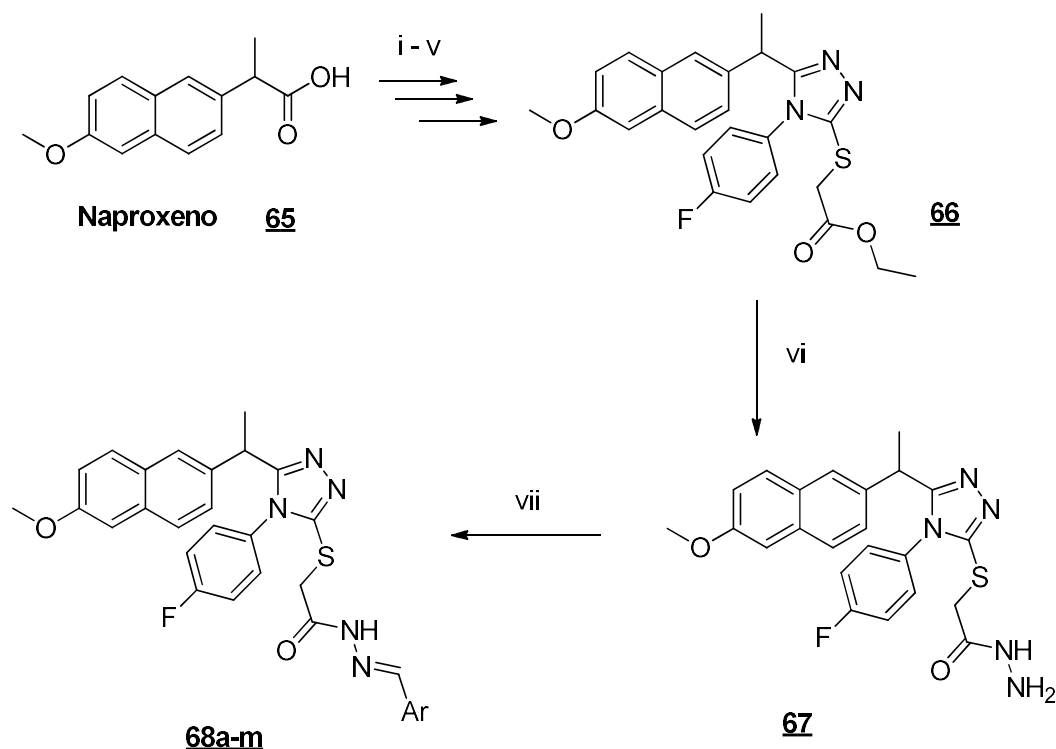


Carbazocrome  
(hemostático)

Fonte: autor

Um estudo de Han *et al.* (2019) avaliou a atividade anticâncer de uma nova série de 1,2,4-triazóis derivados do (S)-naproxeno **68a-m**, contendo porções hidrazida-hidrazonas, sintetizados neste estudo (HAN *et al.*, 2019). Neste estudo, o naproxeno **65** foi escolhido por ter inibido a fosforilação da proteína quinase B (Akt) e induzido apoptose em cânceres de bexiga urinária de ratos (KIM *et al.*, 2013). A porção carboxílica do naproxeno **65** foi modulada para a obtenção do éster 1,2,4-triazólico **66**. Posteriormente, o composto com porção hidrazida **67** foi gerado pela reação com hidrato de hidrazina. O composto final, com porção hidrazida-hidrazona **68a-m**, foi então obtido pela reação com benzaldeídos comerciais (Esquema 9).

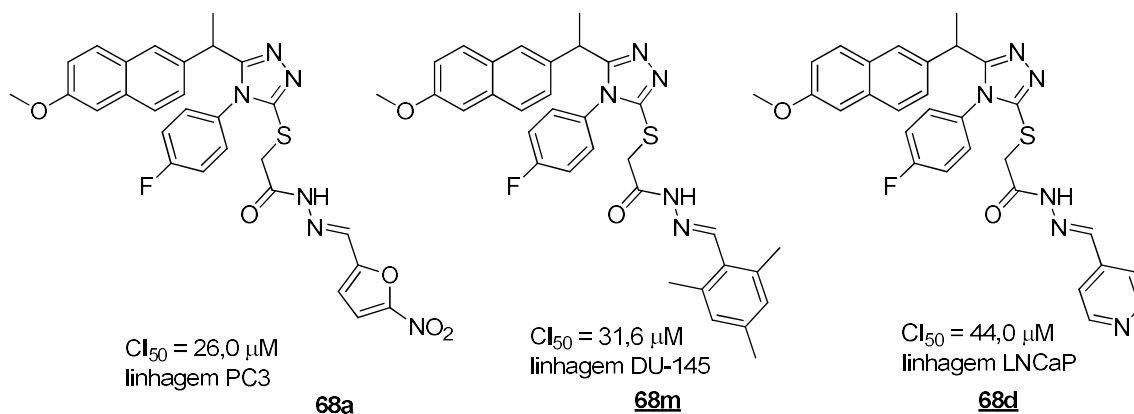
Esquema 9. Síntese de compostos 1,2,4-triazol contendo porções hidrazona-hidrazida **68** derivados do naproxeno **65**.



(i):  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{SO}_4$ , (ii)  $\text{NH}_2\text{NH}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}/\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ , (iii) 4-F- $\text{C}_6\text{H}_4\text{-NCS}/n\text{-butanol}$ , (iv) 4N NaOH, (v)  $\text{BrCH}_2\text{COOC}_2\text{H}_5$ ,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , acetona, (vi)  $\text{NH}_2\text{NH}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}/\text{EtOH}$ , (vii)  $\text{EtOH}/\text{glacial } \text{CH}_3\text{COOH}/\text{Ar-CHO}$ .

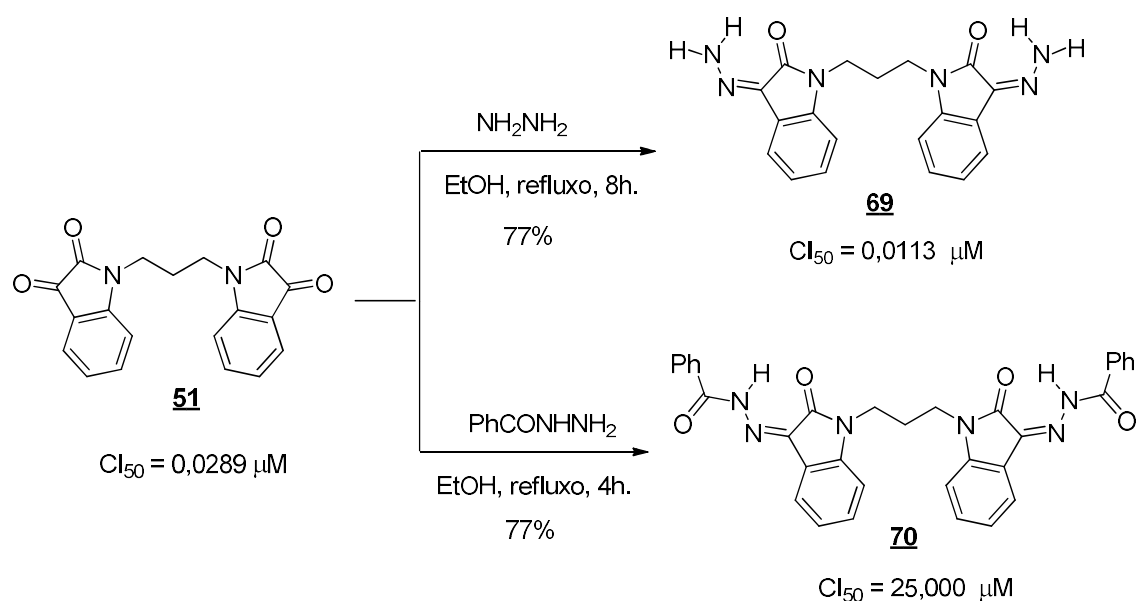
Todos os compostos sintetizados foram avaliados para atividade anticâncer contra três linhas de células de câncer de próstata (PC3, DU-145, e LNCaP) pelo método colorimétrico MTT. O composto **68a** mostrou a melhor atividade contra a linhagem celular PC3, com valores de  $\text{CI}_{50}$  de 26,0  $\mu\text{M}$ , sendo melhor que a cisplatina ( $\text{CI}_{50} = 39,9 \mu\text{M}$ ). Para a linhagem DU-145, o composto **68m** apresentou melhor atividade,  $\text{CI}_{50} = 31,6 \mu\text{M}$ , enquanto para a linhagem LNCaP, o composto **68d** apresentou melhor atividade anticâncer com  $\text{CI}_{50}$  de 44,0  $\mu\text{M}$ . Estudos *in vivo* mostraram que o composto **68a** pode ser promissor para o tratamento do câncer de próstata (Figura 23).

Figura 23. Estruturas químicas dos derivados do (S)-naproxeno **68a**, **68m** e **68d** contendo porções hidrazida-hidrazonas e respectivos valores de  $\text{CI}_{50}$ .



O trabalho de Althagafi *et al.* (2018), apresentado anteriormente, também testou uma atividade citotóxica contra células de câncer de mama (MCF-7) dos compostos bis-indolizina-2,3-diona **50** e seus produtos bis-indolizina-2-ona-3-hidrazona **69** e bis-indolizina-2-ona-3-hidrazida **70**, obtidos a partir das reações com o hidrato de hidrazida e bezohidrazida, respectivamente (Esquema 10). Neste ensaio *in vitro*, foi possível verificar uma atividade citotóxica dos compostos **51** ( $IC_{50} = 0,0289 \mu M$ ) e **69** ( $IC_{50} = 0,0113 \mu M$ ), superiores ao fármaco de referência utilizado, a doxorrubicina ( $IC_{50} = 1,2001 \mu M$ ) e uma baixa atividade do composto **70** ( $IC_{50} = 25,000 \mu M$ ), podendo ser verificado que a presença da porção hidrazona gera um efeito aditivo à atividade citotóxica (ALTHAGAFI *et al.*, 2018).

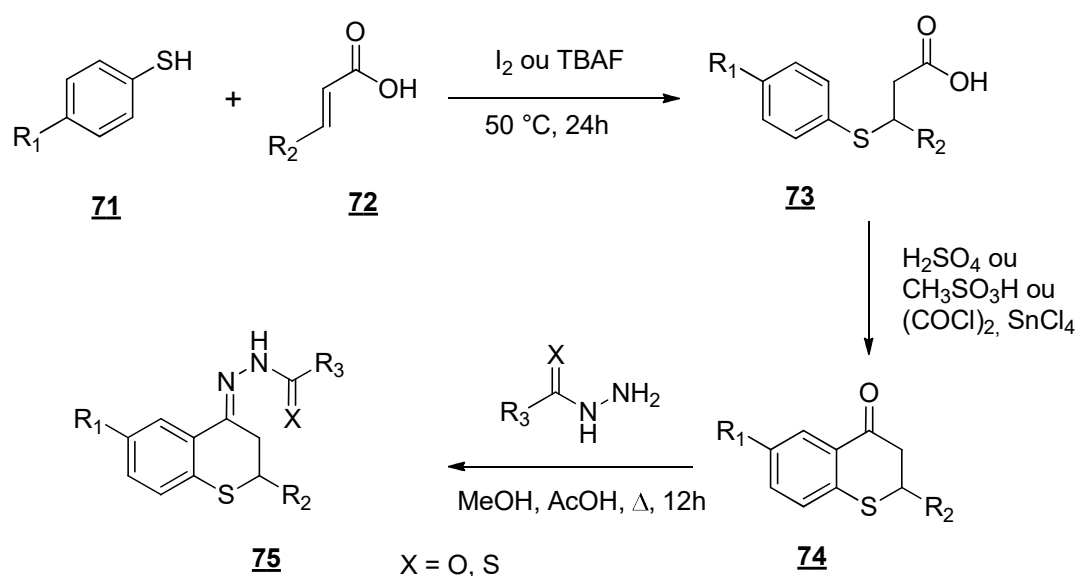
Esquema 10. Síntese de bis-indolizina-2-ona-3-hidrazona **69** e bis-indolizina-2-ona-3-hidrazida **70**.



Derivados acil-hidrazona de tiocroman-4-onas tiveram sua atividade leishmanicida confirmada no trabalho de Vargas *et al.* (2017). Neste trabalho, 18 derivados acil-hidrazona de tiocroman-4-onas foram avaliados quanto à sua atividade antileishmania *in vitro*, a forma amastigota intracelular de *Leishmania panamensis* e atividade citotóxica contra monócitos humanos (U-937 ATCC CRL-1593.2) (VARGAS *et al.*, 2017).

A síntese dos tiocroman-4-onas foi realizada pela adição de tiofenol ou 4-fluorotiofenol **71** com ácidos carboxílicos  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturados **72** (ácido acrílico, crotonico ou cinâmico). Os ácidos carboxílicos **73** obtidos passaram por uma reação de ciclização após o tratamento com ácido sulfúrico ou metanossulfônico, gerando o tiocroman-4-ona **74**. As cetonas resultantes foram condensadas com acil-hidrazidas (hidrazida benzóica, isonicotina-hidrazida, semicarbazida ou tiosemicarbazida), proporcionando a acil-hidrazonas **75** desejadas com rendimentos entre 38-85% (Esquema 11) (VARGAS *et al.*, 2017).

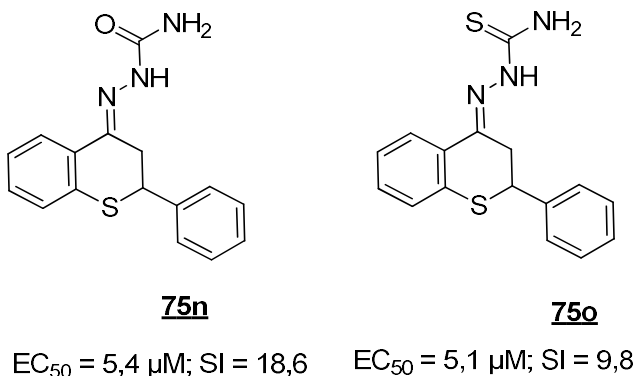
Esquema 11. Síntese dos tiocroman-4-onas acil-hidrazidas **75**.



Os resultados mostram que a inserção das acil-hidrazonas o dos tiocroman-4-onas aumenta significativamente a atividade antileishmania. Entre os compostos testados, a semicarbazona e os derivados de tiosemicarbazona de tioflavanona **75n** e **75o** (Figura 24) exibiram as maiores atividades antileishmania, com valores de EC<sub>50</sub> de 5,4 e 5,1  $\mu$ M e baixas citotoxicidades, (CC<sub>50</sub> = 100,2 e 50,1  $\mu$ M,

respectivamente), resultando em índices mais elevados de seletividade (IS = 18,6 e 9,8, respectivamente) (VARGAS *et al.*, 2017).

Figura 24. Estruturas químicas de acil-hidrazonas com atividade antileishmania.



### 3.CAPÍTULO 1 – Parte química - Série $\Delta^2$ -isoxazolina aza-bicíclica

#### 3.1.Objetivos

##### 3.1.1.Objetivo Geral

Síntese e identificação de novos derivados híbridos  $\Delta^2$ -isoxazolina aza-bicíclica/tiazol, contendo hidrazona como espaçador.

##### 3.1.2.Objetivos Específicos

- a- Síntese de duas séries de novos híbridos isoxazolina aza-bicíclica/tiazol, contendo hidrazona como espaçador **4**.
- b- Purificação e determinação de propriedades físico-químicas das novas moléculas híbridas **4**
- c- Elucidação estrutural das novas moléculas híbridas **4** através de espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C), no infra-vermelho e de massas.



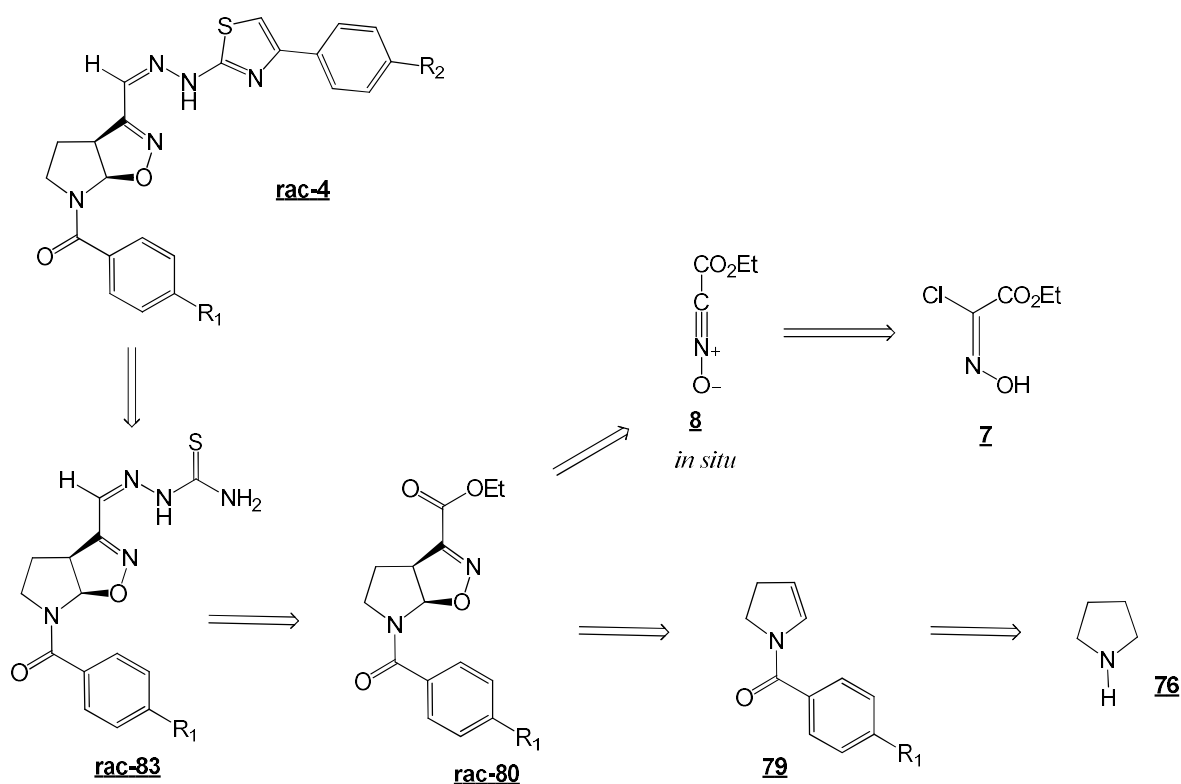
### 3.2.Estratégia Sintética

#### 3.2.1.Parte química

##### 3.2.1.1.Retrossíntese

A síntese proposta foi dividida, inicialmente, em duas vias de reação distintas, para obtenção das duas séries de híbridos. Porém devido a dificuldades reacionais com a segunda via, apenas a com espaçador hidrazona será foca neste trabalho. A retossíntese proposta, têm como composto sintético inicial o éster isoxazolina aza-bicíclico **80**, o qual pode ser obitido por adição de *N*-óxido de nitrila **8** à dupla ligação do sistema de enamida endocíclica **79**, a qual será obtida por reação de substituição dos cloretos de benzoíla substituídos com pirrolina, obtidos a partir da pirolidina **76**. A ciclização de tiossemicarbazonas **83**, derivadas da condensação um aldeído de isoxazolina **82**, gera o híbrido final **4** com espaçador hidrazona, sendo o aldeído obtido pela oxidação do éster **80** (Esquema 12).

Esquema 12. Retrossíntese proposta para izoxazolína/tiazol **4**.

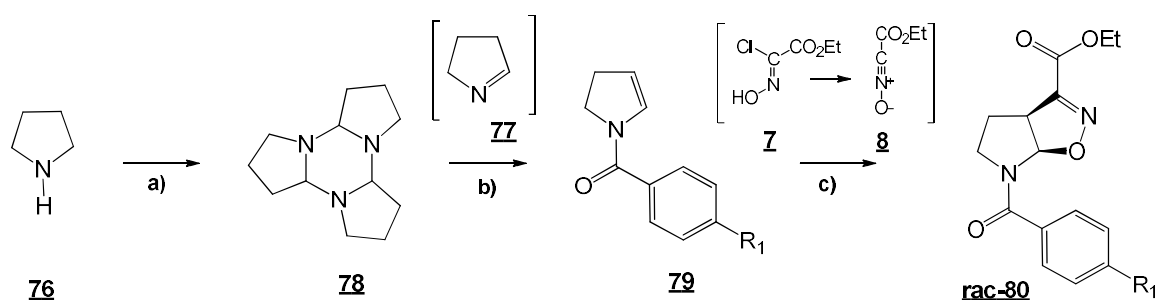


### 3.2.1.2.Via sintética

#### 3.2.1.2.1.Síntese comum para as duas séries – Derivados intermediários que contém o núcleo isoxazolina aza-bicíclica

A rota sintética comum era obter a síntese da isoxazolina aza-bicíclica **80**, que se inicia com a produção do trímero da pirolidina **78**, a partir de uma oxidação da pirolidina **76**, (Esquema 13). A próxima etapa é uma reação de detrimetização formando o monômero de pirrolina **77** seguida por uma reação de conjugação com carboetoxiformonitrila (CEFNO) **8** gerada *in situ*, a partir de seu precursor cloroimidoacetato de etila **7** para finalmente obter a isoxazolina aza-bicíclica **80** (ALMEIDA *et al.*, 2009; REIS *et al.*, 2011).

Esquema 13. Síntese da série desenvolvida no Brasil, molécula aza-bicíclica de isoxazolina **80** para cicloadição.

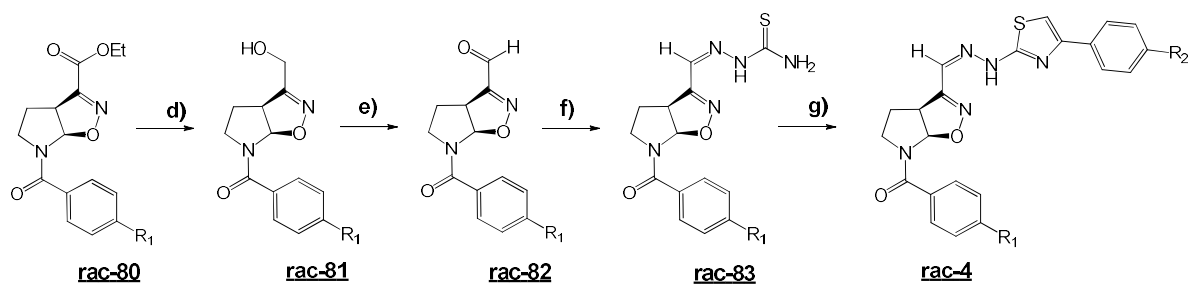


**a)**  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ,  $\text{AgNO}_3$ ,  $\text{NaOH}$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ , 1h, 0 °C depois 3h, t.a.; **b)** Cloretos de benzoíla substituídos, TEA, THF, 2 h, )), 60 °C; **c)** 2-cloro-2-(hidroxiimínio) acetato de etila, TEA, THF, 30 min, t.a.

#### 3.2.1.2.2.Síntese dos híbridos Isoxazolina aza-bicíclica/Tiazol, apresentando hidrazona como grupo espaçador

O éster de isoxazolina **80** formado foi submetido à redução para álcool **81**, utilizando o agente redutor  $\text{NaBH}_4$  e posterior oxidação para aldeído **82** via reação de Swern, visto que a oxidação direta do éster de isoxazolina **80** para aldeído **82** não foi obtida corretamente, gerando um ácido carboxílico função ou não reagindo (Esquema 14). A tiossemicarbazona **83** foi formada pela condensação dos aldeídos da isoxazolina **82** substituídos por tiossemicarbazida. Em seguida, 2-bromo-nitroacetocetonas reagiram tiossemicarbarbazonas **83**, gerando os híbridos da série **4**.

Esquema 14. Obtenção dos híbridos de derivados aza-bicíclicos da 2-isoxazolina / tiazol com espaçador hidrazona **4**



**d)** NaBH<sub>4</sub>, EtOH, 1 h, 0 °C depois 1h, t.a.; **e)** DMSO, (COCl)<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, TEA, 30 min, -70 °C ou MnO<sub>2</sub> ativado, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 1-4 h, t.a.; **f)** Tiossemicarbazida, EtOH, HCl, 2 h, 80 °C.; **g)** 2-bromo-acetocetona, EtOH, HCl, 2 h, t.a.

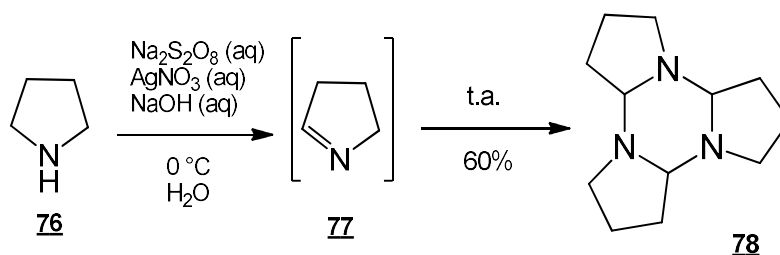
### 3.3.Resultados e Discussão

#### 3.3.1.Síntese do trímero da $\Delta^1$ -pirrolina **78**

A  $\Delta^1$ -pirrolina **77** foi obtida através da oxidação catalítica da pirrolidina **76**, pelo persulfato de sódio e o nitrato de prata como catalisador, procedendo a reação a 0 °C e em meio básico. Devido à sua elevada reatividade, o monômero trimeriza no meio reacional, obtendo seu respectivo trímero. Em nosso grupo de pesquisa, foi verificada uma melhora no rendimento através da agitação vigorosa do meio reacional. O procedimento experimental de síntese do trímero **78** está descrito no Item

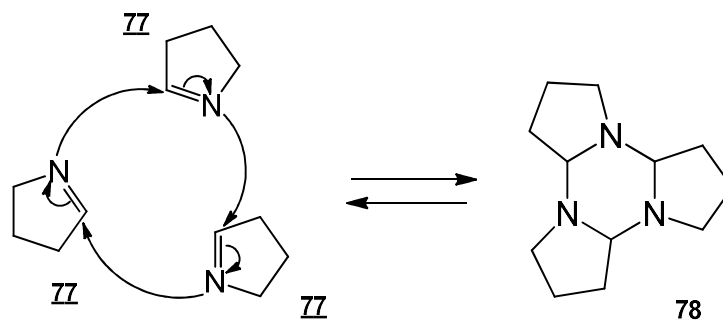
3.4.1.(Esquema 15).

Esquema 15. Síntese do trímero da  $\Delta^1$ -pirrolina **78**.



Como falado acima, o trímero da  $\Delta^1$ -pirrolina **78** é uma estrutura mais estável, sendo formada em temperatura ambiente, mas, ao fornecer energia térmica ao composto, pode novamente ser obtida a  $\Delta^1$ -pirrolina **77**. A reatividade da  $\Delta^1$ -pirrolina **77** se dá pela presença da ligação dupla polarizada e o par de elétrons livres do átomo de nitrogênio, o que gera uma alta instabilidade e consequente formação do trímero **78** como observado no Esquema 16.

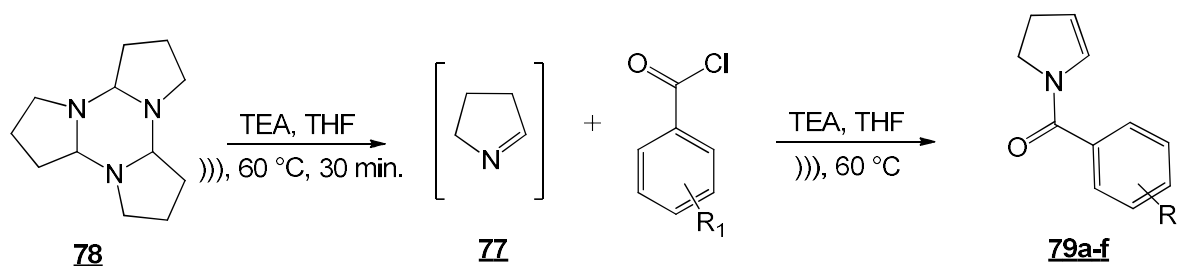
Esquema 16. Trimerização da  $\Delta^1$ -pirrolina **77**: formação do trímero **78** à temperatura ambiente.



### 3.3.2. Síntese das enamidas **79**

Para a formação das enamidas endocíclicas **79a-e**, uma solução do trímero da  $\Delta^1$ -pirrolina **78** (bruto) em THF e TEA foi submetida à sonicação e aquecimento por 30 minutos (Esquema 17). O processo de sonicação e aquecimento, promovem a formação do monômero 1-pirrolina **77**, pela destrimerização do respectivo trímero **78**.

Esquema 17. Síntese das enamidas endocíclicas **79a-f**

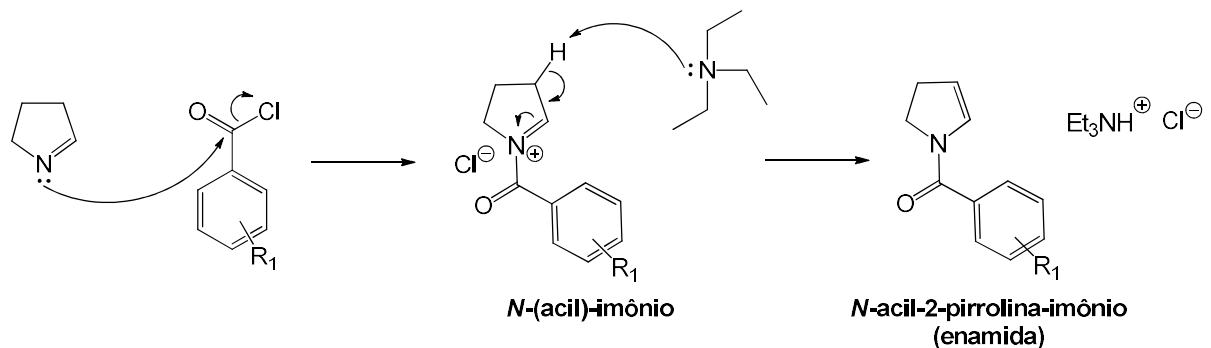


Em trabalhos anteriores em nosso grupo de pesquisa (DOS SANTOS, 2003), foi possível detectar que o aumento do tempo desta etapa não levou a alteração do rendimento, levando a suposição que a destrimerização do trímero **78** atinge o equilíbrio químico com o monômero **77**. Também foi observado que a TEA é importante para evitar uma degradação do monômero da  $\Delta^1$ -pirrolina **77** (Esquema 18).

A segunda etapa consistiu na adição lenta do cloreto de benzoíla *p*-substituído, ainda sob sonicação e aquecimento. A reação foi acompanhada por

CCD, sendo finalizada através da observação consumo total do cloreto de benzoíla *p*-substituído (Esquema 18).

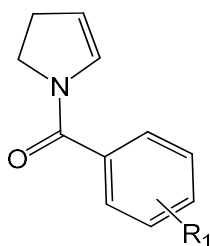
Esquema 18. Mecanismo reacional de formação das *N*-acil-2-enamidas **79**.



A purificação se deu por cromatografia em coluna, sem extração do subproduto formado, o cloreto de trietilamônio, uma vez que tentativas anteriores com água e acetato de etila acarretaram degradação das enamidas (SARAIVA, 2020).

Os distintos substituintes citados, de caráter eletro-atratores e eletro-retiradores, promoveram distintos rendimentos para as enamidas **80** formadas, variando entre 16 – 88%, como apresentado na Tabela 1.

Tabela 1. Rendimentos das enamidas **79a-f** sintetizadas.

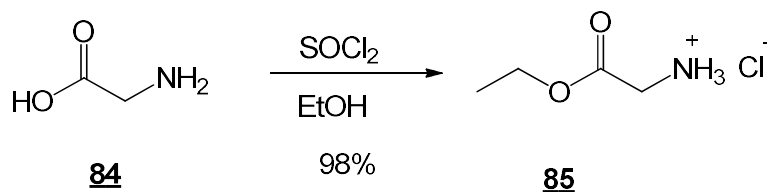


| Enamida    | R <sub>1</sub>            | Rendimento |
|------------|---------------------------|------------|
| <u>79a</u> | <i>p</i> -Cl              | 44%        |
| <u>79b</u> | <i>p</i> -Me              | 35%        |
| <u>79c</u> | <i>p</i> -NO <sub>2</sub> | 8%         |
| <u>79d</u> | <i>p</i> -F               | 30%        |
| <u>79e</u> | <i>p</i> - <i>t</i> Bu    | 27%        |
| <u>79f</u> | <i>p</i> -OMe             | 16%        |

### 3.3.3. Síntese do cloridrato de glicina esterificada 85.

O aminoácido glicina é solubilizado em meio etanólico, sob agitação e aquecimento, e convertido em sua forma de *zwitterion*, devido a abstração do hidrogênio da carboxila pela amina primária do íon dipolar (Esquema 19). Em seguida, ocorre o ataque nucleofílico do carboxilato do íon dipolar sobre o enxofre eletrofílico do cloreto de tionila (SOCl<sub>2</sub>), formando um intermediário, que em seu rearranjo elimina o íon cloreto.

Esquema 19. Síntese do cloridrato de glicina esterificada 85

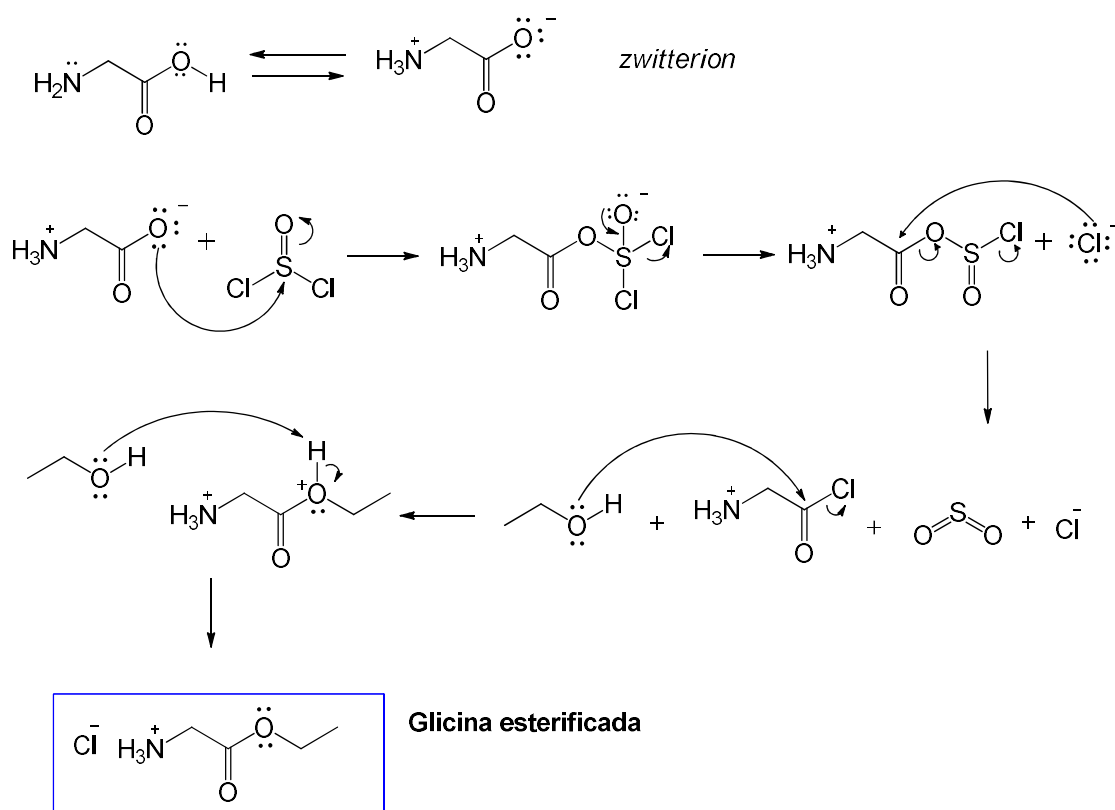


A carbonila do intermediário formado sofre o ataque nucleofílico do ânion cloreto, formando o cloreto de acila, o gás dióxido de enxofre e liberando outro íon cloreto no meio reacional.

O cloreto de acila gerado sofre o ataque nucleofílico do etanol sobre sua carbonila, formando assim o sal cloreto de glicina esterificada 85 (Esquema 20).

O rendimento desta reação foi de 98%.

Esquema 20. Mecanismo da síntese do cloridrato de glicina esterificada **85**.

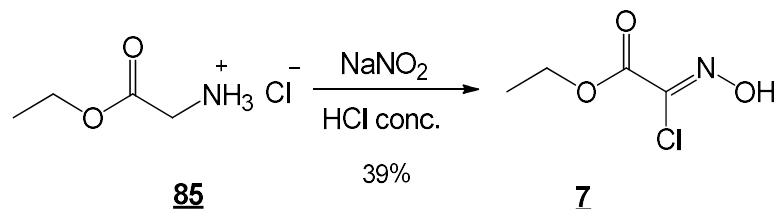


#### 3.3.4. Síntese do clorooximidoacetato de etila **7**, precursor do *N*-Óxido de Nitrila – CEFNO **8**.

Através do éster da glicina **85**, pôde-se obter o clorooximidoacetato de etila **7**, o precursor do CEFNO **8**, obtido *in situ* na reação de cicloadição 1,3-dipolar. A sua

síntese se deu por meio da oxidação do cloridrato de glicina esterificada **85**, tendo como agente oxidante o nitrito de sódio ( $\text{NaNO}_2$ ), em meio ácido ( $\text{HCl}$ ) (Esquema 21).

Esquema 21. Síntese do cloroóximidoacetato de etila **7**, precursor do *N*-Óxido de Nitrila – CEFNO **8**.

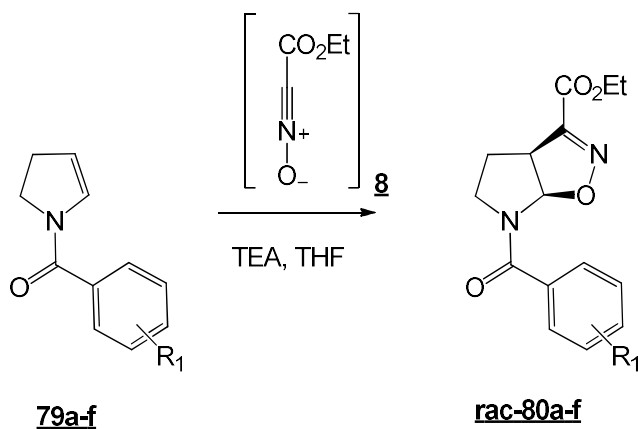


O precursor do *N*-óxido de nitrila possui uma boa estabilidade, por esse motivo ele foi sintetizado em multi-gramas e armazenado por um longo período. Sua purificação foi realizada por meio da recristalização em hexano resfriado. O rendimento desta reação foi de 39%, e a faixa de fusão (69 – 71 °C) para confirmação da formação do produto e sua pureza.

### 3.3.5. Síntese racêmica dos cicloadutos isoxazolínicos **rac-80**

Esta síntese é uma etapa chave devido a formação do grupo farmacofórico, o núcleo 2-isoxazolina, sendo este intermediário necessário para o desenvolvimento distintas séries com potenciais atividades biológicas (Esquema 22).

Esquema 22. Síntese dos ésteres de isoxazolinas **rac-80a-f**.

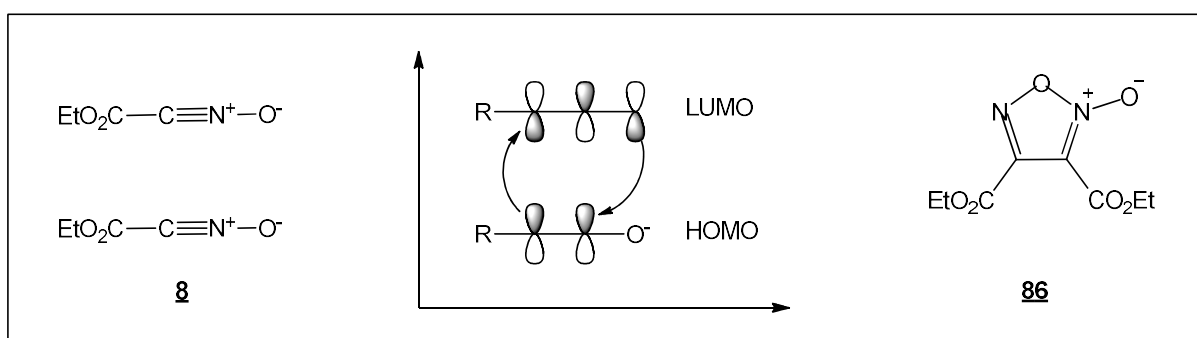


Para formação do núcleo isoxazolírico aza-bicíclico, foi realizada a cicloadição 1,3 dipolar entre as enamidas endocíclicas **rac-80a-f** e *N*-óxido de nitrila (CEFNO) **8**, gerado *in situ*, a partir do clorooximidoacetato de etila **7** e trietilamina (TEA).

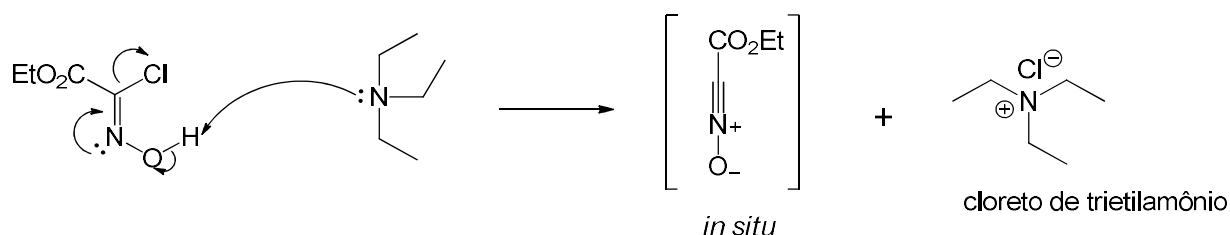
Nesta cicloadição, a enamida se comporta como o dipolarófilo e interage com o dipolo *N*-óxido de nitrila, gerando o núcleo 2-isoxazolina aza-bicíclo. A TEA atua como uma base, desprotonando o precursor, o clorooximidoacetato de etila **7**. A solução de precursor foi adicionada lentamente sobre uma solução de enamida **79**, à temperatura ambiente, condições importantes para favorecer a formação do cicloaduto, por diminuir a formação do dímero **86** do CEFNO **8** (Figura 25).

Mesmo assim, tanto o precursor quanto a TEA foram adicionados em excesso, pois a dimerização ocorre facilmente, devido a reatividade o CEFNO **8**, sendo detectado este fenômeno em relatos na literatura (CECCHI; SARLO; MACHETTI, 2005).

Figura 25. Formação do Dímero *N*-óxido de nitrila **8** representada pela teoria dos Orbitais Moleculares de Fronteira (OMF).

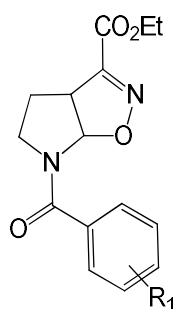


Em contato com a base TEA, ocorre a rápida desprotonação da oxima, voltando o par de elétrons para o oxigênio, o que gera um composto com carga negativa instável. Sendo o cloro um bom grupamento de saída, este é expulso da molécula pela formação da segunda ligação pi entre o nitrogênio e o carbono sp<sup>2</sup>, gerando uma carga global negativa à molécula, tornando-a neutra e estável (Esquema 23).

Esquema 23. Mecanismo de formação dos *N*-óxidos de nitrila 8.

Toda reação foi acompanhada por CCD, onde foi verificado a formação do éster isoxazolílico 80 e do dímero 86. Os rendimentos se encontram na Tabela 2.

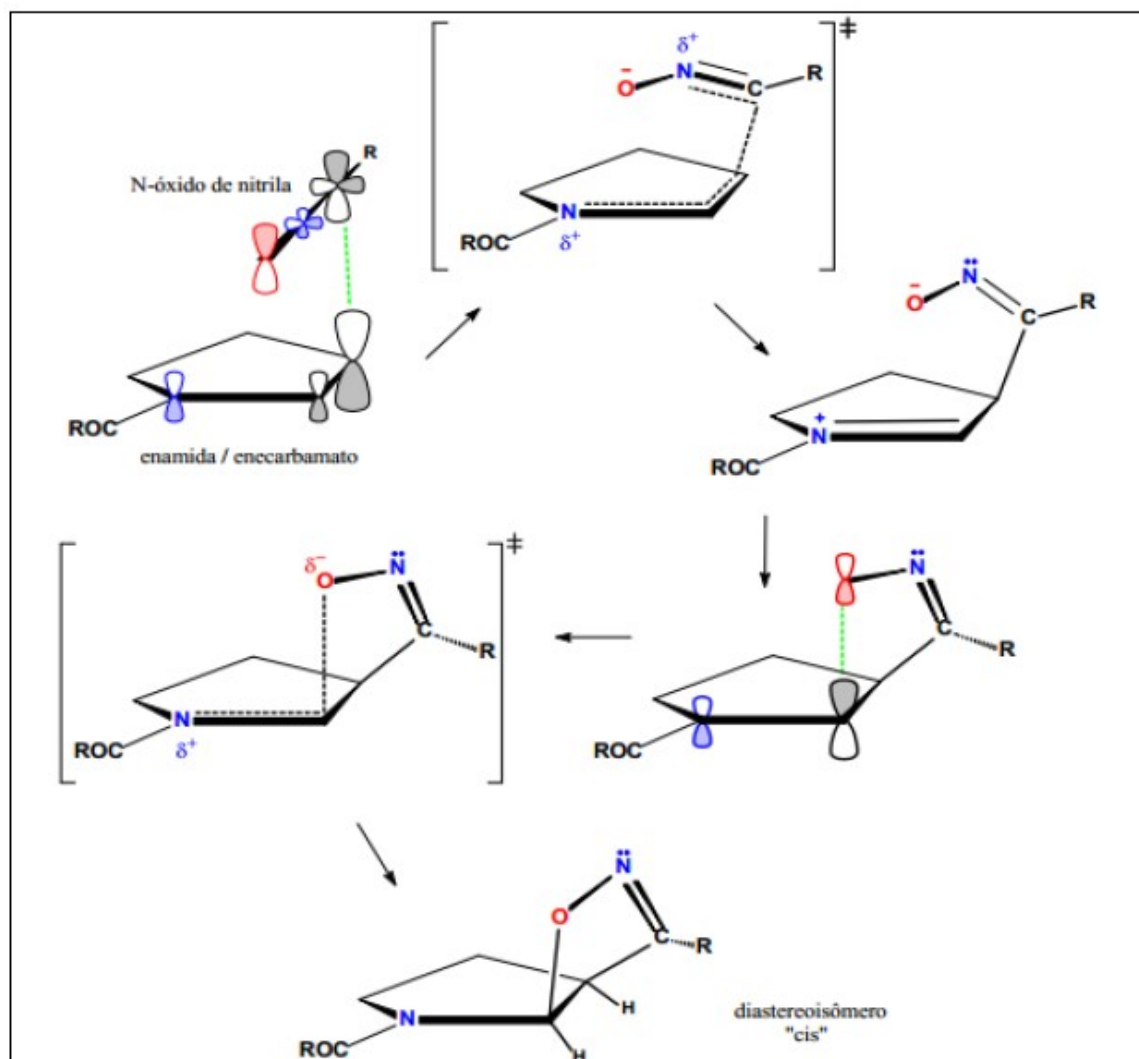
Tabela 2. Rendimentos dos cicloadutos sintetizados.



| Cicloaduto     | R <sub>1</sub>            | Rendimento |
|----------------|---------------------------|------------|
| <u>rac-80a</u> | <i>p</i> -Cl              | 89%        |
| <u>rac-80b</u> | <i>p</i> -Me              | 93%        |
| <u>rac-80c</u> | <i>p</i> -NO <sub>2</sub> | 70%        |
| <u>rac-80d</u> | <i>p</i> -F               | 83%        |
| <u>rac-80e</u> | <i>p</i> - <i>t</i> Bu    | 58%        |
| <u>rac-80f</u> | <i>p</i> -OMe             | 57%        |

A reação de cicloadição nesta etapa é regida pela Teoria dos Orbitais Moleculares de Fronteira (OMF) e devido às características eletrônicas do dipolo (*N*-óxido de nitrila) e o dipolarófilo (enamida), o mecanismo mais provável é o não concertado, pois é o mecanismo reacional que não acontece em uma só fase, passando por intermediário (Figura 24) (SANTOS, 2003).

Figura 26. Mecanismo proposto de cicloadição 1,3-dipolar entre enamidas endocíclicas ou enecarbamatos e *N*-óxido de nitrila CEFNO.



Fonte: Santos, 2003

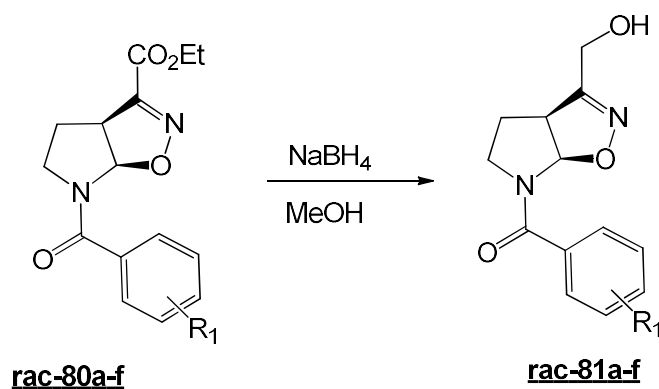
O mecanismo específico desta cicloadição foi proposto por Dos Santos (2003). devido à linearidade, do *N*-óxido de nitrila (dipolo tipo alênico), gerada pela hibridização  $sp$  no átomo de carbono e a polarização da ligação dupla da enamina (dipolarófilo), deve ocorrer a formação de uma das ligações sigma (não concertada), formando o intermediário, o *N*-ácil-imínio. Com a mudança da hibridização (de  $sp$  para  $sp^2$ ), há a possibilidade de aproximação do oxigênio ao carbono da pirrolidina (deficiente de elétrons), formando-se assim a segunda ligação sigma e consequente formação da isoxazolina aza-bicíclica (Figura 26) (SANTOS, 2003).

Cálculos de estudos cinéticos são necessários para a confirmação do mecanismo, mas caso seja concertado, deve ser não sincronizado, devido às características mencionadas acima.

### 3.3.6. Síntese dos álcoois isoxazolínicos **rac-81**.

Para a formação do híbrido isoxazolina/tiazol com função hidrazona, promoveríamos uma redução direta da função éster em C3 à aldeído **rac-82**, gerando uma carbonila susceptível ao ataque nucleofílico da tiossemicarbazona.

Esquema 24. Síntese do álcool isoxazolínicos **rac-81**.



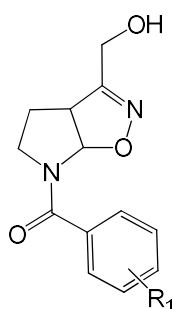
Entretanto, em trabalhos anteriores do grupo de pesquisa, foi verificado experimentalmente, que a tentativa de redução da função éster C3 para a função aldeído utilizando DIBAL-H ou superhidreto  $[(\text{Et}_3\text{AlH})\text{Li}]$ , redutores brandos, foi ineficaz, permanecendo intactos os ésteres isoxazolínicos (REIS, 2011). A utilização de um redutor mais forte, como  $\text{LiAlH}_4$ , não seria ideal, pois reduziria também a função amida (oriunda inicialmente das enamidas) (Esquema 24).

Para resolução deste problema, foi realizada a redução deste éster ao seu respectivo álcool, utilizando o redutor  $\text{NaBH}_4$ , para uma posterior oxidação branda ao aldeído **rac-82** (Esquema 25), conforme metodologia análoga desenvolvida para isoxazolininas (SANTOS, 2003) e achados na literatura possibilitando sequência na via sintética para obtenção do híbrido isoxazolina/tiazol **4**. Durante a redução do éster etílico **rac-80a-f**, pôde ser verificada a ocorrência da formação do éster metílico. Devido a transesterificação e a qualidade do borohidreto, também influenciada pelo tempo de armazenamento, há a necessidade de adicionar excesso

do agente redutor. Os respectivos álcoois isoxazolínicos **rac-81a-f** são formados com bons rendimentos, como mostrado na Tabela 3.

Tabela 3. Rendimentos dos álcoois isoxazolínicos sintetizados.

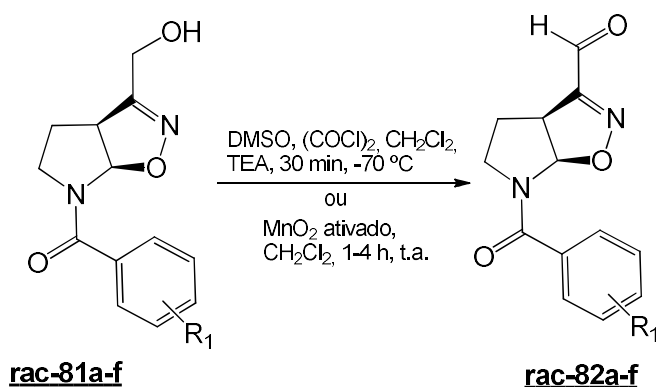
| Álcool                | R <sub>1</sub>            | Rendimento |
|-----------------------|---------------------------|------------|
| <b><u>rac-81a</u></b> | <i>p</i> -Cl              | 96%        |
| <b><u>rac-81b</u></b> | <i>p</i> -Me              | 89%        |
| <b><u>rac-81c</u></b> | <i>p</i> -NO <sub>2</sub> | 96%        |
| <b><u>rac-81d</u></b> | <i>p</i> -F               | 87%        |
| <b><u>rac-81e</u></b> | <i>p</i> - <i>t</i> Bu    | 83%        |
| <b><u>rac-81f</u></b> | <i>p</i> -OMe             | 73%        |



### 3.3.7. Síntese dos aldeídos isoxazolínicos **rac-82**.

A formação do aldeído, a partir do álcool primário formado em C3, foi executada, em primeiro momento, pela reação de Swern (Esquema 25), por também apresentar rendimentos satisfatórios em nosso grupo de pesquisa, para os álcoois isoxazolínicos de 5 membros (REIS et al., 2011; SARAIVA, 2020), assim como para os álcoois isoxazolínicos de 6 membros (ALMEIDA, 2010; MESQUITA, 2018).

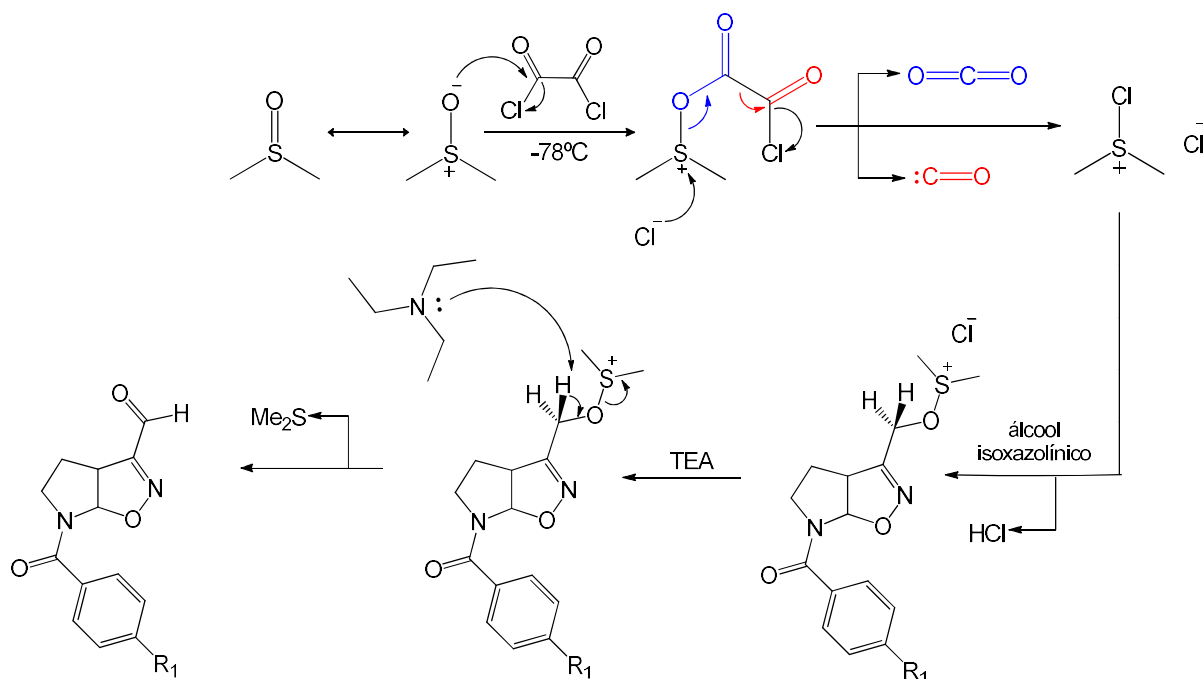
Esquema 25. Síntese do aldeído isoxazolínicos **rac-82**.



Esta reação é conhecida por sua oxidação branda de álcoois e ocorre em primeira etapa a reação do DMSO com o cloreto de oxalila, na qual este último se decompõe, liberando monóxido e dióxido de carbono, liberando o cloreto de dimetilclorossulfônico, o DMSO ativado. Em seguida, ocorre o ataque nucleofílico do álcool **81a-f** ao ânion cloro dimetilssulfônico, formando o íon alcoxissulfônico, vindo consecutivamente a ação da base trietilamina, a qual induz a formação da ligação pi e eliminação do dimetilssulfeto, gerando o aldeído isoxazolíno **82a-f**. Toda a reação foi realizada em meio anidro e sob atmosfera de argônio, com a formação dos subprodutos cloreto de trietilamônio e o dimetilsulfeto que apresenta odor forte característico (OMURA; SWERN, 1978; MANCUSO; HUANG; SWERN, 1978).

O Esquema 26 apresenta o possível mecanismo de obtenção dos aldeídos isoxazolínicos **82a-f**.

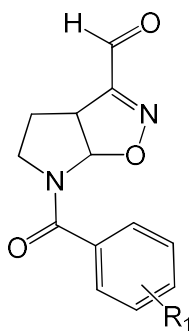
esquema 26. Mecanismo da reação de Swern, oxidação dos álcoois isoxazolínicos aos respectivos aldeídos isoxazolínicos.



Outra via de síntese, para obtenção dos aldeídos isoxazolínicos, envolveu o óxido de manganês ativado (MnO<sub>2</sub> ativado) como agente oxidante. Tal escolha se deu por uma questão de dificuldade logística na obtenção do gelo seco, necessário a reação de Swern, além da não necessidade de reação anidra.

Os aldeídos sintetizados foram purificados por cromatografia em coluna *flash*, com rendimentos entre 53 – 86% para os substituintes descritos na Tabela 4.

Tabela 4. Rendimentos dos aldeídos isoxazolínicos sintetizados.



| Cicloaduto            | R <sub>1</sub>            | Rendimento (%) |
|-----------------------|---------------------------|----------------|
| <b><u>rac-82a</u></b> | <i>p</i> -Cl              | 74*/69**       |
| <b><u>rac-82b</u></b> | <i>p</i> -Me              | 76*/86**       |
| <b><u>rac-82c</u></b> | <i>p</i> -NO <sub>2</sub> | 84*/53**       |
| <b><u>rac-82d</u></b> | <i>p</i> -F               | 96*/71**       |

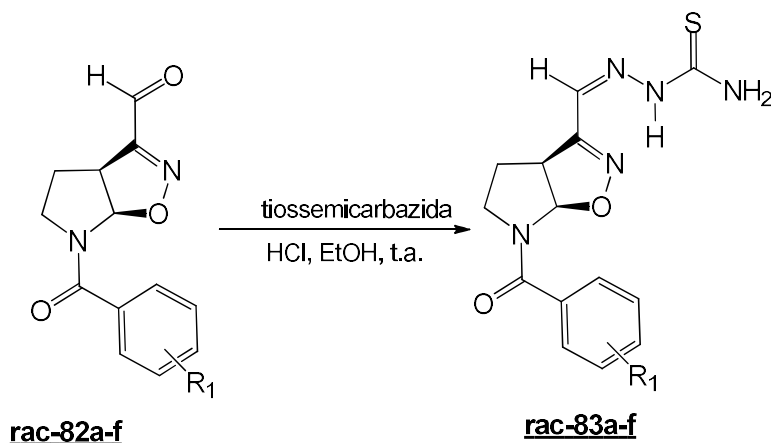
|                       |               |          |
|-----------------------|---------------|----------|
| <b><u>rac-82e</u></b> | <i>p</i> -tBu | 45*/68** |
| <b><u>rac-82f</u></b> | <i>p</i> -OMe | 56*      |

\*oxidação via Swern / \*\*oxidação via MnO<sub>2</sub>

A variação dos rendimentos, apresentada na Tabela 4, mostra que não é possível estabelecer a melhor metodologia, uma vez que as duas metodologias apresentam rendimentos satisfatórios, apresentando vantagens, como reações mais limpas (via Swern) e maior praticidade nas condições reacionais (via MnO<sub>2</sub>).

### 3.3.8. Síntese das tiossemicarbazonas **rac-83**

Esquema 27. Síntese da tiossemicarbazona isoxazolínica **rac-83**.



A condensação dos aldeídos isoxazolínicos sintetizados com tiossemicarbazida, geraram as primeiras moléculas inéditas deste trabalho, as tiossemicarbazonas isoxazolínicas-aza-bicíclicas de 5 membros (Esquema 27).

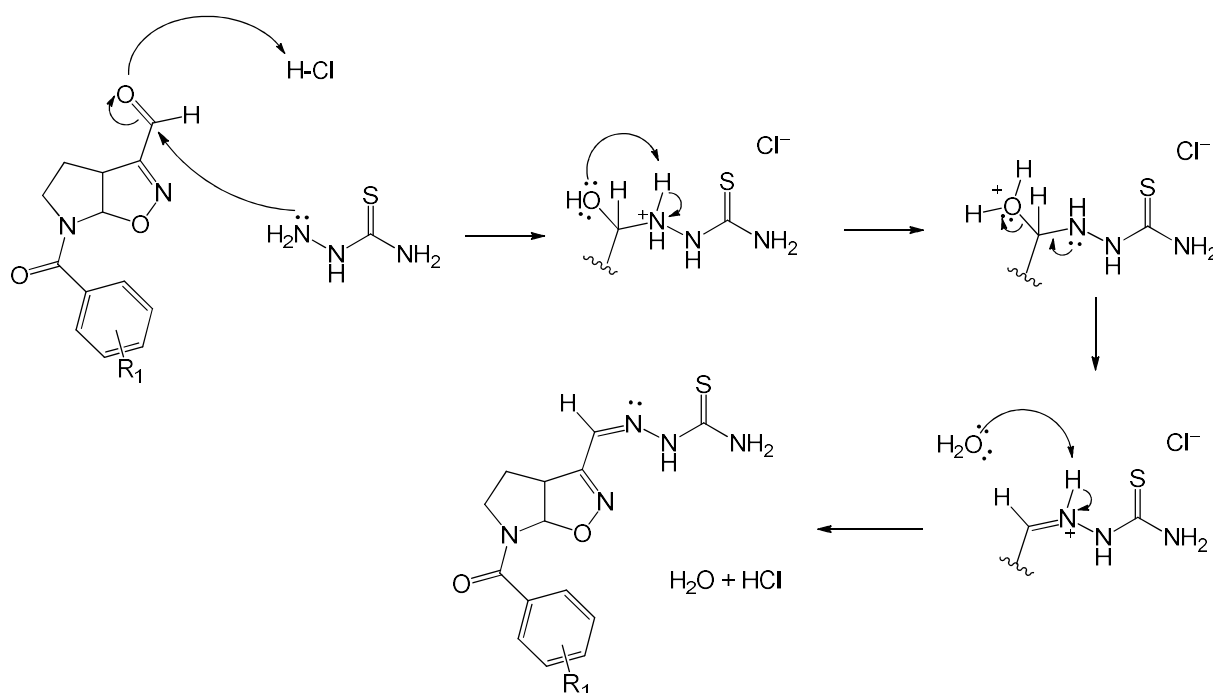
As reações de condensação entre os diferentes aldeídos **rac-82a-f** com tiossemicarbazida ocorreu em meio etanólico ácido e foi baseada no estudo de revisão realizado por Tenório *et al.*, (2005), o qual apresenta diversas vias para obtenção de tiossemicarbazonas, além das metodologias apresentadas por Pishawikar e More (2017) e Reis, C. *et al.* (2011) (PISHAWIKAR; MORE, 2017; REIS, C. *et al.*, 2011; TENÓRIO *et al.*, 2005).

As tiossemicarbazonas podem ser obtidas através de dois métodos: obtenção direta, fazendo uso da tiossemicarbazida podendo reagir com aldeídos ou cetonas; e obtenção indireta, utilizando hidrazina e outros reagentes, com posterior de condensação com um derivado carbonilado específico. O método utilizado neste

trabalho foi o de obtenção direta, para o qual, de acordo com a literatura, obtêm-se melhores rendimentos com a acidificação do meio. Isso ocorre devido às etapas da reação serem reversíveis, de modo que o pH ideal é entre 4 e 5 (TENÓRIO *et al.*, 2005). Esta reação é bastante conhecida por sua alta quimioseletividade, versatilidade e rapidez, apresentando geralmente altos rendimentos, apresentando atividades biológicas na literatura (BAKHERAD *et al.*, 2019; ANAND *et al.*, 2020; TENÓRIO *et al.*, 2005).

Na hipótese reacional, semelhante a proposta por Vekariya *et al.* (2017), o par de elétrons presente no NH<sub>2</sub> mais distante da C=S da tiossemicarbazida, promovendo um ataque nucleofílico sobre a carbonila do aldeído isoxazolínic, estando o oxigênio da carbonila previamente protonado pela presença do catalisador ácido clorídrico (VEKARIYA *et al.*, 2017). Em seguida, ocorre a desidratação, formação da ligação pi, gerando o íon imínio e consequente formação da hidrazona pela remoção do próton, gerando o derivado tiossemicarbazona. (Esquema 28).

Esquema 28. Mecanismo da adição nucleofílica para formação das tiossemicarbazonas isoxazolínicas aos respectivos aldeídos isoxazolínicos.

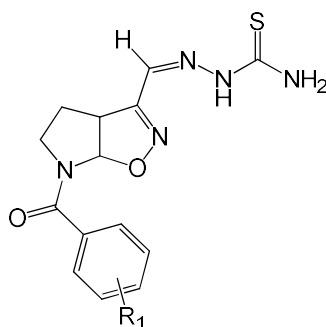


As tiossemicarbazonas **rac-83a-f** foram sintetizadas a partir dos seus respectivos aldeídos, os quais sendo solubilizados em etanol e em meio catalítico

ácido (pH = 4 - 5), foi posteriormente adicionada tiossemicarbazida à solução. Os rendimentos encontram-se na Tabela 5.

O processo de purificação se deu por meio de consecutivas lavagens com etanol e metanol, podendo ser utilizado o método de lavagem e recristalização com os mesmos solventes.

Tabela 5. Rendimentos das tiossemicarbazonas isoxazolínicas sintetizadas.



| Tiossemicarbazona     | R <sub>1</sub>            | Rendimento |
|-----------------------|---------------------------|------------|
| <b><u>rac-83a</u></b> | <i>p</i> -Cl              | 68%        |
| <b><u>rac-83b</u></b> | <i>p</i> -Me              | 80%        |
| <b><u>rac-83c</u></b> | <i>p</i> -NO <sub>2</sub> | 76%        |
| <b><u>rac-83d</u></b> | <i>p</i> -F               | 42%        |
| <b><u>rac-83e</u></b> | <i>p</i> -tBu             | 30%        |
| <b><u>rac-83f</u></b> | <i>p</i> -OMe             | 35%        |

A análise de RMN é apresentada, de modo representativo, para a molécula **83d**. As Figuras 27 e 28 apresentam a estrutura da tiossemicarbazona isoxazolínica **83d**, como ilustração representativa, contendo todos os sinais de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C, respectivamente. Os sinais diagnósticos que confirmam a formação do aza-biciclo 2-isoxazolina, aparecem nos rotâmeros em 6,19 ppm e 6,69 ppm do <sup>1</sup>H RMN e em 91,9 e 94,7 ppm do <sup>13</sup>C RMN. Os sinais característicos de hidrogênios metilênicos em 2,18 e 2,23 ppm e 3,03 e 3,37 ppm; 3,40 e 3,37 ppm; confirmam o núcleo de cinco membros (Figuras 29 e 30). Outras moléculas sintetizadas em estudos anteriores obtiveram deslocamentos químicos semelhantes da 2-isoxazolina aza-bicíclica de 5 membros (REIS et al., 2011; DE ARAÚJO, 2019), sendo a estrutura do heterobiciclo confirmada.

Figura 27. Dados espectrométricos de RMN de  $^1\text{H}$  600 MHz da tiossemicarbazona isoxazolinica **rac-83d**.

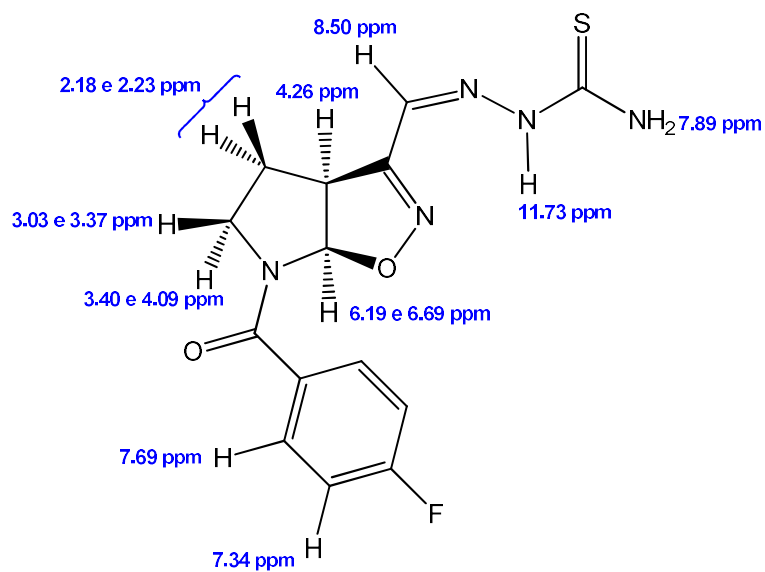


Figura 28. Dados espectrométricos de RMN de  $^{13}\text{C}$  150 MHz da tiossemicarbazona isoxazolinica **rac-83d**.

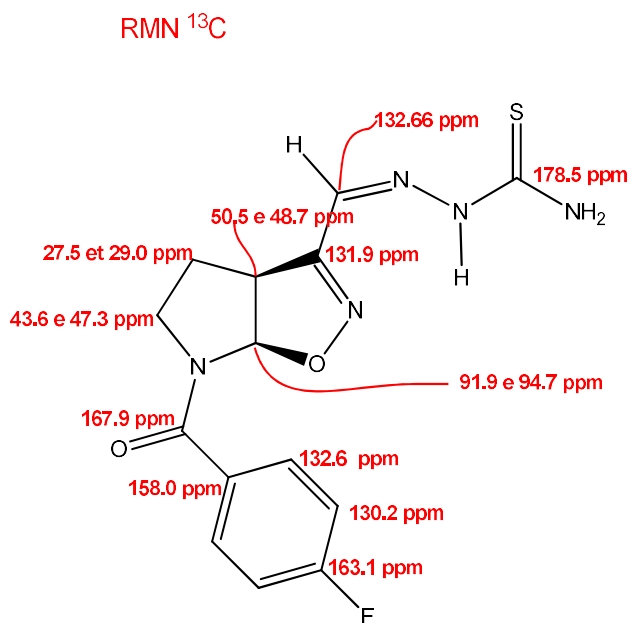


Figura 29. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ ; 600 MHz) da tiossemicarbazona isoxazolinica **rac-83a**

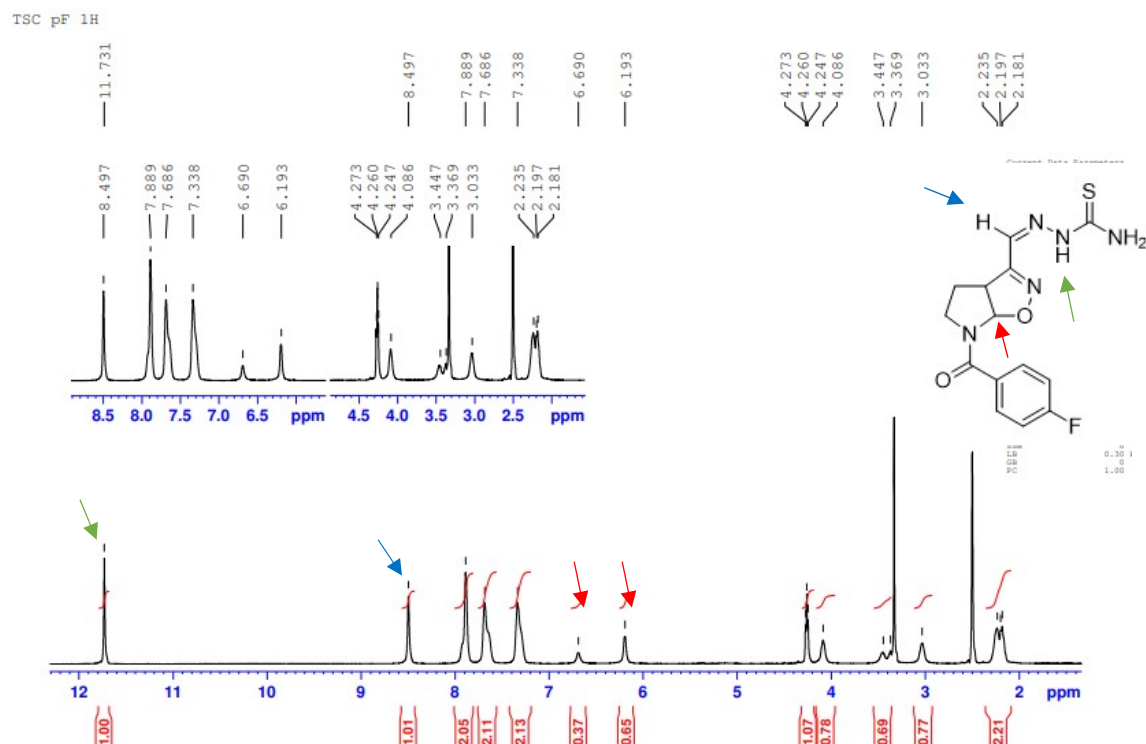
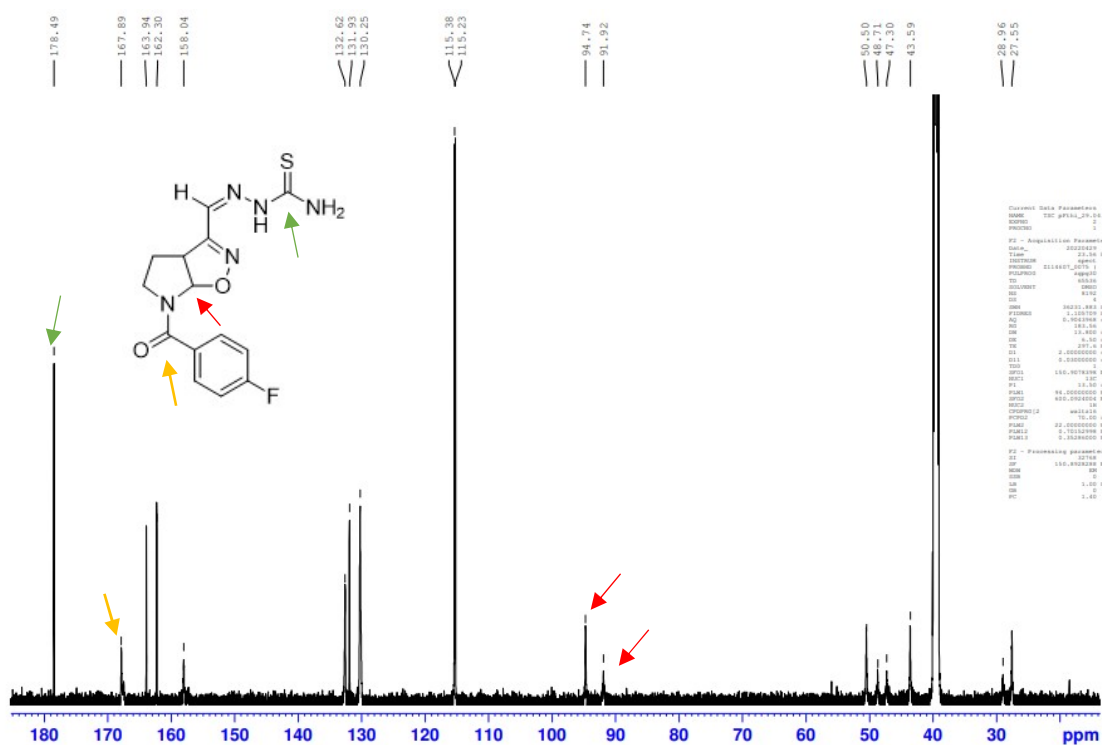


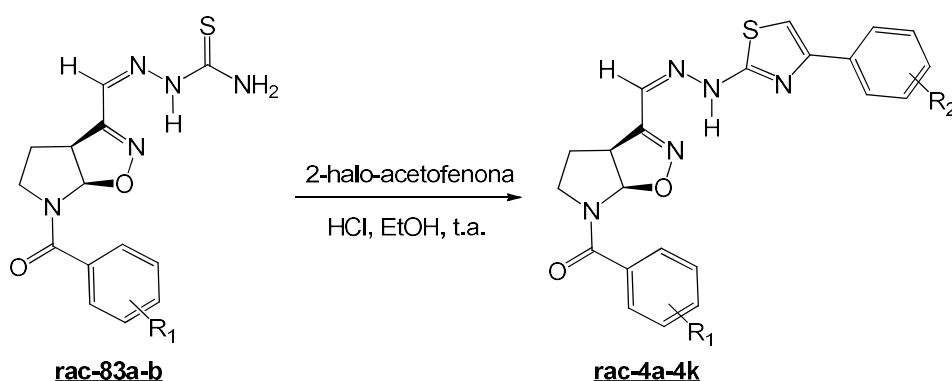
Figura 30. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ ; 150 MHz) da tiossemicarbazona isoxazolinica **rac-83a**



### 3.3.9. Síntese do híbrido tiazol/isoxazolina – hidrazona

Por fim, foi realizada a síntese do híbrido 2-isoxazolina-aza-bicíclico/tiazol com espaçador hidrazona **4** inédito, pela metodologia clássica de Hantzsch (1889), a qual promove a condensação de  $\alpha$ -halocetonas com tioamidas (Esquema 29)(HANTZCH, 1889; DONOHOE *et al.*, 2012).

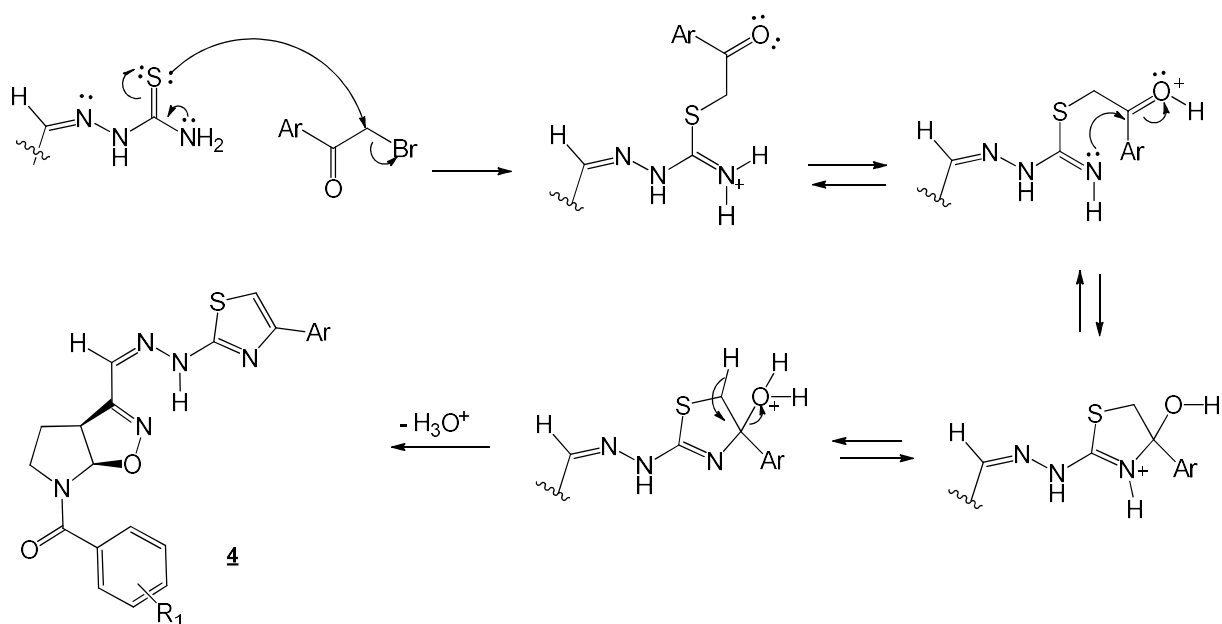
Esquema 29. Síntese da tiazol/isoxazolinica com espaçador hidrazona **rac-4**.



Esta última etapa reacional ocorreu em meio etanólico e foi catalisada por ácido, semelhante as metodologias aplicadas na literatura, onde pode-se obter 11 híbridos inéditos (ALTHAGAFI *et al.*, 2018; BOUHERROU *et al.*, 2017; SOUZA, 2005).

O mecanismo de reação é baseado na síntese clássica de Hantzsch (1889) (Esquema 30), o qual consiste no ataque nucleofílico do átomo de enxofre da tioamida ao carbono alfa do  $\alpha$ -halocarbonil, com a formação de um composto intermediário, que por desidratação subsequente leva ao tiazol correspondente. (HANTZCH, 1889; BORCEA *et al.*, 2021, ER *et al.*, 2014).

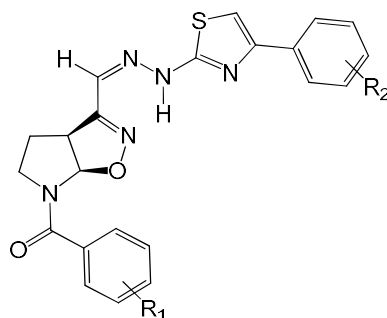
Esquema 30. Mecanismo da síntese do tiazol de Hantzsch para a formação dos híbridos tiazóis/isoxazolínicos **4** com espaçador hidrazona.



As reações foram realizadas com distintas tiossemicarbazonas isoxazolínicas **83** e  $\alpha$ -halo-acetofenonas substituídas, em meio etanólico com pH 4, à temperatura ambiente. O tempo reacional variou entre 30min à 2h, sendo a reação monitorada por CCD.

A purificação se deu por lavagem em etanol e éter etílico, com rendimentos entre 40-86%, apresentados na Tabela 6, sendo semelhantes ao encontrado da literatura para a formação de tiazóis, em semelhantes condições (BOUHERROU *et al.*, 2017; SOUZA, 2005).

Tabela 6. Rendimento do híbrido tiazol/isoxazolina – hidrazona.



| Híbrido               | Código de síntese | R <sub>1</sub>            | R <sub>2</sub>            | Rendimento (%) |
|-----------------------|-------------------|---------------------------|---------------------------|----------------|
| <b><u>rac-4b</u></b>  | FC-02             | <i>p</i> -Me              | <i>p</i> -NO <sub>2</sub> | 48             |
| <b><u>rac-4c</u></b>  | FC-03             |                           | <i>p</i> -Cl              | 39             |
| <b><u>rac-4d</u></b>  | FC-04             |                           | <i>p</i> -F               | 59             |
| <b><u>rac-4a*</u></b> | FC-01             | <i>p</i> -Cl              | <i>p</i> -NO <sub>2</sub> | 40             |
| <b><u>rac-4e</u></b>  | FC-05             |                           | <i>p</i> -Cl              | 81             |
| <b><u>rac-4f</u></b>  | FC-06             |                           | <i>p</i> -F               | 67             |
| <b><u>rac-4g</u></b>  | FC-07             | <i>p</i> -NO <sub>2</sub> | <i>p</i> -NO <sub>2</sub> | 84             |
| <b><u>rac-4h</u></b>  | FC-08             |                           | <i>p</i> -Cl              | 86             |
| <b><u>rac-4i</u></b>  | FC-09             |                           | <i>p</i> -F               | 70             |
| <b><u>rac-4j</u></b>  | FC-10             | <i>p</i> -F               | <i>p</i> -NO <sub>2</sub> | 79             |
| <b><u>rac-4k</u></b>  | FC-11             | <i>p</i> -tBu             | <i>p</i> -NO <sub>2</sub> | 85             |

\*o composto **4a** está fora da ordem numérica para uma melhor visualização dos R<sub>1</sub>

De forma representativa, é apresentada a elucidação estrutural do híbrido isoxazolina azabíclica/tiazol **rac-4j** por ressonância magnética nuclear, através de RMN <sup>1</sup>H de 600 MHz e RMN <sup>13</sup>C de 150 MHz. Os espectros foram obtidos em uma dimensão (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C e DEPT) e em duas dimensões (COSY, HSQC e HMBC).

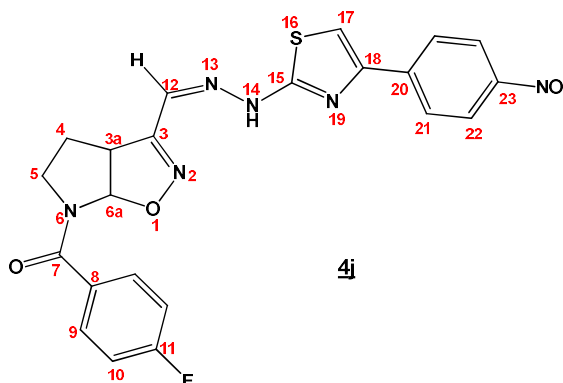
Uma característica apresentada em todos os espectros da série, foi a baixa resolução e intensidade dos sinais dos carbonos do aza-biciclo isoxazolínico, característicos para todos derivados já obtidos com esse núcleo.

Outra característica importante foi a presença de sinais de rotâmeros dos hidrogênios e carbonos próximos da função amida, apresentando sinais duplicados.

O espectro DEPT propiciou a designação dos tipos de carbono (C, CH, CH<sub>2</sub>), enquanto o COSY confirmou os acoplamentos esperados. A análise do espectro HSQC propiciou a correlação dos carbonos aos respectivos hidrogênios ligados a ele. O espectro HMBC permitiu analisar as correlações a duas e três ligações,

possibilitando estabelecer as correlações dos carbonos quaternários principalmente (Figura 31).

Figura 31. Estrutura do híbrido isoxazolíneo **rac-4j** com numeração atribuída.



Analisando os espectros de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ , a isoxazolina aza-bicíclica apresentou sinais característicos, confirmando a presença da mesma na estrutura. Em 6,18 ppm e 6,68 ppm (rotâmeros) aparece o hidrogênio H6a como sinal largo integrando para 1 H. O respectivo carbono C6a, da junção dos anéis, aparece em 94,5 ppm e 92,0 ppm (rotâmeros). O H3a aparece como um tripleto largo em 4,24 ppm ( $J = 9$  Hz). O carbono C3a aparece em 51,0 ppm e 49,1 ppm (rotâmeros). Os metilenos em C4 e C5 apresentaram sinais dos hidrogênios diasterotópicos, além da duplicação dos sinais devido a presença dos rotâmeros. Os dois hidrogênios diasterotópicos H4 apareceram respectivamente em 4,16 ppm e 3,51 ppm (rotâmeros) e 3,08 ppm e 3,44 ppm (rotâmeros), ambos integrando para 1H. O carbono C5 apareceu também duplicado em 43,6 ppm e 47,2 ppm. Os hidrogênios diasterotópicos H4, mais distantes da amida, não apresentaram sinais de rotâmeros, aparecendo como multipletos em 2,43 ppm e 2,25 ppm, ambos integrando para 1H. O carbono C4, mais blindado, aparece em 27,1 ppm.

Com relação à função hidrazona, o hidrogênio característico HN14 aparece em 12,70 ppm como simpleto, integrando para 1H, enquanto o hidrogênio da imina H12 aparece com um sinal alargado em 7,89 ppm, enquanto o respectivo carbono C12 aparece em 131,9 ppm.

Com relação ao grupo benzoíla, os hidrogênios aromáticos H10 aparecem em 7,35 ppm como multipeto, integrando para 2H, enquanto os hidrogênios H9 aparecem como multipeto em 7,70 ppm, integrando para 2H. Os respectivos

carbonos C10 aparece como duplete em 115,2 e 115,4 ppm, acoplando com o átomo de flúor ( $J^2 = 22$  Hz), enquanto o carbono C9 aparece em 130,2 ppm. Os carbonos quaternários C7 da carbonila da amida aparece em 167,8 ppm, enquanto C11, ligado ao flúor, aparece como duplete em 163,9 e 162,3 ppm ( $J^1 = 246$  Hz). O carbono C8 aparece em 131,9 ppm.

Finalizando, o tiazol substituído pela arila, apresenta o hidrogênio C17 como simpleto em 7,78 ppm, integrando para 1H, enquanto o carbono C17 aparece em 109,4 ppm. O carbono quaternário C18 do tiazol aparece em 148,6 ppm. O grupo 4-nitrofenila apresenta os seguintes sinais; os hidrogênios H22 aparecem como duplete em 8,27 ppm ( $J = 6$  Hz), integrando para 2H, enquanto os hidrogênios H21, também aparecem como duplete à 8,10 ppm ( $J = 6$  Hz), integrando para 2H. Os dois carbonos quaternários aromáticos C20 e C23, aparecem respectivamente em 140,3 ppm e 146,3 ppm (Figuras 32 e 33).

Análise similar foi realizada para as outras moléculas da série e todos os espectros, assim como a lista de deslocamentos químicos estão disponíveis em materiais e métodos.

Figura 32. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ ; 600 MHz) do híbrido isoxazolina/tiazol **rac-4j**.

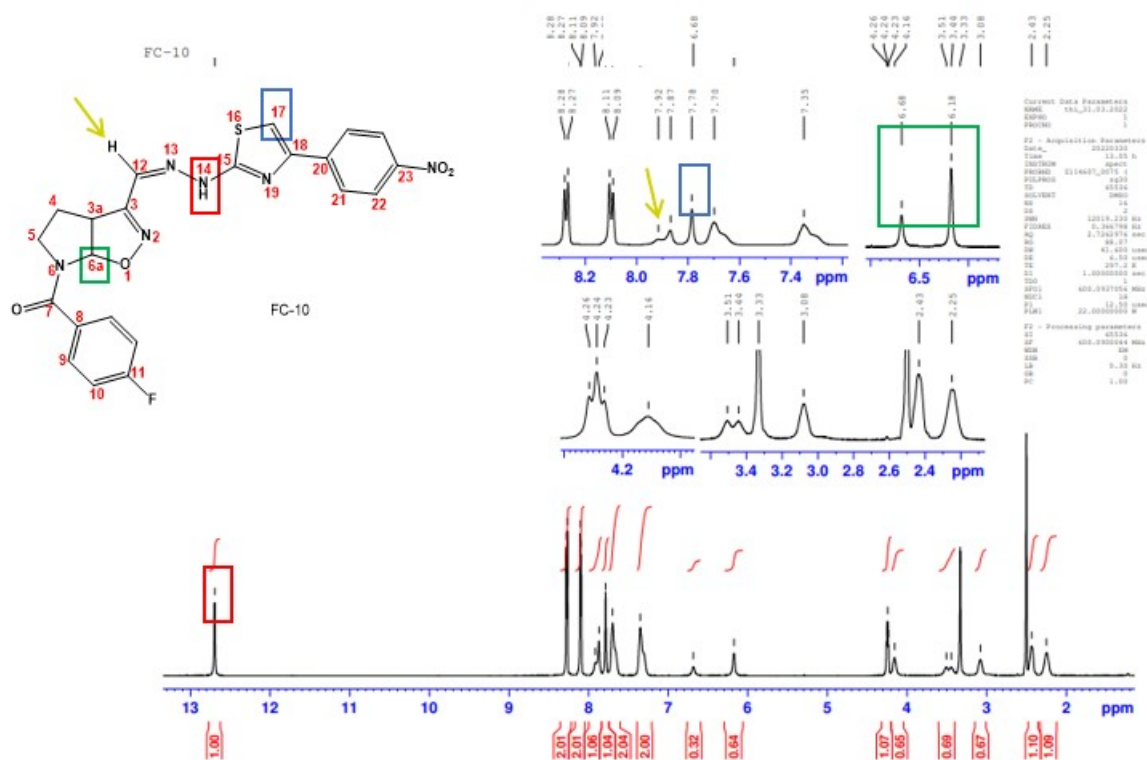
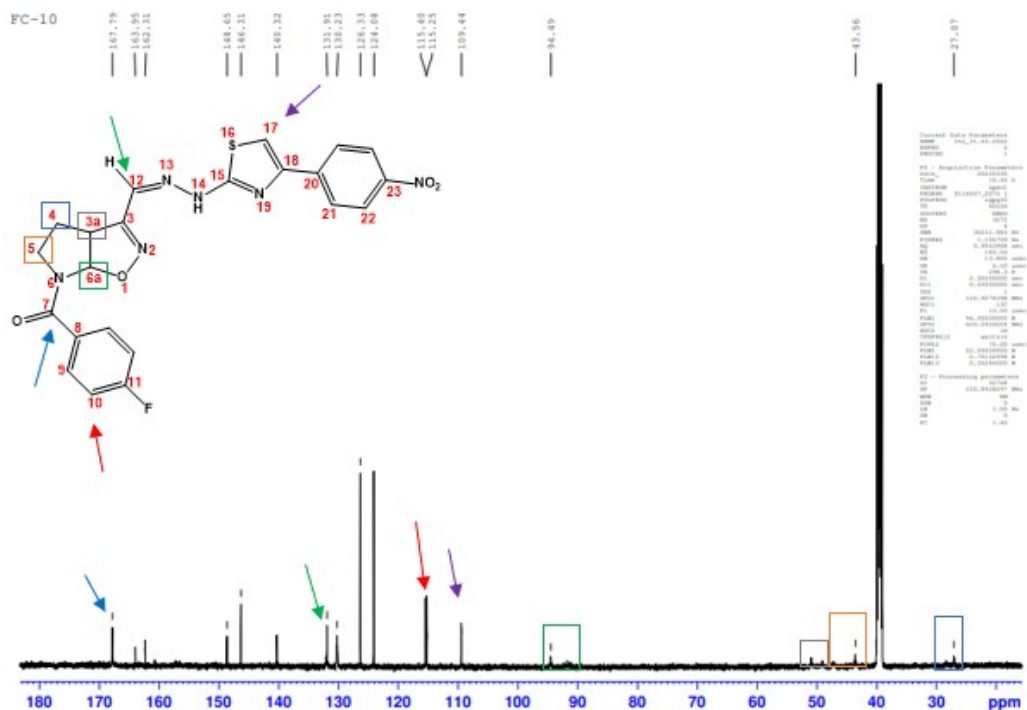
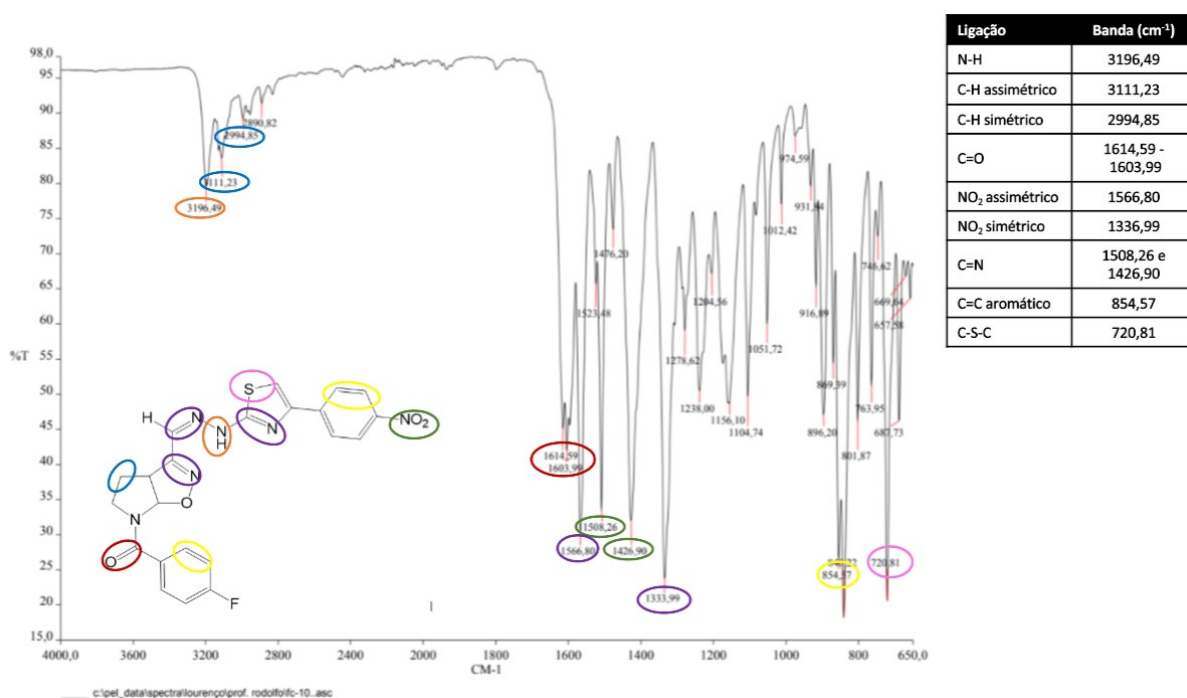


Figura 33. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ ; 150 MHz) do híbrido isoxazolina/tiazol **rac-4j**.



Os espectros de Infravermelho foram obtidos pela metodologia de **IV-ATR**, tanto para a molécula **rac-4j**, quanto para híbridos da série. Assim o espectro de I.V.-ATR da molécula **rac-4j**, híbrido contendo o grupamento *p*-Cl em R<sub>1</sub> e NO<sub>2</sub> em R<sub>2</sub>, está apresentado na Figura 34.

Figura 34. Espectro do Infravermelho (IV-FT-ATR) do Híbrido isoxazolina/tiazol **rac-4j**.



A atribuição das bandas do espectro no IV estão indicadas no próprio espectro, assinaladas por cores diferentes, assim como na tabela ao lado para os principais estiramentos.

### 3.4.Procedimentos Experimentais

Algumas reações por apresentarem sensibilidade à umidade precisaram ser realizadas sob atmosfera de Argônio, a saber, as reações de cicloadição 1,3-dipolar, as de formação dos álcoois a as de formação de aldeídos. Além disto, todas as vidrarias permaneceram por cerca 4h à temperatura de 120 °C na estufa. Da mesma forma, para estas reações, os seus respectivos solventes foram devidamente secos e destilados (THF – sódio/benzofenona; Et<sub>3</sub>N – CaH<sub>2</sub>; CHCl<sub>3</sub> – CaCl<sub>2</sub>; MeOH – I<sub>2</sub>/Mg<sup>0</sup>).

Os procedimentos de purificação das moléculas foram realizados através de colunas cromatográficas *flash* utilizando sílica gel 60 (230-400 mesh) como fase estacionária e acetato de etila e hexano, em suas devidas proporções, como fase móvel, estando estes previamente destilados. Também foram utilizados os procedimentos de recristalização, cristalização e filtração em algumas reações, utilizando metanol, isopropanol e hexano como solventes. Todas as reações foram acompanhadas durante a execução e após seu final por cromatografia em camada delgada utilizando lâminas cromatográficas de alumínio de 0,2 mm de espessura, contendo sílica gel 60 aderidas em uma de suas superfícies. Após aplicação da amostra na lâmina cromatográfica e eluição da mesma, estas foram analisadas através de luz ultravioleta no comprimento de onda de 254 nm. A visualização das manchas foi efetuada com lâmpada de U.V. ENF – 2400 C/F. Nas reações em sonicação, foram utilizados o aparelho de ultrassom UNIQUE® USC 1400-A, apresentando frequência de 40 KHz. As faixas de fusão dos produtos sólidos foram mensuradas pelo do equipamento FISATON® 431D, à seco com leitura digital. Os espectros de absorção na região do infravermelho foram obtidos utilizando o equipamento PerkinElmer® (Spectrum 400), com dispositivo de reflectância total atenuada (ATR) com cristal de Seleneto de Zinco. As frequências dessa absorção expressas em cm<sup>-1</sup>. Os espectros RMN de <sup>1</sup>H, RMN de <sup>13</sup>C foram obtidos em equipamento Varian Unity® 300, 400 MHz e 600 MHz. Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em ppm, tendo como padrão interno o tetrametilsilano (TMS) para RMN <sup>1</sup>H e o solvente da análise (DMSO) para RMN de <sup>13</sup>C. Os sinais dos espectros de RMN <sup>1</sup>H foram designados da seguinte forma: deslocamento químico (δ), multiplicidade (s = simpleto, d = duplete, dl = duplete largo, t = tripleto, tl = tripleto largo, q = quarteto, dd = duplo duplete, dt = duplo tripleto, ddl =duplo duplete largo,

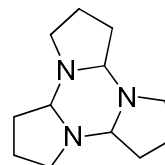
m = multipeto, ml = multipeto largo, sl = sinal largo), constant/e de acoplamento (Hz) e número de hidrogênios.

### 3.4.1. Síntese do trímero da $\Delta^1$ -pirrolina **78**

- Óleo amarelo-alaranjado viscoso

-  $C_{12}H_{21}N_3$

- MM: 207,31 g/mol



Sobre uma solução aquosa de pirrolidina (11,6 mL; 138,8 mmol), hidróxido de sódio (11,48 g; 287,00 mmol) e nitrato de prata (0,118 g; 0,694 mmol) em 140 mL de água destilada, foi adicionada uma solução aquosa 25% de persulfato de sódio (33,82 g; 142,08 mmol; 134 mL) lentamente a 0 °C. Após o término da adição, a reação permaneceu em vigorosa agitação à 0 °C por uma hora. Decorrido esse tempo, a mistura reacional permaneceu por mais três horas adicionais em vigorosa agitação à temperatura ambiente. A mistura resultante foi extraída com diclorometano (3 x 120 mL). A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e o solvente foi removido. O rendimento médio obtido foi de 78%. A utilização do trímero da 1-pirrolina **78** deve ser realizada rapidamente. Devido sua instabilidade, esse deve ser armazenado por longo tempo.

### DADOS ESPECTROMÉTRICOS 78

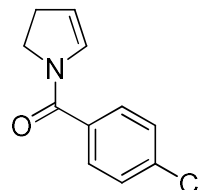
**RMN de  $^1H$  (CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$ , ppm, 300 MHz, t.a.).**

(parte do monômero está presente, devido ao equilíbrio). 1,75 (m); 2,28 (m); 2,50 (m); 2,99 (m); 3,82(m); 7,59 (s).

### 3.4.2. Síntese das enamidas endocíclicas **79a-f**

#### 3.4.2.1. Síntese da *N*-(4-clorobenzoil)-2-pirrolina **79a**

- Sólido branco amorfo
- $C_{11}H_{10}ClNO$
- MM: 207,65 g/mol
- Rf: 0,24 (AcOEt/hexano 3:7)
- PF: 75-76 °C



O trímero da 1-pirrolina (2,12 g; 10,2257 mmol) foi solubilizado em THF seco (150 mL) e a essa solução foi adicionada a trietilamina (3,4 mL; 20,4514 mmol). A solução resultante foi colocada no aparelho de ultrasom, a aproximadamente 60°C, por 30 minutos. Decorrido o tempo, o cloreto de *p*-clorobenzoíla (2,6 mL; 20,4514 mmol) foi adicionado lentamente e após o término da adição, a mistura reacional foi deixada sob sonicação e aquecimento por duas horas adicionais. A suspensão resultante foi filtrada a vácuo e o solvente foi removido em evaporador rotatório. O produto foi purificado em cromatografia em coluna *flash*, o eluente utilizado foi acetato de etila/hexano (3:7). A massa obtida foi 1,432 g, sendo o rendimento médio obtido de 44%.

#### DADOS ESPECTROMÉTRICOS **79a**

**RMN de  $^1H$  ( $CDCl_3$ ,  $\delta$ , ppm, 400 MHz, t.a.), presença de rotâmeros.**

2,70 (m; 2H); 4,00 (t;  $J$ = 8 Hz; 2H); 5,21 (m; 1H; rotâmero em 5,38); 6,40 (m; 1H; rotâmero em 7,06); 7,38 (d;  $J$ = 8 Hz; 2H); 7,45 (d;  $J$ = 12 Hz; 2H)

**RMN de  $^{13}C$  ( $CDCl_3$ ,  $\delta$ , ppm, 100 MHz, t.a.), presença de rotâmeros.**

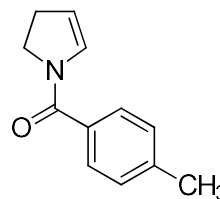
28,48 ( $CH_2$ ); 45,88 ( $CH_2$ ); 112,37 (CH); 128,82 (2CH); 129,33 (2CH); 130,44 (CH); 134,31 (C); 136,53 (C-Cl); 166,83 (C=O)

**IV-FT (ATR,  $cm^{-1}$ ), principais sinais.**

2.863; 1.590; 1.566; 1.423; 846; 708

### 3.4.2.2. Síntese da *N*-(4-metilbenzoil)-2-pirrolina **79b**

- Sólido amarelo claro amorfo
- $C_{12}H_{13}NO$
- MM: 187,23 g/mol
- Rf: 0,28 (AcOEt/hexano 3:7)
- PF: 59-61 °C



O procedimento da reação é semelhante ao do item 3.4.2.1.

Os reagentes utilizados nessa síntese foram o trîmero da 1-pirrolina (1,7136 g; 8,2654 mmol), trietilamina seca (2,18 mL; 16,5309 mmol), THF seco (72 mL) e cloreto de *p*-metilbenzoíla (2,79 mL; 16,5309 mmol). A purificação foi feita por cromatografia em coluna *flash*, o eluente utilizado foi acetato de etila/hexano (3:7). Foram obtidos 0,46 g do produto puro, sendo o rendimento 35%.

### DADOS ESPECTROMÉTRICOS 79b

**RMN de  $^1H$  ( $CDCl_3$ ,  $\delta$ , ppm, 400 MHz, t.a.), presença de rotâmeros.**

2,37 (s; 3H); 2,69 (m; 2H); 4,00 (t;  $J = 8$  Hz; 1H; rotâmero em 3,82); 5,16 (s; 1H; rotâmero em 5,34); 6,47 (s; 1H; rotâmero em 7,08); 7,20 (d;  $J = 8$  Hz; 2H); 7,40 (d;  $J = 4$  Hz; 2H)

**RMN de  $^{13}C$  ( $CDCl_3$ ,  $\delta$ , ppm, 100 MHz, t.a.), presença de rotâmeros.**

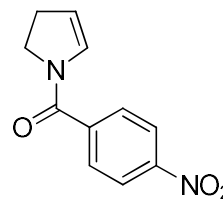
21,52 ( $CH_3$ ); 28,46 ( $CH_2$ ); 45,77 ( $CH_2$ ); 111,44 (CH); 127,88 (CH); 129,09 (4CH); 130,99 (C); 140,61 (C); 167,14 (C=O)

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

2.856; 1.602; 1.567; 1.412; 1.366; 828

### 3.4.2.3. Síntese da *N*-(4-nitrobenzoil)-2-pirrolina **79c**

- Cristais amarelos
- $C_{11}H_{10}N_2O_3$
- MM: 218,20 g/mol
- Rf: 0,34 (AcOEt/hexano 1:1)
- PF: 148-153 °C



O procedimento da reação é semelhante ao do item 3.4.2.1.

Os reagentes utilizados nessa síntese foram o trímero da 1-pirrolina (3,26 g; 15,7408 mmol), trietilamina seca (4,27 mL; 30,6102 mmol), THF seco (100 mL) e cloreto de *p*-nitrobenzoíla (2,914 g; 15,7402 mmol). A purificação foi feita por cromatografia em coluna flash, o eluente utilizado foi acetato de etila/hexano (3:7). A massa obtida foi 0,6 g, sendo rendimento médio obtido 8%.

### DADOS ESPECTROMÉTRICOS 79c

**RMN de  $^1H$  ( $CDCl_3$ ,  $\delta$ , ppm, 400 MHz, t.a.), presença de rotâmeros.**

2,76 (m; 2H; rotâmero em 2,64); 4,06(m; 2H; rotâmero em 3,79); 5,31 (m; 1H; rotâmero em 5,48); 6,34 (m; 1H; rotâmero 7,06); 7,70 (m, 2H); 8,29 (m, 2H)

**RMN de  $^{13}C$  ( $CDCl_3$ ,  $\delta$ , ppm, 100 MHz, t.a.), presença de rotâmeros.**

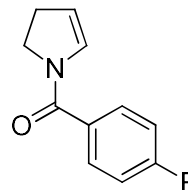
28,4( $CH_2$ ); 45,8( $CH_2$ ); 123,8( $CH$ ; rotâmero em 123); 128,8( $CH$ ; rotâmero em 128,3); 129,5 ( $CH$ ); 141,6 (C); 164,4( $C=O$ )

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

3.100; 2.968; 2.862; 1.595; 1.512; 1.427; 1.353; 1.316; 860.

#### 3.4.2.4. Síntese da *N*-(4-fluorobenzoi)-2-pirrolina **79d**

- Óleo amarelo claro
- $C_{11}H_{10}FNO$
- MM: 191,20 g/mol
- Rf: 0,42 (AcOEt/hexano 1:1)



O procedimento da reação é semelhante ao do item 3.4.2.1.

Os reagentes utilizados nessa síntese foram o trímico da 1-pirrolina 43 (3,5 g; 16,8821 mmol), trietilamina seca (4,7 mL; 33,7642 mmol), THF seco (175 mL) e cloreto de *p*-fluorobenzoíla (4,1 mL; 33,7642 mmol). A purificação foi feita por cromatografia em coluna “Flash”, o eluente utilizado foi acetato de etila/hexano (3:7). Foram obtidos 1,15 g do produto puro, com o rendimento de 30%.

#### DADOS ESPECTROMÉTRICOS 79e

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

2,68 (m; 2H); 3,98 (tl;  $J = 8,7\text{Hz}$ ; 2H; rotâmero em 3,79); 5,19 (m; 1H; rotâmero em 5,36); 6,40 (m; 1H); 7,07 (m; 2H); 7,50 (m; 2H).

**RMN de  $^{13}C$  ( $CDCl_3$ ,  $\delta$ , ppm, 75 MHz, t.a.), presença de rotâmeros.**

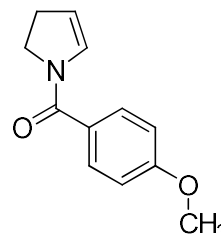
28,2( $CH_2$ ); 45,67( $CH_2$ ); 112,0 (CH); 115,4 (d;  $J = 21,7\text{Hz}$ ; CH); 129,9 (d;  $J = 8,7\text{Hz}$ ; CH); 130,3 (CH); 131,8 (C); 163,6 (d;  $J = 248\text{ Hz}$ ; C); 165,7 (C=O).

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

3.124; 3.078; 3.055; 2.966; 2.898; 2.865; 1.606; 1.508; 1.469; 1.428; 1.368; 1.289; 1.220; 1.153; 1.095; 847; 733; 567.

### 3.4.2.5. Síntese da *N*-(4-metoxibenzoil)-2-pirrolina **79f**

- Óleo amarelo-alaranjado viscoso
- $C_{12}H_{13}NO_2$
- MM: 203,23 g/mol
- Rf: 0,29 (AcOEt/hexano 1:1)



O procedimento da reação é semelhante ao do item 3.4.2.1.

Os reagentes utilizados nessa síntese foram o trímero da 1-pirrolina **43** (3,5 g; 16,9072 mmol), trietilamina seca (4,79 mL; 34,41 mmol), THF seco (107,25 mL) e cloreto de *p*-metoxibenzoíla (7,578 mL; 33,8145 mmol). A purificação foi feita por cromatografia em coluna flash, o eluente utilizado foi acetato de etila/hexano (1:1). A massa obtida foi 2,0875 g, sendo o rendimento médio obtido 16%.

### DADOS ESPECTROMÉTRICOS **80d**

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

2,68(m; 2H; rotâmero em 2,55); 3,81(s;3H); 3,98(m; 2H); 5,16(s; 1H); 6,50(s; 1H; rotâmero em 7,14); 6,89(m; 2H); 7,47(m; 2H)

**RMN de  $^{13}C$  ( $CDCl_3$ ,  $\delta$ , ppm, 75 MHz, t.a.), presença de rotâmeros.**

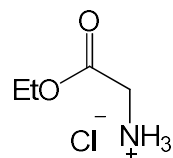
28,2( $CH_2$ ); 45,7( $CH_2$ ); 55,2( $CH_3$ ); 111,5( $CH$ ); 127,9( $CH$ ); 159,5( $CH$ ); 130,8( $CH$ ); 161,0( $C$ ); 167,0( $C=O$ )

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

2.957, 1.607, 1.574, 1.512, 1.404, 1.365, 1.110, 1.028, 839, 708.

### 3.4.3 Síntese da glicina esterificada **85**

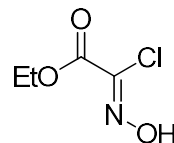
- Sólido branco amorfo
- $C_4H_{10}ClNO_2$
- MM: 139,58 g/mol
- PF: 145 - 146 °C



Em um balão de fundo redondo de 500 mL, foram adicionados 200 mL de etanol P.A., arrefecido em banho de gelo e equipado com agitação magnética. Com auxílio de uma pipeta graduada foi adicionado lentamente ao meio reacional o cloreto de tionila  $[SOCl_2]$  (9,65 mL; 133 mmol), seguida da glicina (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 transcorrido o tempo, o etanol foi removido e a glicina esterificada lavada consecutivas vezes com éter etílico, por meio da filtração em funil de vidro sinterizado, afim de se retirar todas as impurezas oriundas da obtenção da glicina esterificada. O produto obtido foi 18,2 g do com rendimento de 98%.

#### 3.4.4. Síntese do clorooximidoacetato de etila **7** (precursor do CEFNO)

- Cristais brancos
- $C_4H_6ClNO_3$
- MM: 151,54 g/mol
- PF: 80 °C

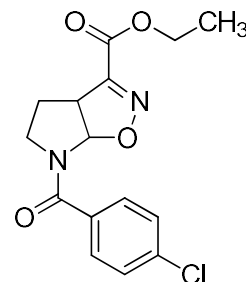


O cloridrato da glicina esterificada (20 g; 0,1432 mol), obtido comercialmente, é dissolvido em água (30 mL) e são adicionados ácido clorídrico concentrado (24,78 mL; 0,8011 mol) e uma solução aquosa de nitrito de sódio (20 g; 0,2898 mol, 35mL de água). A adição do ácido e do  $NaNO_2$  é feita da seguinte forma: metade do ácido é adicionada e em seguida metade da solução de nitrito de sódio. Lentamente após a primeira adição, a outra metade de solução de HCl e da solução de  $NaNO_2$  foram adicionadas nas mesmas condições. A adição do HCl e do  $NaNO_2$  é feita a 0°C. Depois de adicionada a última parte do  $NaNO_2$  a reação permanece em vigorosa agitação à 0°C por 20 minutos adicionais. A solução resultante foi extraída com  $CH_2Cl_2$  (4 x 50 mL) e a fase orgânica foi seca sobre  $Na_2SO_4$  anidro. O solvente foi removido e à solução resultante foi adicionado hexano resfriado. Na adição do hexano, ocorreu a precipitação dos cristais brancos, cristais de clorooximidoacetato de etila. A massa obtida foi de 8,46 g, correspondendo a um rendimento de 39%.

3.4.5. Cicloadição 1,3-dipolar das Enamidas endocíclicas **80a-c** com o óxido de carboetoxiformonitrila (CEFNO) **8**.

3.4.5.1. Síntese do éster etílico do ácido 6-(4-clorobenzoil)-4,5,6,6a-tetrahidro3aH-pirrolo[3,2-d]isoxazol-3-carboxílico **80a**.

- Sólido branco amorfo levemente amarelado
- $C_{15}H_{15}ClN_2O_4$
- MM: 322,74 g/mol
- Rf: 0,38 (AcOEt/hexano 1:1)



Primeiramente, a enamida **79a** (0,9509 g; 4,5791 mmol) é solubilizada em THF (14,9 mL) e a essa solução, a TEA foi adicionada (0,79 mL; 5,6740 mmol). Separadamente, foi feita uma solução em THF do clorooximidoacetato de etila (0,7693 g; 5,0768 mmol; 5,5 mL de THF) que, foi adicionada lentamente, via seringa, na solução reacional. Após o término da adição do clorooximidoacetato de etila, a reação permaneceu em agitação vigorosa por mais 30 minutos. Vale salientar que a reação acontece em atmosfera de argônio e todas as vidrarias foram previamente secas por 4 horas. O término da reação foi verificado por Cromatografia em Camada Delgada (CCD). Decorrido o tempo, a mistura reacional foi filtrada em funil sinterizado para filtrar o sal cloreto de trietilamônio, que precipita no meio reacional. Após a remoção do solvente, um líquido viscoso amarelo foi obtido. Este líquido foi purificado por Cromatografia em Coluna flash, utilizando uma mistura de solventes como eluente, acetato de etila/hexano (1:5). A massa obtida foi 1,36 g, correspondendo a um rendimento médio de 89%.

#### DADOS ESPECTROMÉTRICOS 80a

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

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

RMN de  $^{13}C$  ( $CDCl_3$ ,  $\delta$ , ppm, 75 MHz, t.a.), presença de rotâmeros.

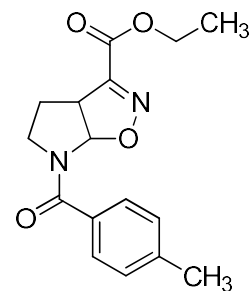
14,0 ( $CH_3$ ); 27,8 ( $CH_2$ ); 43,5 ( $CH_2$ ); 51,1 ( $CH$ ); 62,3 ( $CH_2$ ); 95,8 ( $CH$ ); 128,6 ( $CH$ ); 129,5 ( $CH$ ); 133,1 (C); 137,0 (C); 152,2 (C); 159,7 (C=O); 168,5 (C=O).

**IV-FT - ATR ( $cm^{-1}$ )**, principais sinais.

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

3.4.5.2. Síntese do éster etílico do ácido 6-(4-metilbenzoil)-4,5,6,6a tetrahidro3aH-pirrolo[3,2-d]isoxazol-3-carboxílico **80b**

- Óleo levemente amarelado
- $C_{16}H_{18}N_2O_4$
- MM: 302,32 g/mol
- Rf: 0,21 (AcOEt/hexano 1:1)



O procedimento da reação é semelhante ao do item 3.4.5.1.

Os reagentes utilizados foram a enamida endocíclica **79b** (0,94 g; 5,01 mmol); THF seco (16,3 mL); TEA (0,86 mL; 6,2068 mmol); clorooxiimidoacetato de etila (0,84 g; 5,5541 mmol; THF 6,06 mL). A purificação do cicloaduto foi feita por cristalização em metanol. A massa obtida foi 0,83 g, correspondendo a um rendimento médio de 93%.

**DADOS ESPECTROMÉTRICOS 80b**

**RMN de  $^1H$  ( $CDCl_3$ ,  $\delta$ , ppm, 400 MHz, t.a.), presença de rotâmeros.**

1,39 (t;  $J = 7,6\text{Hz}$ ; 3H); 2,2 (m; 1H); 2,39 (s; 3H); 3,19 (sl; 1H); 4,07 (t;  $J = 8,4\text{Hz}$ ; 1H); 4,38 (m; 2H); 6,24 (sl; 1H); 7,24 (d;  $J = 8,4\text{Hz}$ ; 2H); 7,57 (sl; 2H)

**RMN de  $^{13}C$  ( $CDCl_3$ ,  $\delta$ , ppm, 100 MHz, t.a.), presença de rotâmeros.**

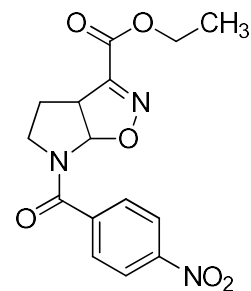
14,03 ( $CH_3$ ); 21,40 ( $CH_3$ ); 28,04 ( $CH_2$ ); 43,12 ( $CH_2$ ); 50,89 ( $CH$ ); 62,29 ( $CH_2$ ); 96,31 (C-O); 128,06 (C); 129,01 (C); 131,92 (C); 141,26 (C); 152,25 (C=N); 159,94 (C=O); 169,74 (C=O).

**IV-FT - ATR ( $cm^{-1}$ ), principais sinais.**

2.983, 1.718, 1.645, 1.381, 1.266; 1.777; 1.124, 1.016, 928, 830

### 3.4.5.3. Síntese do éster etílico do ácido 6-(4-nitrobenzoil)-4,5,6,6a-tetraidro3aH-pirroló[3,2-d]isoxazol-3-carboxílico **80c**

- Sólido branco cristalino
- $C_{15}H_{15}N_3O_6$
- MM: 333,29 g/mol
- Rf: 0,35 (AcOEt/hexano 1:1)
- PF: 110 - 112 °C



O procedimento da reação é semelhante ao do item 3.4.5.1.

Os reagentes utilizados foram a enamida endocíclica **79c** (0,448 g; 2,0539 mmol); THF seco (10,9 mL); TEA (0,36 mL; 2,6164 mmol); cloroxiimidoacetato de etila (0,36 g; 2,3615 mmol; THF 1,0 mL). A purificação do cicloaduto foi feita por meio de uma cromatografia em coluna flash com o sistema eluente acetato de etila/hexano (4:6). A massa obtida foi 0,30 g, correspondendo a um rendimento médio de 70%.

#### DADOS ESPECTROMÉTRICOS **80c**

##### **RMN de $^1H$ ( $CDCl_3$ , $\delta$ , ppm, 300 MHz, t.a.), presença de rotâmeros.**

1,36 (t;  $J = 7,2\text{Hz}$ ; 3H); 2,24 (m; 1H); 2,42 (dd;  $J = 6,1\text{Hz}$ ;  $J = 13,3\text{Hz}$ ; 1H); 3,21 (m; 1H); 4,13 (m; 1H); 4,35 (m; 3H); 6,07 (d;  $J = 7,8\text{Hz}$ ; rotâmero em 6,91); 7,83 (dl;  $J = 7,8\text{Hz}$ ; 2H); 8,28 (d;  $J = 8,7\text{ Hz}$ ; 2H)

##### **RMN de $^{13}C$ ( $CDCl_3$ , $\delta$ , ppm, 75 MHz, t.a.), presença de rotâmeros.**

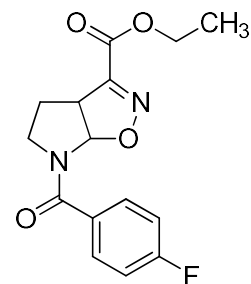
( $CH_2$ ); 43,5 ( $CH_2$ ); 51,4 (CH); 62,4 ( $CH_2$ ); 95,3 (CH); 123,7 (CH); 129,0 (CH); 140,6 (C); 148,9 (C); 152,4 (C); 159,6 (C=O); 167,5 (C=O).

##### **IV-FT - ATR ( $cm^{-1}$ ), principais sinais.**

2.970; 1.722; 1.652; 1.600; 1.524; 1.414; 1.350; 1.272; 1.130; 829.

#### 3.4.5.4. Síntese do éster etílico do ácido 6-(4-fluorobenzoil)-4,5,6,6a-tetrahidro3aH-pirrolo[3,2-d]isoxazol-3-carboxílico **80d**

- Sólido branco amorfo levemente amarelado
- $C_{15}H_{15}FN_2O_4$
- MM: 306,28 g/mol
- Rf: 0,39 (AcOEt/hexano 1:1)
- PF: 83 – 84 °C



O procedimento da reação é semelhante ao do item 3.4.5.1

Os reagentes utilizados foram a enamida endocíclica **79d** (1,15 g; 6,0271 mmol); THF seco (10,1 mL); TEA (1,1 mL; 7,8893 mmol); Clorooxiimidoacetato de etila (1,05 g; 9,8984 mmol; THF 6,7 mL). A purificação do cicloaduto foi feita por meio de uma cromatografia em coluna *flash* com o sistema eluente isopropanol/hexano (1:9). A massa obtida foi 1,23 g, correspondendo a um rendimento médio de 83%.

#### DADOS ESPECTROMÉTRICOS 80d

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

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

**RMN de  $^{13}C$  ( $CDCl_3$ ,  $\delta$ , ppm, 75 MHz, t.a.), presença de rotâmeros.**

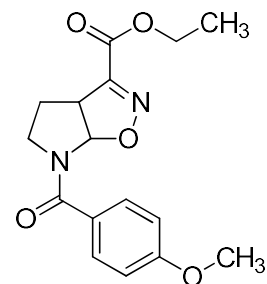
14,08 ( $CH_3$ ); 27,95 ( $CH_2$ ); 43,53 ( $CH_2$ ); 51,19 ( $CH$ ); 62,4 ( $CH_2$ ); 96,17 ( $CH$ ); 115,6 (d;  $J = 21,5\text{Hz}$ ;  $CH$ ); 130,4 ( $CH$ ); 164,1 (d;  $J = 250,0\text{Hz}$ ; C-F); 131,0 (C); 152,4 (C); 159,8 (C=O); 168,7 (C=O)

**IV-FT - ATR ( $cm^{-1}$ ), principais sinais.**

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

#### 3.4.5.5. Síntese do éster etílico do ácido 6-(4-metoxibenzoil)-4,5,6,6a-tetraidro3aH-pirrolo[3,2-d]isoxazol-3-carboxílico **80f**

- Óleo amarelo claro
- $C_{16}H_{18}N_2O_5$
- MM: 318,32 g/mol
- Rf: 0,32 (AcOEt/hexano 1:1)



O procedimento da reação é semelhante ao do item 3.4.5.1

Os reagentes utilizados foram a enamida endocíclica **79f** (1,67 g; 8,2528 mmol); THF seco (26,9 mL); TEA (1,42 mL; 10,2262 mmol); Clorooxiimidoacetato de etila (1,38 g; 9,1498 mmol; THF 10 mL). A purificação do cicloaduto foi feita por meio de uma cromatografia em coluna flash com o sistema eluente acetato de etila/hexano (1:1). A massa obtida foi 2,06 g, correspondendo a um rendimento médio de 57%.

#### DADOS ESPECTROMÉTRICOS **80f**

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

1,38 (t;  $J = 7,1\text{Hz}$ ; 3H); 2,19 (m; 1H); 2,35 (dd;  $J = 6,0\text{Hz}$ ;  $J = 13,3\text{Hz}$ ; 1H); 3,22 (sl; 1H); 4,08 (t;  $J = 8,4\text{Hz}$ ; 1H); 4,36 (m; 3H); 6,35 (sl; 1H); 6,93 (d;  $J = 9,0\text{Hz}$ ; 2H); 7,64 (sl; 2H)

**RMN de  $^{13}C$  ( $CDCl_3$ ,  $\delta$ , ppm, 75 MHz, t.a.), presença de rotâmeros.**

14,1 ( $CH_3$ ); 28,1 ( $CH_2$ ); 43,25 ( $CH_2$ ); 50,9 ( $CH$ ); 55,4 ( $CH_3$ ); 62,3 ( $CH_2$ ); 96,3 ( $CH$ ); 113,6 ( $CH$ ); 126,0 (C); 130,1 ( $CH$ ); 152,4 (C); 159,9 (C-O); 161,7 (C=O); 169,3 (C=O)

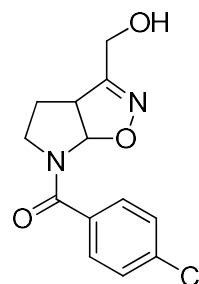
**I.V. – FT (pastilha de KBr,  $cm^{-1}$ ), principais sinais.**

2.998, 1.722, 1.645, 1.607, 1.513, 1.393, 1.257, 1.174, 1.128, 1.027, 932, 847.

### 3.4.6. Síntese dos álcoois isoxazolínicos **81a-e**.

#### 3.4.6.1. Síntese do álcool (4-clorofenil)-(3-hidroxi metil-3a,4,5,6a-tetrahidropirroló[3,2-d]isoxazol-6-il-metanona **81a**.

- Óleo incolor viscoso
- $C_{13}H_{13}ClN_2O_3$
- MM: 280,70 g/mol
- Rf: 0,11 (AcOEt/hexano 1:1)



A uma solução do éster isoxazolínicos **80a** (1,32 g; 4,0973 mmol) em metanol seco (110 mL) à 0°C, foi adicionado um equivalente por vez do borohidreto de sódio (0,46 g; 12,2919 mmol; 3 eq). Decorrida uma hora da adição do primeiro equivalente, o banho de gelo foi retirado e a reação permaneceu sob vigorosa agitação por mais uma hora, em temperatura ambiente. O término da reação foi acompanhado por CCD. Após o fim da reação, o solvente foi removido. O produto bruto foi solubilizado em acetato de etila (15 mL) e então foi feita extração utilizando acetato de etila (3 x 9 mL) e água destilada (9 mL). A fase orgânica foi seca sob sulfato de sódio anidro. Após a remoção do acetato de etila um óleo amarelo foi obtido. A purificação do álcool foi feita por coluna cromatográfica flash, utilizando como eluente um sistema gradiente de acetato de etila/hexano (1:1 / 8:2). A massa obtida foi 1,08 g, correspondendo a um rendimento médio de 96%.

#### DADOS ESPECTROMÉTRICOS **81a**

**RMN de  $^1H$  ( $CDCl_3$ ,  $\delta$ , ppm, 300 MHz, t.a.), presença de rotâmeros.** 2,00 – 2,20 (m, 1H); 2,30 (dd,  $J = 13$  Hz;  $J = 5,7$  Hz; 1H); 2,90 – 3,65 (m, 2H); 4,00 (m, 1H); 4,35 (d;  $J = 14,1$  Hz; 1H); 4,44 (d;  $J = 14,1$ ; 1H); 5,97 (d;  $J = 7,0$  Hz; 1H) rotâmero em 6,72; 7,40 (d;  $J = 8,1$  Hz, 2H); 7,64 (dl;  $J = 8,0$  Hz, 2H)

**RMN de  $^{13}C$  ( $CDCl_3$ ,  $\delta$ , ppm, 75 MHz, t.a.), presença de rotâmeros.**

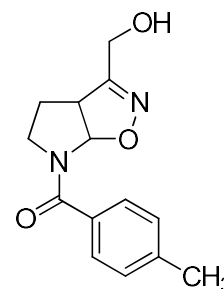
26,7 ( $CH_2$ ); 43,4 ( $CH_2$ ) rotâmero em 47; 52,6 (CH); 56,8 ( $CH_2$ ); 93,3 (CH) rotâmero em 91; 128,6 (CH); 129,6 (CH); 133,3 (C); 136,9 (C); 158,9 (C=N); 169,1 (C=O).

**I.V. - FT (janela de KBr,  $cm^{-1}$ ), principais sinais.**

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

### 3.4.6.2. Síntese do álcool (4-metilfenil)-(3-hidroximetil-3a,4,5,6a-tetrahidropirrólo[3,2-d]isoxazol-6-il-metanona **81b**

- Óleo levemente amarelado
- $C_{14}H_{16}N_2O_3$
- MM: 260,28 g/mol
- Rf: 0,21 (AcOEt/hexano 9:1)



O procedimento da reação é semelhante ao do item 3.4.6.1.

Os reagentes utilizados foram o cicloaduto **80b** (0,83 g; 2,7486 mmol); metanol seco (73,8 mL); borohidreto de sódio (0,312 g; 8,3458 mmol; 3 eq.). A purificação do álcool 49e foi feita por meio de uma cromatografia em coluna flash com o sistema eluente isopropanol/hexano (2:8). A massa obtida foi 0,51 g, correspondendo a um rendimento médio de 89%.

### DADOS ESPECTROMÉTRICOS **81b**

**RMN de  $^1H$  ( $CDCl_3$ ,  $\delta$ , ppm, 400 MHz, t.a.), presença de rotâmeros.**

2,06 (m, 2H); 2,26 (dd,  $J = 13,2\text{Hz}$ ,  $J = 4,8\text{Hz}$ , 1H); 2,36 (s, 3H); 3,12 (sl, 1H); 4,00 (m, 2H); 4,34 (d,  $J = 14\text{Hz}$ , 2H); 4,44 (d,  $J = 1,6\text{Hz}$ , 2H); 6,01 (sl, 1H); 7,21 (d,  $J = 8\text{Hz}$ , 2H); 7,56 (sl, 2H)

**RMN de  $^{13}C$  ( $CDCl_3$ ,  $\delta$ , ppm, 100 MHz, t.a.), presença de rotâmeros.**

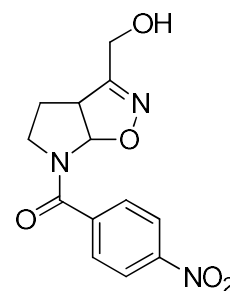
25,21 ( $CH_3$ ); 26,83 ( $CH_2$ ); 43,26 ( $CH_2$ ); 53,44 ( $CH$ ); 56,88 ( $CH_2$ ); 64,40 ( $CH$ ); 93,63 ( $CH$ ); 128,15 ( $CH$ ); 128,94 ( $CH$ ); 132,12 (C); 141,07 (C); 158,84 (C=N); 170,22 (C=O)

**IV-FT - ATR ( $cm^{-1}$ ), principais sinais.**

3.380; 2.955; 2.880; 1.611; 1.569; 1.411; 1.266; 1.138; 926; 847

### 3.4.6.3. Síntese do álcool (4-nitrofenil)-(3-hidroximetil-3a,4,5,6a-tetrahidropirroló[3,2-d]isoxazol-6-il-metanona **81c**

- Sólido amarelo
- $C_{13}H_{13}N_3O_5$
- MM: 291,25 g/mol
- Rf: 0,20 (AcOEt/hexano 1:1)
- PF: 106 °C



O procedimento da reação é semelhante ao do item 3.4.6.1.

Os reagentes utilizados foram o cicloaduto **80c** (0,574 g; 1,7239 mmol); metanol seco (46,3 mL); borohidreto de sódio (0,195 g; 5,1717 mmol; 3 eq;). A purificação do álcool foi feita por meio de uma cromatografia em coluna flash com o sistema eluente de polaridade crescente de acetato de etila/hexano (1:1 / 8:2). A massa obtida foi 0,36 g, correspondendo a um rendimento de 73%.

#### DADOS ESPECTROMÉTRICOS **81c**

**RMN de  $^1H$  (DMSO- $D_6$ ,  $\delta$ , ppm, 300 MHz, t.a.), presença de rotâmeros.**

2,23 (m, 2H); 3,08 (m; 1H); 3,70 (m; 1H); 4,24 (m, 1H); 4,28 (sl, 1H); 5,16 (s; 1H; rotâmero em 5,14); 6,40 (d;  $J = 7,8$ ; 1H); 7,38 (m, 4H).

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

26,9 (CH $_2$ ; rotâmero em 27,7); 44,2 (CH $_2$ ), 50,8 (CH; rotâmero em 49,7); 94,2 (CH; rotâmero em 95,0); 128,4; 127,9; 127,7; 127,5 (dois CH com rotâmeros); 136,4 (C); 152,5 (C); 152,6 (C=N; rotâmero em 153,3); 159,4 (C=O).

**IV-FT - ATR (cm $^{-1}$ ), principais sinais.**

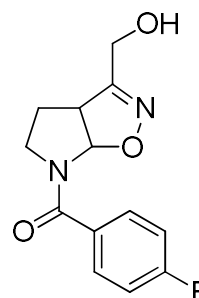
3406; 3108; 3077; 2954; 1639; 1599; 1523; 1424; 1350; 843.

**HRMS - ES- IT- TOF;  $M^+ + 1$**

Calculado para  $C_{13}H_{13}N_3O_5$ : 292,0927; Encontrado: 292,0909.

#### 3.4.6.4. Síntese do álcool (4-fluorofenil)-(3-hidroximetil-3a,4,5,6a-tetrahidropirrolo[3,2-d]isoxazol-6-il-metanona **81d**

- Óleo incolor viscoso
- $C_{13}H_{13}FN_2O_3$
- MM: 264,25 g/mol
- Rf: 0,10 (AcOEt/hexano 1:1)



O procedimento da reação é semelhante ao do item 3.4.6.1.

Os reagentes utilizados foram o éster isoxazolinico **80d** (0,85 g; 2,7637 mmol); metanol seco (74 mL); borohidreto de sódio (0,314 g; 8,2911 mmol; 3 eq). A purificação do álcool foi feita por meio de uma cromatografia em coluna flash com o sistema eluente gradiente de acetato de etila/hexano (1:1 / 8:2). A massa obtida foi 0,69 g, correspondendo a um rendimento médio de 96%

#### DADOS ESPECTROMÉTRICOS **81d**

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

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

**RMN de  $^{13}C$  ( $CDCl_3$ ,  $\delta$ , ppm, 75 MHz, t.a.), presença de rotâmeros.**

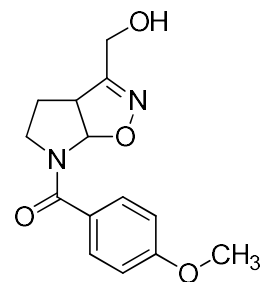
25,9 ( $CH_2$ ) rotâmero 27,3; 43,5 ( $CH_2$ ) rotâmero 47,4; 52,8 (CH) rotâmero 50,8; 55,2 ( $CH_2$ ); 92,7 (CH) rotâmero 90,1; 115,3 (d;  $J = 21,0$  Hz; CH); 130,3 (CH); 132,1 (C); 159,9 (C=N); 164,7 e 161,5 (d;  $J = 240$  Hz, C); 167,9 (C=O);

**I.V. - FT (janela de KBr,  $cm^{-1}$ ), principais sinais.**

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

#### 3.4.6.5. Síntese do álcool (4-metóxfenil)-(3-hidroximetil-3a,4,5,6a-tetrahidropirroló[3,2-d]isoxazol-6-il-metanona **81f**

- Sólido branco amorfo
- $C_{14}H_{16}N_2O_4$
- MM: 276,28 g/mol
- Rf: 0,19 (AcOEt/hexano 9:1)
- PF: 149 °C



O procedimento da reação é semelhante ao do item 3.4.6.1.

Os reagentes utilizados foram o éster isoxazolinico **80f** (2,4g; 6,9436 mmol); metanol seco (186 mL); borohidreto de sódio (0,8 g; 20,8287 mmol; 3 eq;). A purificação do álcool foi feita por meio de uma filtração em sílica (5 cm de altura de sílica na coluna) com o sistema eluente gradiente de acetato de etila/hexano (1:1). A massa obtida foi 1,50 g, correspondendo a um rendimento médio de 73%.

#### DADOS ESPECTROMÉTRICOS **81f**

##### **RMN de $^1H$ ( $CDCl_3$ , $\delta$ , ppm, 300 MHz, t.a.), presença de rotâmeros.**

2,05 (m, 1H); 2,26 (dd,  $J = 13,2\text{Hz}$ ,  $J = 5,6\text{Hz}$ , 1H); 3,22 (sl, 1H) rotâmero em 3,34; 3,81 (s, 3H); 3,96 (t,  $J = 8\text{Hz}$ , 1H); 4,34 (d,  $J = 14,4\text{Hz}$ , 2H); 4,43 (d,  $J = 14\text{Hz}$ , 2H); 6,05 (sl, 1H); 6,90 (d,  $J = 8,4\text{Hz}$ , 2H); 7,64 (sl, 2H)

##### **RMN de $^{13}C$ ( $CDCl_3$ , $\delta$ , ppm, 75 MHz, t.a.), presença de rotâmeros.**

26,91 ( $CH_2$ ); 43,36 ( $CH_2$ ); 52,45 ( $CH$ ); 55,32 ( $CH_3$ ); 56,83 ( $CH_2$ ); 60,37 ( $CH$ ); 93,69 ( $CH$ ); 113,57 (C); 127,06 (C); 130,11 ( $CH$ ); 158,90 (C); 161,57 ( $C=N$ ); 169,77 ( $C=O$ ).

##### **IV-FT - ATR ( $cm^{-1}$ ), principais sinais.**

3.374; 2.940; 2.881; 2.841; 1.604; 1.513; 1.393; 1.251; 1.172; 1.025; 925; 840.

### 3.4.7. Síntese dos aldeídos isoxazolínicos **82a-f** via Swern

#### 3.4.7.1. Síntese do 6-(4-clorobenzoil)-4,5,6,6a-tetrahidro-3aHpirrolo[3,2-d]isoxazol-3-carbaldeído **82a**.

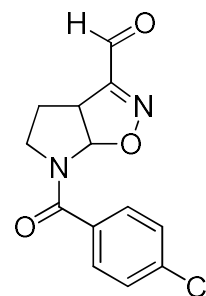
- Sólido amorfo amarelo claro

-  $C_{13}H_{11}ClN_2O_3$

- MM: 278,69 g/mol

- Rf: 0,43 (AcOEt/hexano 2:3)

- PF: 124 °C



O cloreto de oxalila (0,246 mL; 2,8779 mmol) foi solubilizado em um balão de fundo redondo com diclorometano seco (5,2 mL) em atmosfera de argônio e À -70 °C. Após estabilização da temperatura é adicionada de uma só vez a solução de DMSO (0,411 mL; 5,7783 mmol) em 1,23 mL de  $CH_2Cl_2$ , preparada previamente. Após 2 minutos, a solução do álcool isoxazolínicos (0,648 g; 2,3247 mmol;  $CH_2Cl_2$  1,44 mL) foi adicionada gota a gota durante 5 minutos. Após a adição do álcool a reação foi mantida sob agitação por 15 minutos e em seguida foi adicionada a trietilamina (1,64 mL; 11,6972 mmol). Após 5 minutos da adição da TEA o término da reação foi verificado por CCD. Por fim, água destilada foi adicionada ao meio reacional e extração com  $CH_2Cl_2$  (3 x 10 mL) foi realizada. Após secagem da fase orgânica com sulfato de sódio anidro e remoção do solvente, o produto bruto foi purificado através de uma filtração em sílica (5 cm de altura de sílica na coluna) com o sistema eluente acetato de etila/hexano (4:6). O rendimento obtido foi 74%.

#### DADOS ESPECTROMÉTRICOS **82a**

**RMN de  $^1H$  (DMSO- $D_6$ ,  $\delta$ , ppm, 300 MHz, t.a.), presença de rotâmeros.**

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

**RMN de  $^{13}C$  ( $CDCl_3$ ,  $\delta$ , ppm, 75 MHz, t.a.), presença de rotâmeros.**

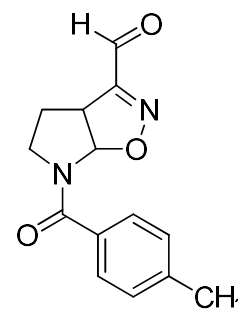
26,2 ( $CH_2$ ; rotâmeros em 27,6); 43,6 ( $CH_2$ ; rotâmero em 46,7); 48,6 ( $CH$ ; rotâmero em 47,3); 96,9 ( $CH$ ; rotâmero em 94,0); 128,6 ( $CH$ ); 129,6; ( $CH$ ).

**I.V. - FT (pastilha de KBr,  $cm^{-1}$ ), principais sinais.**

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

### 3.4.7.2. Síntese do 6-(4-metilbenzoil)-4,5,6,6a-tetrahidro-3aHpirrolo[3,2- d]isoxazol-3-carbaldeído **82b**

- Sólido amorfo amarelo claro
- $C_{14}H_{14}N_2O_3$
- MM: 258,27 g/mol
- Rf: 0,36 (AcOEt/hexano 1:1)
- PF: 138 °C



O procedimento da reação é semelhante ao do item 3.4.7.1.

Os reagentes utilizados foram o álcool **81b** (0,54 g; 2,0749 mmol;  $CH_2Cl_2$  1,28 mL); cloreto de oxalila (0,22 mL; 2,5696 mmol;  $CH_2Cl_2$  4,64 mL); DMSO seco (0,36 mL; 5,1579 mmol;  $CH_2Cl_2$  1,10 mL); trietilamina (1,46 mL; 10,4406 mmol). A purificação do aldeído foi feita por filtração em sílica (5 cm de altura de sílica na coluna) com o sistema eluente acetato de etila/hexano (6:4). A massa obtida foi 0,37 g, correspondendo a um rendimento de 76%.

#### DADOS ESPECTROMÉTRICOS **82b**

**RMN de  $^1H$  ( $CDCl_3$ ,  $\delta$ , ppm, 400 MHz, t.a.), presença de rotâmeros.**

2,20 (m, 2H); 2,38 (s, 3H); 3,14 (sl, 1H); 4,01 (t,  $J = 8,1$ Hz, 1H); 4,45 (sl, 1H); 6,30 (sl, 1H); 7,24(d,  $J = 7,5$  Hz, 2H); 7,55 (sl, 2H); 9,88 (s, 1H)

**RMN de  $^{13}C$  ( $CDCl_3$ ,  $\delta$ , ppm, 100 MHz, t.a.), presença de rotâmeros.**

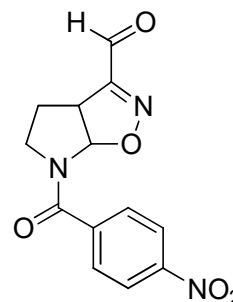
21,41 (CH<sub>3</sub>); 27,50 (CH<sub>2</sub>); 43,31 (CH<sub>2</sub>); 48,16 (CH); 97,50 (CH); 127,98 (CH); 129,07 (CH); 131,78 (C); 141,39 (CH); 159,50 (C=N); 169,71 (C=O); 185,26 (C=O)

**IV-FT - ATR ( $cm^{-1}$ ), principais sinais.**

2.986; 2.865; 1.702; 1.583; 1.392; 1.260; 1.167; 920; 833

### 3.4.7.3. Síntese do 6-(4-nitrobenzoil)-4,5,6,6a-tetrahidro-3aHpirrolo[3,2- d]isoxazol-3-carbaldeído **82c**

- Sólido amorfo amarelo claro
- $C_{13}H_{11}N_3O_5$
- MM: 289,24 g/mol
- Rf: 0,45 (AcOEt/hexano 2:3)
- PF: 81 °C



O procedimento da reação é semelhante ao do item 3.4.7.1.

Os reagentes utilizados foram o álcool **81c** (0,365 g; 1,2545 mmol;  $CH_2Cl_2$  0,776 mL); cloreto de oxalila (0,132 mL; 1,5420 mmol;  $CH_2Cl_2$  2,8 mL); DMSO seco (0,22 mL; 3,1182 mmol;  $CH_2Cl_2$  0,66 mL); trietilamina (0,885 mL; 6,3124 mmol). A purificação do aldeído foi feita por cromatografia em coluna flash com o sistema eluente acetato de etila/hexano (1:1). A massa obtida foi 0,2 g, correspondendo a um rendimento de 84%.

#### DADOS ESPECTROMÉTRICOS **82c**

**RMN de  $^1H$  e  $^{13}C$  (DMSO- $D_6$ ,  $\delta$ , ppm, 300 MHz, t.a.), presença de rotâmeros.**

Substância degradou em solução, porém, sinal em 9,79 ppm, referente ao hidrogênio aldeídico aparece, em RMN  $^1H$ , assim como o sinal 186,1; referente ao carbono aldeídico em RMN  $^{13}C$ . A análise de RMN será repetida imediatamente após a diluição da amostra.

**IV-FT - ATR ( $cm^{-1}$ ), principais sinais.**

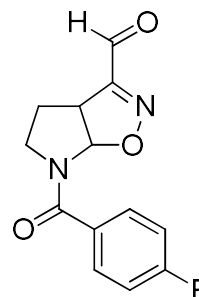
3080, 2986, 2862, 1702, 1625, 1580, 1389, 1266; 1167, 1090; 921, 841; 759; 484.

**HRMS - ES- IT- TOF;  $[M+1]^+$**

Encontrado para  $C_{13}H_{11}N_3O_5$ : 290,0771; Calculado: 396,1469.

#### 3.4.7.4. Síntese do 6-(4-fluorobenzoil)-4,5,6,6a-tetrahidro-3aHpirrolo[3,2-d]isoxazol-3-carbaldeído **82d**

- Sólido amorfo amarelo claro
- $C_{13}H_{11}FN_2O_3$
- MM: 262,23 g/mol



O procedimento da reação é semelhante ao do item 3.4.7.1.

Os reagentes utilizados foram o álcool **81d** (0,3 g; 1,135 mmol;  $CH_2Cl_2$  0,7 mL); cloreto de oxalila (0,12 mL; 1,4059 mmol;  $CH_2Cl_2$  2,62 mL); DMSO seco (0,2 mL; 2,822 mmol;  $CH_2Cl_2$  0,6 mL); trietilamina (0,8 mL; 5,7123 mmol). A purificação do aldeído foi feita por meio de cromatografia em coluna flash com o sistema eluente de acetato de etila/hexano (3:7). A massa obtida foi 0,29 g, correspondendo a um rendimento de 96%

#### DADOS ESPECTROMÉTRICOS **82d**

**RMN de  $^1H$  (DMSO- $D_6$ ,  $\delta$ , ppm, 300 MHz, t.a.), presença de rotâmeros.**

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

**RMN de  $^{13}C$  (DMSO- $D_6$ ,  $\delta$ , ppm, 75 MHz, t.a.), presença de rotâmeros.**

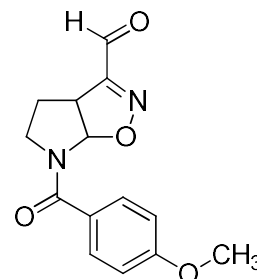
27,3 ( $CH_2$ ); 43,4 ( $CH_2$ ); 48,4 (CH); 97,1 rotâmero em 94,3; 115,6 (d,  $J = 21$  Hz; CH), 130,5 (CH); 132,0 (C); 159,1 (C=N); 162,5 e 165,8 (d,  $J = 250$  Hz, C); 168,6 (C=O); 185,2 (C=O);

**I.V. - FT (pastilha de KBr,  $cm^{-1}$ ), principais sinais.**

3.048, 2.960, 2.857, 1.700, 1.626, 1.388, 1.230, 854

#### 3.4.7.5. Síntese do 6-(4-metoxibenzoil)-4,5,6,6a-tetrahidro-3aHpirrolo[3,2-d]isoxazol-3-carbaldeído **82f**

- Sólido amorfo levemente amarelado
- $C_{14}H_{14}N_2O_4$
- MM: 274,27 g/mol
- Rf: 0,36 (AcOEt/hexano 1:1)
- PF: 119 °C



O procedimento da reação é semelhante ao do item 3.4.7.1.

Os reagentes utilizados foram o álcool **81f** (1,5 g; 5,4438 mmol;  $CH_2Cl_2$  3,36 mL); cloreto de oxalila (0,58 mL; 6,7433 mmol;  $CH_2Cl_2$  12,52 mL); DMSO seco (0,96 mL; 13,5342 mmol;  $CH_2Cl_2$  2,9 mL); trietilamina (3,85 mL; 27,4561 mmol). A purificação do aldeído foi feita por meio de filtração em coluna de sílica (5 cm de sílica) com o sistema eluente acetato de etila/hexano (3:2). A massa obtida foi 1,28 g, correspondendo a um rendimento de 56%.

#### DADOS ESPECTROMÉTRICOS **82f**

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

2,13 – 2,30 (m, 2H); 3,16 (sl, 1H); 3,83 (s, 3H); 4,00 (t,  $J = 8,7\text{Hz}$ , 1H); 6,93 (d,  $J = 7,2\text{Hz}$ , 2H); 7,64 (d,  $J = 7,6\text{Hz}$ , 2H); 9,88 (s, 1H)

**RMN de  $^{13}C$  ( $CDCl_3$ ,  $\delta$ , ppm, 75 MHz, t.a.), presença de rotâmeros.**

27,62 ( $CH_2$ ); 47,87 ( $CH_2$ ); 55,37 ( $CH_3$ ); 113,70 (CH); 126,77 (C); 130,08 (CH); 159,33 (C=N); 169,26 (C=O); 185,26 (C=O)

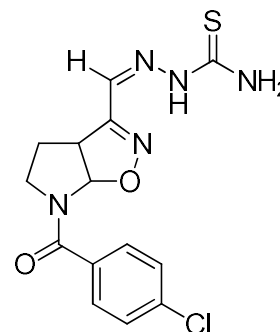
**IV-FT - ATR ( $cm^{-1}$ ), principais sinais.**

2.967; 2.889; 2.857; 1.703; 1.607; 1.576; 1.393; 1.253; 1.178; 1.033; 918; 843.

### 3.4.8. Síntese das tiossemicarbazonas isoxazolínicas **83a-e**.

#### 3.4.8.1. (Z)-2-((6-(4-clorobenzoíla)-4,5,6,6a-tetrahidro-3aH-pirrólo[3,2-d]isoxazol-3-il)metileno)hidrazina-carbotioamida **83a**.

- Sólido amorfo branco
- $C_{14}H_{14}ClN_5O_2S$
- MM: 351,81 g/mol
- Rf: 0,48 (AcOEt/hexano 4:1)
- PF: 183-186 °C



O aldeído isoxazolínicos *p*-cloro **82a** (0,9137 g; 3,2785 mmol) foi solubilizado em etanol (61 mL), sendo adicionada a esta solução, tiossemicarbazida (0,2461 g; 3,2785 mmol) e 0,2 mL  $H_2SO_{4(aq.)}$  10%(v/v) como catalizador da reação (pH 3). A reação permaneceu em agitação à temperatura ambiente, sendo monitorada por CCD. Após 2h, foi possível verificar o consumo total do aldeído *p*-Cl **82a** e formação de um precipitado insolúvel. Após sucessivas lavagens com etanol, em funil sinterizado n° 4, foi obtido o pó amorfo branco puro, a tiossemicarbazona *p*-Cl **83a**. O rendimento obtido foi 68%.

#### DADOS ESPECTROMÉTRICOS **83a**

**RMN  $^1H$ , 600 MHz, DMSO- $d_6$ , ppm:** 11,73 (s, 1H); 8,50 (s, 1H); 7,89 (m, 2H); 7,58 (m, 4H); 6,18 e 6,67 (rot. sl, 1H); 4,25 9 (m, 1H); 4,07 e 3,43 (rot. m, 1H); 3,04 e 3,33 (rot. m, 1H); 2,23 (m, 1H); 2,18 (m, 1H).

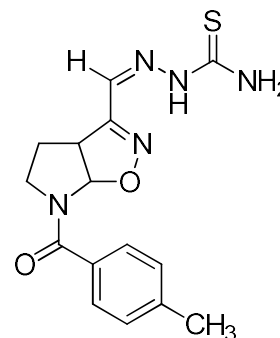
**RMN  $^{13}C$ , 150 MHz, DMSO- $d_6$ , ppm:** 178,5 (C=S); 167,8 (C=O); 158,0 (C); 135,2 (CH); 134,2 (CH); 132,6 (C); 129,6 (C); 128,4 (CH); 94,6 e 91,8 (rot. CH); 50,5 e 48,7 (rot. CH); 43,6 e 47,2 (rot. CH<sub>2</sub>); 27,5 e 29,0 (rot. CH<sub>2</sub>).

#### **IV-FT - ATR (cm<sup>-1</sup>), principais sinais.**

3432,42 ; 3259,78 ; 3176,86 ; 2962,49 ; 1607,65 ; 1514,73 ; 1388,10 ; 1113,55 ; 852,64 .

3.4.8.2. (Z)-2-((6-(4-metilbenzoíla)-4,5,6,6a-tetrahidro-3aH-pirrólo[3,2-d]isoxazol-3-il)metileno)hidrazina-carbotioamida **83b**.

- Sólido amorfo branco
- $C_{15}H_{17}ClN_5O_2S$
- MM: 331,39 g/mol
- Rf: 0,48 (AcOEt/hexano 4:1)
- PF: 219-220 °C



O procedimento da reação é semelhante ao do item 3.4.8.1.

Os reagentes utilizados foram o aldeído **82b** (0,6749 g; 2,6131 mmol); tiossemicarbazida (0,1962 g; 2,6131 mmol); etanol (5 mL); AcOH conc. (0,25 mL), pH 4. Após 2h, houve formação de um precipitado insolúvel o qual foi filtrado e lavado sucessivas vezes com etanol, obtendo-se pó amorfo branco puro, a tiossemicarbazona *p*-CH<sub>3</sub> **83a**. O sobrenadante foi ajustado a pH 7, gerando precipitado o qual também foi filtrado. O rendimento obtido foi 80%.

#### DADOS ESPECTROMÉTRICOS **83b**

**RMN <sup>1</sup>H, 600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, ppm:** 11,72 (s, 1H); 8,49 (s, 1H); 7,88 (m, 2H); 7,47 (m, 2H); 7,29 (sl, 2H); 6,21 e 6,69 (rot. sl, 1H); 4,24 (tl, *J* = 8 Hz, 1H); 4,09 e 3,46 (rot. m, 1H); 3,01 e 3,34 (rot. m, 1H); 2,35 (s, 3H); 2,19 (m, 2H).

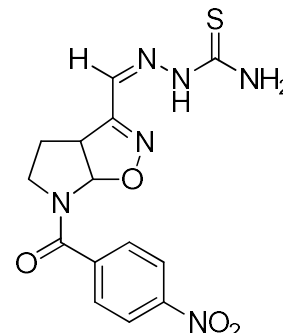
**RMN <sup>13</sup>C, 150 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, ppm:** Necessária repetição desta análise, sinais não identificados no espectro.

#### **IV-FT - ATR (cm<sup>-1</sup>), principais sinais.**

3431,29 ; 3210,42 ; 3163,43 ; 2880,41 ; 1607,22 ; 1518,00 ; 1386,36 ; 1109,60 ; 853,41 .

3.4.8.3. (Z)-2-((6-(4-nitrobenzoila)-4,5,6,6a-tetrahidro-3aH-pirrolo[3,2-d]isoxazol-3-il)metileno)hidrazina-carbotioamida **83c**

- Sólido amorfo branco
- $C_{14}H_{14}N_6O_4S$
- MM: 362,08 g/mol
- Rf: 0,38 (AcOEt/hexano 4:1)
- PF: 193 - 200 °C



O procedimento da reação é semelhante ao do item 3.4.8.1.

Os reagentes utilizados foram o aldeído **82c** (0,7310 g; 2,5273 mmol); tiossemicarbazida (189 mg; 2,5273 mmol); etanol (47 mL); 0,2 mL  $H_2SO_{4(aq.)}$  10%(v/v) (pH 4). Após 20 min. à temperatura ambiente, uma precipitado branco é formado, sendo finalizada a reação após 1h. A purificação por sucessivas lavagens em etanol, e éter etílico, respectivamente. A massa obtida foi 699 mg, correspondendo a um rendimento de 76%.

**DADOS ESPECTROMÉTRICOS 83c**

**RMN  $^1H$ , 400 MHz, DMSO- $d_6$ , ppm:** 11,67 (s, 1H); 8,49 (s, 1H); 8,34 (m, 2H); 7,83 (m, 4H); 6,17 e 6,68 (rot. sl, 1H); 4,31 (m, 1H); 4,06 e 3,40 (rot. m, 1H); 3,09 e 3,33 (rot. m, 1H); 2,28 (m, 2H).

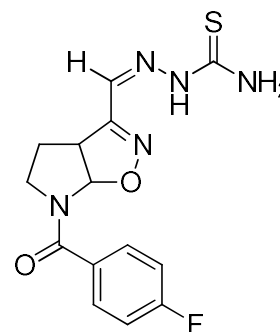
**RMN  $^{13}C$ , 100 MHz, DMSO- $d_6$ , ppm:** 178,5 (C=S); 167,3 (C=O); 158,0 (C); 148,3 (C); 141,5 (C); 132,6 (CH); 129,9 (CH); 123,6 (CH); 94,2 e 91,8 (rot. CH); 50,7 e 49,0 (rot. CH); 43,7 e 47,1 (rot.  $CH_2$ ); 27,5 e 28,9 (rot.  $CH_2$ ).

**IV-FT - ATR ( $cm^{-1}$ ), principais sinais.**

3432,06 ; 3264,37 ; 3169,88 ; 2985,17; 1630,06; 1604,16 ; 1513,13 ; 1342,94 ; 1115,34 ; 863,28 .

3.4.8.4. (Z)-2-((6-(4-fluorobenzóila)-4,5,6,6a-tetrahidro-3aH-pirroló[3,2-d]isoxazol-3-il)metileno)hidrazina-carbotioamida **83d**

- Sólido amorfo cinza
- $C_{14}H_{14}FN_5O_2S$
- MM: 335,09 g/mol
- Rf: 0,44 (AcOEt/hexano 4:1)
- PF: 224 - 224 °C



O procedimento da reação é semelhante ao do item 3.4.8.1.

Os reagentes utilizados foram o aldeído **82d** (0,4959 g; 1,891 mmol); tiossemicarbazida (142 mg; 1,891 mmol); etanol (35,2 mL); 0,12 mL  $H_2SO_{4(aq.)}$  10%(v/v) (pH 4), turvando após 35 min. e a reação finalizada após 2h. A purificação da tiossemicarbazona se deu por sucessivas lavagens em etanol. A massa obtida foi 449,6 mg, correspondendo a um rendimento de 42%.

**DADOS ESPECTROMÉTRICOS 83d**

**RMN  $^1H$ , 600 MHz, DMSO- $d_6$ , ppm:** 11,73 (s, 1H); 8,50 (s, 1H); 7,89 (m, 2H); 7,69 (m, 2H); 7,34 (m, 2H); 6,19 e 6,69 (rot. sl, 1H); 4,26 (m, 1H); 4,09 e 3,45 (rot. m, 1H); 3,03 e 3,37 (rot. m, 1H); 2,23 (m, 1H); 2,18 (m, 1H).

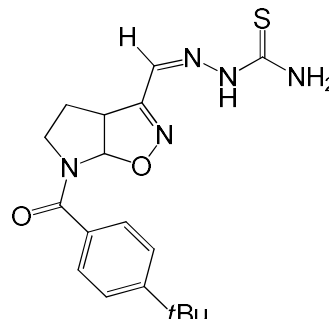
**RMN  $^{13}C$ , 150 MHz, DMSO- $d_6$ , ppm:** 178,5 (C=S); 167,9 (C=O); 163,1 (d,  $J^1 = 246$  Hz, CF); 158,0 (C); 132,6 (CH); 131,9 (C); 130,2 (CH); 115,3 (d,  $J^2 = 22$  Hz); 94,7 e 91,9 (rot. CH); 50,5 e 48,7 (rot. CH); 43,6 e 47,3 (rot.  $CH_2$ ); 27,5 e 29,0 (rot.  $CH_2$ ).

**IV-FT - ATR ( $cm^{-1}$ ), principais sinais.**

3428,80 ; 3214,72 ; 3003,50; 2962,49 ; 1604,31 ; 1509,17 ; 1386,36 ; 1107,48 ; 814,10 .

3.4.8.5. (Z)-2-((6-(4-terc-butilbenzoíla)-4,5,6,6a-tetrahidro-3aH-pirrolo[3,2-d]isoxazol-3-il)metileno)hidrazina-carbotioamida **83e**

- Sólido amorfo branco
- $C_{18}H_{23}N_5O_2S$
- MM: 373,16 g/mol
- Rf: 0,58 (AcOEt/hexano 4:1)
- PF: 198 - 203 °C



O procedimento da reação é semelhante ao do item 3.4.8.1.

Os reagentes utilizados foram o aldeído **82e** (0,8327 g; 2,7724 mmol); tiossemicarbazida (0,208 g; 2,7724 mmol); etanol (51 mL); 0,17 mL  $H_2SO_{4(aq.)}$  10%(v/v) (pH 4) por 3h à temperatura ambiente. Não houve precipitação do meio reacional, sendo o solvente evaporado e o sólido formado lavado com diclorometano. A massa obtida foi 311 mg, correspondendo a um rendimento de 30%

**DADOS ESPECTROMÉTRICOS 83e**

**RMN  $^1H$ , 400 MHz, DMSO- $d_6$ , ppm:** 11,71 (s, 1H); 8,48 (s, 1H); 7,87 (m, 2H); 7,52 (m, 4H); 6,22 e 6,70 (rot. sl, 1H); 4,25 (tl,  $J = 8$  Hz), 4,10 e 3,50 (rot. m, 1H); 3,02 e 3,41 (rot. m, 1H); 2,18 (m, 2H); 1,30 (s, 9H).

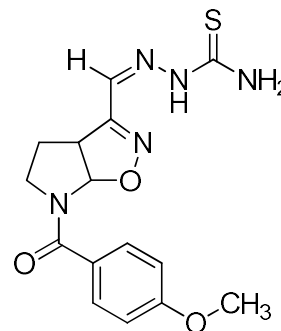
**RMN  $^{13}C$ , 100 MHz, DMSO- $d_6$ , ppm:** 178,4 (C=S); 168,2 (C=O); 153,3 (C); 137,7 (C); 132,7 (CH); 127,5 (CH); 125,0 (CH); 95,0 e 92,3 (rot. CH); 50,7 e 49,4 (rot. CH); 43,6 e 47,3 (rot.  $CH_2$ ); 34,5 (C); 30,9 ( $CH_3$ ); 27,6 e 29,0 (rot.  $CH_2$ ).

**IV-FT - ATR ( $cm^{-1}$ ), principais sinais.**

3417,89 ; 3162,75 ; 2960,85 ; 1642,98 ; 1610,00 ; 1516,15 ;  
1381,30 ; 1112,38; 847,88.

3.4.8.5. (Z)-2-((6-(4-metóxi benzoíla)-4,5,6,6a-tetrahidro-3aH-pirrólo[3,2-d]isoxazol-3-il)metileno)hidrazina-carbotioamida **83f**

- Sólido amorfo branco
- $C_{15}H_{17}N_5O_3S$
- MM: 347,11 g/mol
- Rf: 0,21 (AcOEt/hexano 4:1)
- PF: 204 - 208 °C



O procedimento da reação é semelhante ao do item 3.4.8.1.

Os reagentes utilizados foram o aldeído **82f** (100 mg; 0,3646 mmol); tiossemicarbazida (27,4 mg; 0,3646 mmol); etanol (7 mL); HCl (1 gota) (pH 4), sendo porém 3h de refluxo. A purificação do aldeído foi por sucessivas lavagens em metanol. A massa obtida foi 45 mg, correspondendo a um rendimento de 35%

**DADOS ESPECTROMÉTRICOS 83f**

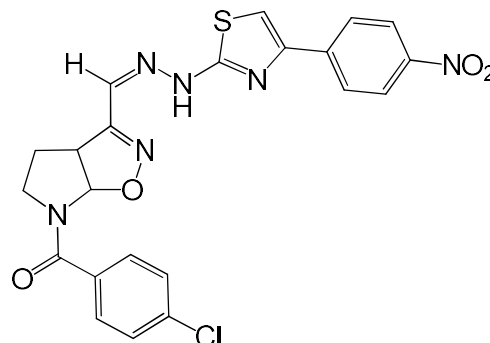
**RMN  $^1H$ , 600 MHz, DMSO- $d_6$ , ppm:** 11,73 (s, 1H); 8,49 (s, 1H); 7,88 (sl, 2H); 7,60 (sl, 2H); 7,02 (sl, 2H); 6,25 e 6,71 (rot. sl, 1H); 4,24 (m, 1H); 4,10 e 3,51 (rot. m, 1H); 3,81 (s, 3H); 3,01 e 3,35 (rot. m, 1H); 2,19 (m, 2H).

**RMN  $^{13}C$ , 150 MHz, DMSO- $d_6$ , ppm:** 178,5 (C=S); 168,1 (C=O); 160,9 (C); 158,0 (C); 132,7 (C); 129,7 (C); 127,4 (C); 113,5 (CH); 94,9 e 92,2 (rot. CH); 55,3 (CH<sub>3</sub>); 50,5 e 48,9 (rot. CH<sub>2</sub>); 44,0 e 47,3 (rot. CH<sub>2</sub>); 27,8 e 28,7 (rot. CH<sub>2</sub>).

### 3.4.9. Síntese do híbrido isoxazolíneo **4**.

3.4.9.1. (Z)-(4-clorofenil)(3-((2-(4-(4-nitrofenil)tiazol-2-il)hidrazono)metil)-4,5-di-hidro-3aH-pirrol[3,2-d]isoxazol-6(6aH)-il)metanona **4a**.

- Sólido amorfo amarelo
- $C_{22}H_{17}ClN_6O_4S$
- MM: 496,07 g/mol
- Rf: 0,52 (AcOEt/hexano 1:1)
- PF: 244 - 247 °C fundiu com decomposição



A tiossemicarbazona isoxazolínea *p*-cloro **83a** (0,1180 g; 0,3354 mmol) foi solubilizada em etanol (10,0 mL), sendo adicionada a esta solução, 2-bromo-4-nitroacetofenona (0,0861 g; 0,3354 mmol). A reação permaneceu em agitação à temperatura ambiente, sendo monitorada por CCD. Após 0,5h, foi possível verificar o consumo total da tiossemicarbazona. Após sucessivas lavagens com etanol, foi obtido o sólido amorfo amarelo puro, o híbrido isoxazolina/tiazol **83a**. O rendimento obtido foi 40%.

### DADOS ESPECTROMÉTRICOS **4a**

**RMN  $^1H$ , 400 MHz, DMSO- $d_6$ , ppm:** 12,71 (s, 1H); 8,27 (*d*,  $J$  = 8,5 Hz, 2H); 8,10 (*d*,  $J$  = 8,5 Hz, 2H); 7,88 (*m*, 1H); 7,80 (s, 1H); 7,59 (*m*, 4H); 6,16 e 6,66 (rot. *sl*, 1H); 4,44 (*tl*; 1H); 4,14 e 3,48 (rot. *m*, 1H); 3,08 e 3,44 (rot. *m*, 1H); 2,44 (*m*, 1H); 2,25 (*m*, 1H)

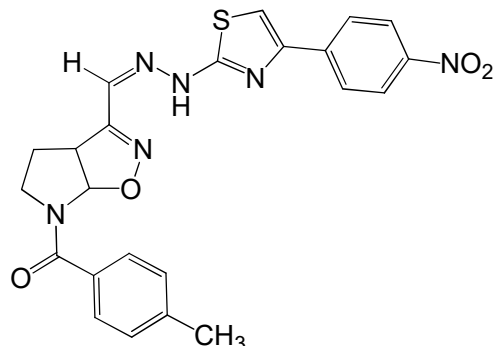
**RMN  $^{13}C$ , 100 MHz, DMSO- $d_6$ , ppm:** 167,8 (C=O); 157,1 (C); 156,5 (C), 148,7 (C); 146,3 (C); 140,3 (C); 135,3 (C); 134,2 (CH); 131,9 (CH); 129,6 (C); 128,5 (CH); 126,4 (CH); 124,2 (CH); 109,5 (CH); 94,4 e 91,7 (rot. C); 51,0 e 49,0 (rot. CH); 43,6 e 47,2 (rot. CH<sub>2</sub>); 27,1 e 28,4 (rot. CH<sub>2</sub>).

### **IV-FT - ATR (cm<sup>-1</sup>), principais sinais.**

3198,18 ; 2955,88 ; 1614,59 ; 1566,24 ; 1424,11 1330,09 ; 1104,58; 839,02; 720,75.

3.4.9.2. ((Z)-3-((2-(4-(4-nitrofenil)tiazol-2-il)hidrazono)metil)-4,5-di-hidro-3aH-pirrolo[3,2-d]isoxazol-6(6aH)-il)(*p*-toluil)metanona **4b**.

- Sólido amorfo amarelo opaco
- $C_{23}H_{20}N_6O_4S$
- MM: 476,13 g/mol
- Rf: 0,50 (AcOEt/hexano 1:1)
- PF: 246 - 249 °C fundiu com decomposição



A tiossemicarbazona isoxazolílica *p*-metil **83b** (0,1180 g; 0,3017 mmol) foi solubilizada em etanol (10,0 mL), sendo adicionada a esta solução, 2-bromo-4-nitroacetofenona (0,067 g; 0,3017 mmol). A reação permaneceu em agitação à temperatura ambiente, sendo monitorada por CCD. Após 20 min., foi possível verificar o consumo total da tiossemicarbazona. Após sucessivas lavagens com etanol, foi obtido o sólido amorfo amarelo puro, o híbrido isoxazolina/tiazol **83b**. O rendimento obtido foi 48%.

#### DADOS ESPECTROMÉTRICOS 4b

**RMN  $^1H$ , 600 MHz, DMSO- $d_6$ , ppm:** 12,68 (*sl*, 1H); 8,27 (*sl*, 2H); 8,10 (*sl*, 2H); 7,87 (*sl*, 1H); 7,78 (*s*, 1H); 7,53 (*m*, 2H); 7,30 (*sl*, 2H); 6,19 e 6,68 (rot. *sl*, 1H); 4,23 (*sl*, 1H); 4,16 e 3,51 (rot. *m*, 1H); 3,06 e 3,45 (rot. *m*, 1H); 2,45-2,15 (*m*, 5H)

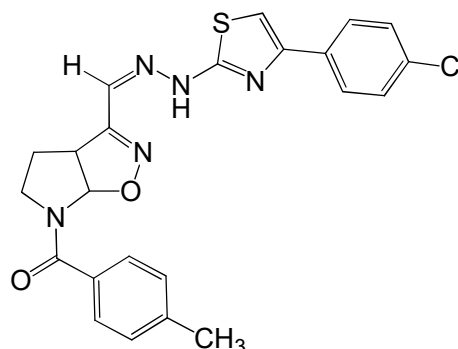
**RMN  $^{13}C$ , 150 MHz, DMSO- $d_6$ , ppm:** 167,8 (C=O); 158,9 (C); 157,2 (C); 148,6 (C); 146,3 (C); 140,3 (C); 132,6 (CH); 132,1 (C); 128,8 (CH); 127,5 (CH); 126,3 (CH); 124,1 (CH); 109,4 (CH); 94,9 e 91,8 (rot. CH); 50,9 e 49,0 (rot. CH); 43,4 e 47,5 (rot. CH<sub>2</sub>); 27,1 e 28,5 (rot. CH<sub>2</sub>); 20,9 (CH<sub>3</sub>).

#### **IV-FT - ATR (cm<sup>-1</sup>), principais sinais.**

3194,64 ; 2955,38 ; 1614,34; 1566,65 ; 1422,53; 1330,17 ; 1105,87; 839,37; 720,99.

3.4.9.3. ((Z)-3-((2-(4-(4-clorofenil)thiazol-2-il)hidrazono)metil)-4,5-di-hidro-3aH-pirrolo[3,2-d]isoxazol-6(6aH)-il)(p-toluil)metanona **4c**.

- Sólido amorfo amarelo
- $C_{23}H_{20}ClN_5O_2S$
- MM: 465,10 g/mol
- Rf: 0,60 (AcOEt/hexano 1:1)
- PF: 257 - 258 °C fundiu com decomposição



A tiossemicarbazona isoxazolílica *p*-cloro **83c** (0,2120 g; 0,6396 mmol) foi solubilizada em etanol (21,2 mL), sendo adicionada a esta solução, 2-bromo-4-cloroacetofenona (0,1490 g; 0,6396 mmol). A reação permaneceu em agitação à temperatura ambiente, sendo monitorada por CCD. Após 1 h, foi possível verificar o consumo total da tiossemicarbazona isoxazolílica. Após sucessivas lavagens com etanol, foi obtido o sólido amorfo amarelo puro, o híbrido isoxazolina/tiazol **4c**. O rendimento obtido foi 39%.

#### DADOS ESPECTROMÉTRICOS **4c**

**RMN  $^1H$ , 600 MHz, DMSO- $d_6$ , ppm:** 12,59 (*sl*, 1H); 7,80-8,00 (*m*, 3H); 7,40-7,60 (*m*, 5H); 7,30 (*sl*, 2H); 6,18 e 6,68 (rot. *sl*, 1H); 4,22 (*t*,  $J = 8,1$  Hz, 1H); 4,15 e 3,50 (rot. *m*, 1H); 3,05 e 3,43 (rot. *m*, 1H); 2,30-2,50 (*m*, 4H); 2,22 (*sl*, 1H)

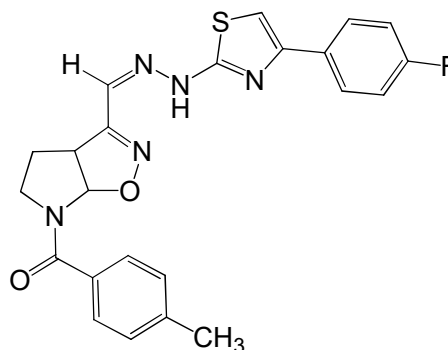
**RMN  $^{13}C$ , 150 MHz, DMSO- $d_6$ , ppm:** 167,5 (C=O); 157,2 (C); 156,5 (C); 149,4 (C); 140,3 (C); 133,2 (C); 132,6 (C); 132,0 (CH); 131,7 (C); 128,8 (CH); 128,6 (CH); 127,7 (CH); 127,2 (CH); 105,4 (CH); 94,6 e 92,0 (rot. CH); 50,8 e 49,0 (rot. CH); 43,4 e 57,4 (rot. CH<sub>2</sub>); 27,1 e 28,4 (rot. CH<sub>2</sub>); 20,9 (CH<sub>3</sub>).

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

3181,63 ; 2999,69 ; 1620,95; 1568,07; 1422,13; 1330,17 ; 1159,74; 830,48; 729,34.

3.4.9.4. ((Z)-3-((2-(4-(4-fluorofenil)tiazol-2-il)hidrazono)metil)-4,5-di-hidro-3aH-pirrol[3,2-d]isoxazol-6(6aH)-il)(*p*-toluil)metanona **4d**.

- Sólido amorfo bege claro
- $C_{23}H_{20}FN_5O_2S$
- MM: 449,13 g/mol
- Rf: 0,55 (AcOEt/hexano 1:1)
- PF: 202 - 207 °C fundiu com decomposição



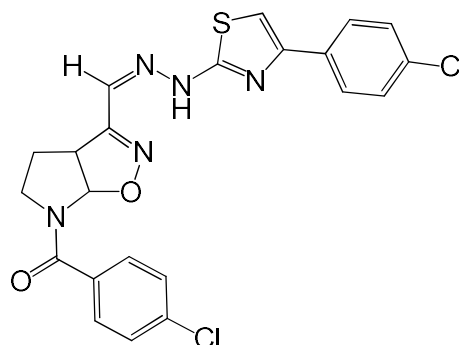
A tiossemicarbazona isoxazolílica *p*-cloro **83d** (0,200 g; 0,6035 mmol) foi solubilizada em etanol (20 mL), sendo adicionada a esta solução, 2-cloro-4-fluoroacetofenona (0,1040 g; 0,6035 mmol). A reação permaneceu em agitação à temperatura ambiente, sendo monitorada por CCD. Após 24 h, foi possível verificar o consumo total da tiossemicarbazona isoxazolílica. Após sucessivas lavagens com etanol, foi obtido o sólido amorfo bege claro, o híbrido isoxazolina/tiazol **4d**. O rendimento obtido foi 59%.

#### DADOS ESPECTROMÉTRICOS 4d

**RMN  $^{13}C$ , 150 MHz, DMSO- $d_6$ , ppm:** 168,6 (C=O); 161,6 (*d*,  $J^1 = 241$  Hz, CF); 157,8 (C); 155,7 (C); 149,2 (C); 140,3 (C); 132,6 (CH); 131,5 (C); 131,4 (CH); 128,8 (CH); 127,7 (CH); 127,6 (C); 115,4 (CH, *d*,  $J^2 = 21$  Hz); 104,0 (CH); 94,4 e 92,1 (rot. CH); 50,9 e 49,1 (rot. CH); 43,4 e 47,5 (rot. CH<sub>2</sub>); 27,3 e 28,6 (rot. CH<sub>2</sub>); 20,9 (CH<sub>3</sub>)

3.4.9.5. (Z)-(4-clorofenil)(3-((2-(4-(4-clorofenil)tiazol-2-il)hidrazono)metil)-4,5-di-hidro-3aH-pirrolo[3,2-d ]isoxazol-6(6aH)-il)metanona **4e**.

- Sólido amorfo branco
- $C_{22}H_{17}Cl_2N_5O_2S$
- MM: 485,05 g/mol
- Rf: 0,62 (AcOEt/hexano 1:1)
- PF: 238 - 241 °C fundiu com decomposição



A tiossemicarbazona isoxazolílica p-cloro 83a (0,250 g; 0,7106 mmol) foi solubilizada em etanol (23,5 mL), sendo adicionada a esta solução, 2-bromo-4-cloroacetofenona (0,165 g; 0,7106 mmol). A reação permaneceu em agitação à temperatura ambiente, sendo monitorada por CCD. Após 18 h, foi possível verificar o consumo total da tiossemicarbazona isoxazolílica. Após sucessivas lavagens com etanol e éter etílico, foi obtido o sólido amorfo branco puro, o híbrido isoxazolina/tiazol **4e**. O rendimento obtido foi 81%.

#### DADOS ESPECTROMÉTRICOS **4e**

**RMN  $^1H$ , 400 MHz, DMSO- $d_6$ , ppm:** 12,62 (s, 1H); 7,70-7,95 (m, 3H); 7,40-7,70 (m, 7H); 6,15 e 6,65 (rot. d,  $J = 7,6$  Hz); 4,34 (tl,  $J = 7,6$  Hz); 4,14 e 3,48 (rot. m, 1H); 3,07 e 3,42 (rot. m, 1H); 2,42 (m, 1H); 2,24 (m, 1H).

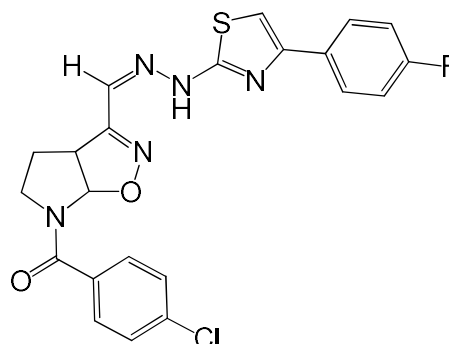
**RMN  $^{13}C$ , 100 MHz, DMSO- $d_6$ , ppm:** 167,5 (C=O); 157,3 (C); 156,6 (C); 149,5 (C); 135,3 (C); 134,2 (C); 133,3 (C); 132,1 (C); 131,5 (CH); 129,6 (CH); 128,7 (CH); 128,5 (CH); 127,2 (CH); 105,5 (CH); 94,3 e 91,7 (rot. CH); 51,1 e 49,2 (rot. CH); 43,6 e 47,3 (rot.  $CH_2$ ); 27,1 e 28,4 (rot.  $CH_2$ ).

#### **IV-FT - ATR ( $cm^{-1}$ ), principais sinais.**

3183,60 ; 2872,43 ; 1624,29; 1568,06 ; 1476,02; 1405,06; 1158,68; 830,40; 729,01.

3.4.9.6. (Z)-(4-clorofenil)(3-((2-(4-(4-fluorofenil)tiazol-2-il)hidrazono)metil)-4,5-di-hidro-3aH-pirrol[3,2-d ]isoxazol-6(6aH)-il)metanona **4f**.

- Sólido granuloso amarelo
- $C_{22}H_{17}ClFN_5O_2S$
- MM: 469,08 g/mol
- Rf: 0,60 (AcOEt/hexano 1:1)
- PF: 239 - 243 °C fundiu com decomposição



A tiossemicarbazona isoxazolílica *p*-cloro **83a** (0,250 g; 0,7106 mmol) foi solubilizada em etanol (23,5 mL), sendo adicionada a esta solução, 2-cloro-4-fluoroacetofenona (0,122 g; 0,7106 mmol). A reação permaneceu em agitação à 70 °C, sendo monitorada por CCD. Após 6 h, foi possível verificar o consumo total da tiossemicarbazona isoxazolílica. Após sucessivas lavagens com etanol, foi obtido o sólido granuloso amarelo puro, o híbrido isoxazolina/tiazol **4f**. O rendimento obtido foi 67%.

#### DADOS ESPECTROMÉTRICOS **4f**

**RMN  $^1H$ , 600 MHz, DMSO- $d_6$ , ppm:** 12,59 (s, 1H); 7,80-8,00 (m, 3H); 7,50-7,70 (m, 4 H); 7,38 (s, 1H); 7,24 (t,  $J = 8,4$  Hz); 6,15 e 6,66 (rot. sl, 1H); 4,24 (m, 1H); 4,14 e 3,49 (rot. m, 1H); 3,07 e 3,42 (rot. m, 1H); 2,44 (m, 1H); 2,23 (m, 1H)

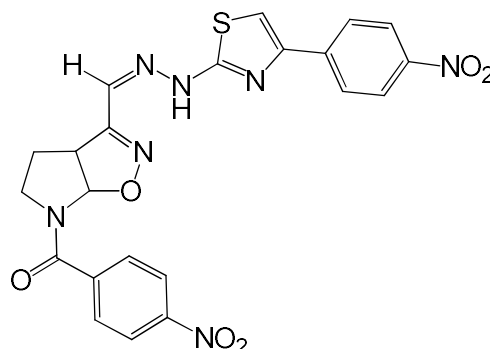
**RMN  $^{13}C$ , 150 MHz, DMSO- $d_6$ , ppm:** 167,4 (C=O); 161,6 ( $d$ ,  $J^1 = 243$  Hz, CF); 157,4 (C); 156,6 (C); 149,7 (C); 135,2 (C); 134,2 (C); 131,4 (C); 131,0 (CH); 129,5 (CH); 128,4 (CH); 127,5 (CH); 115,4 ( $d$ ,  $J^2 = 21$  Hz, CH); 104,4 (CH); 94,3 e 91,9 (rot. CH); 51,0 e 49,1 (rot. CH); 43,6 e 47,2 (rot. CH $_2$ ); 27,0 e 28,3 (rot. CH $_2$ ).

#### **IV-FT - ATR (cm $^{-1}$ ), principais sinais.**

3169,86 ; 2950,33 ; 1618,70; 1565,81 ; 1484,59; 1427,99; 1226,67; 837,99; 722,50.

3.4.9.7. (Z)-(4-nitrofenil)(3-((2-(4-(4-nitrofenil)tiazol-2-il)hidrazono)metil)-4,5-dihidro-3aH-pirrolo[3,2-d]isoxazol-6(6aH)-il)metanona **4g**.

- Sólido granuloso amarelo
- $C_{22}H_{17}N_7O_6S$
- MM: 507,10 g/mol
- Rf: 0,40 (AcOEt/hexano 1:1)
- PF: 238 - 239°C fundiu com decomposição



A tiossemicarbazona isoxazolínica *p*-NO<sub>2</sub> **83g** (0,200 g; 0,5519 mmol) foi solubilizada em etanol (22 mL), sendo adicionada a esta solução, 2-bromo-4-nitroacetofenona (0,123 g; 0,5519 mmol). A reação permaneceu em agitação à temperatura ambiente, sendo monitorada por CCD. Após 26 h, foi possível verificar o consumo total da tiossemicarbazona isoxazolínica. Após sucessivas lavagens com etanol e éter etílico, foi obtido o sólido granuloso amarelo puro, o híbrido isoxazolina/tiazol **4g**. O rendimento obtido foi 84%.

#### DADOS ESPECTROMÉTRICOS 4g

**RMN <sup>1</sup>H, 600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, ppm:** 12,72 (s, 1H); 8,20-8,40 (m, 4H); 8,10 (sl, 2H); 7,70-8,00 (m, 4H); 6,11 e 6,66 (rot. sl, 1H); 4,26 (sl, 1H); 4,14 e 3,44 (rot., m, 1H); 3,13 e 2,96 (rot., m, 1H); 2,50 (m, 1H); 2,28 (m, 1H).

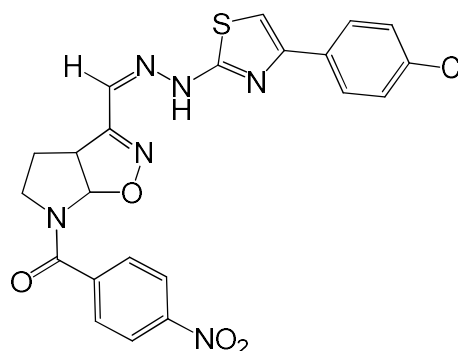
**RMN <sup>13</sup>C, 150 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, ppm:** 167,8 e 167,2 (rot. C=O); 157,2 (C); 156,6 (C); 148,7 (C); 148,3 (C); 146,3 (C); 141,5 (C); 140,3 (C); 131,9 (CH); 128,8 (CH); 126,3 (CH); 124,1 (CH); 123,6 (CH); 109,5 (CH); 94,0 e 91,6 (rot. CH); 51,1 e 49,3 (rot. CH); 43,7 e 47,1 (rot. CH<sub>2</sub>); 26,9 e 28,2 (rot. CH<sub>2</sub>).

#### **IV-FT - ATR (cm<sup>-1</sup>), principais sinais.**

3186,07 ; 2988,54 ; 1626,55; 1567,85 ; 1507,78; 1427,45; 1326,96; 838,13; 716,74.

3.4.9.8. ((Z)-3-((2-(4-(4-clorofenil)tiazol-2-il)hidrazono)metil)-4,5-dihidro-3aH-pirrolo[3,2-d]isoxazol-6(6aH)-il)(4-nitrofenil)metanona **4h**.

- Sólido amorfo amarelo claro
- $C_{22}H_{17}ClN_6O_4S$
- MM: 496,07 g/mol
- Rf: 0,51 (AcOEt/hexano 1:1)
- PF: 227 - 233 °C fundiu com decomposição



A tiossemicarbazona isoxazolílica *p*-NO<sub>2</sub> **83h** (0,200 g; 0,5519 mmol) foi solubilizada em etanol (22 mL), sendo adicionada a esta solução, 2-bromo-4-cloroacetofenona (0,128 g; 0,5519 mmol). A reação permaneceu em agitação à 60 °C, sendo monitorada por CCD. Após 6 h, foi possível verificar o consumo total da tiossemicarbazona isoxazolílica. Após sucessivas lavagens com etanol e éter etílico, foi obtido o sólido amorfo amarelo puro, o híbrido isoxazolina/tiazol **4h**. O rendimento obtido foi 86%.

#### DADOS ESPECTROMÉTRICOS **4h**

**RMN <sup>1</sup>H, 600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, ppm:** 12,62 (s, 1H); 8,27-8,38 (m, 2H); 7,80-7,92 (m, 5H); 7,42-7,50 (m, 3H); 6,10 e 6,65 (rot. sl, 1H); 4,27 (m, 1H); 4,13 e 3,48 (rot. m, 1H); 3,13 e 3,42 (rot. m, 1H); 2,49 (m, 1H); 2,29 (m, 1H).

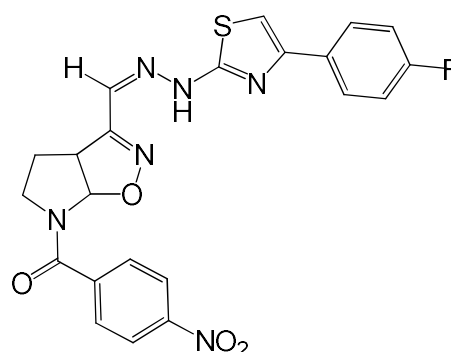
**RMN <sup>13</sup>C, 150 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, ppm:** 167,3 (C=O); 157,2 (C); 156,8 (C); 149,5 (C); 148,3 (C); 141,5 (C); 133,2 (C); 132,1 (CH); 131,3 (C); 128,9 (CH); 128,6 (CH); 127,2 (CH); 123,6 (CH); 105,5 (CH); 93,9 e 91,6 (rot. CH); 51,2 e 49,4 (rot. CH); 43,7 e 47,1 (rot. CH<sub>2</sub>); 26,9 e 28,2 (rot. CH<sub>2</sub>).

#### **IV-FT - ATR (cm<sup>-1</sup>), principais sinais.**

3209,74 ; 2992,22 ; 1625,06; 1568,37 ; 1525,15; 1475,12; 1344,54; 832,18; 711,84.

3.4.9.9. (Z)-(3-((2-(4-(4-fluorofenil)thiazol-2-il)hidrazono)metil)-4,5-dihidro-3aH-pirrolo[3,2-d']isoxazol-6(6aH)-il)(4-nitrofenil)metanona **4i**.

- Sólido granuloso marrom
- $C_{22}H_{17}FN_6O_4S$
- MM: 480,10 g/mol
- Rf: 0,48 (AcOEt/hexano 1:1)
- PF: 237 - 239 °C fundiu com decomposição



A tiossemicarbazona isoxazolinica  $p$ -NO<sub>2</sub> **83i** (0,200 g; 0,5519 mmol) foi solubilizada em etanol (22 mL), sendo adicionada a esta solução, 2-cloro-4-fluoroacetofenona (0,095 g; 0,5519 mmol). A reação permaneceu em refluxo à 80 °C, sendo monitorada por CCD. Após 20 h, foi possível verificar o consumo total da tiossemicarbazona isoxazolinica. Após sucessivas lavagens com etanol, foi obtido o sólido amorfo amarelo puro, o híbrido isoxazolina/tiazol **4i**. O rendimento obtido foi 70%.

#### DADOS ESPECTROMÉTRICOS **4i**

**RMN <sup>1</sup>H, 600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, ppm:** 12,61 (s, 1H); 8,32 (m, 2H); 7,86 (m, 5H); 7,38 (m, 1H); 7,24 (tl,  $J = 8,4$  Hz, 2H); 6,10 e 6,65 (rot. d,  $J = 7,2$  Hz, 1H); 4,27 (m, 1H); 4,13 e 3,43 (rot. m, 1H); 3,12 e 3,40 (rot. m, 1H); 2,47 (m, 1H); 2,27 (m, 1H).

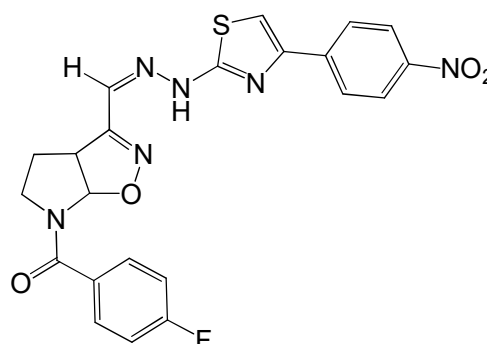
**RMN <sup>13</sup>C, 150 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, ppm:** 167,2 (C=O); 161,6 ( $d$ ,  $J^1 = 243$  Hz, CF); 157,2 (C); 156,6 (C); 149,7 (C); 148,3 (C); 141,5 (C); 131,0 (CH); 128,9 (CH); 128,7 (C); 127,5 (CH); 123,6 (CH); 115,4 ( $d$ ,  $J^2 = 21$  Hz); 104,4 (CH); 93,9 e 91,5 (rot. CH); 51,2 e 49,4 (rot. CH); 43,7 e 47,1 (rot. CH<sub>2</sub>); 26,9 e 28,3 (rot. CH<sub>2</sub>).

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

3075,04 ; 2944,42 ; 1625,80; 1528,03; 1436,67; 1347,50; 1138,34; 839,37; 728,32.

3.4.9.10. (Z)-(4-fluorofenil)(3-((2-(4-(4-nitrofenil)tiazol-2-il)hidrazono)metil)-4,5-dihidro-3aH-pirrolol[3,2-d]isoxazol-6(6aH)-il)metanona **4j**.

- Sólido amorfo amarelo
- $C_{22}H_{17}FN_6O_4S$
- MM: 480,10 g/mol
- Rf: 0,46 (AcOEt/hexano 1:1)
- PF: 255 - 262 °C fundiu com decomposição



A tiossemicarbazona isoxazolinica *p*-F **83j** (0,200 g; 0,5964 mmol) foi solubilizada em etanol (23,8 mL), sendo adicionada a esta solução 2-bromo-4-nitroacetofenona (0,1336 g; 0,5964 mmol). A reação permaneceu em agitação à temperatura ambiente, sendo monitorada por CCD. Após 2,5h, foi possível verificar o consumo total da tiossemicarbazona isoxazolinica . Após lavagem com etanol, foi obtido o sólido amorfo amarelo puro, o híbrido isoxazolina/tiazol **4j**. O rendimento obtido foi 79%.

#### DADOS ESPECTROMÉTRICOS **4j**

**RMN  $^1H$ , 600 MHz, DMSO- $d_6$ , ppm:** 12,70 (s, 1H); 8,27 (d,  $J = 7$  Hz, 2H); 8,10 (d,  $J = 7$  Hz, 2H); 7,89 (m, 1H); 7,78 (s, 1H); 7,70 (m, 2H); 7,35 (m, 2H); 6,16 e 6,68 (rot. sl, 1H); 4,24 (tl,  $J = 8$  Hz); 4,16 e 3,51 (rot. m, 1H); 3,08 e 3,44 (rot. m, 1H); 2,43 (m, 1H); 2,25 (m, 1H).

**RMN  $^{13}C$ , 150 MHz, DMSO- $d_6$ , ppm:** 167,8 (C=O); 163,1 (d,  $J' = 246$  Hz, CF); 157,4 (C); 156,6 (C); 148,6 (C); 146,3 (C); 140,3 (C); 131,9 (CH); 131,8 (C); 130,2 (CH);

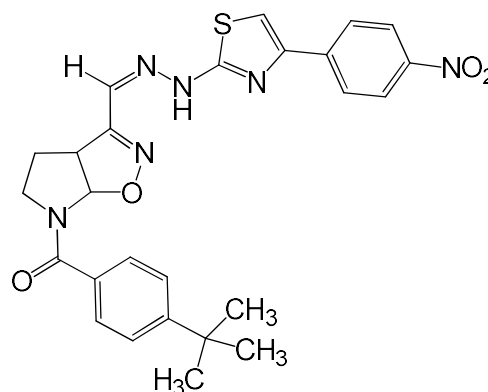
126,3 (CH); 124,1 (CH); 115,3 (*d*,  $J^2 = 22$  Hz, CH); 109,4 (CH); 94,5 e 91,8 (rot. CH); 51,0 e 49,1 (rot. CH); 43,6 e 47,2 (rot. CH<sub>2</sub>); 27,1 e 28,2 (rot. CH<sub>2</sub>).

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

3196,49 ; 2890,82 ; 1614,59; 1508,26 ; 1426,90; 1333,99; 1238,00; 854,57; 720,81.

3.4.9.11. (Z)-(4-(4-(*terc*-butil)fenil)(3-((2-(4-(4-nitrofenil)tiazol-2-il)hidrazono)metil)-4,5-dihidro-3a*H*-pirrolo[3,2-*d*]isoxazol-6(6a*H*)-il)metanona **4k**.

- Sólido amorfo amarelo
- C<sub>26</sub>H<sub>26</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub>S
- MM: 518,17 g/mol
- R<sub>f</sub>: 0,56 (AcOEt/hexano 1:1)
- PF: 235 - 238 °C fundiu com decomposição



A tiossemicarbazona isoxazolílica *p*-*t*Bu **83k** (0,1180 g; 0,3354 mmol) foi solubilizada em etanol (10,0 mL), sendo adicionada a esta solução, 2-bromo-4-nitroacetofenona (0,0861 g; 0,3354 mmol). A reação permaneceu em agitação à temperatura ambiente, sendo monitorada por CCD. Após 0,5h, foi possível verificar o consumo total da tiossemicarbazona isoxazolílica. Após sucessivas lavagens com etanol, foi obtido o sólido amorfo amarelo puro, o híbrido isoxazolina/tiazol **4k**. O rendimento obtido foi 85%.

**DADOS ESPECTROMÉTRICOS 4k**

**RMN <sup>1</sup>H, 400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, ppm:** 12,71 (s, 1H); 8,27 (d,  $J = 6$  Hz, 2H); 8,10 (d,  $J = 6$  Hz, 2H); 7,87 (m, 1H); 7,79 (sl, 1H); 7,54 (m, 4H); 6,20 e 6,69 (rot. sl, 1H); 4,23 (sl, 1H); 4,20 e 3,53 (rot. m, 1H); 3,06 e 3,50 (rot. m, 1H); 2,41 (m, 1H); 2,22 (m, 1H).

**RMN <sup>13</sup>C, 100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, ppm:** 167,8 (C=O); 157,5 (C); 153,3 (C); 148,7 (C); 146,3 (C); 140,3 (C); 137,2 (C); 132,6 (CH); 132,0 (C); 127,6 (CH); 126,4 (CH); 125,1

(CH); 124,1 (CH); 109,5 (CH); 94,7 e 91,9 (rot. CH); 50,8 e 49,1 (rot. CH); 43,3 e 47,5 (rot. CH<sub>2</sub>); 34,6 (C); 30,9 (CH<sub>3</sub>); 27,2 e 28,5 (rot. CH<sub>2</sub>).

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

3204,11 ; 2965,11 ; 1603,92; 1566,17 ; 1508,59; 1336,13; 1105,00; 835,45; 721,61.

## **4.CAPÍTULO 2 – Parte química - Série diaril-isoxazol**

### **4.4.Objetivos**

#### **4.4.1.Objetivo Geral**

Síntese e elucidação de novos derivados híbridos diaril-isoxazóis **10** e **11**.

#### **4.4.2. Objetivos Específicos**

- d- Síntese da série de derivados diaril-isoxazóis **10** e **11**.
- e- Purificação e determinação de propriedades físico-químicas das novas moléculas **10** e **11**.
- f- Elucidação estrutural das novas moléculas híbridas **10** e **11** através de espectroscopia de ressonância magnética nuclear (<sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C), no infravermelho e de massas.

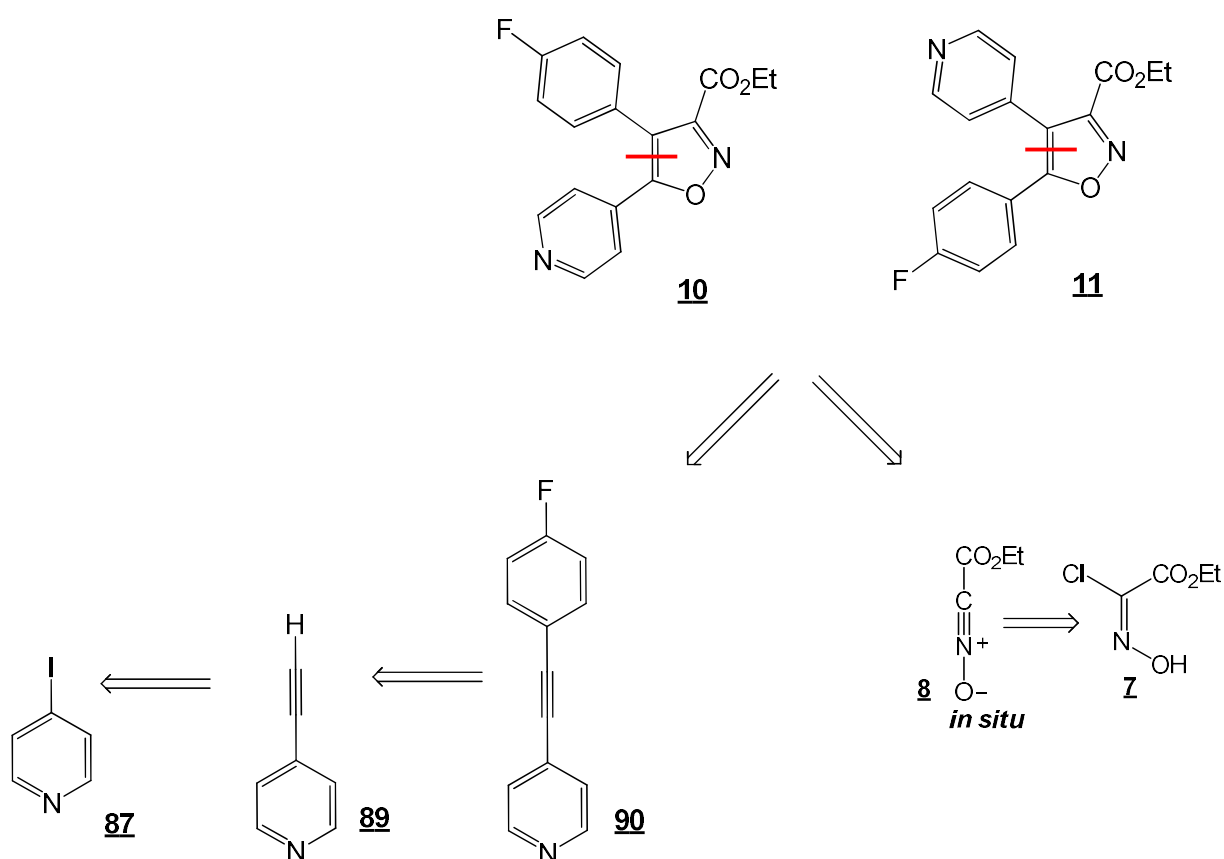
.

## 4.5.Estratégia Sintética

### 4.5.1.Retrossíntese dos diaril-isoxazóis **10** e **11**

A retrossíntese proposta encontra-se no Esquema 31 e consistiu-se na obtenção do diaril-isoxazol **10** e **11**, a partir da cicloadição da 4-((4-fluorophenil)etnil)piridina **90** com a carboetóxi-formonitrila (CEFNO) **8** gerada *in situ*. A 4-((4-fluorophenil)etnil)piridina **90** seria obtida pela condensação do 4-fluoro-iodobenzeno com a 4-etnilpiridina **89**, oriunda da desproteção do 4 - ((trimetilsilil) etnil). Este último composto provém da 4-iodopiridina **87**, reagente inicial. A porção éster presente no carbono C3, possibilitará a inserção de novos grupamentos às estruturas formadas.

Esquema 31. Retrossíntese proposta dos diaril-isoxazóis **10** e **11**.



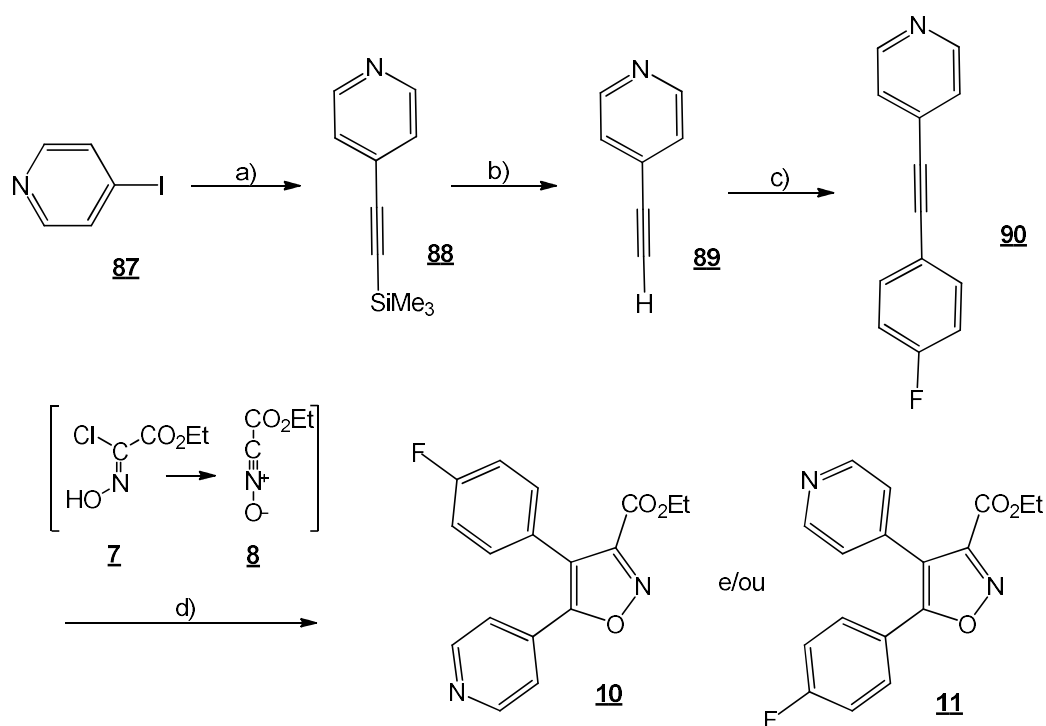
## 4.5.2. Via sintética

## 4.5.2.1. Síntese via cicloadição

A rota de reação utilizada consistiu na obtenção do diaril-isoxazol **10** e **11**.

A primeira rota sintética proposta, começa com a produção de 4 - ((trimetilsilil) etinil) piridina **88** a partir de um acoplamento a 4-iodopiridina **87** (Esquema 32). Na etapa seguinte, ocorreu uma reação de desproteção formando 4-etinilpiridina **89** (produto volátil) e após uma reação de acoplamento com 4-fluoro-iodobenzeno o sistema diaril-acetileno **90** foi gerado, sendo realizado sobre a reação de cicloadição 1,3-dipolar com carboetóxi-formonitrila (CEFNO) **8** gerado *in situ*, a partir de seu precursor cloro-oximidocetato de etila **7**, para a então formação do núcleo isoxazol.

Esquema 32. Reagentes e condições para síntese dos diaril-isoxazóis.



**a)** trimetilsililacetileno, CuI, Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, Et<sub>3</sub>N, acetonitrila, MW, 120 °C, 10min; **b)** TBAF, THF, -15 °C, 30min; **c)** 4-fluoro-iodobenzene, Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, CuI, Et<sub>3</sub>N, MW, 120 °C, 5 min.; **d)** KF, 1,2-DME, 80 °C, 18h.

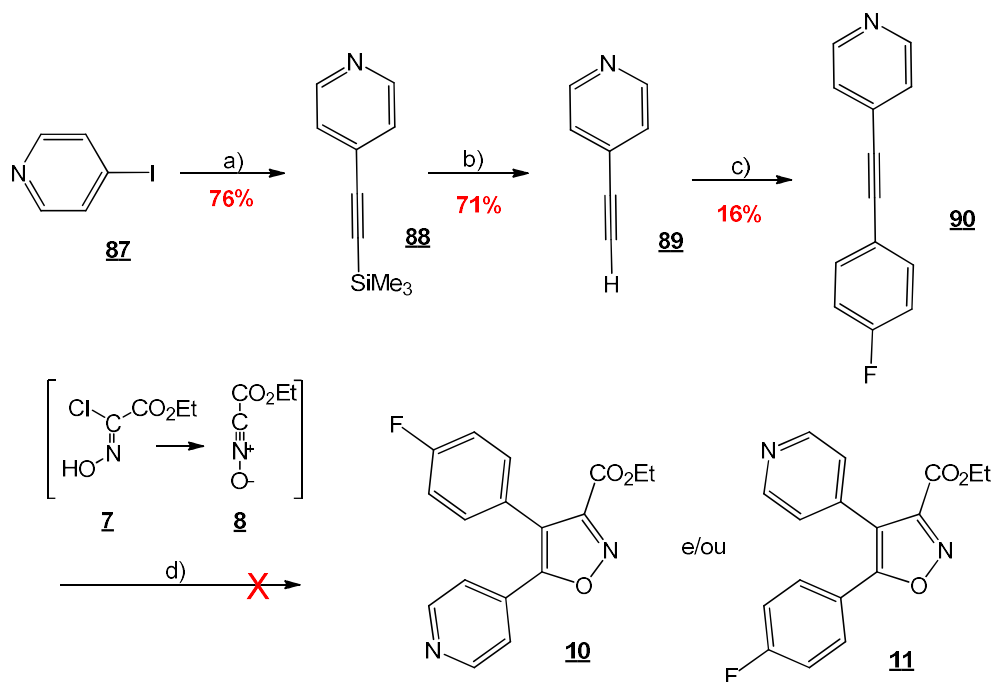
Devido a dificuldades encontradas na síntese pela via de cicloadição, outras rotas sintéticas foram propostas, buscando a síntese da molécula final. Dentre as vias propostas, a ciclização de  $\beta$ -ceto-enol foi escolhida e será apresentada mais a frente nos resultados deste trabalho.

#### 4.6.Resultados e Discussão

##### 4.6.1.Síntese via cicloadição

A síntese começa com a produção de 4-((trimetilsilil) etinil) piridina **88** a partir de um acoplamento com a 4-iodopiridina **87** (Esquema 33). Na etapa seguinte, ocorreu uma reação de desproteção formando 4-etinilpiridina **89** (produto volátil), seguida de um acoplamento com 4-fluoro-iodobenzeno, o qual da origem a 4-((4-fluorofenil)etinil)piridina **90**. Este último, foi submetido a uma reação de cicloadição 1,3 dipolar com o CEFNO, porém sem sucesso.

Esquema 33. Síntese dos diaril-isoxazóis até o composto **90**.



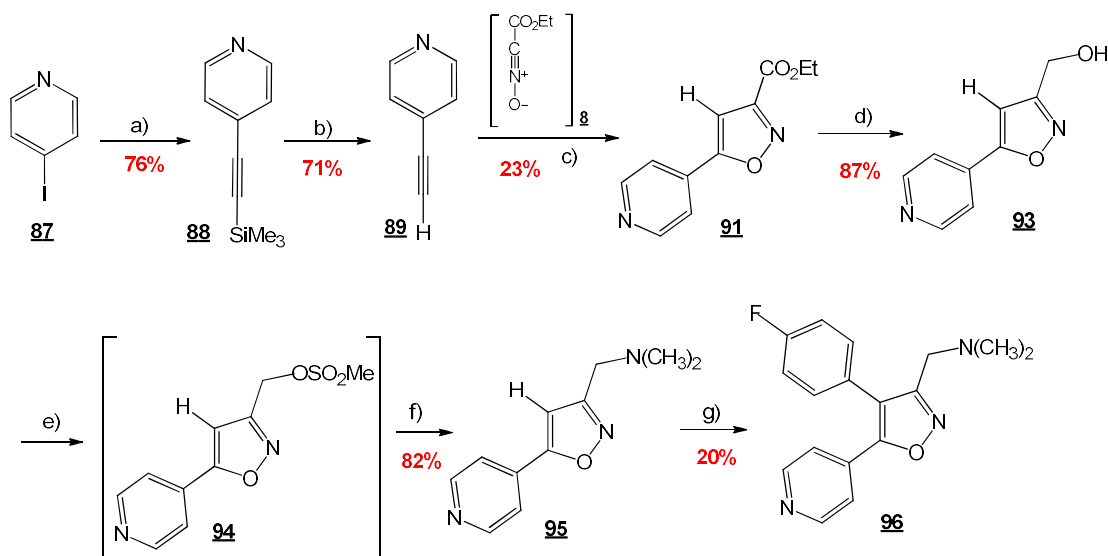
**a)** trimetilsililacetileno, CuI, Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, Et<sub>3</sub>N, acetonitrila, MW, 120 °C, 10min; **b)** TBAF, THF, -15 °C, 30min; **c)** 4-fluoro-iodobenzene, Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, CuI, Et<sub>3</sub>N, MW, 120 °C, 5 min.; **d)** KF, 1,2-DME, 80 °C, 18h

A síntese foi acompanhada por UPLC-MS, porém não foi verificada a formação do produto, sendo verificado a permanência do reagente de partida na reação. Mesmo com mudanças na metodologia, não houve a formação do diaril-isoxazol **10** e/ou **11**, o que nos levou a considerar o possível impedimento estérico do difenil-acetileno **90** sobre o CEFNO **8**, impossibilitando a aproximação destes e consequente formação do anel isoxazol.

Tal suposição foi confirmada com a mudança na metodologia, onde a cicloadição 1,3-dipolar da 4-etinilpiridina **89** com o CEFNO **8** se processou com sucesso, obtendo-se o núcleo isoxazol éster **91**. Seguindo a mudança metodológica, após a purificação do isoxazol éster **91**, diversas tentativas de halogenação no C4 do anel isoxazol foram realizadas, com o intuito de promover a introdução do 4-fluoro-benzeno, através de uma reação de Suzuki e consequente formação do diaril-isoxazol **10**, porém, em nenhuma delas obteve-se sucesso sintético, como apresentado no Esquema 34.

Após várias tentativas de otimização, o composto **10** foi obtido com sucesso, mas com baixos rendimentos. A via de síntese começa obtendo 4-((trimetilsilil) etinil) piridina **88** de um acoplamento para 4-iodopirridina **87**. O próximo passo é uma reação de desproteção formando 4-etinilpiridina **89** (produto volátil) seguido por uma reação de cicloadição 1,3-dipolar com óxido carboetóxi-formonitrila **8** (CEFNO) gerado *in situ*, a partir de seu cloroximidoceto de etila precursor, promovendo a formação do núcleo isoxazol com uma função éster C3 e instalando 4-piridina C5 (composto **91**). Em seguida, o éster foi reduzido ao álcool para promover a inserção de dimetilamina em uma reação de um *one pot* via mesilato intermediário **94**. Esta estratégia de síntese possibilitou a obtenção de 4-piridil-isoxazol **95** que sofre uma reação de arilação direta na presença de 4-fluoro-iodobenzene para levar ao composto desejado com um baixo rendimento (20%).

Apesar do sucesso da síntese, uma pequena quantidade de produto foi obtida com baixa eficiência de reação, para o único composto obtido. Devido às condições impostas pela pandemia do COVID-19, esta série não foi concluída.

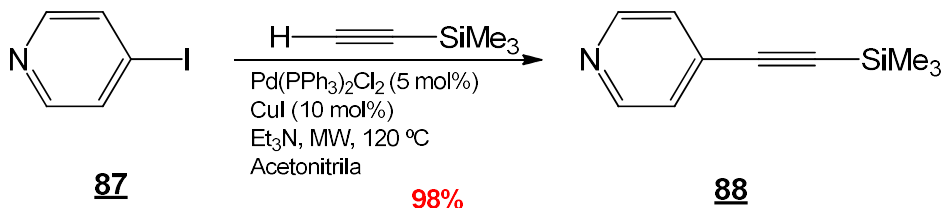
Esquema 34. Síntese do composto **96** via cicloadição.

[**a**] trimetilsililacetilino, CuI, Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, E<sub>3</sub>N, acetonitrilo, MW, 120 °C, 10 min; **b**) TBAF, THF, -15 °C, 30 min; **c**) Acetato de cloroóximida de etila, CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O, ascorbate de sódio, KHCO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O/tBuOH (1:1), t.a., 4h; **d**) NaBH<sub>4</sub>, EtOH, 1h, 0 °C, e *overnight* à t.a.; **e**) Cloreto de metanosulfonil, TEA, THF, 5 °C e 1h à t.a.; **f**) NH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, diisopropiltilamina, ACN, t.a., 30 min; **g**) 4-fluoro-iodobenzeno, PPh<sub>3</sub>, Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Pd(OAc)<sub>2</sub>, DMF, 3,5 h a 85 °C e t.a., *overnight*].

Nesta etapa sintética, houve o empenho em acessar o análogo do composto **105** (o qual será citado mais à frente), a saber o composto **96**, invertendo as posições de 4-piridina e 4-fluorofenil no núcleo isoxazol, a fim de completar o estudo da relação de atividade estrutural, uma vez que neste doutorado a série do composto **105** foi obtida primeiro.

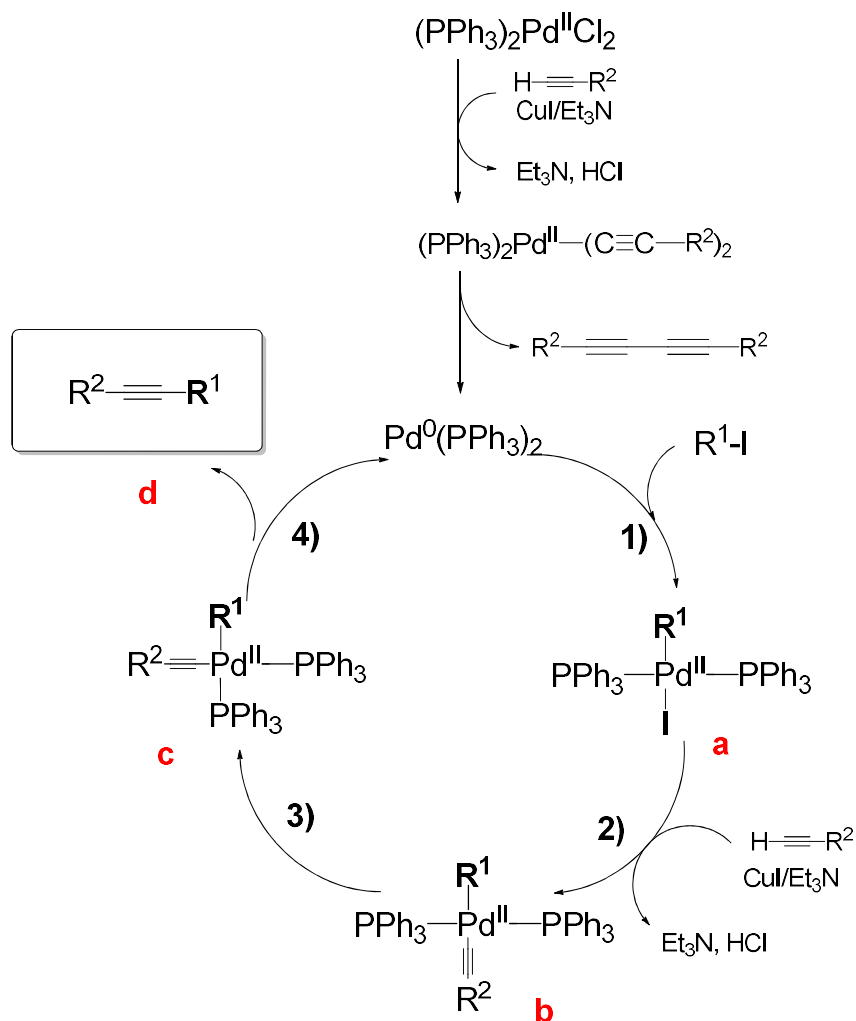
#### 4.6.1.1. Síntese da 4-((trimetilsilil)etnil)-piridina **88**

A síntese da 4-((trimetilsilil)etnil)-piridina **88** foi baseada na reação clássica *cross coupling* de Sonogashira *et. al* (1975), onde halogenetos de arila podem ser acoplados com alcinos verdadeiros para a formação de alcinos dissustituídos (Esquema 36) (SONOGASHIRA; TOHDA; HAGIHARA, 1975). Esta reação possui vantagem de ser realizada em condições mais brandas e de bons rendimentos em comparação com a reação de acoplamento de Castro (STEPHENS; CASTRO, 1963).

Esquema 35. Síntese da 4-(trimetilsilil)etinilpiridina **88**.

O mecanismo de reação consiste em dois ciclos catalíticos, um do paládio e outro do cobre. É proposto que, a partir de um complexo de cloreto de paládio II, seja formado o paládio com grau de oxidação 0, o qual é o catalizador ativo. Após a formação do complexo de cloreto de paládio II (PdCl<sub>2</sub>), ocorre no ciclo do Pd a etapa de adição oxidativa **1**), onde há a inserção de Pd<sup>0</sup> na ligação de haleto de arila, fornecendo o complexo de paládio II (Pd<sup>II</sup>) (**a**). Um ciclo lateral apoiado por cobre como co-catalisador (CuI) desenvolve o reagente organometálico σ-alquinil para a etapa de transmetalção **2**) com o complexo (**a**). O intermediário σ-alcínilpaládio II (**b**) é produzido e passa pelo processo de isomerização **3**) formando o intermediário (**c**). A eliminação redutiva **4**) ocorre eventualmente para fornecer o produto de acoplamento (**d**) e regenerar o catalisador Pd<sup>0</sup> ativo (Esquema 36).

Esquema 36. Ciclo catalítico da reação de acoplamento de Sonogashira

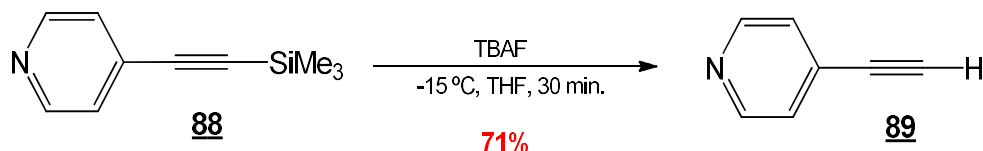


Fonte: Autor

Apesar da síntese ser descrita à temperatura ambiente, esta etapa foi realizada utilizando o micro-ondas para uma síntese mais rápida, sendo utilizado um período de 10 minutos apenas (SALIH; BAQI, 2019).

#### 4.6.1.2. Desproteção do TMS

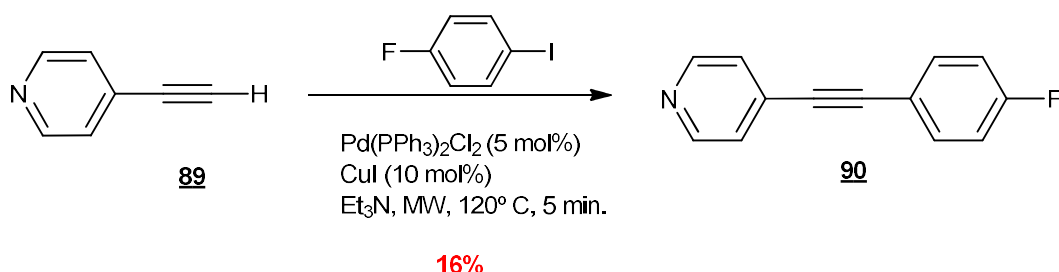
A desproteção para formação da 4-etinilpiridina **89** foi realizado por hidrólise alcalina com fluoreto de tetrabutylamônio em THF (Esquema 37) conforme apresentado na literatura (DAWOOD *et al.*, 2014), sendo em temperatura de  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ . A reação ocorreu em apenas 30 minutos, sendo verificada 95% de conversão sobre do reagente de partida ao produto pelo UPCL/MS.

Esquema 37. Síntese da 4-etinilpiridina **89**.

Todavia, após a purificação em cromatografia *flash* automatizada, o produto não foi detectado. Após outras tentativas de purificação, dentre elas a liofilização para evitar o contato com a sílica da coluna cromatográfica, foi verificada a presença do produto na água de descarte do liofilizador, sendo a 4-etinilpiridina **89** volátil, sublimando facilmente. Por este motivo, a purificação em coluna *flash* utilizou apenas diclorometano como solvente da fase móvel, seguindo a evaporação do solvente sem a utilização do vácuo no evaporador rotatório, apenas com a temperatura do banho-maria (55 °C), obtendo-se o produto sólido com rendimento de 71%.

#### 4.6.1.3. Síntese da 4-((4-fluorofenil)etnil)piridina **90**

As etapas anteriores, até a síntese deste alcino dissustituído, a partir de halogenetos de arila, são descritas em alguns trabalhos (DAWOOD *et al.*, 2014; ELANGO VAN; WANG; HO, 2003), dentre eles está a tese de doutorado de Puget (2003), realizada no grupo de pesquisa IICimed, Université de Nantes (PUGET, 2003). A utilização do micro-ondas nesta reação é descrita na revisão de Batalha, Sagrillo e Gama (2014) (BATALHA; SAGRILLO; GAMA, 2014).

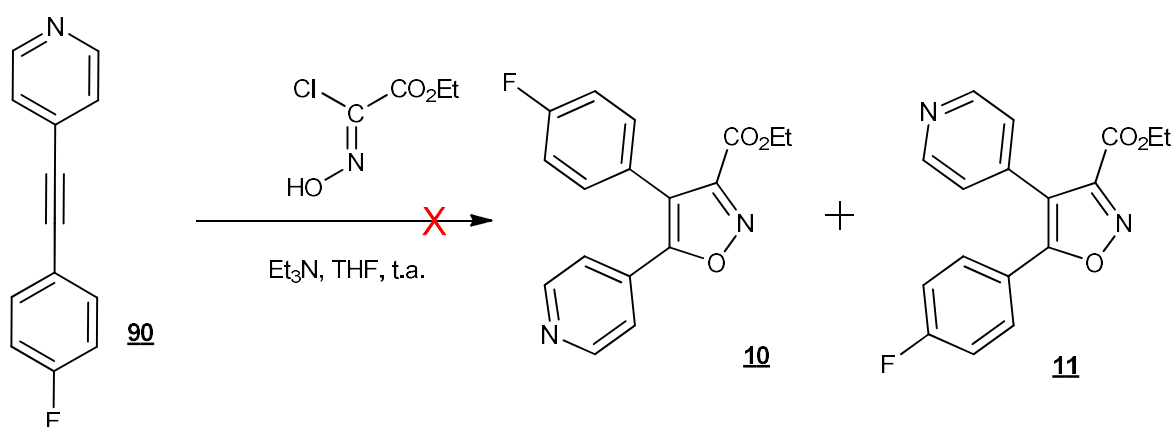
Esquema 38. Síntese da 4-((4-fluorofenil)etnil)piridina **90**

Esta síntese ocorre pelo acoplamento catalítico de Sonogashira *et al.* (1975) sob as mesmas condições equimolares do primeiro acoplamento com a 4-iodopiridina e o trimetilsililacetileno, supracitados. O mecanismo é o mesmo encontrado no Esquema 36, no tópico 4.6.1.1 modificando-se os reagentes. Apesar do baixo rendimento, este foi submetido à reação de cicloadição 1,3-dipolar.

#### 4.6.1.4.Cicloadição 1,3 dipolar

##### 4.6.1.4.1.Dipolarófilo alcinos bi-substituído **90**

Esquema 39. Síntese do sistema orto-diaril-isoxazol



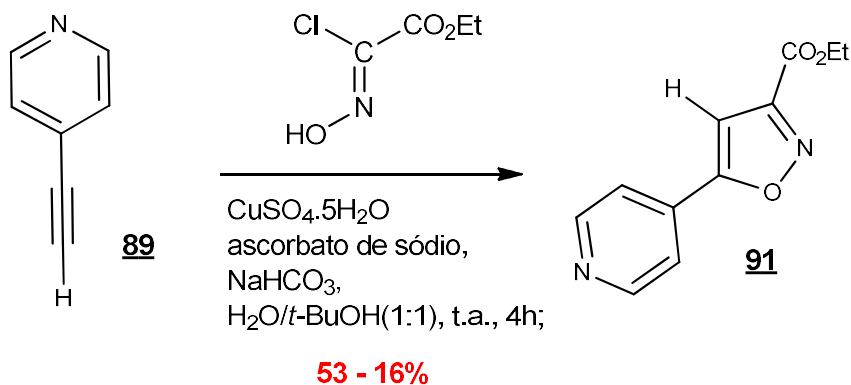
A cicloadição a partir da 4-(4-fluorofenil)etnilpiridina **90** foi realizada pela mesma metodologia proposta por Almeida, V. *et al.* (2009) para a formação do núcleo isoxazolina. Como não haveria diferenciação eletrônica significativa entre os carbonos sp da ligação tripla, poderia haver a formação de 2 isômeros isoxazóis. Entretanto a reação não teve sucesso, mesmo com a modificações na metodologia (CHULKY, *et al.* 2016; KANKALA *et al.*, 2011). Uma hipótese para a não formação do produto, é um possível impedimento estérico causado pela densa nuvem eletrônica da tripla ligação, o que impediria a aproximação do dipolo CEFNO.

##### 4.6.1.4.2.Dipolarófilo alcino mono-substituído **89**

A metodologia que apresentou melhor rendimento para a síntese do cicloaduto foi a de Himo F. *et al.* (2005), onde o anel isoxazol é obtido a partir da

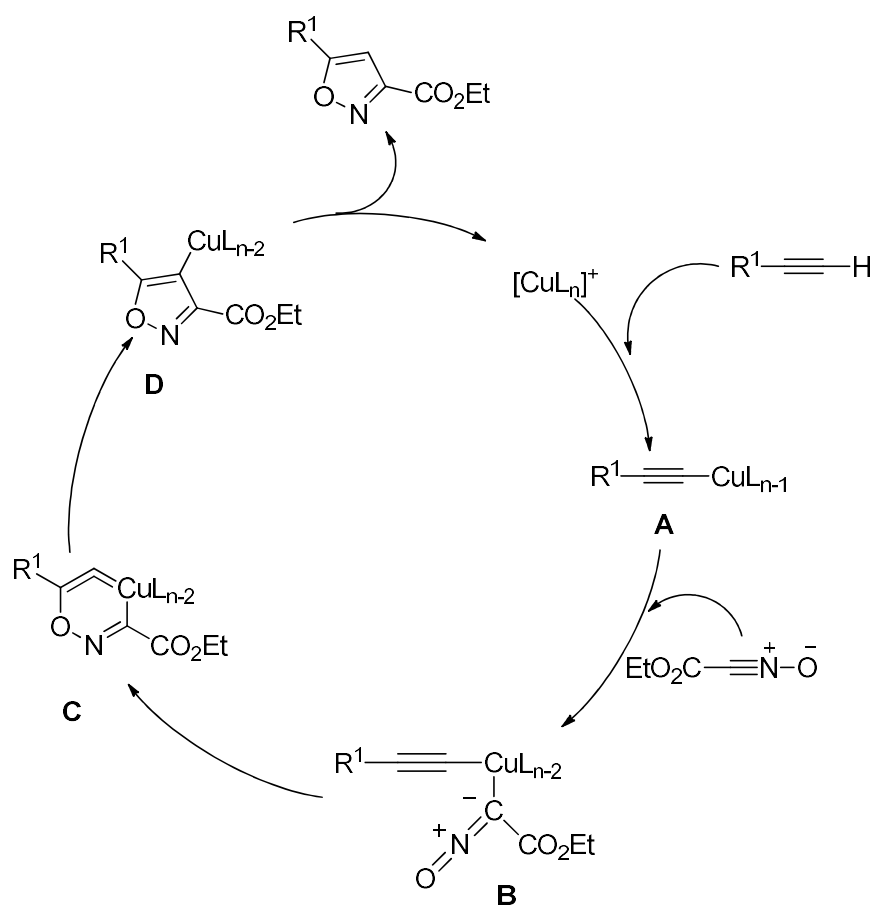
cicloadição-1,3-dipolar de Huisgen (1963) entre uma azida e um alcino terminal, com o catalisador do sulfato de cobre (II) na presença de ascorbato de sódio. A reação ocorre à temperatura ambiente resultando na formação seletiva de um único regioisômero, o 3,5-isoxazol-dissubstituídos (Esquema 40) (HIMO *et al.*, 2005).

Esquema 40. Síntese do cicloaduto fenil-isoxazol **91**.



Na presença de acetiletos de cobre (I) os NOs reagem com alcinos fornecendo isoxazóis 3,5-dissubstituídos. A sequência catalítica (Esquema 41) começa com a coordenação do alcino às espécies reativas de Cu (I)  $[\text{CuLn}]^+$  deslocando um dos ligantes L, neste caso o ascorbato (intermediário A). Na próxima etapa, o NO substitui um dos ligantes e se liga ao átomo de cobre através do carbono ligado ao nitrogênio, formando o intermediário B. Em seguida, o oxigênio do NO em B ataca o carbono C-2 do acetileto, formando o metalacido C de cobre (III) de seis membros. De C, ocorre a contração do anel, que forma o derivado de cobre D. A proteólise de D libera o produto isoxazol, completando assim o ciclo catalítico. As etapas deste ciclo foram confirmadas por métodos computacionais (ROSCALES; PLUMET, 2018).

Esquema 41. Mecanismo de reação proposto para o catalisador Cu (I) de cicloadição 1,3-dipolar entre NOs e alcinos.

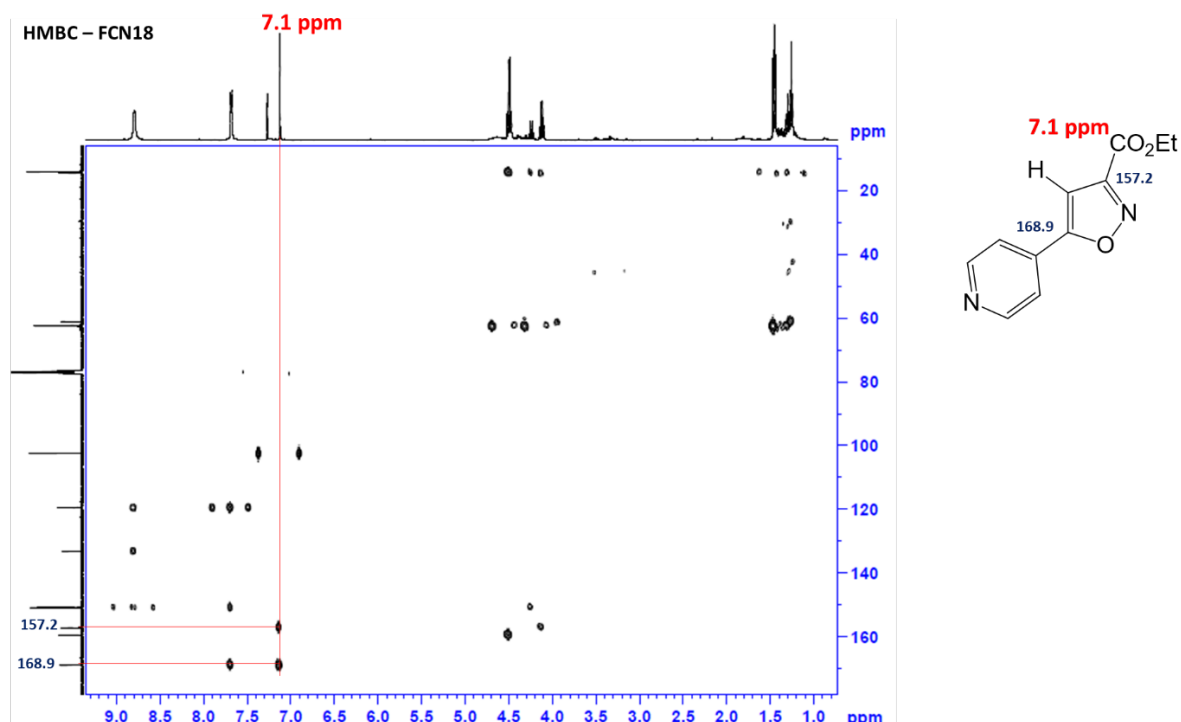


Fonte: Roscales e Plumet (2018). Adaptado.

Análise de RMN  $^1H$  confirmou a formação do isoxazol pela presença do singlete em 7,125 ppm pertencente ao H do anel isoxazol, dos tripleto e quarteto em 1,45 ppm ( $J = 7,2$  Hz) e 4,50 ( $J = 7,2$  Hz) ppm, respectivamente, pertencentes aos H do éster. Os sinais correspondentes ao H aromáticos são observados em 7,68 ppm ( $J = 6,0$  Hz, d) e o mais desblindado, em 8,79 ppm ( $J = 3,6$  Hz, sl).

A determinação da piridina no C-5 do isoxazol pôde ser confirmada pela análise do espectro de RMN bidimensional de HMBC, onde o H em 7,1 ppm realiza um acoplamento  $J_2$  com o C isoxazólico em 157,2 ppm ligado ao éster e com o C também isoxazólico em 168,9 ppm ligado à piridina. Este último C também apresenta um acoplamento  $J_2$  como os *meta*-H em relação ao N da piridina, enquanto que o C 157,2 ppm acopla apenas com o H em 7,1 ppm, como pode ser verificado na Figura 35.

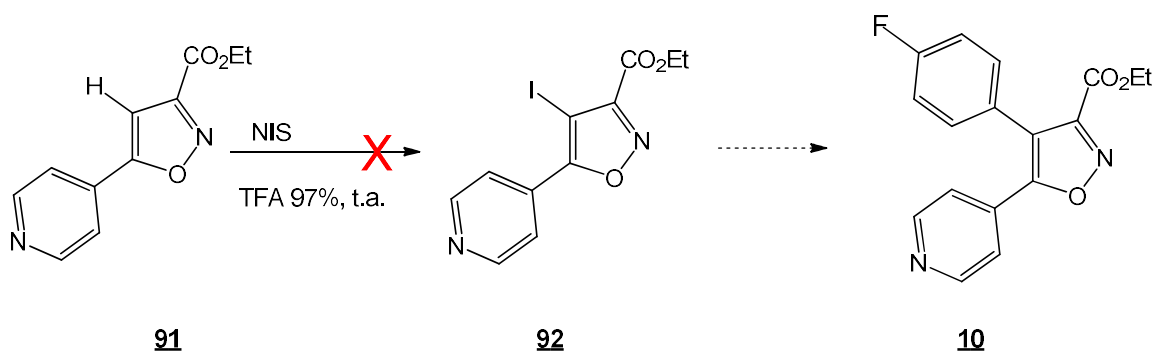
Figura 35. Espectro de RMN HMBC 400 MHz do composto isoxazol **91**



#### 4.6.1.5. Halogenação

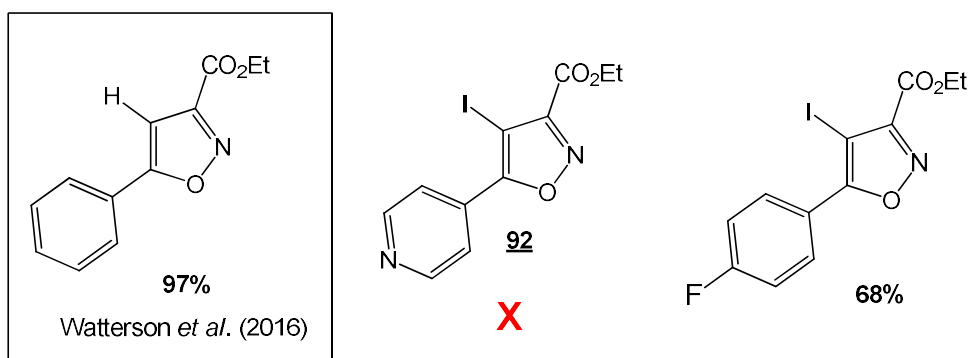
Com a mudança da rota sintética para a formação do núcleo isoxazol, foi necessária a adequação metodológica para formação do *scaffold* aril-isoxazol **10** (Esquema 42), sendo escolhida uma halogenação em C-4 para posterior inserção do 4-fluoro-benzeno nesta posição pela reação de *cross coupling* de Suzuki (1979). (SUZUKI-MIYAURA *et al.*, 1979).

Esquema 42. Halogenação em C-4 **92**.



A halogenação foi baseada no trabalho de Watterson *et al.* (2016), onde uma estrutura semelhante foi halogenada em C3, com rendimento de 97%, na presença de ácido trifluoroacético (TFA) e *N*-iodosuccinimida (NIS). Esta estrutura é um isoxazol com éster em C-3, sendo diferenciada apenas o substituinte fenil em C-5. Mesmo com a similaridade estrutural, nosso cicloaduto isoxazol-éster **96** com o substituinte piridina em C-5 permaneceu intacto, sem a formação do produto halogenado. No presente doutorado, outras vias sintéticas promoveram a formação do isoxazol-éster com 4-fluorofenil em C-5, sendo a posterior halogenação desta realizada com sucesso e um rendimento de 68%, com os mesmos reagentes, como demonstrado na Figura 36.

Figura 36. Rendimentos dos isoxazóis-éster halogenados com diferentes substituintes.

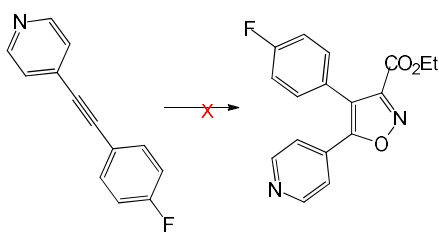


Outras metodologias foram aplicadas no intuito de contornar este problema, inclusive uma halogenação direta. Entretanto, nesta última houve a degradação do produto de partida e nenhuma das outras metodologias aplicadas apresentaram resultado eficaz na obtenção do diaril-isoxazol, como pode ser verificado no Esquema 43.

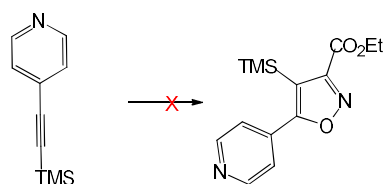
Diante das dificuldades sintéticas que foram se apresentando, outra via de obtenção do diaril isoxazol **11** foi proposta e executada paralelamente, a qual, pode-se dizer antecipadamente, nos levou a formação do composto final.

Esquema 43. Testes para obter moléculas com o *scaffold* diaril-isoxazol **10**

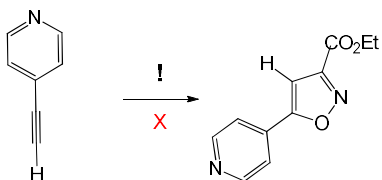
|  |
|--|
|  |
|  |
|  |
|  |



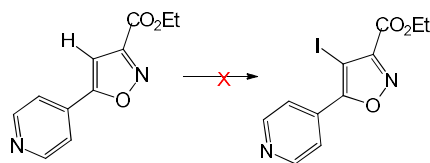
1) *N*-óxido de nitrila, Et<sub>3</sub>N, AcOEt, 80 °C, 18h.



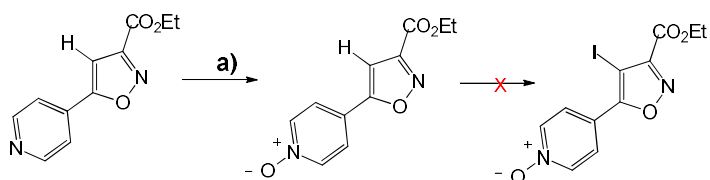
1) *N*-óxido de nitrila, KF, 1,2 - DME, 80 °C, 18h.  
2) *N*-óxido de nitrila, Et<sub>3</sub>N, AcOEt, 80 °C, 18h.



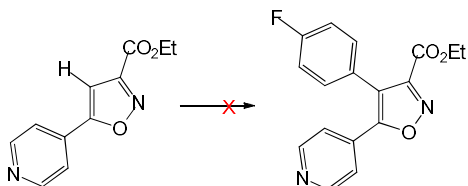
X 1) *N*-óxido de nitrila, Et<sub>3</sub>N, THF, t.a., 48h.  
X 2) *N*-óxido de nitrila, Et<sub>3</sub>N, AcOEt, 0 °C → 80 °C, 3h.  
! 3) *N*-óxido de nitrila, sal de imidazólio, Et<sub>3</sub>N, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>(g), t.a., 48h.



1) NIS, TFA, t.a. → 40 °C, 48h.  
2) NIS, CH<sub>3</sub>CN/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0 °C → 80 °C, 48h.  
3) ICl, CaCO<sub>3</sub>, MeOH/H<sub>2</sub>O, 0 °C → t.a., 48h.



a) *m*-CPBA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, t.a., 1h.  
1) NIS, TFA, t.a. → 40 °C., 48h.

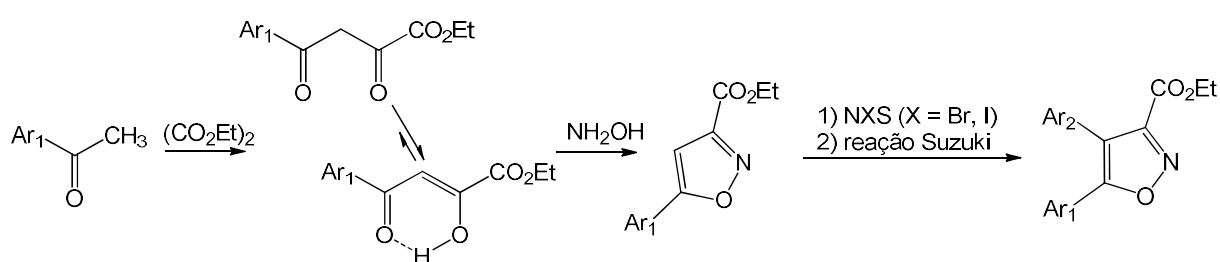


1) 4-fluoro-iodobenzeno, Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, PPh<sub>3</sub>, Pd(OAc)<sub>2</sub>, DMF, N<sub>2</sub>(g), 16h, 100 °C, tubo selado.  
2) 4-fluoro-bromobenzeno, Pd(OAc)<sub>2</sub>, PCy<sub>3</sub>.HBF<sub>4</sub>, DMA, PivOH, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, N<sub>2</sub>(g), 16h, 100 °C, tubo selado.

#### 4.6.2. Síntese via ciclização

Com o objetivo de dar prosseguimento a síntese outra via sintética, foi planejada e executada de acordo com os trabalhos de Banoglu *et al.* (2016) e Brough *et al.* (2008), onde  $\beta$ -ceto-enóis foram ciclizados, formando o núcleo isoxazol dissustituído e submetido a um halogenação e posterior acoplamento de Suzuki (Esquema 44)(BANOGLU *et al.*, 2016; BROUGH *et al.*; 2008).

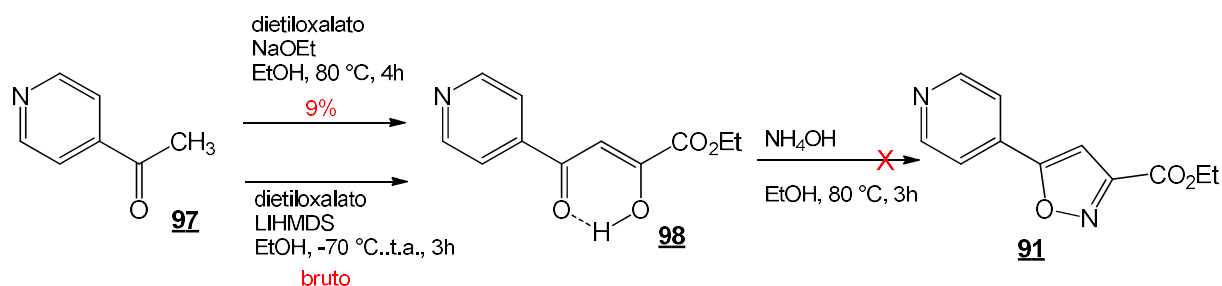
Esquema 44. Síntese do diaril-isoxazol via ciclização  $\beta$ -ceto-enol.



#### 4.6.2.1. Ciclização a partir da acetilpiridina

A formação do isoxazol com a piridina em C5, via ciclização foi ensaiada pelos métodos de Banoglu *et al.* (2016) e Brough *et al.* (2008) com o a obtenção de 9% no rendimento do  $\beta$ -ceto-enol após a lavagem em etanol, porém com degradação do enolato na reação de ciclização com hidróxido de amônio.

Esquema 45. Obtenção do isoxazol a partir da acetilpiridina, via ciclização.



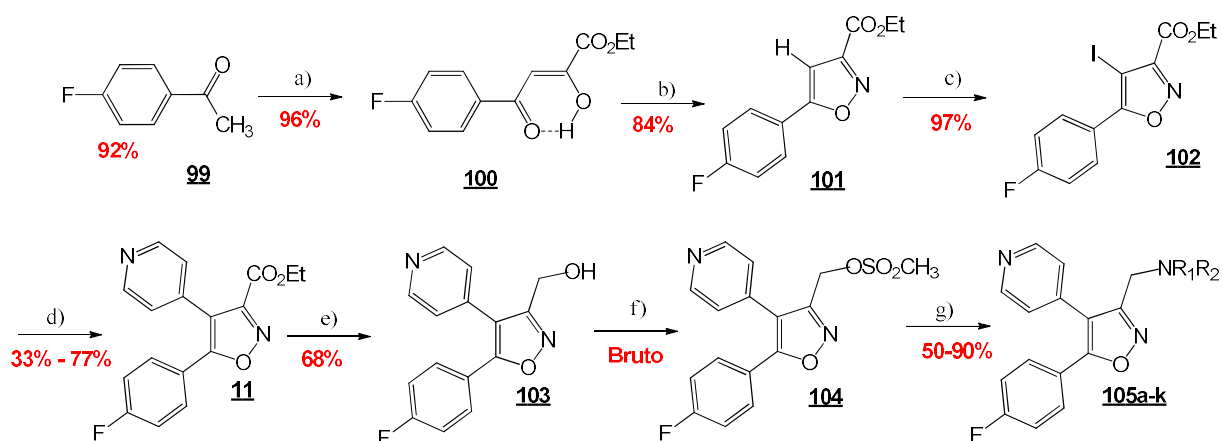
A metodologia aplicada por Okawa T., *et al.* (2017), utiliza a própria acetilpiridina como produto de partida e a base LHMDS a -70 °C para a formação do  $\beta$ -ceto-enol (Esquema 45). Este foi submetido a ciclização em sua forma bruta, havendo a formação do núcleo isoxazol, sendo preferível a formação deste núcleo

por cicloadição 1,3-dipolar (BANOGLU *et al.*, 2016; BROUGH *et al.*, 2008; OKAWA *et al.*, 2017).

#### 4.6.2.2. Ciclização a partir da acetil-4-fluorobenzeno

O 5-(4-fluorofenil)-4-(piridin-4-il)isoxazol-3-carboxilato de etila **101**, foi sintetizado a partir da reação de 1-(4-fluorofenil)etanona **99** com oxalato de dietila e subsequente ciclização do 4-(4-fluorofenil)-2-hidroxi-4-oxobut-2-enoato **100**. Essas duas reações, após várias otimizações, apresentaram altos rendimentos e reduziram em 1 etapa a obtenção da molécula de 5-(4-fluorofenil)isoxazol-3-carboxilato de etila **101**, obtendo sua purificação por lavagem com água. O núcleo de isoxazol foi então halogenado no carbono 4 com *N*-iodosuccinimida e submetido ao acoplamento de Suzuki. Foi observado nesta reação que o produto de partida não foi completamente consumido e que após várias tentativas para aumentar o rendimento, o ácido piridina-4-borônico mostrou ser pouco solúvel no meio de reação. Em seguida, a porção éster em C3 foi convertida em álcool reduzido com boro-hidreto de sódio, em seguida, um bom grupo de saída, o mesilato foi introduzido e a primeira molécula final, 1-(5-(4-fluorofenil)-4-(piridina-4-il)isoxazol-3-il)-*N,N*-dimetilmetanamina **105a** foi obtido (Esquema 46), com inserção do grupo dietilamina.

Esquema 46. Obtenção do isoxazol a partir da 4-fluoro-acetofenona, via ciclização

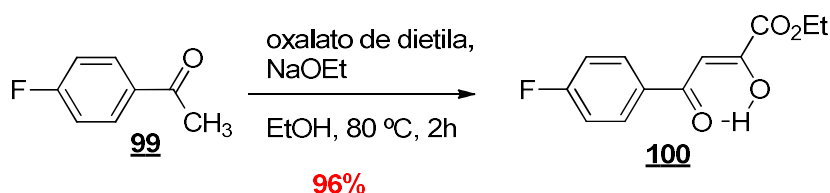


a) oxalato de dietila, NaOEt, EtOH, 80 °C, 2h; b) NH<sub>2</sub>OH, EtOH, 80 °C, 2h; c) NIS, TFA, t.a., 2h; d) ácido piridina-4-borônico, Pd(dppf)Cl<sub>2</sub>, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, THF/H<sub>2</sub>O, MW, 120 °C, 20 min; e) NaBH<sub>4</sub>, EtOH, 30min à 0 °C depois 1,5h à t.a.; f) cloreto de metanossulfonila, TEA, THF, 5 °C depois 1 h à t.a.; g) NHR<sub>1</sub>R<sub>2</sub>, ACN, t.a., 30 min

#### 4.6.2.3. Síntese do $\beta$ -ceto-enol

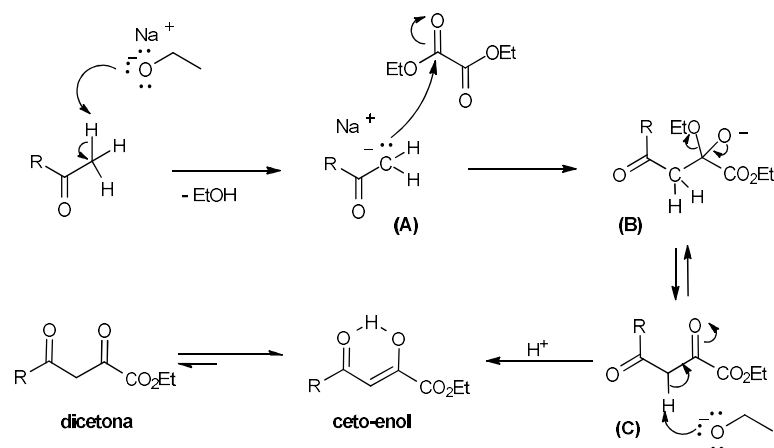
A obtenção da  $\beta$ -ceto-enol-4-fluorofenil **100** foi realizada pela metodologia encontrada no trabalho de Banoglu *et al.* (2016) e Brough *et al.* (2008) com modificação do reagente de partida e do método de purificação (Esquema 47). Houve aqui a condensação de oxalato de dietila com 1-(4-fluorofenil) etanona **99** utilizando etóxido de sódio como base. A purificação foi realizada com lavagem em água, obtendo-se um rendimento de 96%.

Esquema 47. Obtenção do  $\beta$ -ceto-enol partir da 4-fluoro-acetofenona **100**.



A síntese começou com a formação de um enolato de cetona nucleófilo pela adição da 1-(4-fluorofenil)-etanona **99** gota à gota à uma solução de etóxido de sódio 21% (m/v), à temperatura ambiente. O sistema é aquecido e o enolato (A) formado realiza um ataque nucleofílico no oxalato de dietila que é adicionado, produzindo intermediário tetraédrico (B) (Esquema 48).

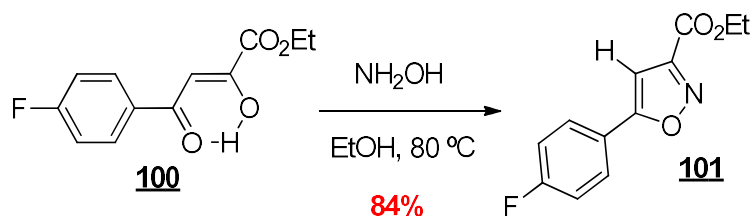
A expulsão do íon etóxido do intermediário tetraédrico instável do inicial aduto de Claisen, produziu uma  $\beta$ -dicetona (C). A base expelida (etóxido de sódio), em seguida, remove um próton alfa ácido a partir da  $\beta$ -dicetona. Após o ajuste para pH = 5, o sistema ceto-enol é formado e entra em equilíbrio com a dicetona, sendo o primeiro de maior proporção. O mecanismo de formação pode ser encontrado no Esquema 48 abaixo. (RADI *et al.*, 2015)

Esquema 48. Mecanismo de obtenção do  $\beta$ -ceto-enolAdaptado Radi *et al.* (2015)

## 4.6.2.4. Síntese do isoxazol via ciclização

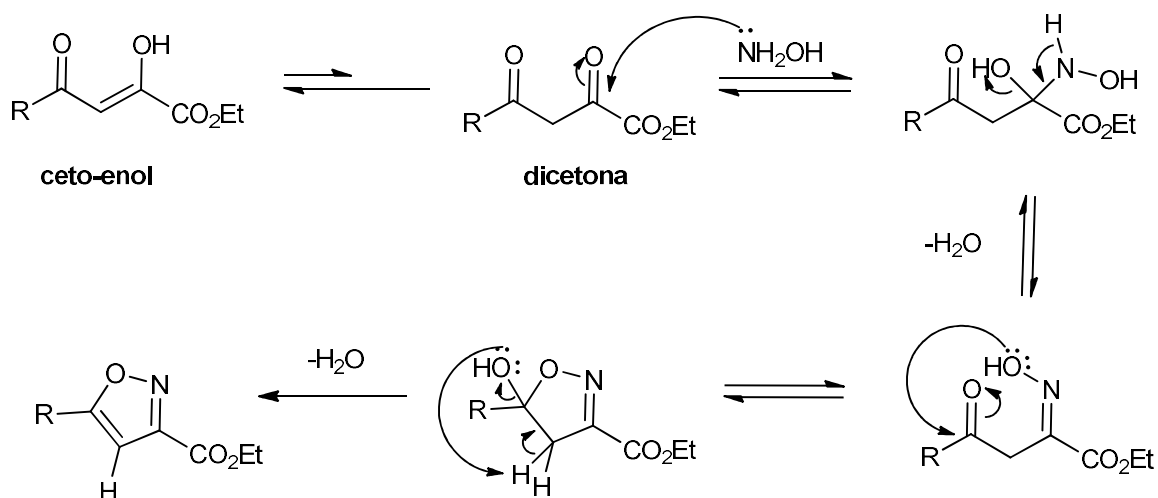
O  $\beta$ -ceto-enol formado é dissolvido em etanol e sobre esta solução é adicionada  $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$  irá promover a desidratação do composto e formação do núcleo isoxazol, a metodologia prossegue sob o modelo apresentado por Banoglu *et al.* (2016) e Brough *et al.* (2008) (Esquema 49).

Esquema 49. Obtenção do isoxazol a partir da 4-fluoro-acetofenona, via ciclização



No mecanismo de ação proposto por Kumar e Kaur (2015), ocorre em primeira etapa o ataque nucleofílico da hidroxilamina à carbonila mais eletrofílica, ligada ao grupo éster. A primeira desidratação ocorre com o rearranjo intramolecular para a formação da ligação  $\pi$  entre o nitrogênio da hidroxilamina e o carbono tetra substituído. Outro ataque nucleofílico ocorre pela hidroxila à carbonila remanescente ligada ao R (4-fluoro-benzeno), devido sua maior eletrofilia em comparação com o éster. A última etapa ocorre com a segunda desidratação e formação da dupla ligação, o que gera o núcleo isoxazol. (esquema 50)

Esquema 50. Condensação da dicetona com hidroxilamina para formação do núcleo isoxazol.



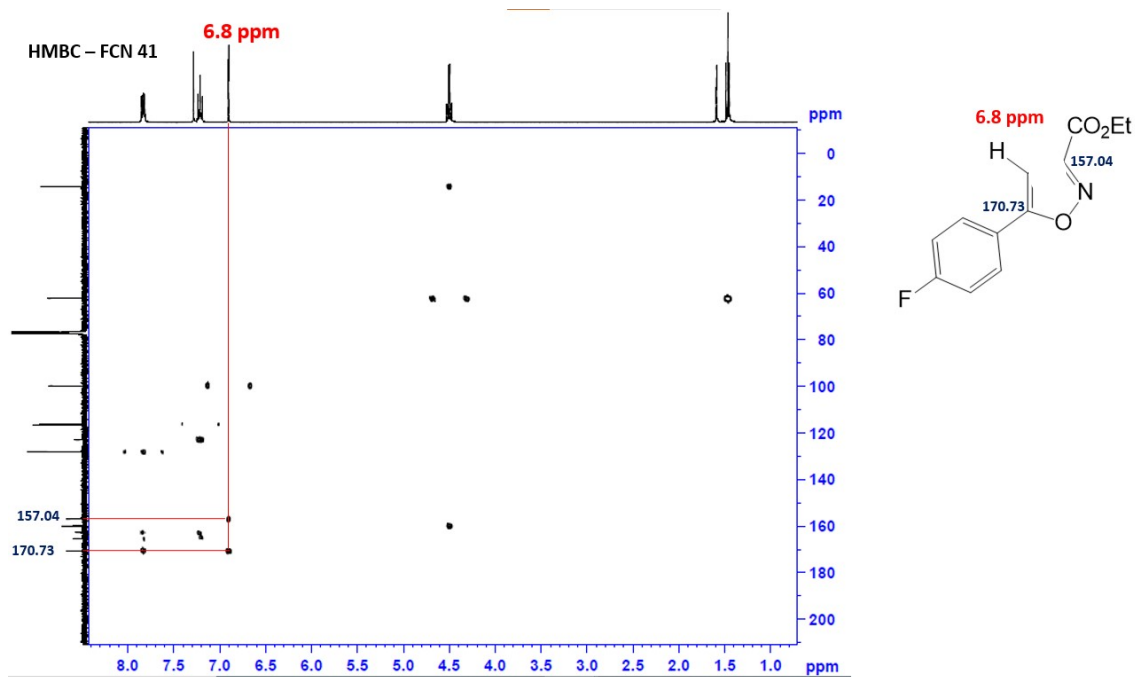
Fonte adaptado: Kumar e Kaur, 2015

A purificação se deu por lavagem em funil sinterizado apenas com água com rendimento de 84%. Lavagens com outros solventes como metanol e/ou éter etílico, levaram a dissolução do produto e queda no rendimento, sendo então o produto levado ao dessecador por 24h para remoção da água remanescente.

O 5-(4-fluorofenil)-isoxazol-3-carboxilato **101** foi verificado no UPLC/MS com a massa correspondente. Análise de RMN  $^1\text{H}$  confirmou a formação do isoxazol pela presença do singlete em 6,8 ppm pertencente ao H do anel isoxazol, dos tripleto e quarteto em 1,45 ppm (t,  $J = 7,1$  Hz, 3H) e 4,49 (q,  $J = 7,2$  Hz, 2H) ppm, respectivamente, pertencentes aos H do éster. Os sinais correspondentes ao H aromáticos são observados em 7,20 ppm (t,  $J = 8,6$  Hz, 2H) e o mais desblindado, em 7,82 ppm (dd,  $J = 8,9$  e 5,2 Hz, 2H).

A determinação do 4-fluorobenzênio no C-5 do isoxazol pôde ser confirmada pela análise do espectro de RMN bidimensional de HMBC, onde o H em 6,8 ppm realiza um acoplamento J2 com os C em 157,04 ppm ligado ao éster, o qual apresenta apenas este acoplamento o H, e o sinal em 170,73 ppm ligado à piridina, o qual também a apresenta um acoplamento J2 como os *meta*-H em relação ao substituinte F, como pode ser verificado na Figura 37.

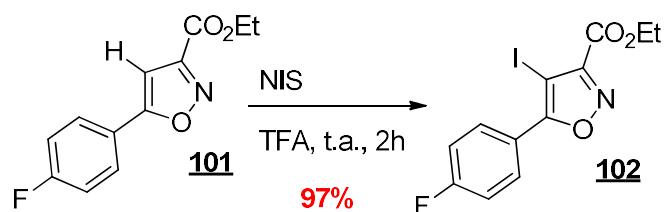
Figura 37. Espectro de RMN HMBC ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) do composto isoxazol **101**.



#### 4.6.2.5. Reação de Halogenação

A princípio, a halogenação se processou pela metodologia de Banoglu *et al.* (2016), utilizando *N*-bromossuccinimida (NBS) na presença de nitrato de amônio cérico (CAN) em quantidade catalítica, porém a reação durou 20h. Foi então aplicada a metodologia de Watterson *et al.* (2016), onde este utilizou *N*-iodossuccinimida (NBI) na presença de ácido trifluoroacético (TFA) à temperatura ambiente, tendo a duração de apenas 2h reacionais, com rendimento de 68% (Esquema 51).

Esquema 51. Halogenação em C-4.

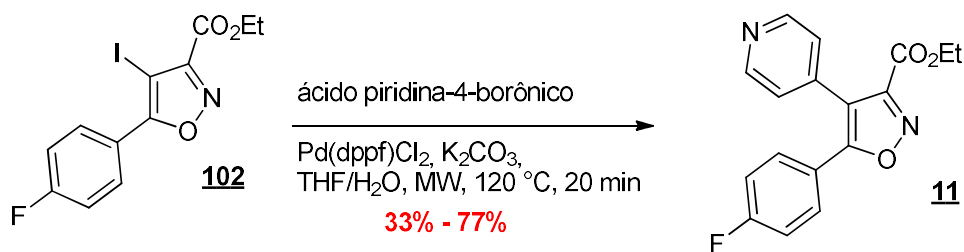


Após a realização da recristalização do NIS, houve o aumento do rendimento para 97%, após a purificação em coluna cromatográfica (WATTERSON *et al.*, 2016).

#### 4.6.2.6. Reação de Acoplamento de Suzuki-Miyaura

Esta etapa reacional foi realizada pelo acoplamento catalítico de Suzuki *et al.* (1979) e com as condições encontradas no trabalho de Brough *et al.* (2008). A formação do *scaffold* diaril-isoxazol **11** foi realizada pela adição do ácido piridina 4-borônico e catalisada pelo Pd(dppf)Cl<sub>2</sub> (Esquema 52) utilizando uma síntese em micro-ondas a 150 watts e 120 °C a 20 minutos. (BROUGH *et al.*; 2008).

Esquema 52. Acoplamento de Suzuki para formação do diaril-isoxazol **5**

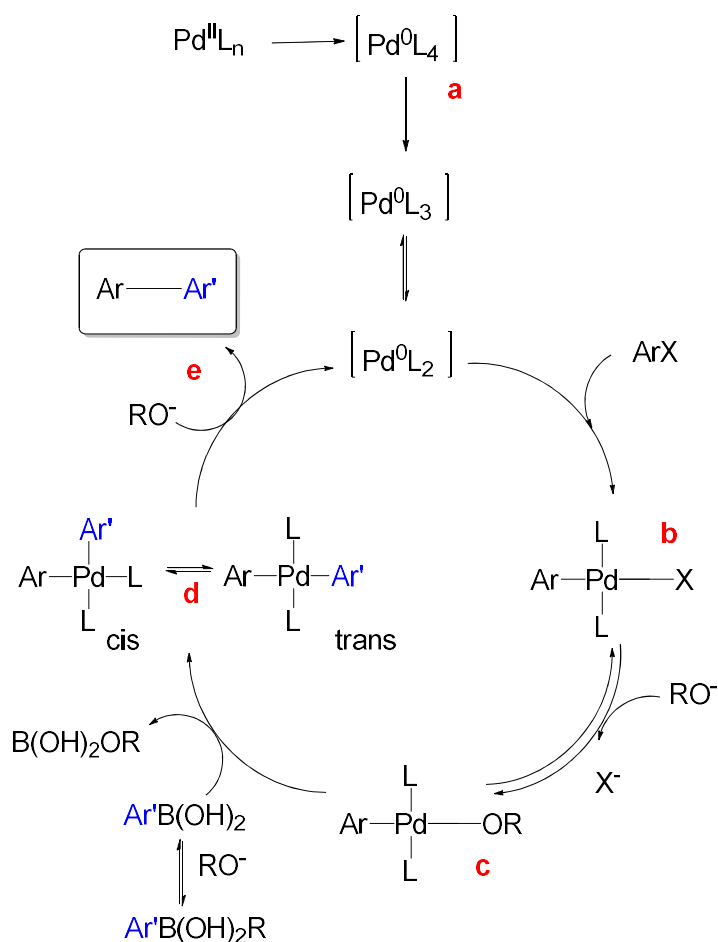


Nesta síntese, o composto halogenado **102** foi visualizado no UPLC/MS mesmo após o fim da reação, diminuindo desta maneira o rendimento do diaril-isoxazol **11**. Para contornar tal problema, houve modificações diversas quanto a temperatura, potência e tempo da reação no micro-ondas, assim como a utilização do TETRAKIS, o que não resultaram em mudanças relacionadas nos rendimentos, nem no consumo total do reagente de partida, sendo um tempo superior a 40 min. capaz de degradar a reação. Em condições mais brandas de temperatura e potência, não houve aumento nos rendimentos, sendo o maior rendimento conseguido o de 77% nas condições 110w, 12 min e 120 °C, sem o mesmo sucesso com a repetição. Sendo ainda o desafio a ser resolvido tal etapa sintética.

O ciclo catalítico de Suzuki-Miyaura de maneira semelhante ao do acoplamento de Sonogashira, com as etapas de adição oxidativa, transmetalção e eliminação redutiva. Após a formação da espécie catalítica Pd (0) (**a**), gerada *in situ* a partir de paládio Pd (II) ou diretamente de derivados de Pd (0), a adição oxidativa do haleto de arila ArX (nosso isoxazol-halogenado **102**) leva ao complexo de paládio

[ArPdXL<sub>n</sub>] (**b**). A etapa de transmetalização ocorre pela conversão do haleto de paládio [ArPdXL<sub>n</sub>] na presença de base RO<sup>-</sup> (K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) para um complexo de alcóxi de paládio nucleofílico [ArPdORL<sub>n</sub>] (**c**) que posteriormente reage com um composto de organoboro neutro Ar'OB(OH)<sub>2</sub> para fornecer o complexo diaril [Ar'PdAOL<sub>n</sub>] (**d**) em um cis – trans equilíbrio. A eliminação redutiva da forma cis dá derivado biaril Ar-ArO (**e**) e Pd (0) (Esquema 53) (HERVÉ *et al.*, 2014).

Esquema 53. Ciclo catalítico da reação de acoplamento Suzuki-Miyaura

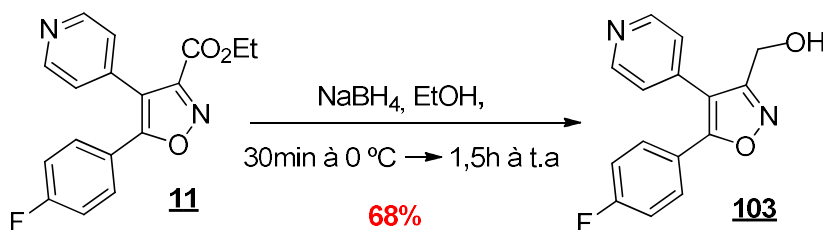


Fonte: Hervé *et al.* (2014). Adaptado.

#### 4.6.2.7. Síntese do álcool em C3

A presença do teto polar em C3 do isoxazol, o grupo éster, permite a modificação a inserção de outros grupos farmacofóricos para o incremento da funcionalidade da estrutura final. O grupamento escolhido para esta posição foram séries de aminas di-substituídas, utilizadas no trabalho de Marchand *et al.* (2015), as quais são relatadas com atividade leishmanicida (MARCHAND *et al.*, 2015).

Esquema 54. Síntese do álcool isoxazólico **103**.



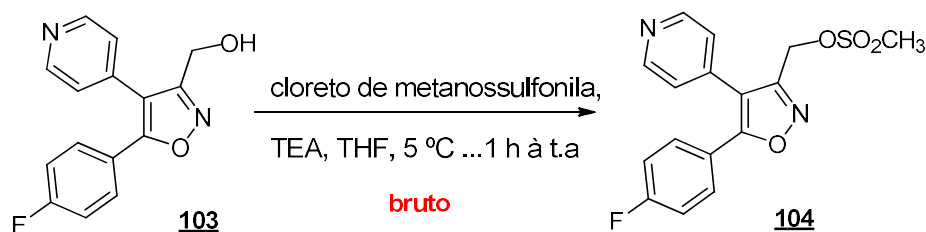
Para isto, houve o planejamento da redução do éster para álcool, o qual facilita a inserção de um bom grupo de saída, como foi o caso da formação do tosilato, o qual será apresentado posteriormente.

A redução ocorre na presença do agente redutor boro-hidreto de sódio ( $\text{NaBH}_4$ ) em etanol (Esquema 54). O reagente é inserido na proporção molar de 3 equivalentes devido a uma transesterificação reportada por Almeida, V *et al.* (2008), sendo a metodologia baseada neste estudo. O agente redutor foi adicionado à  $0^\circ\text{C}$  e em pequenas porções devido a reatividade deste. Após 30 min., a reação ocorreu por mais 1,5 h à temperatura ambiente avendo consumo total do isoxazol-éster e formação do seu derivado álcool. Após evaporação solvente, o excesso de borohidreto de sódio foi removido com extração em solução saturada de  $\text{NaCl}$  e acetato de etila (ALMEIDA, V *et al.*; 2008).

#### 4.6.2.8. Síntese do mesilato **104**

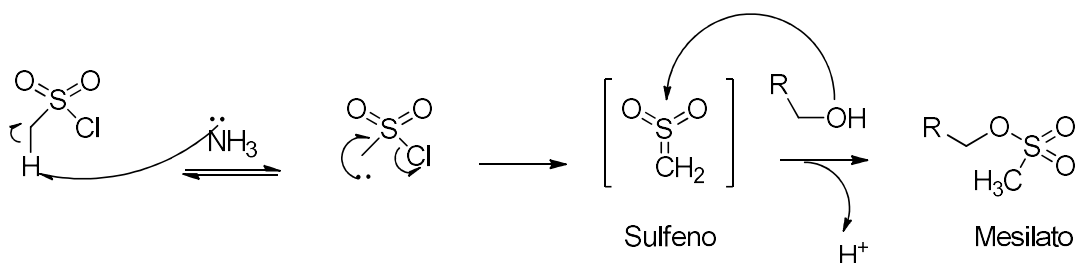
Essa etapa consistiu na formação de um excelente grupo de saída, o mesilato, o qual foi obtido pelo ataque nucleofílico da hidroxila do álcool ao cloreto de metanossulfonila (Esquema 55) (VASTRA; SAINT-JALMES, 2006). A reação ocorreu em 1h e devido baixo rendimento após purificação em coluna cromatográfica, o produto foi utilizado bruto, sendo a reação realizada *one pot*.

Esquema 55. Síntese do mesilato isoxazólico **104**.



Na primeira etapa do mecanismo de ação ocorre a formação do carbânio primário pela captura de um dos hidrogênios do CH<sub>3</sub> no cloreto de metanossulfonila, pela base trietilamina. Em seguida ocorre a eliminação do cloreto pela formação do intermediário sulfeno. Sobre este intermediário ocorre o ataque nucleofílico do álcool e após rearranjo, há a formação do mesilato (Esquema 56).

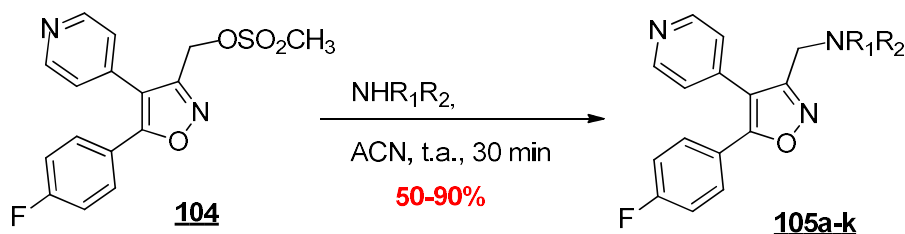
Esquema 56. Mecanismo da reação de formação do mesilato isoxazólico **104**.



#### 4.6.2.9. Síntese do isoxazol final **105**

A formação do composto final, o diaril-isoxazol com amina terciária em C3 **105** foi realizada via reação  $S_N2$  (Esquema 57) utilizando distintas aminas secundárias como nucleófilo e acetonitrila como solvente aprótico, sendo formado até o momento 10 compostos distintos, como apresentado na Tabela 7, com seus respectivos rendimentos.

Esquema 57. Síntese do diaril-isoxazol com amina terciária **105a-k**.



A purificação se deu por cromatografia em coluna, numa mistura de acetonitrila e metanol, sendo necessário o uso de metanol 100% no fim da purificação, devido à alta polaridade do produto formado.

Esquema 58. Mecanismo  $S_N2$  para formação do produto final **105a-k**.

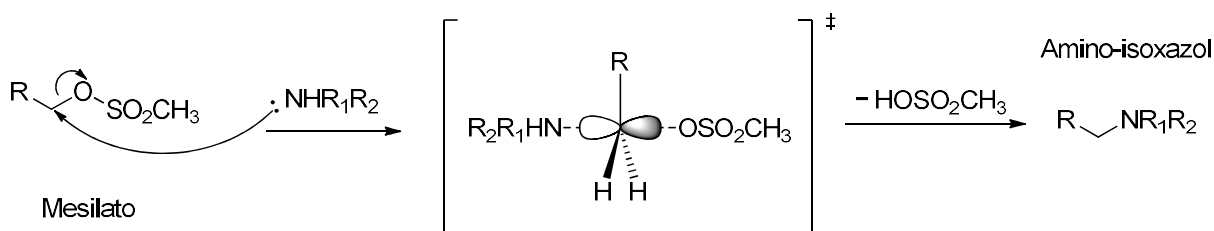
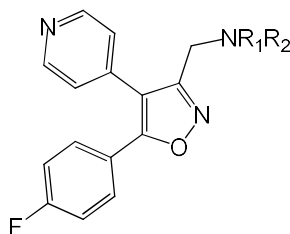


Tabela 7. Rendimentos dos diaril-isoxazóis sintetizados

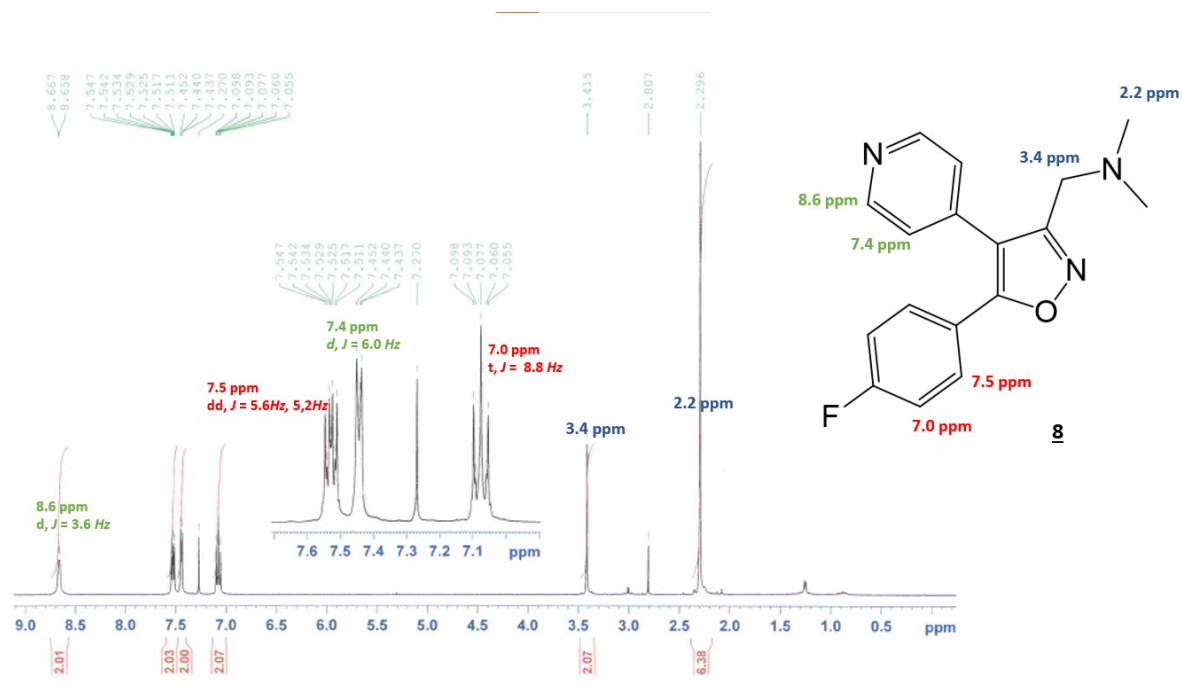


| Composto           | NR <sub>1</sub> R <sub>2</sub>                     | Rendimento (%) |
|--------------------|----------------------------------------------------|----------------|
| <b><u>105a</u></b> | -N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>                  | 82             |
| <b><u>105b</u></b> | -NH <sub>2</sub>                                   | 48             |
| <b><u>105c</u></b> | -NHCH <sub>3</sub>                                 | 59             |
| <b><u>105d</u></b> | -NHCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>                 | 81             |
| <b><u>105e</u></b> | -NHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | 70             |
| <b><u>105f</u></b> |                                                    | 85             |
| <b><u>105g</u></b> |                                                    | 54             |
| <b><u>105h</u></b> |                                                    | 82             |
| <b><u>105i</u></b> |                                                    | 90             |
| <b><u>105j</u></b> |                                                    | 40             |
| <b><u>105k</u></b> |                                                    | 64             |

A molécula **105a** foi analisada de maneira representativa na análise de RMN <sup>1</sup>H, confirmando a formação do diaril-isoxazol pelo desaparecimento do singleto em 6,8 ppm pertencente ao H do anel isoxazol, sendo verificado dois sinais em 8,6 ppm (dl, *J* = 3,6 Hz, 2H) e 7,4ppm (d, *J* = 6,0 Hz, 2H), pertencentes a piridina oriunda da reação de Suzuki. Há também a presença dos singletos em 3,4 ppm (s, 2H) e 2,2 ppm (s, 3H) pertencentes ao CH<sub>2</sub> e CH<sub>3</sub>, respectivamente, da amina terciária

formada. Os sinais correspondentes ao H aromáticos 4-fluororo-benzeno são observados em 7,5 ppm (dd,  $J = 5,6$  Hz, 5,2 Hz, 2H) e em 7,0 ppm (t,  $J = 8,0$  Hz, 2H) como pode ser verificado na figura 38.

Figura 38. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) do composto isoxazol **105a**

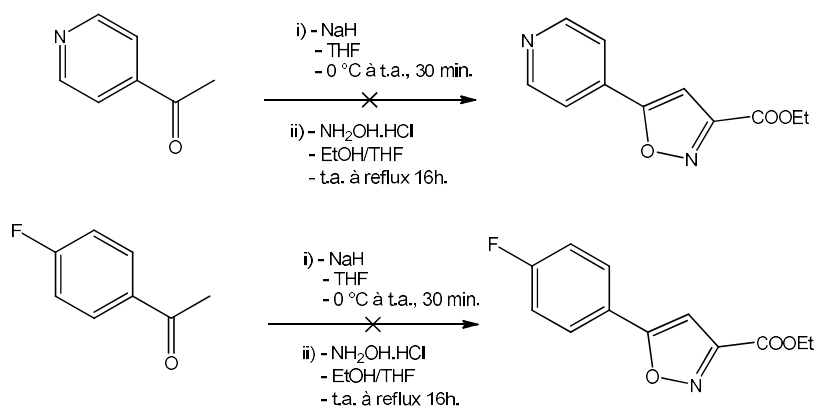


Os onze compostos sintetizados foram enviados para a análise biológica nos teste leishmanicida e nos testes de citotoxicidade sob a direção da professora Teresinha Gonçalves.

#### 4.6.3. Reações alternativas ciclização direta para formação do núcleo isoxazol.

Neste estudo, também foram realizados ensaios no intuito de obter uma formação direta do núcleo isoxazol via *one pot*, pela metodologia de Ye, N. *et al.* (2015). Tal método diminuiria em 1 etapa reacional a formação do isoxazol, entretanto não houve o sucesso sintético (esquema 59).

Esquema 59. Tentativas de obtenção direta do isoxazol.



#### 4.7. Procedimentos Experimentais

Todos os reagentes comerciais foram utilizados sem purificação adicional. Todos os solventes eram reagentes grau P.A. A CCD analítica foi realizada em placas de gel de sílica 60 F254. A cromatografia em coluna foi realizada em gel de sílica Merck 60 (70-230 mesh ASTM) e Cromatografia Flash Grace Reveleris X2TM. Os rendimentos referem-se aos compostos cromatograficamente e espectroscopicamente puros. Os pontos de fusão foram determinados num aparelho de ponto de fusão Electrothermal IA 9000. Os espectros de infravermelho (IV) foram registrados em um espectrofotômetro Shimadzu IRAffinity-1 IR-FT equipado com um acessório ATR MIRacle 10. Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  foram registados em DMSO- $\text{d}_6$  utilizando um espectrômetro Bruker AVANCE de 400 MHz. Os deslocamentos químicos são expressos em ppm, tendo como padrão interno o tetrametilsilano para RMN de  $^1\text{H}$  e os sinais designados como s – singleto, d – dubleto, dd – duplodupleto, sl – sinal largo, ft – falso tripleto e m - multiplete. Os solventes utilizados nas análises foram o DMSO- $\text{d}_6$ ,  $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$  ou  $\text{CH}_3\text{CN-d}_3$ . As análises de LC / MS foram realizadas num sistema Waters ACQUITY UPLC-MS constituído por um espectretro de massa (MS) equipado com uma Interface de Ionização por Electrospray (ESI) e um detector de Array de Fotodiol (PDA). Os HR-ESI-MS foram realizados utilizando um instrumento UFLC-MS (IT-TOF) Shimadzu da FIA - (+/-) - HR-ESI-MS.

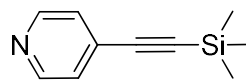
4.7.1. Síntese da 4-((trimetilsilil)etnil)piridina **88**

Óleo amarelo

$C_{10}H_{13}NSi$

MM = 175,30 g.mol<sup>-1</sup>

$R_f$  = 0.30 (ciclohexano/ acetato de etila:  
4/1)



**Método HDL02:** A uma solução de 4-iodopiridina (307 mg, 1,5 mmol) em acetonitrila (1 mL) foi adicionado trimetilsilil acetileno (213  $\mu$ L, 1,5 mmol), iodeto de cobre (28 mg, 0,15 mmol) e trietilamina (1 mL, 7,5 mmol) à temperatura ambiente em atmosfera de nitrogênio. Após 10 minutos, cloreto de trifenilfosfina paládio (52 mg, 0,07 mmol) foi adicionado e a mistura de reação foi levada a um forno de micro-ondas a 150 watts e 120 ° C por 10 minutos. Após resfriamento à temperatura ambiente sob fluxo de ar comprimido, o tubo foi removido. Após adição de água (30 mL), a camada aquosa foi extraída com diclorometano (30 mL). A fase orgânica foi separada e lavada com água (2x30mL) novamente e depois seca sobre sulfato de sódio e filtrada. O solvente foi evaporado in vacuo e o resíduo foi purificado por cromatografia em coluna de gel de sílica usando ciclo-hexano / acetato de etila (1/1) como eluente para dar o composto **88** como um óleo amarelo (200 mg, 76% de rendimento).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ :** 0.26 (s, 9H), 7.31 (d,  $J$  = 5.8 Hz, 2H), 8.56 (s, 2H)

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ :** 149.43(CH), 125.91(CH), 101.88(C), 100.25(C), 26.90(C), -0.35(CH<sub>3</sub>)

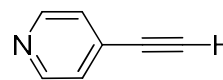
4.7.2. Síntese da 4-etinilpiridina **89**

Óleo amarelo

$C_7H_5N$

MM = 103,12 g.mol<sup>-1</sup>

$R_f$  = 0.20 (ciclohexano/ acetato de etila:  
4/1)



Método FCN-04: A uma solução de 4 - ((trimetilsilil) etinil) piridina (200 mg, 1,94 mmol) em tetra-hidrofurano (THF) (9 mL), sobre atmosfera de nitrogênio (15 min), foi adicionada solução de fluoreto de tetrabutylamônio (TBAF) 1,0 M em THF (233  $\mu$ L, 2,33 mmol) a uma temperatura de -15 ° C e a mistura de reação foi agitada por 30 min nesta temperatura. Depois, o solvente foi evaporado in vacuo e o resíduo foi purificado por cromatografia em coluna de gel de sílica usando apenas diclorometano como eluente (porque o produto é volátil e a próxima evaporação foi realizada sem vácuo, apenas temperatura) para dar o composto **89** como um óleo cinza (73 mg, rendimento de 71%) que pode oxidar a preto, sem degradação.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ :** 8.60 (d, <sup>2</sup>J = 6.0 Hz, 2H), 7.35 (d, <sup>2</sup>J = 6.0 Hz, 2H), 3.30 (s, 1H,).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ :** 149.8 (2CH), 130.3 (C), 126.0 (2CH), 81.8 (C), 80.9 (CH).

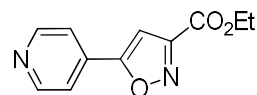
4.7.3. Síntese da 5-(4-piridina)isoxazol-3- etil carboxilato **91**

Óleo amarelo

$C_{11}H_{10}N_2O_3$

MM = 218,21 g.mol<sup>-1</sup>

$R_f$  = 0.30 (ciclohexano/ acetato de etila:  
4/1)



Método FCN-29 (FCN-18): A uma solução de 4-etinilpiridina (206 mg, 2 mmol) em terc-butanol / água (1: 1) (12 mL) foi adicionado acetato de etil clorooximida (303 mg, 2 mmol), um aquoso solução 10 mol% de ascorbato de sódio (200 µL, 0,20 mmol), uma solução aquosa 2 mol% de sulfato de cobre pentahidratado (200 µL, 0,04 mmol) e bicarbonato de sódio (727 mg, 8,6 mmol), e foi agitada durante 1h na sala temperatura. Após adição de água, a camada aquosa foi extraída com diclorometano (3 x 100 mL). Os extractos orgânicos combinados foram secos sobre sulfato de sódio e filtrados. O solvente foi evaporado in vacuo e o resíduo foi purificado por cromatografia em coluna de gel de sílica usando ciclohexano/acetato de etila (8/2) como eluente para dar o composto **96** como um sólido bege (mg, 23% de rendimento).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ:** 8.79 (d, 1H,  $J$  = 3.6 Hz, H<sub>Ar</sub>), 7.68 (d, 1H,  $J$  = 6 Hz, H<sub>Ar</sub>), 7.13 (s, 1H), 4.49 (q, 2H,  $J$  = 7.2 Hz, CH<sub>2</sub>), 1.45 (t, 2H,  $J$  = 7.2 Hz, CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ:** 167.2 (2C=O), 162.8 (C<sub>5</sub>), 162.7 (C<sub>3</sub>), 160.9 (C<sub>1</sub>), 135.9 (C), 135.7 (C), 128.7 (2CH), 128.7 (2CH), 128.4 (1CH), 128.2 (1CH), 127.8 (2CH), 127.5 (2CH), 113.6 (C<sub>2</sub>), 95.5 (C<sub>4</sub>), 74.2 (C<sub>6</sub>), 71.3 (CH<sub>2</sub>), 71.0 (CH<sub>2</sub>), 70.0 (CH<sub>2</sub>), 61.0 (CH<sub>2</sub>), 14.1 (CH<sub>3</sub>).

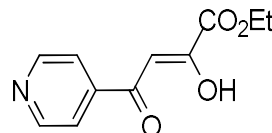
4.7.4. Síntese da (Z)-etil 2-hidróxi-4-oxo-4-(4-piridina)-but-2-enoato **98**

Óleo amarelo

$C_{11}H_{11}NO_4$

MM = 221.21 g.mol<sup>-1</sup>

$R_f$  = 0.30 (ciclohexano/ acetato de etila:  
6/4)



Método FCN-34: A uma mistura de 4-acetilpiridina (241  $\mu$ L, 2,2 mmol) e oxalato de dietil (299  $\mu$ L, 2,2 mmol) em tetrahidrofurano (4,4 mL) foi adicionada gota a gota uma solução de bis (trimetilsilil) amida de lítio 2 mL, 2,2 mmol) a uma temperatura de -70 °C em atmosfera de nitrogênio. Após a adição, foi agitada durante 3h à temperatura ambiente. Concluído este tempo, foi adicionada, gota a gota, uma solução de ácido clorídrico 5M (1,9 mL) à temperatura de -60 °C e permaneceu em agitação por 30min à temperatura ambiente. O pH foi ajustado para 4 com solução de hidróxido de sódio 1M e o precipitado foi lavado com água e éter dietílico.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ :** 16.06 (s, 1H, OH), 8.40 (s, 1H, CONH<sub>2</sub>), 8.01 (s, 1H, CONH<sub>2</sub>), 7.54-7.43 (m, 10H, H<sub>Ar</sub>), 6.61 (s, 1H, H<sub>5</sub>), 5.45 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 5.32 (s, 2H, CH<sub>2</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ :** 171.0 (C=O), 168.3 (C<sub>2</sub>), 164.2 (C<sub>6</sub>), 162.9 (C<sub>4</sub>), 135.4 (C), 135.2 (C), 128.7 (2CH), 128.6 (2CH), 128.5 (1CH), 128.2 (1CH), 128.1 (2CH), 127.6 (2CH), 113.6 (CN), 97.2 (C<sub>1</sub>), 90.1 (C<sub>5</sub>H), 83.6 (C<sub>3</sub>), 71.2 (CH<sub>2</sub>), 70.5 (CH<sub>2</sub>).

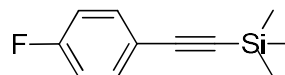
## 4.7.5 - Síntese da ((4-fluorofenil)etnil)trimetilsilano

Óleo cinza

$C_{11}H_{13}FSi$

MM = 192.30 g.mol<sup>-1</sup>

$R_f$  = 0.27 (ciclohexano/ acetato de etila:  
1/4)



**Método FCN-24:** Uma mistura de 4-fluoriodobenzeno (230  $\mu$ L, 2 mmol), trimetilsilil acetileno (0,6 mL, 2,15 mmol), iodeto de cobre (66 mg, 0,18 mmol) e trietilamina (0,7 mL, 2,5 mmol) em tolueno (10 mL) permaneceu em uma atmosfera de nitrogênio. Após 10 minutos, tetraquis (trifenilfosfina) paládio (142 mg, 0,06 mmol) foi adicionado e a mistura de reação foi levada à temperatura ambiente durante 3h. O solvente foi evaporado in vacuo e o resíduo foi purificado por cromatografia em coluna de gel de sílica usando ciclohexano / acetato de etila (9/1) como eluente para dar o composto 05 como um óleo incolor (97 mg, rendimento de 50%).

**$^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ :** 7.44 (dd,  $J$  = 8.9, 5.4 Hz, 2H), 6.99 (t,  $J$  = 8.8 Hz, 2H), 1.55 (s, 1H), 0.24 (s, 9H).

**$^{13}C$  NMR (100 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ :** 162.59 (CF), 133.89 (CH), 119.27 (C), 115.46 (CH), 107.14 – 104.04 (C), 93.85 (C), -0.07 (CH<sub>3</sub>)

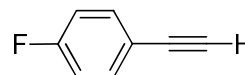
## 4.7.6 - Síntese da 1-etinil-4-fluorobenzeno

Óleo marrom

$C_8H_5F$

MM = 120.12 g.mol<sup>-1</sup>

$R_f$  = 0.30 (ciclohexano/ acetato de etila:  
6/4)



**Método FCN-32:** A uma solução de ((4-fluorofenil) etinil) trimetilsilano 05 (164 mg, 0,19 mmol) em tetrahidrofurano (THF) (4,3 mL), em atmosfera de nitrogênio (15 min), foi adicionado fluoreto de tetrabutilamônio (TBAF) solução 1,0 M em THF (274 mL, 0,94 mmol) a uma temperatura de -15 ° C e a mistura de reação foi agitada durante 30 min nesta temperatura. Depois, o solvente foi evaporado in vacuo e o resíduo foi purificado por cromatografia em coluna de gel de sílica usando apenas diclorometano como eluente (porque o produto é volátil) para dar o composto 06 como um sólido cinza (67 mg, rendimento de 65%).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ:** 7.49 (dd,  $J$  = 8.9, 5.4 Hz, 2H), 7.03 (t,  $J$  = 8.8 Hz, 2H), 3.05 (s, 1H), 1.56 (s, 1H).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ:** 162.77 (CF), 134.05 (CH), 118.18 (C), 115.61 (CH), 82.58 (C), 67.96 (C), 29.42 (C), 25.61 (C).

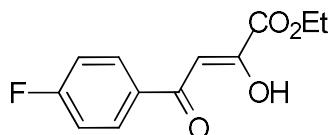
4.7.7 - Síntese da (Z)-etil 4-(4-fluorofenil)-2-hidróxi-4-oxobut-2-enoato **100**

Sólido amarelo

$C_{12}H_{11}FO_4$

MM = 238.21 g.mol<sup>-1</sup>

$R_f$  = 0.32 (ciclohexano/ acetato de etila:  
4/1)



**Método FCN-17:** A uma solução etanólica de etóxido de sódio 21% (m / v) (2,5 mL, 7,7 mmol) foi adicionada uma solução de 1- (4-fluorofenil) etanona (0,5 g, 3,62 mmol) dissolvido em etanol gota a gota durante 5 minutos com agitação e a solução foi agitada durante mais 5 minutos à temperatura ambiente. Após, foi adicionado oxalato dietílico (0,88 mL, 6,48 mmol) e a reação permaneceu em refluxo por 4h. Após a reação atingir a temperatura ambiente, o pH foi ajustado para 4 com ácido clorídrico 5M, o precipitado foi filtrado e lavado com água para dar o composto **100** como um sólido amarelo (827 mg, 96 % de rendimento).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ:** 15.24 (s, 1H, OH), 8.05-8.02 (m, 2H, H<sub>Ar</sub>), 7.19 (t,  $J$  = 8.8 Hz, 2H, H<sub>Ar</sub>), 7.04 (s, 1H, CH), 4.40 (q,  $J$  = 7.2 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.42 (t,  $J$  = 7.2 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ:** 189.6 (C=O), 169.2 (C=O), 167.4 (C-F), 162.1 (C=O), 131.3 (C), 130.5 (2CH), 116.2 (2CH), 97.7 (CH), 62.6 (CH<sub>2</sub>), 14.0 (CH<sub>3</sub>).

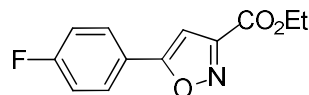
4.7.8 - Síntese da 5-(4-fluorofenil)isoxazol-3-etil carboxilato **101**

Sólido amarelo

$C_{12}H_{10}FNO_3$

MM = 235.21 g.mol<sup>-1</sup>

$R_f$  = 0.32 (ciclohexano/ acetato de etila:  
4/1)



**Método FCN - 41:** A uma solução de (Z) -etil 4- (4-fluorofenil) -2-hidroxi-4-oxobut-2-enoato **100** (406 mg, 1,7 mmol) em etanol (15 mL) foi adicionada hidroxilamina cloridrato (148 mg, 2,12 mmol) e a solução foi agitada em refluxo durante 1,5 h. Após a reação atingir a temperatura ambiente, o pH foi ajustado para 4 com ácido clorídrico 5M, o precipitado foi filtrado e lavado com água para dar o composto **101** como um sólido amarelo ( 336 mg, 84% de rendimento).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ :** 7.82 (dd,  $J$  = 8.9, 5.2 Hz, 2H), 7.20 (t,  $J$  = 8.6 Hz, 2H), 6.89 (s, 1H), 4.49 (q,  $J$  = 7.1 Hz, 2H), 1.58 (s, 1H), 1.45 (t,  $J$  = 7.1 Hz, 3H).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ:** 170.7 (C-O), 169.2 (C=O), 167.4 (C), 165.3-162.1 (C-F), 157.0 (C=N), 128.0 (2CH), 123.0 (C), 116.3 (2CH), 99.7 (CH), 62.2 (CH<sub>2</sub>), 14.1 (CH<sub>3</sub>).

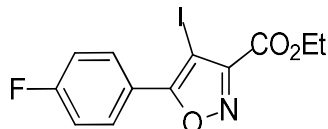
4.7.9 - Síntese da 5-(4-fluorofenil)-4-iodoisoxazol-3-etil carboxilato **102**

Sólido cinza

$C_{12}H_9FINO_3$

MM = 361.11 g.mol<sup>-1</sup>

$R_f$  = 0.47 (ciclohexano/ acetato de etila:  
4/1)



**Método FCN-27:** Uma mistura de 5- (4-fluorofenil) isoxazol-3-etil carboxilato **101** (200 mg, 0,42 mmol) e N-iodosuccimida (50 mg, 0,5 mmol) em ácido trifluoroacético (2 mL) foi agitada em temperatura ambiente por 1, 5h Após, foi adicionado diclorometano e a evaporação dos solventes foi realizada, o precipitado formado foi extraído com acetato de etila (100 mL) e água (100 mL). As camadas orgânicas foram lavadas com as soluções de hidróxido de sódio 1N (), bissulfito de sódio 3% (m / v) (), salmoura () e secas sobre sulfato de sódio, filtradas e evaporadas à secura. O óleo resultante foi purificado por cromatografia em coluna de gel de sílica usando ciclohexano / acetato de etila (9/1) como eluente para dar o composto **102** como um sólido bege (115 mg, 73% de rendimento).

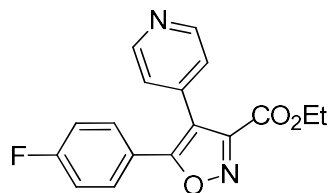
4.7.10 - Síntese da 5-(4-fluorofenil)-4-(piridin-4-il)isoxazol-3- etil carboxilato **11**

Sólido amarelo

$C_{17}H_{13}FN_2O_3$

MM = 312.30 g.mol<sup>-1</sup>

$R_f$  = 0.53 (ciclohexano/ acetato de etila:  
1/4)



**Método FCN-28:** Uma mistura de 5- (4-fluorofenil) -4-iodoisoxazol-3-etil carboxilato **102** (286 mg, 0,8 mmol), ácido 4-piridinilborânico (240 mg, 1,6 mmol) e carbonato de potássio (220 mg , 1,6 mmol) em uma solução de tetra-hidrofurano / água 10: 1 (8,8 mL) e uma atmosfera de nitrogênio. Após 10 minutos, [1,1'-Bis (difenilfosfino) ferroceno] dicloropaládio (II) (29 mg, 0,8 mmol) foi adicionado e a mistura de reação foi levada a um forno de microondas a 120 watts e 150 ° C por 10 minutos. O solvente foi evaporado à vácuo e o resíduo foi purificado por cromatografia em coluna de gel de sílica usando ciclohexano / acetato de etila (9/1) como eluente para dar o composto 05 como um óleo incolor (384 mg, 77% de rendimento).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$ : 8.71 (d,  $J$  = 4.6 Hz, 2H), 7.53 – 7.41 (m, 2H), 7.31 (d,  $J$  = 5.4 Hz, 2H), 7.07 (t,  $J$  = 8.6 Hz, 2H), 4.36 (q,  $J$  = 7.1 Hz, 2H), 1.31 (t,  $J$  = 7.1 Hz, 3H).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$ : 167.02 (C-O), 165.31-162.79 (CF), 159.49 (C=O), 154.75 (C), 150.07 (C), 137.88 (C), 129.39 (C), 125.16 (CH), 122.41 (C), 116.51 (C), 116.29 (CH), 113.90 (C), 62.35 (CH<sub>2</sub>), 13.89 (CH<sub>3</sub>).

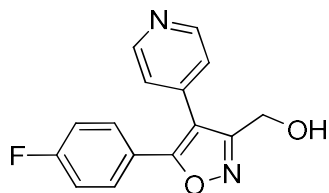
4.7.11 - Síntese da (5- (4-fluorofenil) -4- (piridin-4-il) isoxazol-3-il) metanol **103**

Óleo amarelo

$C_{15}H_{11}FN_2O_2$

MM = 270.26 g.mol<sup>-1</sup>

$R_f$  = 0.30 (ciclohexano/ acetato de etila:  
6/4)



**Method FCN-47:** A uma solução de 5- (4-fluorofenil) -4- (piridin-4-il) isoxazol-3-etil carboxilato **11** (312 mg, 1 mmol) em etanol (5 mL) foi adicionado boro-hidreto de sódio (114 mg, 3 mmol) em porções e a solução foi agitada a 0 °C durante 1h e à temperatura ambiente durante 1h. Depois que o solvente foi evaporado e uma extração foi realizada com acetato de etila (20 mL) e salmoura 3x (20 mL) para gerar o composto **103** como um óleo amarelo (183 mg, 68% de rendimento).

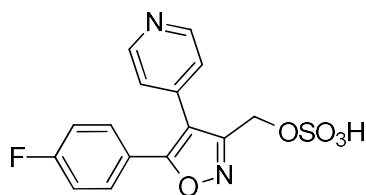
**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ:** 8.66 (d,  $J$  = 4.4 Hz, 1H), 7.58 – 7.47 (m, 1H), 7.41 (d,  $J$  = 6.0 Hz, 1H), 7.16 – 6.99 (m, 1H), 4.73 (s, 1H), 2.56 (s, 1H).

4.7.12 - Síntese da (5- (4-fluorofenil) -4- (piridin-4-il) isoxazol-3-il) metil sulfato de metila **104**

Óleo amarelo

$C_{16}H_{13}FN_2O_5S$

MM = 350.32 g.mol<sup>-1</sup>



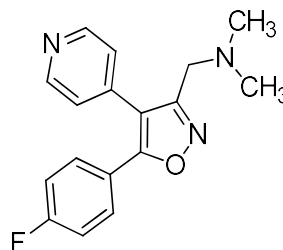
**Método FCN-49:** Para uma mistura de (5- (4-fluorofenil) -4- (piridin-4-il) isoxazol-3-il) metanol **103** (270 mg, 1 mmol) e trietilamina (21 mL, 1,5 mmol) em tetrahydrofurano (1 , 2 mL), foi adicionado cloreto de metanossulfonil (84 mL, 1,1 mmol) gota a gota a 5 °C e foi agitado à temperatura ambiente 20 min. Após verificado em UPLC/MS, a reação prosseguiu *one pot* com as respectivas aminas secundárias.

4.7.13 - Síntese da 1- (5- (4-fluorofenil) -4- (piridin-4-il) isoxazol-3-il) -N, N-dimetilmatanamina **105a**

Sólido amorfo amarelo

$C_{17}H_{16}FN_3O$

MM = 297.13 g.mol<sup>-1</sup>



**Método MN-656:** Para uma mistura de (5- (4-fluorofenil) -4- (piridin-4-il) isoxazol-3-il) metanol **104** (100 mg, 0,37 mmol) e TEA ( 77 mL, 0,55 mmol) em THF (0,5 mL), foi adicionado cloreto de metanossulfonila (68 mL, 0,87 mmol) gota a gota a 0 °C sob atmosfera de N<sub>2</sub> (g). Após verificado em UPLC/MS, a reação prosseguiu *one pot* onde foi adicionada diisopropiletilamina (71 mL, 0.41mmol) e dimetilamina 2N THF (32 mL, 1.04 mmol). Após adição de 2 mL de dimetilamina e *overnight*, houve remoção do solvente e extração com água/AcOEt. O solvente orgânico foi evaporado *in vacuo* e o resíduo foi purificado por cromatografia em coluna de gel de sílica usando éter CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (98/2) como eluente. Ainda houve recristalização em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Foi então obtido o composto **105a** como um sólido amorfo amarelo (103 mg, rendimento de 82%).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ:** 8.65 (d, *J* = 3.6 Hz, 2H), 7.54 – 7.51 (m, 2H), 7.43 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H), 7.05 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), 3.41 (s, 2H), 1.31 (s, 6H).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ:** 165.03 (C), 162.52 (C), 160.34 (C), 150.35 (CH), 138.77 (C), 129.45 (CH), 124.69 (C), 123.39 (C), 116.30 (CH), 113.86 (C), 52.97 (CH<sub>2</sub>), 45.14 (CH<sub>3</sub>).

**IV-FT – ATR (cm<sup>-1</sup>), principais sinais.**

3059,10 ; 2816,07 ; 1620,21; 1517,98 ; 1408,04; 1230,58; 848,68; 682,80.

**MS (ESI), m/z (%):**

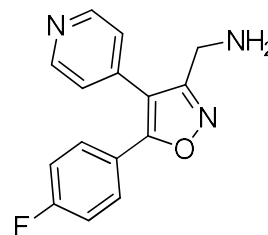
298,2 (M+1)

4.7.14 - Síntese da *N*-((5-(4-fluorofenil)-4-(piridin-4-il)isoxazol-3-il)metanamina **105b**

Sólido amorfo amarelo

 $C_{15}H_{12}FN_3O$ MM = 269.10 g.mol<sup>-1</sup>

PF = 99,5 °C



**Método MN-657:** Para uma mistura de (5- (4-fluorofenil) -4- (piridin-4-il) isoxazol-3-il) metanol **104** (215 mg, 0,79 mmol) e TEA ( 166 mL, 1,19 mmol) em THF (2 mL), foi adicionado cloreto de metanossulfonila (68 mL, 0,87 mmol) gota a gota a 0 °C sob atmosfera de N<sub>2</sub> (g). Após verificado em UPLC/MS, a reação prosseguiu *one pot* onde foi adicionada diisopropiletilamina (180 mL, 1.04 mmol) e amônia em MeOH 7N (138 mL, 1.04 mmol). Após adição de 1.3 eqv. de amônia e *overnight*, houve remoção do solvente e extração com água/AcOEt. O solvente orgânico foi evaporado *in vacuo* e o resíduo foi purificado por cromatografia em coluna de gel de sílica usando éter CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (95/5) como eluente. Ainda houve lavagem com éter de petróleo 2x. Foi então obtido o composto **105b** como um sólido amorfo amarelo (103 mg, rendimento de 48%).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ:** 8.70 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H), 7.50 (dd, *J* = 8.8, 5.3 Hz, 2H), 7.32 (d, *J* = 5.8 Hz, 2H), 7.07 (t, *J* = 8.6 Hz, 2H), 3.93 (s, 2H), 1.64 (s, 2H)

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ:** 165.12 (C), 163.68 (C), 162.54 (C), 150.76 (CH), 138.53 (C), 129.31 (CH), 124.37 (CH), 123.24 (C), 116.34 (CH), 116.12 (CH), 112.37 (C), 37.28 (CH<sub>2</sub>).

**IV-FT – ATR (cm<sup>-1</sup>), principais sinais.**

3375,43; 3053,32 ; 1604,77; 1516,05 ; 1408,04; 1219,01; 831,21.

**MS (ESI), m/z (%):**

270,1 (M+1)

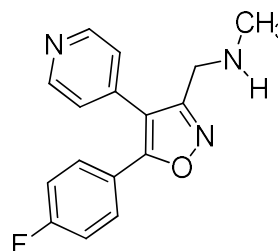
4.7.15 - Síntese da *N*-((5-(4-fluorofenil)-4-(piridin-4-il)isoxazol-3-il)-*N*-metilmetanamina **105c**

Sólido amorfo amarelo claro

$C_{16}H_{14}FN_3O$

MM = 283.11 g.mol<sup>-1</sup>

PF = 91 °C



**Método MN-662:** Para uma mistura de (5- (4-fluorofenil) -4- (piridin-4-il) isoxazol-3-il) metanol **104** (150 mg, 0,55 mmol) e TEA ( 116 mL, 0,83 mmol) em THF (0,75 mL), foi adicionado cloreto de metanossulfonila (47 mL, 0,6 mmol) gota a gota a 0 °C sob atmosfera de N<sub>2</sub> (g). Após verificado em UPLC/MS, a reação prosseguiu *one pot* onde foi adicionada diisopropiletilamina (124 mL, 0.71 mmol) e metilamina em THF 2N (0,83 mL, 1.67 mmol). Após adição de 3 eqv. de metilamina e *overnight*, houve remoção do solvente e extração com água/AcOEt. O solvente orgânico foi evaporado *in vacuo* e o resíduo foi purificado por cromatografia em coluna de gel de sílica usando éter CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (98/2 depois 95/5) como eluente. Ainda houve lavagem com éter de petróleo. Foi então obtido o composto **105c** como um sólido amorfo amarelo claro (92 mg, rendimento de 58%).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ:** 8.69 (dd, *J* = 4.5, 1.5 Hz, 2H), 7.57 – 7.45 (m, 2H), 7.36 (dd, *J* = 4.4, 1.6 Hz, 2H), 7.12 – 7.00 (m, 2H), 3.78 (s, 2H), 2.48 (s, 3H), 1.65 (s, 1H).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ:** 165.09 (C), 162.53 (C), 161.25 (C), 150.64 (CH), 138.59 (C), 129.36 (CH), 124.43 (CH), 123.29 (C), 116.33 (CH), 116.11 (CH), 113.00 (C), 45.67 (CH<sub>3</sub>), 36.07 (CH<sub>2</sub>).

**IV-FT – ATR (cm<sup>-1</sup>), principais sinais.**

3323,35; 2846,93; 1606,70; 1517,98 ; 1473,62; 1228,66; 813,96.

**MS (ESI), m/z (%):**

284,1 (M+1)

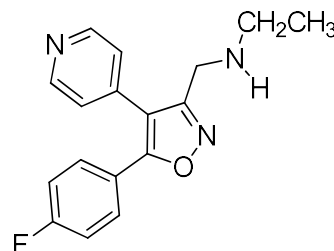
4.7.16 – Síntese da *N*-((5-(4-fluorofenil)-4-(piridina-4-il)isoxazol-3-il)metil)etanamina **105d**

Sólido amorfo branco

$C_{17}H_{16}FN_3O$

$M_r = 297.12 \text{ g.mol}^{-1}$

PF = 91 °C



**Método MN-665:** Para uma mistura de (5- (4-fluorofenil) -4- (piridina-4-il) isoxazol-3-il) metanol **104** (150 mg, 0,55 mmol) e TEA ( 116 mL, 0,83 mmol) em THF (0,6 mL), foi adicionado cloreto de metanossulfonila (47 mL, 0,61 mmol) gota a gota a 0 °C sob atmosfera de  $N_2$  (g). Após verificado em UPLC/MS, a reação prosseguiu *one pot* onde foi adicionada diisopropiletilamina (0,125 mL, 0.72 mmol) e etilamina sol. Aq 70% (58 mL, 0.72 mmol). Após adição de 2 mL de etilamina e *overnight*, houve remoção do solvente e extração com água/AcOEt. O solvente orgânico foi evaporado *in vacuo* e o resíduo foi purificado por cromatografia em coluna de gel de sílica usando éter dietílico/MeOH (95/5) como eluente. Ainda houve maceração com éter dietílico e diclorometano. Foi então obtido o composto **105d** como um sólido branco amorfo (179 mg, rendimento de 81%).

**$^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ :** 8.68 (dd,  $J = 4.5, 1.5$  Hz, 2H), 7.57 – 7.45 (m, 2H), 7.37 (dd,  $J = 4.5, 1.5$  Hz, 2H), 7.12 – 7.02 (m, 2H), 3.82 (s, 2H), 2.70 (q,  $J = 7.1$  Hz, 2H), 1.48 (sl, 1H), 1.43 (s, 1H), 1.10 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3H).

**$^{13}C$  NMR (100 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ :** 165.04 (C), 162.51 (C), 161.60 (C), 150.61 (CH), 138.65 (C), 129.35 (CH), 124.46 (C), 123.32 (C), 116.31 (CH), 116.09 (CH), 112.98 (C), 43.69 ( $CH_2$ ), 30.29 ( $CH_2$ ), 15.07 ( $CH_3$ ).

**IV-FT – ATR ( $cm^{-1}$ ), principais sinais.**

3304,06 ; 2966,52 ; 1602,85; 1479,40 ; 1409,96; 1226,73; 1161,15; 827,46.

**MS (ESI),  $m/z$  (%):**

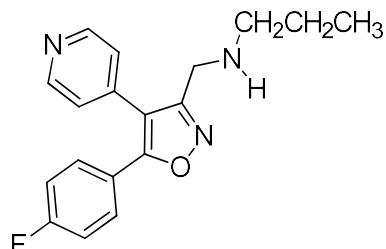
298,1 (M+1)

4.7.17. Síntese da *N*-((5-(4-fluorofenil)-piridinidin-4-il)isoxazol-3-il)metilpropilamina **105e**

Sólido amarelo

 $C_{18}H_{18}FN_3O$ MM = 311.14 g.mol<sup>-1</sup>

PF = 78 °C



**Método MN-659:** Para uma mistura de (5- (4-fluorofenil) -4 184 iridinadin-4-il) isoxazol-3-il) metanol **104** (120 mg, 0,44 mmol) e TEA ( 93 mL, 0,66 mmol) em THF (0,6 mL), foi adicionado cloreto de metanossulfonila (38 mL, 0,61 mmol) gota a gota a 0 °C sob atmosfera de N<sub>2</sub> (g). Após verificado em UPLC/MS, a reação prosseguiu *one pot* onde foi adicionada diisopropiletilamina (0,101 mL, 0.44 mmol) e propilamina (47 mL, 0.58 mmol). Após adição de 1eqv. dos reagentes e *overnight*, houve remoção do solvente e extração com água/AcOEt. O solvente orgânico foi evaporado *in vacuo* e o resíduo foi purificado por cromatografia em coluna de gel de sílica usando CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (98/2) como eluente. Ainda houve maceração com éter dietílico e diclorometano. Foi então obtido o composto **105e** como um sólido amarelo claro (97 mg, rendimento de 70%).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ:** 8.69 (d, *J* = 5.7 Hz, 2H), 7.57 – 7.47 (m, 2H), 7.38 (dd, *J* = 4.5, 1.5 Hz, 2H), 7.27 (s, 1H), 7.11 – 7.04 (m, 2H), 3.81 (s, 2H), 2.62 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 1.80 (s, 2H), 1.50 (dd, *J* = 14.5, 7.3 Hz, 2H), 1.44 (s, 1H), 1.25 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 0.90 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ:** 165.03 (C), 162.53 (C), 161.60 (C), 150.58 (CH), 138.68 (C), 129.37 (CH), 124.48 (C), 123.34 (C), 116.32 (CH), 116.10 (CH), 113.03 (C), 51.38 (CH<sub>2</sub>), 43.79 (CH<sub>2</sub>), 22.95 (CH<sub>2</sub>), 11.66 (CH<sub>3</sub>).

**IV-FT – ATR (cm<sup>-1</sup>), principais sinais.**

3300,20; 2924,09; 1622,13; 1604,77; 1516,05; 1469,76; 1226,73; 1165,00; 827,46.

**MS (ESI), m/z (%):**

312,2 (M+1)

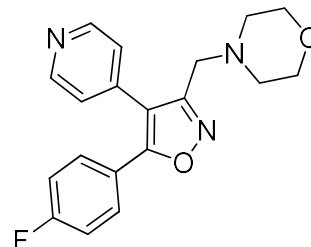
4.7.18 - Síntese da 4-((5-(4-fluorofenil)-4-(piridin-4-il)isoxazol-3-il)metil)morfolina **105f**

Cristal amarelo claro

$C_{19}H_{18}FN_3O_2$

MM = 339.14 g.mol<sup>-1</sup>

PF = 105 °C



**Método MN-663:** Para uma mistura de (5- (4-fluorofenil) -4- (piridin-4-il) isoxazol-3-il) metanol **104** (150 mg, 0,55 mmol) e TEA (0,116mL, 0,83mmol) em THF (0,75 mL), foi adicionado cloreto de metanossulfonila (0,047 mL, 0,61 mmol) gota a gota a 0 °C sob atmosfera de N<sub>2</sub> (g). Após verificado em UPLC/MS, a reação prosseguiu *one pot* onde foi adicionada diisopropiletilamina (0,125 mL, 0.72 mmol) e morfolina (62 mL, 0.72 mmol). Após adição de 1eqv. dos reagentes e *overnight*, houve remoção do solvente e extração com água/AcOEt. O solvente orgânico foi evaporado *in vacuo* e o resíduo foi purificado por cromatografia em coluna de gel de sílica usando CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (98/2) como eluente. Ainda houve maceração com éter dietílico e diclorometano. Foi então obtido o composto **105f** como um sólido amarelo claro (163 mg, rendimento de 86%).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ:** 8.67 (d, *J* = 5.5 Hz, 2H), 7.60 – 7.48 (m, 2H), 7.43 (dd, *J* = 4.6, 1.4 Hz, 2H), 7.15 – 7.01 (m, 2H), 5.30 (s, 1H), 3.75 – 3.59 (m, 4H), 3.49 (s, 2H), 2.59 – 2.44 (m, 4H), 1.81 (s, 1H).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ:** 165.29 (C), 165.05 (C), 162.54 (C), 159.55 (CH), 150.35 (C), 138.83 (CH), 129.38 (C), 124.69 (C), 123.25 (C), 116.33 (CH), 116.11 (C), 66.88 (CH<sub>2</sub>), 53.22 (CH<sub>2</sub>), 52.24 (CH<sub>2</sub>)

**IV-FT – ATR (cm<sup>-1</sup>), principais sinais.**

3066,82 ; 2804,50 ; 1602,85; 1514,12 ; 1224,80; 1112,93; 858,32.

**MS (ESI), m/z (%):**

340,1 (M+1)

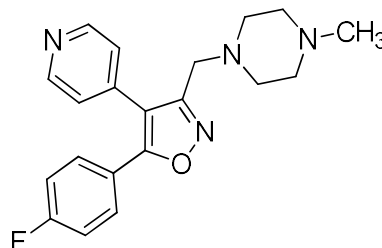
4.7.19 - Síntese da 5-(4-fluorofenil)-3-((4-metilpiperazin-1-il)metil)-4-(piridin-4-il)isoxazol **105g**

Sólido amorfo amarelo

$C_{20}H_{21}FN_4O$

MM = 352.17g.mol<sup>-1</sup>

PF = 114,5 °C



**Método MN-664:** Para uma mistura de (5- (4-fluorofenil) -4- (piridin-4-il) isoxazol-3-il) metanol **104** (150 mg, 0,55 mmol) e TEA (0,116mL, 0,83mmol) em THF (1 mL), foi adicionado cloreto de metanossulfonila (0,047 mL, 0,61 mmol) gota a gota a 0 °C sob atmosfera de N<sub>2</sub> (g). Após verificado em UPLC/MS, a reação prosseguiu *one pot* onde foi adicionada diisopropiletilamina (0,125 mL, 0.72 mmol) e metilpiperazina (73 mg, 0.72 mmol). Após adição de 1eqv. dos reagentes e *overnight*, houve remoção do solvente e extração com água/AcOEt. O solvente orgânico foi evaporado *in vacuo* e o resíduo foi purificado por cromatografia em coluna de gel de sílica usando CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (95/5) como eluente. Foi então obtido o composto **105g** como um sólido amarelo claro (105 mg, rendimento de 53%).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ:** 8.66 (d, *J* = 5.7 Hz, 2H), 7.52 (m, 2H), 7.43 (dd, *J* = 4.5, 1.5 Hz, 2H), 7.11 – 7.02 (m, 2H), 3.50 (s, 2H), 2.76 – 2.33 (m, 8H), 2.35 – 2.24 (m, 3H).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ:** 165.11 (C), 162.51 (C), 159.30 (C), 138.87 (CH), 129.39 (CH), 124.76 (C), 123.32 (C), 116.20 (CH), 113.84 (C), 54.99 (CH<sub>2</sub>), 52.59 (CH<sub>2</sub>), 51.76 (CH<sub>2</sub>), 45.86 (CH<sub>2</sub>), 26.88 (CH<sub>3</sub>).

**IV-FT – ATR (cm<sup>-1</sup>), principais sinais.**

3030,17 ; 2798,85 ; 1604,77; 1514,12 ; 1290,38; 1226,73; 1164,15; 837,11; 682,80.

**MS (ESI), m/z (%):**

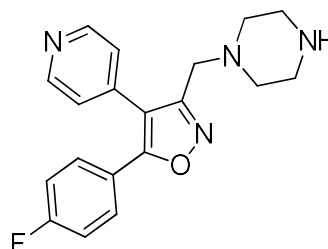
353,2 (M+1)

4.7.20 - Síntese da 5-(4-fluorofenil)-3-(piperazin-1-ilmetil)-4-(piridin-4-il)isoxazol **105h**

Sólido amorfo branco

 $C_{19}H_{19}FN_4O$ MM = 338.15 g.mol<sup>-1</sup>

PF = 88,5 °C



**Método MN-666:** Para uma mistura de (5- (4-fluorofenil) -4- (piridin-4-il) isoxazol-3-il) metanol **104** (175 mg, 0,65 mmol) e TEA (0,136mL, 0,97mmol) em THF (2 mL), foi adicionado cloreto de metanossulfonila (0,55 mL, 0,71 mmol) gota a gota a 0 °C sob atmosfera de N<sub>2</sub> (g). Após verificado em UPLC/MS, a reação prosseguiu *one pot* onde foi adicionada diisopropiletilamina (0,146 mL, 0.84 mmol) e piperazina (73 mg, 0.84 mmol). Após adição de 1eqv. dos reagentes e *overnight*, houve remoção do solvente e extração com água/AcOEt. O solvente orgânico foi evaporado *in vacuo* e o resíduo foi purificado por cromatografia em coluna de gel de sílica usando CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (95/5) como eluente. Foi então obtido o composto **105h** como um sólido amarelo claro (170 mg, rendimento de 68%).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, , CDCl<sub>3</sub>) δ:** 8.66 (d, *J* = 4.4 Hz, 2H), 7.53 (dd, *J* = 8.4, 5.3 Hz, 2H), 7.45 (d, *J* = 5.4 Hz, 2H), 7.08 (t, *J* = 8.5 Hz, 2H), 3.47 (s, 2H), 2.84 (s, 4H), 2.48 (s, 4H), 1.80 (s, 1H).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ:** 165.11 (C), 162.52 (C), 159.86 (C), 150.31 (CH), 138.91 (C), 129.39 (CH), 124.78 (C), 123.35 (C), 118.49 (CH), 113.88 (C), 54.06 (CH<sub>2</sub>), 52.43 (CH<sub>2</sub>), 45.99 (CH<sub>3</sub>).

**IV-FT – ATR (cm<sup>-1</sup>), principais sinais.**

3282,84 ; 2899,01 ; 1625,99; 1602,85; 1514,12; 1473,62 ; 1224,80; 1159,22; 815,89.

**MS (ESI), m/z (%):**

339,1 (M+1)

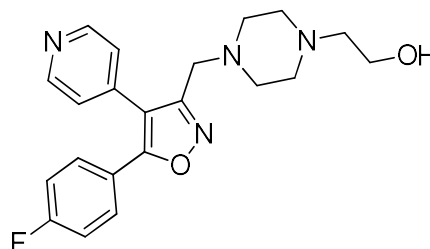
4.7.21 - Síntese da 2-(4-((5-(4-fluorofenil)-4-(piridin-4-il)isoxazol-3-il)metil)piperazin-1-il)etanol **105i**

Sólido amorfo amarelo

$C_{21}H_{23}FN_4O_2$

MM = 382.18 g.mol<sup>-1</sup>

PF = 114,5 °C



**Método MN-667:** Para uma mistura de (5- (4-fluorofenil) -4- (piridin-4-il) isoxazol-3-il) metanol **104** (175 mg, 0,65 mmol) e trietilamina (0,135mL, 0,97mmol) em THF (2 mL), foi adicionado cloreto de metanossulfonila (0,55 mL, 0,71 mmol) gota a gota a 0 °C sob atmosfera de N<sub>2</sub> (g). Após verificado em UPLC/MS, a reação prosseguiu *one pot* onde foi adicionada diisopropiletilamina (0,146 mL, 0.84 mmol) e piperidina metanol (109 mg, 0.84 mmol). Após adição de 1eqv. dos reagentes e *overnight*, houve remoção do solvente e extração com água/AcOEt. O solvente orgânico foi evaporado *in vacuo* e o resíduo foi purificado por cromatografia em coluna de gel de sílica usando CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (98/2) como eluente, sendo o sólido obtido macerado em éter de petróleo. Foi então obtido o composto **105i** como um sólido amarelo claro (170 mg, rendimento de 68%)

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, , CDCl<sub>3</sub>) δ:** 8.66 (d, *J* = 5.9 Hz, 2H), 7.57 – 7.49 (m, 2H), 7.43 (dd, *J* = 4.5, 1.6 Hz, 2H), 7.13 – 7.03 (m, 2H), 3.65 – 3.57 (m, 2H), 3.51 (s, 2H), 2.65 – 2.35 (m, 8H).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ:** 165.13 (C), 162.54 (C), 159.85 (C), 150.31 (CH), 138.89 (C), 129.39 (CH), 124.75 (C), 123.32 (C), 116.32 (CH), 113.81 (C), 59.12 (CH<sub>2</sub>), 57.67 (CH<sub>2</sub>), 52.75 (CH<sub>2</sub>), 51.79 (CH<sub>2</sub>).

**IV-FT – ATR (cm<sup>-1</sup>), principais sinais.**

3228,84 ; 2929,87 ; 1637,71; 1516,05; 1477,47; 1404,18 ; 1222,87; 1155,36; 835,18.

**MS (ESI), m/z (%):**

383,1 (M+1)

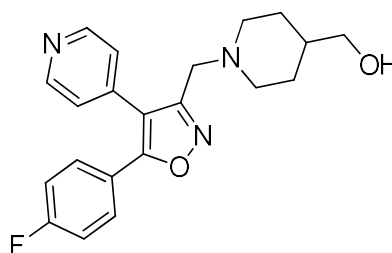
4.7.22. Síntese da 5(4-((5-(4-fluorofenil)-4-(piridin-4-il)isoxazol-3-il)metil)piperidin-1-il)metanol **105j**

Sólido amorfo branco

$C_{21}H_{22}FN_3O_2$

MM = 367.17 g.mol<sup>-1</sup>

PF = 123,5 °C



**Método MN-670:** Para uma mistura de (5- (4-fluorofenil) -4- (piridin-4-il) isoxazol-3-il) metanol **104** (270 mg, 1 mmol) e trietilamina (21 mL, 1,5 mmol) em tetrahydrofurano (1 mL), foi adicionado cloreto de metanossulfonil (84 mL, 1,1 mmol) gota a gota a 0 °C sob atmosfera de N<sub>2</sub> (g). Após verificado em UPLC/MS, a reação prosseguiu *one pot* onde foi adicionada diisopropiletilamina (0,83 mL, 0.48 mmol) e piperidina metanol (0,55 mg, 0.48 mmol)/1mL THF. Após adição de 1eqv. dos reagentes e *overnight*, houve remoção do solvente e extração com água/AcOEt. O solvente orgânico foi evaporado *in vacuo* e o resíduo foi purificado por cromatografia em coluna de gel de sílica usando CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (97/3) como eluente, sendo o sólido obtido macerado em éter de petróleo. Foi então obtido o composto **105j** como um sólido amarelo claro (55 mg, rendimento de 40%).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ:** 8.64 (d, *J* = 4.3 Hz, 2H), 7.57 – 7.49 (m, 2H), 7.45 (d, *J* = 4.5 Hz, 2H), 7.07 (t, *J* = 8.5 Hz, 2H), 4.80 (s, 1H), 3.47 (d, *J* = 8.9 Hz, 4H), 2.90 (d, *J* = 11.2 Hz, 2H), 2.08 (t, *J* = 11.5 Hz, 2H), 1.72 (d, *J* = 12.6 Hz, 2H), 1.50 (s, 1H), 1.18 (dd, *J* = 22.3, 9.9 Hz, 2H).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ:** 165.03 (C), 162.49 (C), 160.28 (C), 150.19 (CH), 139.01 (C), 129.39 (CH), 124.82 (C), 123.37 (C), 116.28 (CH), 113.89 (C), 67.69 (CH<sub>2</sub>), 53.14 (CH<sub>2</sub>), 52.21 (CH<sub>2</sub>), 38.30 (CH<sub>2</sub>), 28.80 (CH<sub>2</sub>).

**IV-FT – ATR (cm<sup>-1</sup>), principais sinais.**

3250,05 ; 2904,80 ; 1602,85; 1516,05; 1475,54; 1406,11 ; 1224,80; 1161,15; 833,25.

**MS (ESI), m/z (%):**

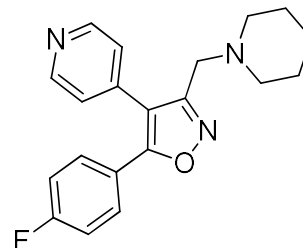
368,2 (M+1)

#### 4.7.23 - Síntese da 5-(4-fluorofenil)-3-(piperidin-1-il-metil)-4-(piridin-4-il)isoxazol **105k**

Sólido amorfo amarelo claro

C<sub>20</sub>H<sub>20</sub>FN<sub>3</sub>O

MM = 337.16 g.mol<sup>-1</sup>



**Método MN-668:** Para uma mistura de (5- (4-fluorofenil) -4- (piridin-4-il) isoxazol-3-il) metanol **104** (160 mg, 0,59 mmol) e trietilamina (0,4 mL, 0,76 mmol) em tetrahydrofurano (1 mL), foi adicionado cloreto de metanossulfonil (84 mL, 0,84 mmol) gota a gota a 5 °C e foi agitado à temperatura ambiente 20 min. Após verificado em UPLC/MS, a reação prosseguiu *one pot* onde foi adicionada diisopropiletilamina (0,133 mL, 0.77 mmol) e piperidina (0,76 mL, 0.77 mmol). Após *overnight*, houve remoção do solvente e extração com água/AcOEt. O solvente orgânico foi evaporado *in vacuo* e o resíduo foi purificado por cromatografia em coluna de gel de sílica usando CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (97/3) como eluente, sendo o sólido obtido macerado em éter de petróleo. Foi então obtido o composto **105k** como um sólido amarelo claro (128 mg, rendimento de 64%).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ:** 8.65 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H), 7.55 – 7.51 (m, 2H), 7.43 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H), 7.05 (t, *J* = 8.4 Hz, 2H), 3.43 (s, 2H), 2.43 (sl, 4H), 1.49 (sl, 1H), 1.52 (m, 4H), 1.43 (d, *J* = 4.8 Hz, 2H).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ:** 165.03 (C), 162.48 (C), 160.38 (C), 150.21 (CH), 139.01 (C), 129.45 (CH), 124.88 (C), 123.47 (C), 116.26 (CH), 114.00 (C), 54.15 (CH<sub>2</sub>), 52.60 (CH<sub>2</sub>), 25.95 (CH<sub>2</sub>), 24.06 (CH<sub>2</sub>).

**IV-FT – ATR (cm<sup>-1</sup>), principais sinais.**

2941,44 ; 2792,93 ; 1600,92; 1512,19; 1406,11; 1224,80 ; 1157,29; 825,53.

**MS (ESI), m/z (%):**

338,1 (M+1)

## **5.CAPÍTULO 3 – Avaliação do potencial biológico das moléculas**

### **5.1 Objetivos**

#### **5.1.1 Objetivo Geral**

Avaliar as atividades anti-*Trypanosoma cruzi* e anti-*Leishmania* dos novos derivados sintetizados e a citotoxicidade destes em células tumorais humanas e célula não cancerígena.

#### **5.1.2. Objetivos Específicos.**

- a - Avaliar a atividade anti-*Leishmania* dos compostos **105a-k** e **4a-k** frente às espécies *L. amazonensis* e *L. infantum*, em todas as formas evolutivas dos parasitas;
- b - Avaliar a atividade tripanocida dos compostos **105a-k** e **4a-k** frente a todas as formas evolutivas do *T. cruzi*;
- c - Avaliar a citotoxicidade dos compostos **105a-k** e **4a-k** frente às células tumorais MCF-7, NCI-H292, Jukart e HT-29 e célula normal VERO.

## 5.2. Metodologia

### 5.2.1. Avaliação da atividade anti-*Leishmania*

#### 5.2.1.1. Ensaios com promastigotas de *L. amazonensis* e *L. infantum*

Formas promastigotas de *L. 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 completo na concentração de  $1 \times 10^6$  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 o veículo foram utilizados como controle negativo. Após a incubação, os poços foram lavados e foi adicionada solução de CPRG (500 µM, 0,5% de Nonidet P-40, em PBS), seguida de nova incubação por 10 minutos, a 22 °C. Foi realizada a leitura da absorbância a 570 nm no espectrofotômetro THERMO SCIENTIFIC Multiskan FC. A atividade leishmanicida dos compostos foi verificada pela diminuição no número de promastigotas nas culturas tratadas em comparação com a cultura controle sem tratamento. A miltefosina foi utilizada como controle positivo. Os valores de IC<sub>50</sub> foram calculados por análise de regressão utilizando o *software* GraphPad Prism. Cada ensaio foi realizado em duplicata.

#### 5.2.1.2. Ensaios com amastigotas de *L. amazonensis* e *L. infantum*

Para esta avaliação, macrófagos RAW 264.7 ( $3 \times 10^5$  células/mL) foram incubados para aderência por 1 h, a 37 °C e atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>. Após essa incubação inicial foram acrescentadas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. infantum* na proporção de 15 parasitas/macrófago, por um período de 6 h, a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. Os parasitas não internalizados foram removidos por lavagem e a cultura foi incubada novamente na presença de diferentes concentrações dos compostos (3,125 a 100 µg/mL) por 24 h, a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. Amastigotas incubadas apenas com meio de cultura e com miltefosina foram utilizadas como controle negativo e positivo, respectivamente. Após a incubação, os poços foram lavados e foi adicionada solução de CPRG (500 µM, 0,5% de Nonidet P-40, em PBS), seguida de nova incubação por 18 h, a 22 °C. Foi realizada a leitura da absorbância a 570 nm no espectrofotômetro THERMO SCIENTIFIC Multiskan FC. A atividade leishmanicida dos compostos foi verificada pela diminuição no número de amastigotas intracelulares nas culturas tratadas em comparação com a cultura controle sem tratamento. Os valores de CI<sub>50</sub> foram calculados por análise de regressão utilizando o software *GraphPad Prism*. Cada ensaio foi realizado em duplicata.

### 5.2.2. Citotoxicidade

A citotoxicidade em células de mamíferos foi avaliada através de ensaios com MTT. Esse ensaio baseia-se na redução dos sais amarelos de tetrazólio por redutases mitocondriais de células metabolicamente ativas. Cristais de formazan são formados no interior dessas células, que devem ser lisadas para a solubilização e posterior análise por espectrofotometria. Uma vez que a quantidade de formazan produzida é diretamente proporcional ao número de células viáveis, quanto maior for a viabilidade celular, maior será a proporção de redução do MTT e maior será a absorbância.

Os fibroblastos da linhagem L929 (célula normal, não tumoral) foram plaqueados em placas de 96 poços, fundo reto e incubadas por 24h, a 37°C e atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>, para aderência. Após esse tempo, os compostos foram adicionados nas concentrações de 6,25 a 200 µg/mL e incubados novamente por um período de 48h. Foram utilizados poços apenas com meio de cultura como controle negativo. Após a incubação foi acrescentado 25 µL de MTT (3 - (4,5-dimetiltiazol-2-il)

-2,5-brometo difenil tetrazólio) a 5 mg/mL em PBS, seguida de uma nova incubação por 2h, a 37°C e ao abrigo da luz. Parte do meio de cultura juntamente com o restante de MTT foi aspirado e 100 µL de DMSO foi adicionado por poço para solubilização dos cristais de formazan resultantes da redução do MTT. Foi realizada a leitura da absorbância a 570 nm no espectrofotômetro THERMO SCIENTIFIC Multiskan FC. A concentração citotóxica para 50% da cultura (CC<sub>50</sub>) foi determinada por análise de regressão pelo *software* GraphPad Prism. Cada ensaio foi realizado em duplicata.

### 5.2.3. Os ensaios *in vitro* e *in vivo* para identificação de compostos com atividade anti-*Trypanosoma cruzi*

#### 5.2.3.1. Ensaio anti-*Trypanosoma cruzi* usando a cepa Tulahuen-β-galactosidase

O ensaio da β-galactosidase desenvolvido por Buckner e colaboradores (1996), com modificações (Romanha et al., 2010), utiliza a cepa Tulahuen de *T. cruzi* que expressa o gene da beta-galactosidase de *Escherichia coli* e foi utilizado para determinar a atividade tripanocida dos compostos. Resumidamente, para a realização dos ensaios, fibroblastos de camundongos da linhagem L929 foram semeados em placas de 96 poços e incubados por 24 horas a 37° C para a adesão e posterior infecção com 10 parasitas/célula. Após 2 h, o meio contendo os parasitas extracelulares foi substituído por meio novo e a placa novamente incubada a 37° C por 48 horas. Após esse período, o meio de cultura foi substituído por meio novo, além dos compostos em concentrações decrescentes, a partir de 100 µg/ mL, até se chegar a CI<sub>50</sub>. Após 96 horas de incubação, foi adicionado o substrato CPRG, a placa foi incubada a 37° C, e a leitura realizada após 16-20 h em espectrofotômetro utilizando um filtro de 570 nm. O benzonidazol no seu CI<sub>50</sub> (1 µg/mL = 3,81 µM) foi utilizado como controle positivo. Os resultados foram expressos como a porcentagem de inibição do crescimento parasitário. As CI<sub>50</sub> sobre as formas amastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi* foram determinadas por interpolação linear

#### 5.2.3.2. Ensaio de citotoxicidade sobre células de vertebrado

Os compostos com atividade tripanocida identificados no ensaio com a cepa Tulahuen transfectada com beta-galactosidase foram testados contra as células L929 para determinação da citotoxicidade (Romanha et al., 2010). A viabilidade das células submetidas aos tratamentos foi determinada utilizando o indicador de viabilidade celular alamarBlue™. As amostras foram testadas em concentrações crescentes a partir da IC<sub>50</sub> encontrada sobre o parasita, utilizando o mesmo número de células, tempo de desenvolvimento celular e tempo de exposição aos compostos usados no ensaio da beta-galactosidase. Após a adição do alamarBlue™, a placa foi incubada por 4 a 6 h e a leitura realizada a 570 e 600 nm. Os resultados foram expressos como a diferença percentual na redução entre células tratadas e não tratadas. As CC<sub>50</sub> sobre as células L929 foram determinadas por interpolação linear.

#### 5.2.3.3. Determinação do Índice de Seletividade

O Índice de Seletividade (IS) é utilizado para definir os compostos que devem ser testados em ensaios *in vivo*. É determinado por meio da razão CC<sub>50</sub> sobre L929/ CI<sub>50</sub> sobre *T. cruzi*. Somente os compostos que apresentam IS  $\geq$  50 são recomendados a ensaios *in vivo* (Romanha et al., 2010).

#### 5.2.3.4. Toxicidade aguda em camundongos

Com o objetivo de determinar a dose máxima tolerada (DMT) dos compostos selecionados para ensaios *in vivo*, foram usados dois camundongos suíços para cada composto, um macho e uma fêmea, não infectados, com seis semanas de idade. No dia 1, a cada camundongo foi administrado, por via oral ou intraperitoneal, em doses crescentes e a cada 2 horas, os compostos dissolvidos em DMSO e diluídos em Tampão Fosfato-Salino (PBS) com 20% de PEG 400 e 0,05% de Tween 80. A dose inicial foi de 5 mg/kg. Após 2 h, uma dose adicional de 15 mg/kg foi administrada (resultando em uma dose acumulada (DA) de 20 mg/kg). Após 2 h, uma nova dose de 30 mg/kg foi administrada (DA = 50 mg/kg). Após outras 2 h, 50 mg/kg (DA = 100 mg/kg), e finalmente após mais 2 h, 100 mg/kg (DA = 200 mg/kg) foram administrados. No dia 2, os camundongos foram inspecionados à procura de sinais clínicos tóxicos e sub-tóxicos de acordo com as regras da *Organisation for Economic Co-operation and Development* (OECD) (Walum, 1998). Posteriormente,

esses compostos serão testados em camundongos infectados com a cepa Y de *T. cruzi*, utilizando a DMT.

O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética com a seguinte numeração: **CEUA IAM/FIOCRUZ número 162/2020.**

#### 5.2.4. Atividade Citotóxica em células tumorais

As linhagens de células humanas utilizadas foram: NCI-H292 (carcinoma pulmonar de células escamosas), MCF-7 (câncer de mama humano), Jukart (leucemia aguda de células T de humanos), HT-29 (câncer de cólon humano) mantidas no laboratório de Cultura de Células do Departamento de Antibióticos, UFPE. A triagem anticâncer *in vitro* dos compostos sintetizados foi realizada através do método do MTT, brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólic (ALLEY, M. C., 1983; MOSMANN, 1983). As linhagens de células foram plaqueadas na concentração adequada para cada tipo celular, sendo mantidas a 37 °C em atmosfera úmida enriquecida com 5% de CO<sub>2</sub>. Os compostos foram solubilizados em DMSO (1%), e em seguida diluídos de forma seriada no meio de cultura e plaqueados na concentração única final de 25 µg/mL e incubados por 72 h. Após esse período, foi adicionado 25 µL de MTT (5 mg/mL) e depois de 3 h de incubação, o meio de cultura foi aspirado e 100 µL de DMSO foi adicionado a cada poço. A absorbância foi medida em um leitor de microplacas no comprimento de onda de 560 nm e a percentagem de inibição calculada. Após a triagem inicial, os derivados que apresentaram inibição do crescimento celular superior a 75%, foram testados em várias concentrações para a determinação da concentração que inibe 50% da proliferação celular (CI<sub>50</sub>). A porcentagem de inibição, o CI<sub>50</sub> e os intervalos de confiança (IC95%) foram calculados no programa *GraphPadPrism* 5.0. Os experimentos foram realizados em triplicata em três ensaios independentes.

### 5.3.Resultados e discussão

#### 5.3.1.Atividade leishmanicida e de citotoxicidade

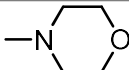
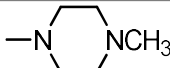
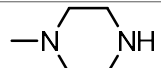
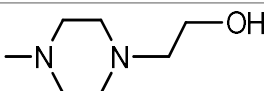
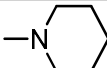
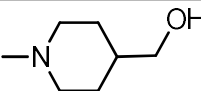
A determinação da atividade leishmanicida contra as espécies *L. amazonensis* e *L. infantum* assim como a determinação da citotoxicidade contra fibroblastos da linhagem L929, em duplicata.

##### 5.3.1.1. Série difenil-isoxazol (Séries **105a-105k**)

Os resultados obtidos na determinação da Concentração Inibitória 50% (CI<sub>50</sub>) frente às espécies *L. amazonensis* e *L. infantum* (formas promastigota e amastigota) e da Concentração Citotóxica 50% (CC<sub>50</sub>) frente à fibroblastos da linhagem L929 da série de compostos diaril-isoxazóis **105a-105k** estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8. Atividade leishmanicida *in vitro* (CI<sub>50</sub>) da série difenil-isoxazol (**105a-105k**) e respectiva citotóxicidade (CI<sub>50</sub>) e índice de seletividade (IS).

| Atividade leishmanicida (µM) |                                   |                                 |                                       |                                     |                                       |                                     |
|------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------|---------------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------|-------------------------------------|
| Composto                     | R <sup>1</sup>                    | L929                            | L. amazonensis                        |                                     | L. infantum                           |                                     |
|                              |                                   | fibroblasto<br>CC <sub>50</sub> | promastigota<br>CI <sub>50</sub> (IS) | amastigota<br>CI <sub>50</sub> (IS) | promastigota<br>CI <sub>50</sub> (IS) | amastigota<br>CI <sub>50</sub> (IS) |
| <b>105a</b>                  | -N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> | 201,5                           | 212<br>(0,95)                         | 193,7<br>(1,04)                     | 222,3<br>(0,90)                       | 192<br>(1,10)                       |
| <b>105b</b>                  | -NH <sub>2</sub>                  | 263,3                           | 23,8<br>(11,0)                        | 155,2<br>(1,69)                     | 53,5<br>(4,90)                        | 125,2<br>(0,19)                     |
| <b>105c</b>                  | -NHCH <sub>3</sub>                | 299,7                           | 191<br>(1,56)                         | 68,1<br>(4,40)                      | 221,7<br>(1,35)                       | 102<br>(1,87)                       |

|                    |                                                                                   |       |                 |                 |                 |                 |
|--------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|-------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| <b>105d</b>        | -NHCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>                                                | 86,8  | 168,8<br>(0,51) | 72,6<br>(1,19)  | 199,1<br>(0,43) | 103,9<br>(1,62) |
| <b>105e</b>        | -NHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>                                | 129,1 | 85,4<br>(1,51)  | 30,8<br>(4,19)  | 76,1<br>(1,69)  | 50,4<br>(1,69)  |
| <b>105f</b>        |  | 129,4 | 124,6<br>(1,03) | 168<br>(0,77)   | 139,7<br>(0,92) | 166,2<br>(0,74) |
| <b>105g</b>        |  | 231,3 | 53,6<br>(4,31)  | 34,6<br>(6,68)  | 64,4<br>(3,59)  | 41,1<br>(1,30)  |
| <b>105h</b>        |  | 163,1 | 71,5<br>(2,28)  | 21,9<br>(7,44)  | 113,5<br>(1,43) | 24,2<br>(2,95)  |
| <b>105i</b>        |  | 124,5 | 39,5<br>(3,15)  | 72,4<br>(1,71)  | 50,5<br>(2,46)  | 77,1<br>(0,51)  |
| <b>105j</b>        |  | 104,3 | 37,9<br>(2,75)  | 54,2<br>(1,92)  | 42,1<br>(2,47)  | 88,9<br>(0,42)  |
| <b>105k</b>        |  | 96,6  | 144,2<br>(0,66) | 121,1<br>(0,79) | 178<br>(0,54)   | 139,9<br>(1,03) |
| <b>Miltefosina</b> | -                                                                                 | 60,8  | 10,1<br>(6,02)  | 6,9<br>(8,81)   | 17,2<br>(3,53)  | 1,7<br>(5,94)   |

Todos os compostos da série diaril-isoxazol foram inativos contra as espécies *L. amazonensis* e *L. infantum*, tanto nas formas promastigotas quanto nas formas amastigotas. As menores concentrações registradas foram encontradas com as moléculas **105b**, com IC<sub>50</sub> de 23,8 µM contra a forma promastigota da *L. amazonensis*, e **105h** contra a forma amastigota, com CI<sub>50</sub> de 21,9 µM para *L. amazonensis* e 24,2 µM para *L. infantum*, sendo todos os outros valores superiores a estes.

Os valores de Concentração Citotóxica 50% (CC<sub>50</sub>) frente à fibroblastos da linhagem L929 demonstraram que os compostos da série apresentam baixa citotoxicidade, com todos os valores superiores à miltefosina, fármaco referência neste teste.

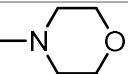
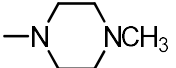
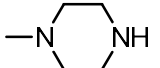
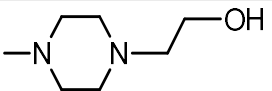
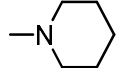
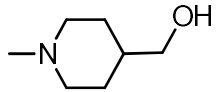
### 5.3.2. Atividade *T. cruzi* e citotoxicidade

A determinação da atividade anti-*T. cruzi* foi procedida utilizando-se a cepa Tulahuen de *T. cruzi* e a determinação da citotoxicidade contra fibroblastos utilizando-se a linhagem L929 (por meio do método do alamarBlue™). Os ensaios foram realizados utilizando-se quadruplicatas para cada concentração dos compostos.

### 5.3.2.1. Série diaril-isoxazol (Séries **105a-105k**)

Os resultados obtidos na determinação da Concentração Inibitória 50% ( $CI_{50}$ ) frente às formas tripomastigota e amastigota, assim como da Concentração Citotóxica 50% ( $CC_{50}$ ) frente à fibroblastos da linhagem L929 da série de compostos diaril-isoxazóis **105a-105k** estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9. Atividade antichagásica ( $CI_{50}$ ) *in vitro* da série diaril-isoxazol (**105a-105k**) e respectiva citotoxicidade ( $CC_{50}$ ) e índice de seletividade (IS)

| Comp.              | R <sup>1</sup>                                                                      | L929                                | <i>Trypanossoma cruzi</i>                         | SI     |
|--------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------------------|--------|
|                    |                                                                                     | fibroblasto<br>$CC_{50}$ ( $\mu$ M) | tripomastigota/amastigota<br>$CI_{50}$ ( $\mu$ M) |        |
| <b>105a</b>        | -N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>                                                   | >336,33                             | 67,94±17,2                                        | > 4,9  |
| <b>105b</b>        | -NH <sub>2</sub>                                                                    | >371,37                             | 28,22±26,4                                        | > 13,1 |
| <b>105c</b>        | -NHCH <sub>3</sub>                                                                  | >352,98                             | 121,07±22,6                                       | > 2,9  |
| <b>105d</b>        | -NHCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>                                                  | >336,33                             | 297,99±0,0                                        | > 1,1  |
| <b>105e</b>        | -NHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>                                  | 321,18                              | 59,74±27,6                                        | 5,4    |
| <b>105f</b>        |  | >294,67                             | 104,90±48,0                                       | > 2,8  |
| <b>105g</b>        |  | >283,76                             | 171,68±8,8                                        | > 1,6  |
| <b>105h</b>        |  | 295,53                              | 95,75±8,0                                         | 3,1    |
| <b>105i</b>        |  | >261,49                             | 195,33±1,0                                        | > 1,3  |
| <b>105j</b>        |  | 296,39                              | 46,83±10,4                                        | 6,3    |
| <b>105k</b>        |  | >272,17                             | 109,68±16,6                                       | > 2,5  |
| <b>Benznidazol</b> | -                                                                                   | 2401,54                             | 3,81                                              | 630    |

Dos compostos testados, apenas o **105b** apresentou atividade anti-*T. cruzi*, com  $CI_{50}$  de 28,2  $\mu$ M. Todos os outros da série **105a-105k** foram pouco potentes para esta atividade, uma vez que apresentaram  $CI_{50}$  acima de 10  $\mu$ M, (Romanha et al., 2010).

Para o teste de citotoxicidade, os compostos **105e**, **105h**, **105j** foram capazes de inibir a viabilidade dos fibroblastos da linhagem L929 apenas na concentração

maior (100  $\mu\text{g/mL}$ ), enquanto todos os outros não foram citotóxicos, mesmo na concentração máxima, o que impossibilitou a determinação da  $\text{CC}_{50}$  desses. O índice de seletividade (IS) calculado foi inferior a 50 para todos os compostos, demonstrando seletividade insuficiente para indicação a ensaios *in vivo*.

Mesmo sem uma atividade tripanocida significativa, o **105b** apresentou o valor de menor  $\text{Cl}_{50}$  (28,2  $\mu\text{M}$ ), tendo como o  $\text{R}^1$  o  $-\text{NH}_2$ . Analisando o padrão de substituição em  $\text{R}^1$ , não foi possível determinar uma relação estrutura atividade (REA), visto que as concentrações mais baixas apresentaram substituintes aminados ramificados ou cíclicos. O acréscimo de um metil na amina secundária, como visto em **105c** diminui a  $\text{Cl}_{50}$  (121,07  $\mu\text{M}$ ), o acréscimo de etil diminui mais ainda (297,99  $\mu\text{M}$ ) como visto no **105d**, sendo este o de maior  $\text{Cl}_{50}$  verificado. Quando, porém, há o acréscimo de um propil **105e**, o valor diminui significativamente (59,74  $\mu\text{M}$ ).

Novas análises com uma maior concentração inicial, poderá determinar a concentração citotóxica

#### 5.3.2.2. Série isoxazolina aza-bicíclica (Séries **4a-4k**)

Os resultados obtidos na determinação da Concentração Inibitória 50% ( $\text{IC}_{50}$ ) frente ao *T. cruzi* usando as formas evolutivas tripomastigota e amastigota e os obtidos na determinação da Concentração Citotóxica 50% ( $\text{CC}_{50}$ ) frente à fibroblastos da linhagem L929 da série de compostos isoxazolina aza-bicíclica **4a-4k** estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10. Atividade antichagásica ( $\text{Cl}_{50}$ ) *in vitro* da série isoxazolina aza-bicíclica (**4a-4k**) e respectiva citotoxicidade ( $\text{CC}_{50}$ ) e índice de seletividade (IS)

| Compostos | $\text{R}^1$ | $\text{R}^2$              | L929                                              | <i>T. cruzi</i>                                                 | IS                              |
|-----------|--------------|---------------------------|---------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|---------------------------------|
|           |              |                           | Fibroblasto<br>$\text{CC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ ) | tripomastigota/amastigota<br>$\text{Cl}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ ) | $\text{CC}_{50}/\text{Cl}_{50}$ |
| <b>4a</b> | <i>p</i> -Cl | <i>p</i> -NO <sub>2</sub> | >201,58                                           | 3,23±0,1                                                        | > 62,5                          |
| <b>4b</b> | <i>p</i> -Me | <i>p</i> -NO <sub>2</sub> | >210,03                                           | 6,09±4,8                                                        | > 34,5                          |
| <b>4c</b> | <i>p</i> -Me | <i>p</i> -Cl              | >107,50                                           | 45,80±19,1                                                      | > 2,3                           |
| <b>4d</b> | <i>p</i> -Me | <i>p</i> -F               | >222,65                                           | 11,13±10,2                                                      | > 20                            |
| <b>4e</b> | <i>p</i> -Cl | <i>p</i> -Cl              | >206,16                                           | 6,39±0,4                                                        | > 32,2                          |
| <b>4f</b> | <i>p</i> -Cl | <i>p</i> -F               | >213,18                                           | 5,54±0,0                                                        | > 38,5                          |

|             |                           |                           |         |             |         |
|-------------|---------------------------|---------------------------|---------|-------------|---------|
| <b>4g</b>   | <i>p</i> -NO <sub>2</sub> | <i>p</i> -NO <sub>2</sub> | >197,20 | 4,14±0,6    | > 47,6  |
| <b>4h</b>   | <i>p</i> -NO <sub>2</sub> | <i>p</i> -Cl              | >201,58 | 1,19±0,0    | > 169,5 |
| <b>4i</b>   | <i>p</i> -NO <sub>2</sub> | <i>p</i> -F               | >208,29 | 4,06±0,1    | > 51,3  |
| <b>4j</b>   | <i>p</i> -F               | <i>p</i> -NO <sub>2</sub> | >208,29 | 5,62±1,2    | > 37    |
| <b>4k</b>   | <i>p</i> - <i>t</i> Bu    | <i>p</i> -NO <sub>2</sub> | >192,99 | 0,29±0,0    | > 666,7 |
| <b>83a</b>  | <i>p</i> -Cl              | -                         | >284,85 | 74,63±8,8   | > 3,8   |
| <b>83b</b>  | <i>p</i> -Me              | -                         | >302,01 | 73,09±61,6  | > 4,1   |
| <b>83c</b>  | <i>p</i> -NO <sub>2</sub> | -                         | >276,18 | 83,96±0,6   | > 3,3   |
| <b>83d</b>  | <i>p</i> - <i>t</i> Bu    | -                         | 142,57  | 8,31±9,6    | 17,2    |
| <b>83e</b>  | <i>p</i> -F               | -                         | >298,43 | 169,51±56,4 | > 1,8   |
| <b>83f</b>  | <i>p</i> -OMe             | -                         | >288,09 | 137,42±61,4 | > 2,1   |
| Benznidazol | -                         | -                         | 2401,54 | 3,84±0,0    | 630     |

A série dos híbridos isoxazolina aza-bicíclica/tiazol apresentou excelentes resultados para a atividade anti-*T. cruzi*. Como verificado na Tabela 10, os compostos **4a**, **4b**, **4d**, **4e**, **4f**, **4g**, **4h**, **4i**, **4j**, **4k** e **83d** foram ativos e altamente potentes ( $Cl_{50} < 10 \mu\text{g/mL}$ ). De acordo com Romanha *et al.* (2010), são recomendados à ensaios *in vivo* os compostos que apresentam seletividade (IS) maior ou igual a 50. Desta maneira, os híbridos **4a**, **4h**, **4i** e **4k** foram escolhidos para a sequência dos estudos antichagásicos *in vivo*.

Dos híbridos selecionados para a avaliação *in vivo*, o **4k**, com radical *terc*-Butil (*t*Bu) em R<sup>1</sup> e nitro (NO<sub>2</sub>) em R<sup>2</sup>, apresentou maior potência na atividade tripanocida, com a IC<sub>50</sub> de 0,29  $\mu\text{M}$ , além de uma seletividade superior a 666,7, sendo que o valor deve ser definido utilizando-se uma concentração maior que 100  $\mu\text{g/mL}$ , em um novo teste. Mesmo assim, esse valor foi superior ao benznidazol (IS = 630), fármaco referência nos testes *in vitro* e *in vivo*.

Dentre os três outros híbridos selecionados para a avaliação *in vivo*, **4a**, **4h**, **4i**, o híbrido **4i** (R<sup>1</sup> = *p*-NO<sub>2</sub> / R<sup>2</sup> = *p*-Cl) apresentou o segundo menor valor de  $Cl_{50}$  (1,19  $\mu\text{M}$ ), sendo ele um isômero de posição do híbrido **4a** (R<sup>1</sup> = *p*-Cl/ R<sup>2</sup> = NO<sub>2</sub>), o terceiro menor valor de  $Cl_{50}$  (3,23  $\mu\text{M}$ ), havendo, porém, uma queda na seletividade em 2,5 vezes (**4a** SI > 62,5). Observando o híbrido **4k**, é possível verificar que a presença do radical *terc*-Butil (*t*Bu) em R<sup>1</sup> é responsável pela destacada atividade tripanocida, sendo 11 vezes mais potente que o híbrido **4a** (R<sup>1</sup> = *p*-Cl).

O híbrido **4i** (R<sup>1</sup> = *p*-NO<sub>2</sub> / R<sup>2</sup> = *p*-F), também escolhido para a avaliação *in vivo*, apresentou  $Cl_{50}$  = 4,06  $\mu\text{M}$  e IS > 51,3. Em comparação com o **4h** (R<sup>1</sup> = *p*-NO<sub>2</sub> /

$R^2 = p\text{-Cl}$ ) há uma mudança do  $R^2 = \text{Cl}$  para o  $R^2 = \text{F}$ , gerando diminuição da potência em 3 vezes, em relação a  $\text{Cl}_{50}$ .

O híbrido **4j** ( $R^1 = p\text{-F}/R^2 = p\text{-NO}_2$ ) teve um  $\text{Cl}_{50}$  de 5,62  $\mu\text{M}$  ( $\text{IS} > 37$ ) sendo inferior em potência em relação ao seu isômero de posição, o híbrido **4i** ( $R^1 = p\text{-NO}_2 / R^2 = p\text{-F}$ ). Mesmo assim, o **4j** apresentou potente atividade antichagásica. Os compostos **4b**, **4d**, **4e**, **4f**, **4g**, **4j** apresentaram relevantes atividades tripanocidas, podendo ter o SI superior ou igual a 50 em teste com concentração citotóxica superior a 100  $\mu\text{g/mL}$ , elevando seu valor na  $\text{CC}_{50}$  e os habilitando para avaliação *in vivo*, conseqüentemente. O híbrido **4c** ( $R^1 = p\text{-Me}/R^2 = p\text{-Cl}$ ) apresentou atividade reduzida com  $\text{IC}_{50}$  de 45,80  $\mu\text{M}$ , valor 4 vezes superior ao **4d** ( $R^1 = p\text{-Me}/R^2 = p\text{-F}$ ), o qual demonstrou valor de  $\text{Cl}_{50}$  elevado, 11,13  $\mu\text{M}$ .

Os precursores tiossemicarbazônicos **83a-83f** também foram testados, sendo pouco potentes no ensaio de avaliação da atividade tripanocida, com exceção do **83d** o qual apresentou  $\text{Cl}_{50}$  de 8,31  $\mu\text{M}$ . Os demais apresentaram  $\text{Cl}_{50}$  superior a 70  $\mu\text{M}$ , sendo verificado que a presença do grupo tiazol é essencial para a atividade antichagásica em todos os híbridos, gerando potencialização da atividade para o **83d**, como verificado no híbrido **4k**.

#### 5.3.2.3.Determinação da dose máxima tolerada (DMT)

Antes de prosseguir com a avaliação *in vivo* dos compostos **4a**, **4h**, **4i** e **4k**, foi realizada o ensaio de DMT, verificando-se que não houve sinais de toxicidade na concentração igual a 200 mg/kg, pelas vias oral e intraperitoneal, o que revelou baixa toxicidade destes compostos em camundongos.

#### 5.3.3.Citotoxicidade

Os resultados da atividade citotóxica frente a células tumorais estão descritos na Tabela 11.

Para o *screening* inicial, uma escala de intensidade foi utilizada para avaliar o potencial citotóxico das amostras testadas. Amostras com alta atividade (91 a 100 % de inibição), com atividade moderada (inibição de crescimento celular variando de

70 a 90%), baixa atividade citotóxica (inibição do crescimento de 51 a 69%) e sem atividade (inibição de crescimento menor que 50 %) (RODRIGUES et al., 2014).

Tabela 11. Atividade citotóxica dos compostos **4a-4k** e **83a-83f**, frente a células cancerígenas e célula normal representados em inibição de crescimento percentual. Os valores representam o percentual de inibição do crescimento celular com 72 h de incubação.

| Comp.      | <i>R</i> <sup>1</sup>     | <i>R</i> <sup>2</sup>     | VERO                                                     | MCF-7    | NCI-H292  | Jukart   | HT-29    |
|------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------------------------------------|----------|-----------|----------|----------|
|            |                           |                           | Inibição % do crescimento celular ± desvio padrão (D.P.) |          |           |          |          |
| <b>4a</b>  | <i>p</i> -Cl              | <i>p</i> -NO <sub>2</sub> | 34,7±3,9                                                 | 45,2±0,3 | 60,6±4,9  | 77,3±0,3 | 49,4±2,2 |
| <b>4b</b>  | <i>p</i> -Me              | <i>p</i> -NO <sub>2</sub> | 60,6±4,1                                                 | 21,7±2,0 | 47,2±1,1  | 69,0±1,9 | 41,5±6,2 |
| <b>4c</b>  | <i>p</i> -Me              | <i>p</i> -Cl              | 41,8±1,0                                                 | 53,2±4,9 | 60,5±3,7  | 72,4±4,8 | 69,5±1,3 |
| <b>4d</b>  | <i>p</i> -Me              | <i>p</i> -F               | 48,3±1,7                                                 | 51,3±1,9 | 62,2±1,2  | 59,6±2,9 | 51,2±0,3 |
| <b>4e</b>  | <i>p</i> -Cl              | <i>p</i> -Cl              | 38,3±1,3                                                 | 48,5±4,0 | 70,8±1,3  | 55,5±6,5 | 66,8±4,7 |
| <b>4f</b>  | <i>p</i> -Cl              | <i>p</i> -F               | 35,3±6,2                                                 | 44,6±2,0 | 58,4±0,08 | 87,0±0,9 | 54,5±0,7 |
| <b>4g</b>  | <i>p</i> -NO <sub>2</sub> | <i>p</i> -NO <sub>2</sub> | 49,1±1,4                                                 | 55,0±4,3 | 71,1±1,3  | 45,8±7,6 | 47,7±5,6 |
| <b>4h</b>  | <i>p</i> -NO <sub>2</sub> | <i>p</i> -Cl              | 46,4±3,1                                                 | 70,0±1,0 | 86,8±1,4  | 44,7±6,5 | 67,4±2,2 |
| <b>4i</b>  | <i>p</i> -NO <sub>2</sub> | <i>p</i> -F               | 52,4±0,6                                                 | 31,8±2,8 | 70,6±2,3  | 58,9±5,5 | 38,7±2,8 |
| <b>4j</b>  | <i>p</i> -F               | <i>p</i> -NO <sub>2</sub> | 51,2±4,1                                                 | 44,0±2,5 | 54,1±1,8  | 54,7±1,2 | 69,7±0,8 |
| <b>4k</b>  | <i>p</i> -tBu             | <i>p</i> -NO <sub>2</sub> | 42,2±1,7                                                 | 41,3±2,1 | 57,2±2,3  | 28,5±2,1 | 44,1±5,5 |
| <b>83a</b> | <i>p</i> -Cl              | -                         | 46,5±2,5                                                 | 21,5±0,2 | 20,5±4,8  | 9,1±5,5  | 25,1±2,7 |
| <b>83b</b> | <i>p</i> -Me              | -                         | 45,2±1,1                                                 | 24,9±3,6 | 4,6±2,4   | 44,9±3,4 | 10,4±4,3 |
| <b>83c</b> | <i>p</i> -NO <sub>2</sub> | -                         | 37,8±1,5                                                 | 10,4±1,9 | 27,1±1,8  | *N.A     | 19,9±2,4 |
| <b>83d</b> | <i>p</i> -tBu             | -                         | 17,3±4,9                                                 | 23,0±1,7 | 36,8±2,8  | *N.A     | 3,4±4,0  |

|                      |               |   |          |          |          |           |          |
|----------------------|---------------|---|----------|----------|----------|-----------|----------|
| <b>83e</b>           | <i>p</i> -F   | - | 26,6±2,4 | 15,6±3,1 | 27,1±1,4 | *N.A      | 29,1±5,1 |
| <b>83f</b>           | <i>p</i> -OMe | - | 45,2±1,5 | 45,3±0,9 | 20,8±3,2 | 30,4±18,5 | 20,1±4,5 |
| <b>Doxorrubicina</b> |               |   | 33,4±1,4 | 94,5±0,6 | 92,0±1,6 | 81,4±3,7  | 66,6±0,8 |

Células: NCI-H292 (carcinoma pulmonar de células escamosas), MCF-7 (câncer de mama), Jukart (leucemia aguda de células T), HT-29 (câncer de cólon) e VERO (rim de macaco).

Concentração única = 25 µg/mL

\*N.A. = Não ativo

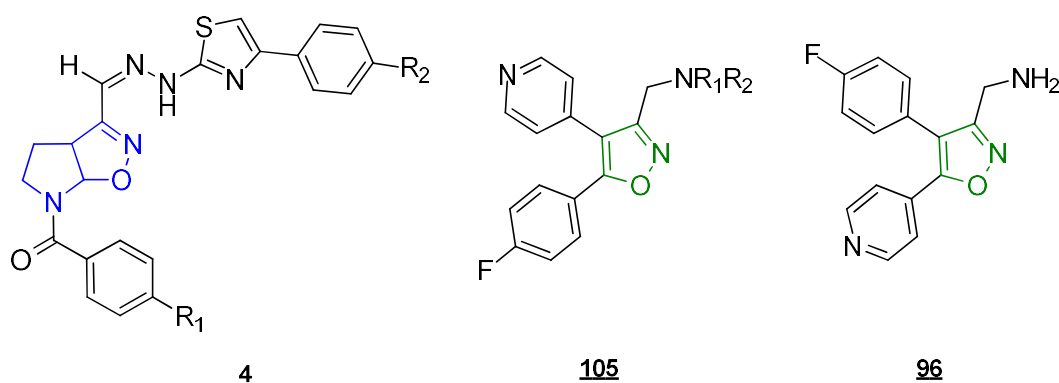
Para as células MCF-7, nenhum dos híbridos apresentou atividade inibitória superior a 75%, sendo o maior valor de 70% para **4h**. Para a linha celular Jukart, os compostos **4a** e **4f** apresentaram um percentual de inibição de 77% e 87%, respectivamente, e **4f** foram selecionados para a determinação do  $CI_{50}$ , o que resultou em uma  $CI_{50}$  de 7,15 µM frente as células Jukart, inferior a doxorrubicina ( $CI_{50}$  = 13,06 µM) e o híbrido **4h** apresentou  $CI_{50}$  de 0,96 µM frente a linha celular NCI-H292, com menor  $CI_{50}$  (doxorrubicina,  $CI_{50}$  = 0,46 µM).

. Para a linha celular HT-29, quatro compostos apresentaram percentual semelhante de inibição: **4c**, **4e**, **4h** e **4j** com uma inibição média de 67%, os outros, uma menor inibição.

Com relação aos resultados nos compostos na célula normal VERO, nenhum composto apresentou citotoxicidade relevante, de acordo com a classificação de Rodrigues *et al.* (2014).

## 6.CONCLUSÃO

A síntese proposta neste projeto pôde ser realizada com sucesso para ambas as séries, a saber, do híbrido isoxazolina/tiazol **4** com espaçador hidrazona e do sistema diaril-isoxazol **105**.



Os híbridos  $\Delta^2$ -isoxazolina/tiazol **4a** inéditos foram sintetizados, totalizando 11 híbridos, e elucidados por espectroscopia de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C unidimensionais e bidimensionais e IV-FT, e suas características físico-químicas determinadas, demonstrando a eficácia sintética na obtenção de novos compostos por esta via, por meio das reações de cicloadição 1,3-dipolar entre, o óxido de carboetóxi-formonitrila (CEFNO) e enamidas endocíclicas substituídas. A utilização de MnO<sub>4</sub> ativado para a formação dos aldeídos foi eficaz possuindo rendimentos semelhantes às da reação de Swern, além de ter como vantagem a praticidade da reação. As tiossemicarbazonas sintetizadas, também tiveram suas estruturas elucidadas por RMN e IV-FT, os quais também foram submetidas às avaliações biológicas. A análise de massas ainda está em curso de realização.

Da série dos diaril-isoxazóis, 11 compostos **105a-k** e apenas um da série **96** foram sintetizados e caracterizados pelas espectroscopias de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C

unidimensionais e bidimensionais e IV-FT e pela espectrometria de massas, além de suas propriedades físico-químicas determinadas. Das rotas sintéticas testadas, a ciclização de  $\beta$ -ceto-enóis foi a que proveu melhores rendimentos na série diaril-isoxazol **105**, formando estruturas onde o anel piridina se encontra em C4 do anel isoxazol. Já para a série diaril-isoxazol **105**, a mesma via sintética não favoreceu a formação do núcleo isoxazol, sendo possível a obtenção pela via da cicloadição 1,3-dipolar entre o óxido de carboetóxi-formonitrila (CEFNO) e a 4-etinilpiridina, catalisada por cobre, formando o diaril-isoxazol com a piridina na posição C5 do anel, porém à baixos rendimentos, o que justificou apenas 1 composto final sintetizado. Diversas outras tentativas foram realizadas para contornar a reatividade da piridina nas reações, porém sem o devido sucesso, neste trabalho.

Para a avaliação da atividade leishmanicida *in vitro*, apenas os compostos da série diaril-isoxazol foram submetidos a atividade contra as formas promastigota e amastigota das espécies *L. amazonensis* e *L. infantum*. O resultado foi expresso pela IC<sub>50</sub> dos compostos, sendo inativos contra as formas evolutivas das espécies testadas. A avaliação citotóxica, contra fibroblastos da linhagem L929, demonstrou baixa citotoxicidade da série diaril-isoxazol com valores de CC<sub>50</sub> superiores a miltefosina.

Para a atividade anti-*T. cruzi* *in vitro*, ambas as séries, diaril-isoxazol **105a-105k** e  $\Delta^2$ -isoxazolina/tiazol **4a-4k**, foram submetidas ao ensaio, contra as formas tripomastigota e amastigota da cepa Tulahuen do *T. cruzi*, avaliando-se a diminuição da carga parasitária, de modo conjunto, das duas formas, mimetizando o que acontece no hospedeiro vertebrado. A avaliação da citotoxicidade se deu contra as células não infectadas, a saber, fibroblastos da linhagem L929.

A avaliação anti-*T. cruzi* contra a série diaril-isoxazol foi expressa em CI<sub>50</sub>, demonstrando inatividade dos compostos ou baixa atividade quando se tratando da **105b**. Tais compostos não apresentaram citotoxicidade mesmo na concentração máxima testada e novos testes devem ser realizados para determinar tal avaliação. Para a série dos híbridos  $\Delta^2$ -isoxazolina/tiazol **4a-4k**, os compostos apresentaram potente atividade tripanocida com ausência de citotoxicidade para a concentração máxima testada. Os valores de SI, com os dados obtidos, elegeram os compostos **4a**, **4h**, **4i** e **4k** para a avaliação *in vivo*, sendo o SI do **4k** superior ao benzonidazol e

seu  $CI_{50}$  13 vezes mais potente que o fármaco de referência. Para dar prosseguimento a avaliação *in vivo*, a dose de tolerância máxima foi determinada, verificando a não toxicidade dos compostos **4a**, **4h**, **4i** e **4k** mesmo numa concentração de 200 mg/kg de peso vivo.

Os compostos da série isoxazolina aza-bicíclica **4a-4k** e **83a-83f** foram submetidos a avaliação antitumoral frente a células cancerígenas das linhagens NCI-H292 (carcinoma mucoepidermóide de pulmão), MCF-7 (câncer de mama), Jukart (leucemia aguda de células T), HT-29 (câncer de cólon) e contra linhagens de células normais L929 (fibroblastos murinos) e VERO. Para as células da linhagem cancerígena, o composto **4f** apresentou  $CI_{50}$  de 7,15  $\mu$ M frente as células Jukart e o híbrido **4h** apresentou  $CI_{50}$  de 0,96  $\mu$ M frente a linha celular NCI-H292.

Outras análises estão em andamento para melhor averiguar os resultados biológicos. De modo geral, duas inéditas séries químicas, as isoxazolínas aza-bicíclicas e os di-aril isoxazóis, tiveram seus compostos sintetizados, totalizando 29 moléculas, as quais, algumas apresentaram atividades citotóxica para células tumorais e atividade leishmanicida, sendo de destaque a atividade antichagásica para a série isoxazolína aza-bicíclica.

## 7. ARTIGO PUBLICADO

Título: Antinociceptive Effects of Aza-Bicyclic Isoxazoline-Acylhydrazone Derivatives in Different Models of Nociception in Mice.

MOTA, Fernanda Virginia Barreto; **COUTINHO, Felipe Neves**; CARVALHO, Vanessa Mylenna Florêncio de; CORREIA, Julyanne Cunha de Assis; BASTOS, Isla Vanessa Gomes Alves; MARCELINO-NETO, Pedro Paulo; XIMENES, Rafael Matos; BRONDANI, Dalci José; FARIA, Antônio Rodolfo de; MARCHAND, Pascal. Antinociceptive Effects of Aza-Bicyclic Isoxazoline-Acylhydrazone Derivatives in Different Models of Nociception in Mice. **Current Topics In Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 22, n. 4, p. 247-258, fev. **2022**. Bentham Science Publishers Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2174/1568026622666220105102508>.



## RÉSUMÉ

## 1.INTRODUCTION

L'obtention de nouveaux médicaments a contribué au développement scientifique dans le domaine des sciences pharmaceutiques et médicales. Les premières études galéniques, menées par des alchimistes et des apothicaires, ont été à l'origine de ce qui est aujourd'hui le fruit de grandes découvertes et d'améliorations technologiques dans le domaine des cosmétiques, des médicaments et des vaccins (SNELL, 2019).

Dans les sciences pharmaceutiques, la chimie médicinale se distingue par l'obtention et la modulation de nouveaux médicaments, et parmi les outils présents, il y a l'hybridation moléculaire, dont la fonction est l'union de différents groupes pharmacophores dans une seule molécule, afin de réduire les toxicités connues et d'améliorer l'effet pharmacologique des composés candidats aux médicaments (GONTIJO *et al.*, 2020).

Parmi les noyaux chimiques dont l'activité biologique est connue, on peut citer l'isoxazole et l'isoxazoline, qui ont présenté des activités anti-inflammatoires, anticancéreuses et antiparasitaires, en plus d'être présents dans des médicaments commerciaux. (GONÇALVES *et al.*, 2020; BARMADÉ *et al.*, 2016).

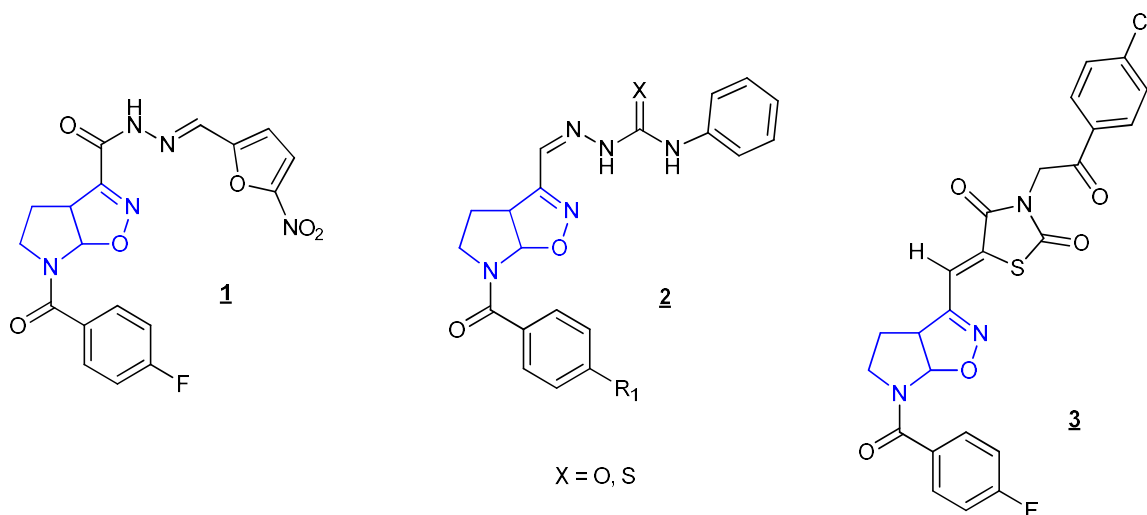
Un autre noyau d'un grand intérêt est le thiazole, qui a une activité antiparasitaire, antimicrobienne et anticancéreuse prononcée (SCHADICH *et al.*, 2020; ZOU *et al.*, 2021; BERA *et al.*, 2021). En plus des noyaux, la présence d'espaces d'hydrazide et d'hydrazone parmi les noyaux pharmacophoriques est mise en évidence dans plusieurs études en tant que groupes d'importance dans les activités biologiques, telles que l'activité anticancéreuse (ZEBBICHE *et al.*, 2020; UMAPATHI *et al.*, 2020) et leishmanicide (SILVA *et al.*, 2020) .

Dans le groupe de recherche (LASOF), des dérivés isoxazoliniques ont été obtenus, sous la forme d'hydrazones **1** (ALMEIDA, 2010), de semicarbazones et de thiosemicarbazones **2** (ALMEIDA *et al.*, 2009; REIS *et al.*, 2011) et de thiazolidinediones **3** (ALMEIDA, 2010)(Figure 1). Le noyau isoxazoline à cinq membres (2-isoxazoline-azabicyclique) a été développé dans le Laboratoire de Synthèse Organique de Médicaments (LASOF) et a été appliqué dans l'obtention plusieurs dérivés, dont ceux mentionnés ci-dessous, qui ont été soumis à l'évaluation de l'activité anti-*T. cruzi* (résultats non encore publiés) (ALMEIDA, 2010).

Les résultats les plus expressifs de l'étude d'Almeida, 2010, étaient le nitrofurfuril-hydrazone **1**, qui est apparu comme l'anti-*T. cruzi* le plus puissant des deux séries, sur la forme épimastigote de *T. cruzi*, démontrant une cytotoxicité de 60,19  $\mu\text{M}$  et une  $\text{Cl}_{50}$  de 2,81  $\mu\text{M}$ , une valeur supérieure à celle du benznidazole (6,02  $\mu\text{M}$ ).

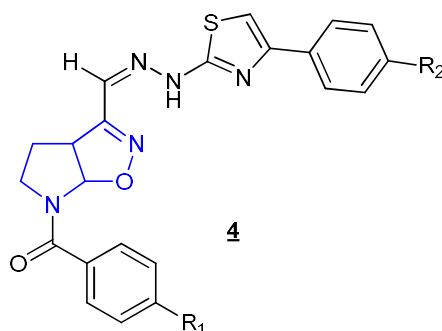
Dans l'étude la plus récente menée par De Araújo, 2019, le serie thiazolidine-2,4-dione a montré des résultats anti-*T. cruzi* plus prometteurs, parmi lesquels la thiazolidine-2,4-dione **3** (Figure 1) a présenté un  $\text{Cl}_{50}$  de 2,50  $\mu\text{M}$  contre la forme épimastigote, qui présentait également une activité leishmanicide contre la forme promastigote de *L. amazonensis* et *L. infantum*, à savoir  $\text{Cl}_{50}$  de 7,33  $\mu\text{M}$  et  $\text{Cl}_{50}$  5,81  $\mu\text{M}$ , respectivement, plus élevé que la miltéfosine ( $\text{Cl}_{50}$  de 15,82  $\mu\text{M}$  et  $\text{Cl}_{50}$  18,00  $\mu\text{M}$ , respectivement) (DE ARAÚJO, 2019).

Figure 1. Structures chimiques des molécules contenant le cycle 2-isoxazoline-azabicyclique à activité anti-*T. cruzi* et leishmanicide



La thiazolidine-dione **3** (Figure 1), est un dérivé du noyau thiazole, qui est d'une grande importance en chimie médicinale pour ses activités biologiques et est présent dans plusieurs médicaments commerciaux (RAM *et al.*, 2019). Ainsi, la synthèse d'hybrides 2-isoxazoline/thiazole inédits a été proposée avec un bras espaceur de type hydrazone, présentées dans le structure de molécule **4** (Figure 2) comme une série proposée au Brésil.

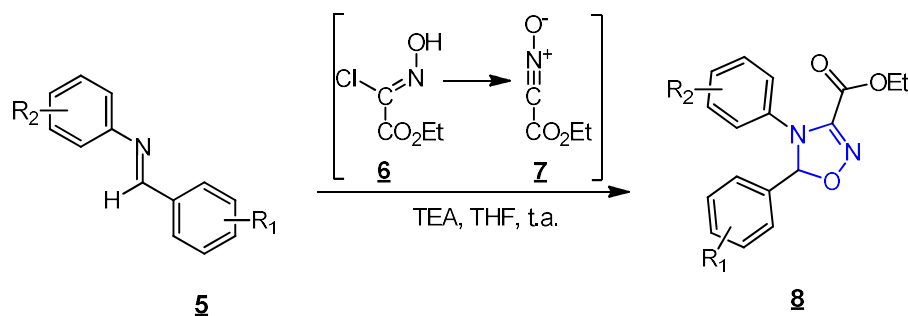
Figure 2. Structure générale des hybrides 2-isoxazoline-azabicyclique/thiazole inédits avec espaceur hydrazone **4**.



Ce doctorat est développé sous un régime de co-tutelle, en coopération avec l'Université de Nantes/France, sous la direction du Prof. Pascal Marchand (UR 1155 – IICiMed, École Doctorale Biologie et Santé) avec l'Université Fédérale de Pernambuco sous la direction du Prof. Antônio Rodolfo de Faria (Programme de Post-Graduation en Innovation Thérapeutique) et de la Prof. Teresinha Gonçalves Silva (Programme de Post-Graduation en Sciences Pharmaceutiques). Le projet a été financé par le programme CAPES-COFECUB et le doctorant est resté un an dans la ville de Nantes.

Dans le LASOF / Brésil, le projet de synthèse d'analogues de coxib a été mis au point pour une évaluation biologique des propriétés anti-inflammatoires et anticancéreuses (COUTINHO, 2018). Le noyau utilisé était l'oxadiazoline **8**, obtenue par une réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire en utilisant le précurseur 2-chloro-2-(hydroxyimino)acétate d'éthyle **6** (synthétisé par le groupe de recherche) et des imines diarylées **5** (Schéma 1).

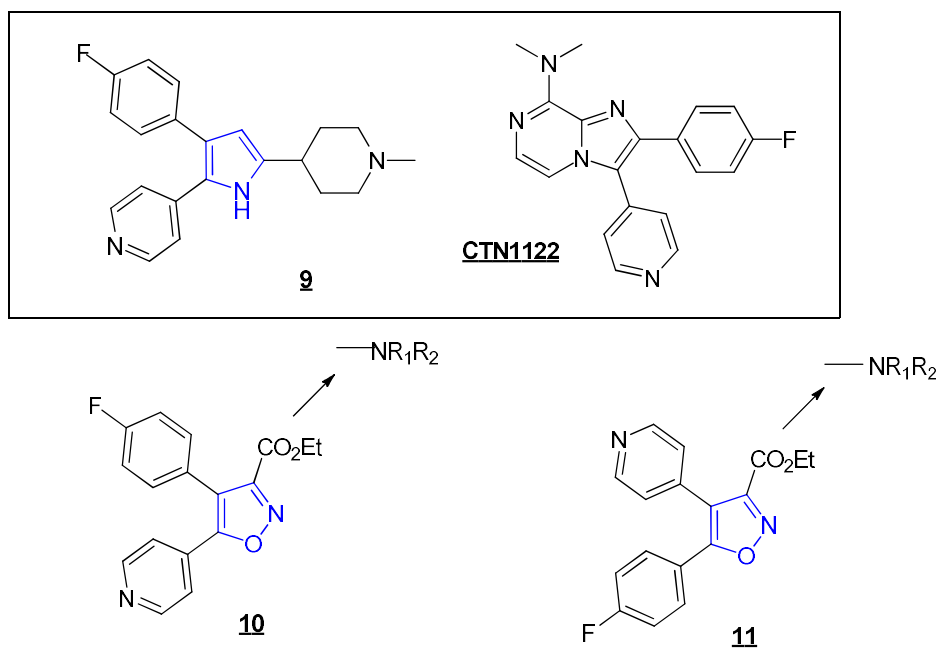
Schéma 1. Schéma réactionnel de la synthèse de 1,2,4-oxadiazoline diaryles **8** à partir de l'imines diarylées **5** et de 2-chloro-2-(hydroxyimino)acétate d'éthyle **6** (précurseur du *N*-oxyde de nitrile **7**).



Dans les travaux présentés par Allocco (2006) et Marchand (2015), les systèmes *ortho*-diarylpyrrole **9** et imidazo [1,2-*a*]pyrazine **CTN1122** ont présenté une activité leishmanicide en relation avec l'inhibition de la caséine kinase 1 (CK1) chez *Leishmania major* (LmCK1), parmi les résultats, on note les valeurs de  $CI_{50}$  LmCK1 de 7 nM et 0,72  $\mu$ M, respectivement. (ALLOCCO *et coll.*, 2006; MARCHAND *et al.*, 2015).

A partir de ce qui a été démontré précédemment et aussi avec l'expertise du groupe de recherche co-dirigé par le Prof. Pascal Marchand, dans la synthèse des molécules hétérocycliques à visée antiparasitaire (MARCHAND *et al.*, 2015), le projet de supervision doctorale conjointe a été proposé, permettant d'envisager la synthèse de nouvelles molécules de type diarylisoxazole **10** et **11** aux propriétés antileishmaniennes (Figure 3).

Figure 3. Structure des molécules modèles **9** et **CTN1122** et structure générale des nouvelles molécules diarylisoxazoles **10** et **11**.



La leishmaniose est une maladie parasitaire négligée, et est causée par un protozoaire flagellé du genre *Leishmania* et qui touche environ 1 million de personnes dans le monde. Cette maladie touche plus de 3500 personnes par an rien qu'au Brésil et actuellement un traitement est limité, aucun vaccin humain n'étant disponible (LUZ *et al.*, 2018; OMS, 2021).

Une autre maladie négligée est la Maladie de Chagas (MC), qui a pour agent étiologique le parasite *Trypanosoma cruzi*. La MC touche plus de 6 millions de personnes dans le monde, et est endémique dans des pays en développement. Elle a comme seule alternative thérapeutique le benznidazole et le nifurtimox, efficaces uniquement dans la phase aiguë de la maladie et de toxicité élevée, la recherche de nouveaux médicaments est nécessaire (DNDi, 2022; PITASSE-SANTOS *et al.*, 2017).

Une autre maladie d'une grande incidence dans le monde entier et d'un grand défi thérapeutique est le cancer. Le cancer est le nom de plus de 100 maladies caractérisées par la croissance désordonnée des cellules qui envahissent les tissus et les organes, et peuvent se propager à d'autres régions du corps et ont une origine multifactorielle et des facteurs de risque tels que le tabagisme et la consommation d'alcool (INCA, 2020). Actuellement, un nombre limité de médicaments est utilisé en chimiothérapie, et qui présentent souvent des effets secondaires indésirables, en observant également le développement d'une résistance à ces agents (NHI, 2020).

Au vu des données présentées ci-dessus, ce travail s'engage dans la synthèse de molécules originales ayant des activités antiparasitaires et anticancéreuses potentielles, sur la base de l'expertise des laboratoires en question et des données présentées dans la littérature. Différentes séries contenant le noyau isoxazole et l'hybride isoxazoline-azabicyclique/thiazole seront synthétisées et, après confirmation, seront soumises à des études des activités leishmanicides, anti-*T. cruzi* et cytotoxiques.

## 2.REVUE DE LA LITTÉRATURE

### 2.1.Leishmaniose

La leishmaniose est considérée comme une maladie tropicale négligée, comme la maladie de Chagas, la filariose, la dengue et le paludisme. Il s'agit d'une maladie parasitaire causée par le protozoaire flagellé du genre *Leishmania*, et sa transmission se produit lorsque l'hôte vertébré (le chien ou l'humain) est mordu par la femelle du phlébotome infecté, qui inocule les parasites dans sa circulation sanguine (FIOCRUZ, 2013).

La leishmaniose est présente dans 98 pays et classée parmi les dix premières maladies tropicales négligées dans le monde, avec plus de 12 millions de personnes infectées, 0,9 à 1,6 million de nouveaux cas chaque année, entre

20.000 et 30.000 décès et 350 millions de personnes à risque d'infection Le Brésil fait partie des dix pays avec le plus grand nombre de cas au monde, en 2020, 16.432 nouveaux cas d'infection ont été signalés (PAHO, 2021).

Il existe plus de 20 espèces de *Leishmania*, qui manifestent trois formes cliniques principales de la maladie, qui diffèrent selon le parasite responsable de l'infection (REITHINGER *et al.* , 2007) :

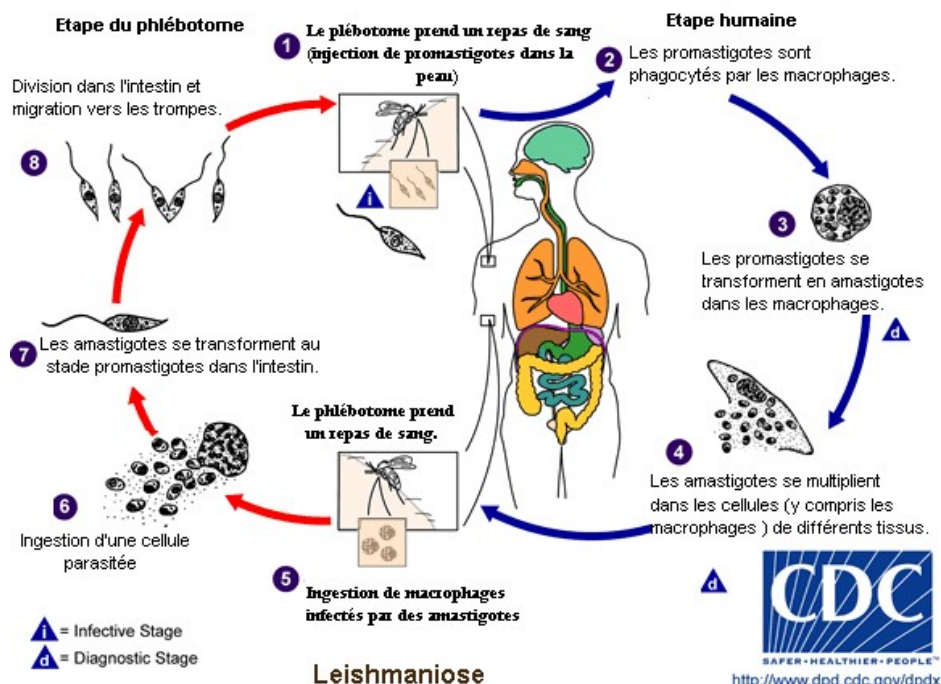
- Leishmaniose viscérale (VL, également connue sous le nom de kala-azar): c'est le type de leishmaniose le plus mortel avec une létalité de 90%, qui est causée par les espèces *Leishmania donovani* et *Leishmania infantum* / *L. chagasi*. Les symptômes les plus courants sont: fièvre irrégulière, perte de poids, hépatosplénomégalie et anémie. En 2016, environ 90 % des cas de cette maladie étaient concentrés au Brésil, en Éthiopie, en Inde, au Bangladesh, au Soudan et au Soudan du Sud (MOHEBALI *et al.* , 2020; PAHO, 2021).

- Leishmaniose cutanée (LC) : est la forme la plus courante de la maladie. Les espèces de *Leishmania* les plus courantes qui causent la LC dans l'Ancien Monde sont *L. major*, *L. infantum* et *L. tropica* et dans le Nouveau Monde, cette maladie est causée par *L. amazonensis*, *L. chagasi*, *L. mexicana*, *L. naiffi*, *L. braziliensis* et *L. guyanensis* . Il se caractérise par des lésions cutanées, y compris des ulcères, laissant des cicatrices permanentes. 90% de tous les cas de LC ne surviennent que dans sept pays: Afghanistan, Algérie, Brésil, Iran, Pérou, Arabie saoudite et Syrie. Dans le Brésil, LC représente plus de 90% des cas (LIMA, 2017; VRIES; REEDIJK; SCHALLIG, 2015).

- Leishmaniose cutanée-muqueuse (LMC) : Dans la plupart des cas, le LMC résulte d'une LC chronique et guérie sans traitement ou d'un traitement inadéquat. Elle est principalement causée par *L. braziliensis*, mais aussi par *L. panamensis*, *L. guyanensis*, *L. amazonensis* et *L. major*. Ses caractéristiques sont des lésions qui atteignent l'oropharynx, compromettre le septum cartilagineux et d'autres zones associées, ce qui est causé par une forte réponse immunopathologique. Environ 90% des cas se trouvent au Brésil, en Bolivie et au Pérou. Au Brésil, 3 % à 6 % des cas de leishmaniose sont atteints de LMC, mais dans certaines municipalités endémiques, cette proportion peut être supérieure à 25 % (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018; LIMA, 2017).

Le cycle de vie de *Leishmania* spp. comporte deux stades, l'un chez l'hôte vertébré et l'autre chez l'hôte invertébré, et le parasite a deux formes: promastigote (flagellé) et amastigote (non flagellé) présentés à la figure 4.

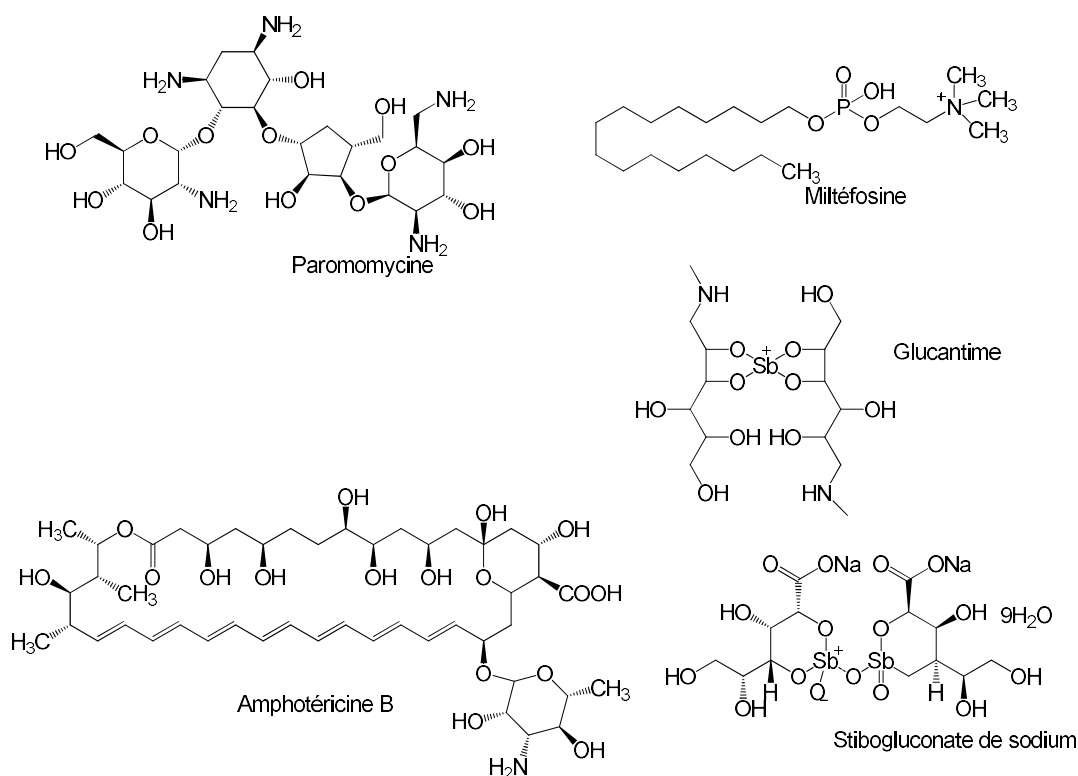
Figure 4. Le cycle de vie de *Leishmania* spp. Adapté : Adapté de « Centers for Disease Control and Prevention »



Source : (<https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>)

Le diagnostic de la maladie est établi à partir d'examen clinique, parasitologique et immunologique. Actuellement, les médicaments existants pour le traitement de cette maladie chronique sont principalement parentéraux, ont de nombreux effets secondaires, en plus des parasites qui y résistent. Les principaux médicaments utilisés dans le traitement de la leishmaniose sont les antimoniaux pentavalents, l'amphéthromycine B, la miltéfosine, la pentamidine et la paromomycine. Il n'existe actuellement aucun vaccin (Figure 5)(GHORBANI; FARHOUDI, 2017).

Figure 5. Les principaux médicaments utilisés dans le traitement de la leishmaniose.



Source: L'auteur

Ces traitements génèrent des effets indésirables très graves, tels que des effets tératogènes et cardiotoxiques, en plus d'une résistance accrue attribuée à leur utilisation. Les traitements actuels sont donc toxiques, coûteux ou conduisent à une résistance aux parasites, il y a donc un besoin urgent de nouveaux médicaments.

Dans ce contexte, les travaux préliminaires de l'équipe IICiMed ont identifié une sérine-thréonine kinase de *Leishmania* spp., caséine kinase 1 (*LmCK1*), comme cible parasitaire potentielle. (BAZIN *et al.*, 2021; MARCHAND *et al.*, 2015)

La caséine kinase 1 (CK1) est présente dans toutes les cellules eucaryotes et a récemment été décrite dans plusieurs organismes protozoaires. Dans *Leishmania* spp., deux écocinases excrétées ont été caractérisées biochimiquement et ont été déterminées comme ayant des activités similaires à CK1 (RACHIDI *et al.*, 2013).

Plusieurs études ont montré que cette enzyme joue un rôle important dans les voies de signalisation biologique chez les parasites (DURIEU *et al.*, 2016; RACHIDI *et al.*, 2013; MARHADOUR *et al.*, 2012) . Ainsi, l'évaluation biologique impliquant l'enzyme *LmCK1* est un excellent choix dans la recherche d'un nouvel antiparasitaire

## 2.2. *Trypanosoma cruzi*

La maladie de Chagas (MC) est une autre maladie parasitaire causée par le kinétoplastide hémoflagellé *Trypanosoma cruzi* et sa transmission se produit lorsqu'une punaise hématophage, connue sous le nom de triatome ou réduve, se nourrit du sang de l'hôte vertébré et libère par les matières fécales, le parasite, sous sa forme trypomastigotes, près du site de la morsure, l'infectant (FIOCRUZ, 2017).

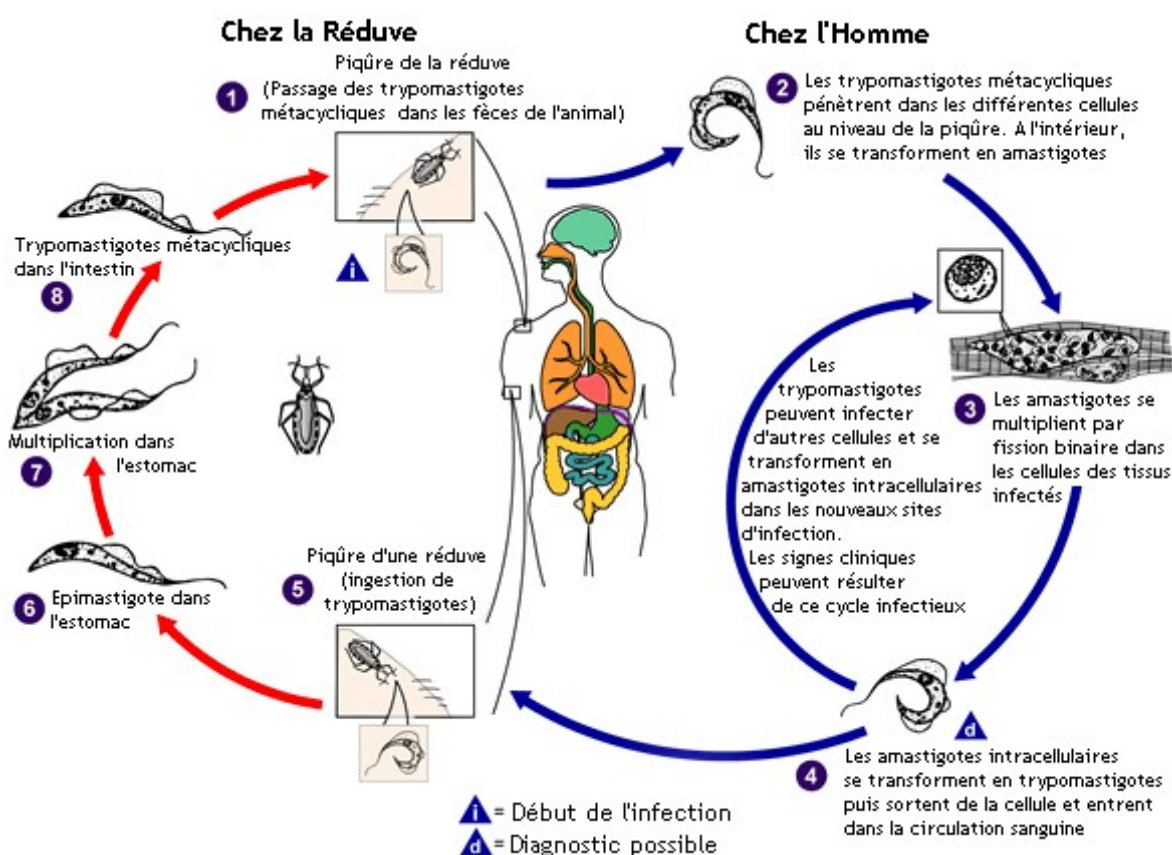
Il a été décrit pour la première fois par le chercheur brésilien Carlos Chagas en 1909 alors qu'il travaillait sur le contrôle d'une épidémie de malaria connue sous le nom de paludisme. Dans le travail de Chagas, il a lui-même décrit le cycle de vie, les moyens de transmission, l'étiologie, les formes cliniques et l'épidémiologie de la nouvelle maladie découverte, ce qui lui a valu deux recommandations au prix Nobel de médecine de l'époque. La maladie est également connue sous le nom de trypanosomiase américaine, car la trypanosomiase fait référence à une maladie causée par les protozoaires du genre *Trypanosoma* en un hommage au chercheur Oswaldo Cruz (CUNHA; CUNHA, 2021; LEWINSOHN, 1979).

Etant endémique dans les pays en développement et avoir comme seule alternative thérapeutique, le benznidazole, efficace uniquement dans la phase aiguë de la maladie et de toxicité élevée, la MC est reconnue comme une maladie négligée. Elle est endémique dans 21 pays d'Amérique latine, mais elle est présente dans des pays d'Amérique du Nord, d'Europe, du Japon et d'Australie, touchant 6 millions de personnes dans le monde (PAHO, 2021, 2022; DNDi, 2022). Au Brésil, on estime que 1 à 4,6 millions de personnes sont infectées, avec une moyenne de 4.000 décès chaque année, avec 1746 décès enregistrés en 2020. Cependant, ce nombre peut être plus élevé, en particulier le nombre de cas sans enregistrement, pendant la période pandémique de COVID-19, en plus du

manque de connaissance de la maladie et, par conséquent, du peu de diagnostic et de notification de la maladie (BRASIL, Ministère de la Santé, 2022; MSF, 2020; SANTOS *et al.*, 2020 ).

Le cycle de vie de *Trypanosoma cruzi* comporte deux stades, l'un chez l'hôte vertébré (l'humain) et l'autre chez l'hôte invertébré (la réduve), et le parasite a trois formes: le trypomastigote (flagellé) qui peut être circulant ou métacyclique, l'amastigote (non enflammé) et l'épimastigote (flagellé) illustrés à la Figure 6. Les trypomastigotes métacycliques se trouvent dans les matières fécales et l'urine de l'insecte vecteur et les trypomastigotes circulants dans le sang des mammifères, les deux sont des formes non répliquatives et infectieuses. Les épimastigotes sont présentes dans le tube digestif de l'insecte vecteur et dans la façon dont les amastigotes sont observés à l'intérieur des cellules de mammifères, à la fois sous formes répliquatives (FIOCRUZ, 2017).

Figure 6. Le cycle de vie de *Trypanosoma cruzi*. Adapté : Adapté de « Centers for Disease Control and Prevention »



Source : (<https://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>)

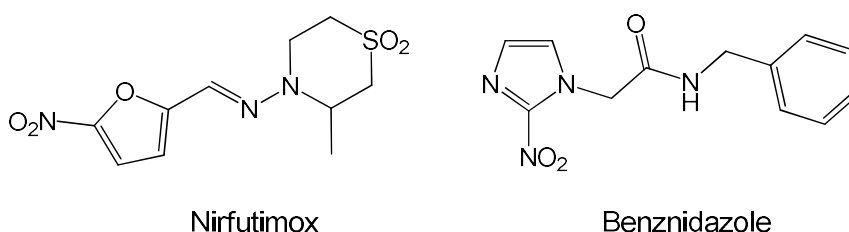
Au cours de la phase chez l'hôte invertébré, les formes epimastigote, présentes dans l'intestin postérieur, diffèrent par des trypomastigotes métacycliques (un processus connu sous le nom de métacyclogenèse) qui, éliminés par les matières fécales et l'urine de l'insecte vecteur, sont capables d'infecter l'hôte vertébré. Le parasite ne pénètre pas intact dans la peau, infectant seulement l'hôte par des lésions muqueuses ou cutanées. Chez les mammifères, les parasites sous leur forme trypomastigote pénètrent et se développent à l'intérieur des cellules près du site d'inoculation, où ils se différencient en amastigotes intracellulaires. Les amastigotes se multiplient par fission binaire et se différencient en trypomastigotes libérées dans le sang circulant après la perturbation des cellules hôtes, et les formes de trypanomastigotes circulantes peuvent réinfecter d'autres cellules en redémarrant le cycle. Si la réduve se nourrit du sang infecté de l'hôte mammifère, les formes de trypanomastigote sont ingérées par l'insecte et après les derniers jours, les parasites deviennent des épimastigotes, se divisant par fission binaire dans leur intestin, et migrent vers le rectum du parasite et se différencient en trypomastigotes métacycliques et sont ainsi éliminés par les matières fécales et l'urine (COIN; CUNHA, 2021; CDC, 2019).

La MC a une phase aiguë et une phase chronique. La phase aiguë se produit immédiatement après l'infection et peut durer quelques semaines ou quelques mois et pendant cette phase, des parasites circulent dans la circulation sanguine. La symptomatologie de cette phase est généralement légère ou même asymptomatique, présentant de la fièvre, un gonflement autour du site d'inoculation ou un gonflement rougeâtre des paupières, connu sous le nom de signe Romaña. Au cours de la phase chronique, après des décennies, les parasites sont internalisés dans les cellules cardiaques et le muscle digestif, ce qui entraîne des troubles cardiaques et digestifs (mégacôlon et mégacœsophage), mais aussi neurologiques (CDC, 2019; OMS, 2022).

Le diagnostic de la MC peut être fait par microscopie dans la phase aiguë de la maladie, tandis que dans la phase chronique, il est effectué par la recherche immunologique. Les deux principaux médicaments utilisés pour le traitement sont le benznidazole (le médicament de première intention) ou le nifurtimox (qui n'est pas disponible au Brésil) et a une durée moyenne de 60 jours. Ces médicaments sont plus efficaces dans la phase aiguë de la maladie, et lorsque la personne

infectée a reçu le traitement approprié dans cette phase, il y a environ 100% de chance de guérison (MSF, 2022) (Figure 7).

Figure 7. Les principaux médicaments utilisés dans le traitement de la maladie de Chagas (MC)



Source: L'auteur

Les deux provoquent des effets indésirables avec une faible efficacité du traitement pendant la phase chronique, en plus d'une résistance du parasite à ceux-ci. Le benznidazole, avec une dose thérapeutique plus élevée, provoque des effets toxiques beaucoup plus prononcés et fréquents tels que l'asthénie, les douleurs musculaires, les nausées et les troubles de l'hématopoïèse. Nifurtimox a des effets similaires, mais avec une intensité et une fréquence plus faibles, tels que l'anorexie, les troubles psychiques, l'épigastralgie, l'irritabilité et la névrite périphérique sensorielle (SILVA J. *et al.*, 2014).

Ainsi, il y a une urgence par la découverte de nouveaux médicaments plus efficaces, puisque les traitements actuels sont toxiques, limités à la phase aiguë et conduisent à un parasite résistant.

### 2.3.Cancer

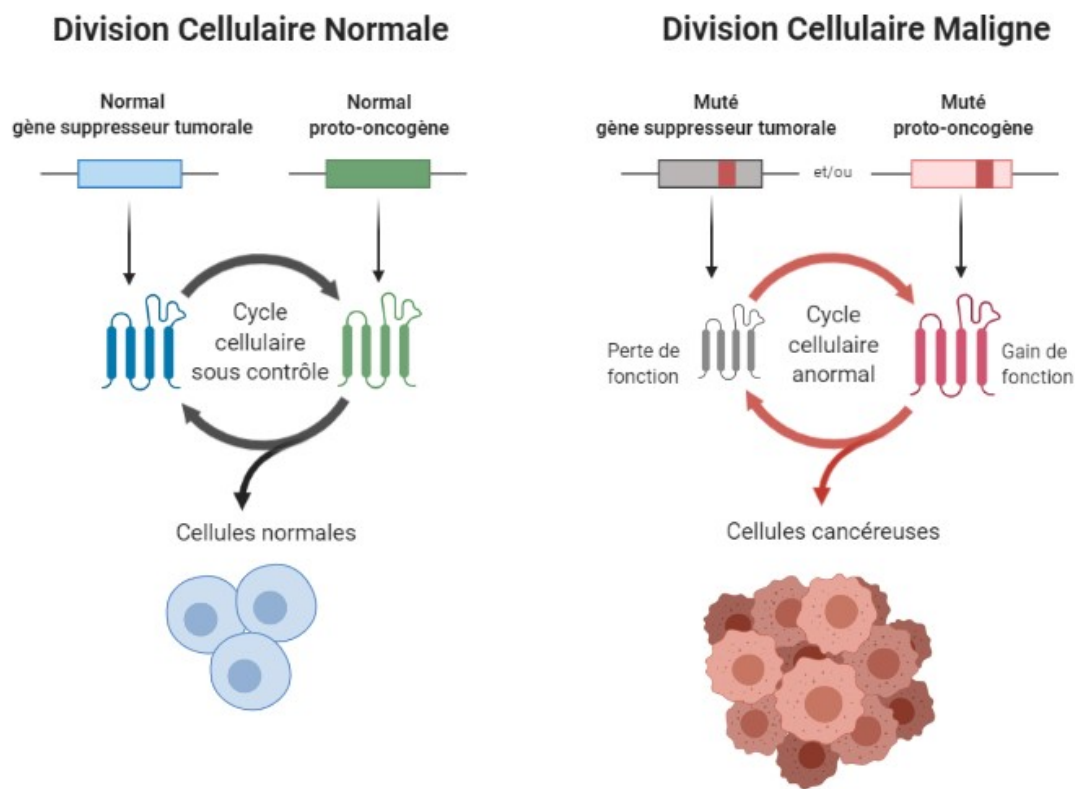
Le cancer est le nom donné à une collection de maladies connexes, qui couvre plus de 100 types différents de maladies malignes qui ont en commun la croissance incontrôlée de cellules anormales. Dans tous les types de cancer, les cellules commencent à se diviser sans arrêt et à se propager à distance aux tissus

ou organes adjacents, et peuvent infiltrer les tissus sains (sang, cerveau, os, poumon, etc.) du corps, les détruisant. Il est également connu sous le nom de néoplasie et contraste avec les tumeurs bénignes, car elles ne se propagent pas (INCA, 2020; NIH, 2015).

L'oncogenèse (le processus physiopathologique du cancer) est due à une maladie génétique, qui peut survenir en raison de l'exposition à des facteurs de risque tels que l'exposition aux rayonnements ionisants ou solaires, le tabagisme, l'alcool, l'exposition prolongée à des agents chimiques ou l'héritage génétique. (PLUMMER *et al.*, 2016; INCA, 2020)

Tout le cycle de vie cellulaire est régulé par des gènes, qui codent chacune des protéines impliquées dans le cycle cellulaire. Dans le contrôle positif du cycle, induisant ou stimulant la progression de celui-ci, il existe des **proto-oncogènes**, qui, après mutation, deviendront des oncogènes, dont l'action permettra de gagner en fonction à la cellule mutante. Dans le contrôle négatif du cycle cellulaire se trouvent les gènes **suppresseurs de tumeurs**, qui agissent en bloquant ou en protégeant le cycle, et les mutations dans ce groupe de gènes se manifestent par leur manque d'action contre la cellule oncogène (Figure 8). Par conséquent, des mutations dans ces gènes peuvent conduire à la dérégulation de ce cycle (WARD, 2002).

Figure 8. Expression du gène proto-oncogène et du gène suppresseur de tumeur dans les cellules normales et les cellules cancéreuses.



Source: <https://app.biorender.com/biorender-templates>. Adapté

En plus des changements du cycle de vie, des changements dans les gènes qui contrôlent la vie ou programment la mort cellulaire, tels que les gènes de réparation de l'ADN et les gènes impliqués dans le **processus d'apoptose** (un processus qui permet d'éliminer rapidement les cellules inutiles ou dangereuses pour le corps) peuvent se produire. Résistant à l'apoptose, de nombreuses tumeurs survivent et se développent, avec pour résultat, s'accumulent dans le corps et utilisent l'oxygène et les nutriments des cellules saines (LIVINGSTON, 2001).

Lorsqu'elles se divisent rapidement, ces cellules ont tendance à être très agressives et incontrôlables, déterminant la formation de tumeurs, qui peuvent migrer dans la circulation sanguine ou les ganglions lymphatiques et s'installer dans d'autres organes, remplaçant les tissus sains par la tumeur. Ce processus de dissémination du cancer est appelé métastase (FARES *et al.* , 2020).

Les différents types de cancer correspondent aux différents types de cellules dans le corps. Lorsqu'ils prennent naissance dans les tissus épithéliaux, tels que la peau ou les muqueuses, ils sont appelés carcinomes. Si le point de départ sont des

tissus conjonctifs, tels que les os, les muscles ou le cartilage, ils sont appelés sarcomes (SMITH; DUEBER; ALLISON, 2020).

Selon l'Organisation mondiale de la santé, le cancer est la deuxième maladie la plus mortelle au monde. En 2020, il y a eu plus de 19 millions de nouveaux cas et 9,95 millions de décès, le type de cancer du poumon le plus meurtrier, avec plus de 1,79 million de décès à tous les âges et chez les deux sexes (IARC, 2020). Le cancer du poumon est le plus mortel parmi les foyers, chez les femmes, le cancer du sein est le plus fréquent. Les cinq types de cancer les plus courants qui tuent les hommes sont, par ordre de fréquence, le cancer du poumon, le cancer de l'estomac, le cancer du foie, le cancer colorectal et le cancer de l'œsophage. Les cinq cancers les plus courants qui tuent les femmes sont, par ordre de fréquence, le cancer du sein, le cancer du poumon, le cancer de l'estomac, le cancer colorectal et le cancer du col de l'utérus (IARC, 2020; OMS, 2018).

Au Brésil, le cancer est également la deuxième maladie la plus mortelle, avec plus de 600 000 cas et plus de 224 000 décès en 2020. Le cancer du sein était le plus répandu en 2020 et en 2018 chez les femmes, tandis que le cancer de la prostate était le plus répandu en 2020, avec la trachée, les bronches et les poumons en 2018 (INCA, 2020).

Le traitement du cancer est effectué selon trois modalités principales: la chimiothérapie, la radiothérapie et la chirurgie. Le choix dépend de la susceptibilité des tumeurs à chacune des modalités thérapeutiques et de la meilleure séquence de leur administration, et peut être administré ensemble. Actuellement, il existe peu de néoplasmes malins traités avec une seule de ces modalités (BRACCI *et al.*, 2013).

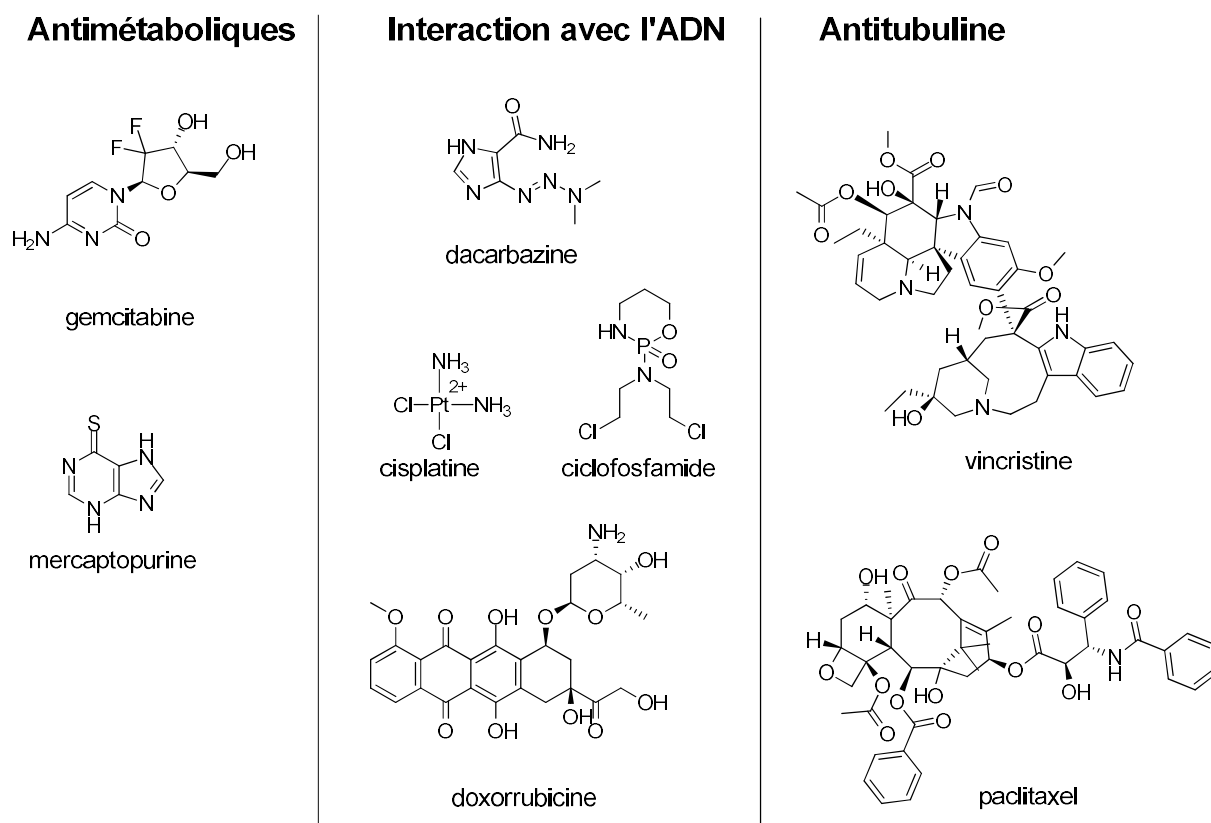
La chimiothérapie utilise des médicaments appelés médicaments antinéoplasiques, administrés à intervalles réguliers, qui varient selon les schémas thérapeutiques. Cependant, ces agents peuvent avoir un impact non seulement sur les cellules tumorales, mais aussi sur les cellules hôtes normales et, par conséquent, sur leur système immunitaire (BRACCI *et al.*, 2013) (SWIFT; GOLSTEYN, 2014).

Trois familles différentes de médicaments antinéoplasiques conventionnels peuvent être distinguées en fonction de leur action sur l'ADN (GUICHARD *et al.*, 2017) (NUSSBAUMER *et al.*, 2011) (Figure 9) :

- 1) Molécules qui agissent sur la synthèse de l'ADN (antimétabolites);

- 2) Molécules à action directe sur l'ADN (agents alkylants, agents de réticulation, agents d'intercalation et inhibiteurs de la topoisomérase);
- 3) Molécules ayant une action sur la mitose (agents antitubulines).

Figure 9. Certains antinéoplasiques selon leur fonction pharmacologique dans la cellule.

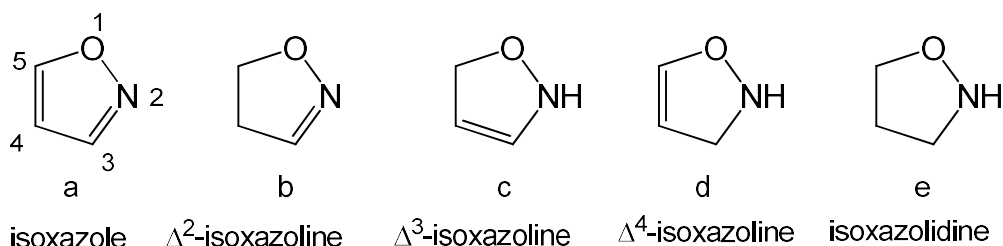


Source: L'auteur

## 2.4. Isoxazoles (isoxazole et ses dérivés)

Les isoxazoles sont des composés hétérocycliques de cinq membres, qui jouent un rôle important dans le domaine de la chimie médicinale. Ils ont trois atomes de carbone et un atome d'oxygène vicinal à un autre d'azote, et peuvent être classés comme isoxazoline, isoxazoline et isoxadiazolidine, en fonction de l'insaturation présente dans le cycle. Lorsqu'il est hétérocycle aromatique insaturé, il est appelé isoxazole (a), étant partiellement saturé, les analogues sont appelés isoxazolines (b-d) et complètement l'analogue saturé est l'isoxazolidine (e) (Figure 10)(CHIKKULA; S., 2017).

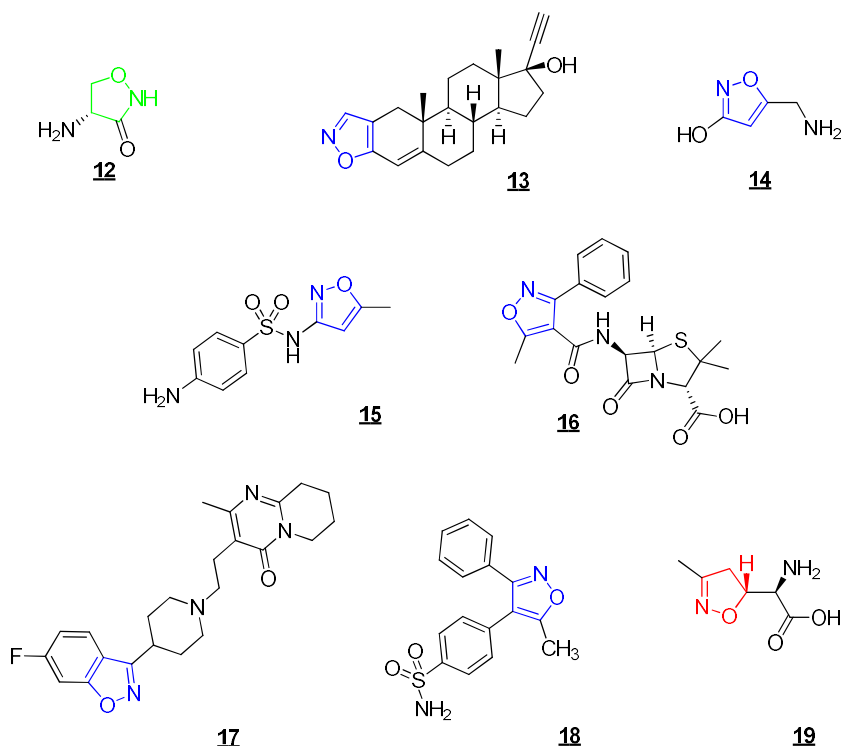
Figure 10. Structure de base de l'isoxazole, des isoxazolines et de l'isoxazolidine



Source: L'auteur

Les noyaux d'intérêt de ce travail, l'isoxazole et la Δ<sup>2</sup>-isoxazoline, sont mis en évidence sur leurs activités pharmacologiques, étant présents dans la nature, comme dans le cas de l'antibiotique antituberculeux et de l'antilépra cyclosérine **12** (DESJARDINS *et al.*, 2016), les stéroïdes tels que le danazol **13** (MCKINNEY *et al.*, 2013) et muscimol **14** isolé d'*Amanita muscaria* (MICHELOT; MELENDEZ-HOWELL, 2003). Ils peuvent être obtenus synthétiquement par des réactions de cycle et de cycloaddition, qui sont à l'origine de composés ayant une activité anti-inflammatoire (BANOGLU *et al.*, 2016), immunosuppressive (ZIMECKI *et al.*, 2018), antimicrobienne et antioxydante (SHAIK *et al.*, 2020). En outre, ce noyau est présent dans des médicaments tels que les antibiotiques sulfaméthoxazole **15** et oxacilline **16**, la rispéridone **17** antipsychotique, l'inhibiteur sélectif de la COX-2, le valdécoxib **18** et l'acivicine **19**, qui a une activité antitumorale et leishmanicide (Figure 11)(AGRAWAL; MISHRA, 2018).

Figure 11. Médicaments commerciaux contenant le noyau isoxazole (bleu), isoxazoline (rouge) et isoxazolidine (vert).

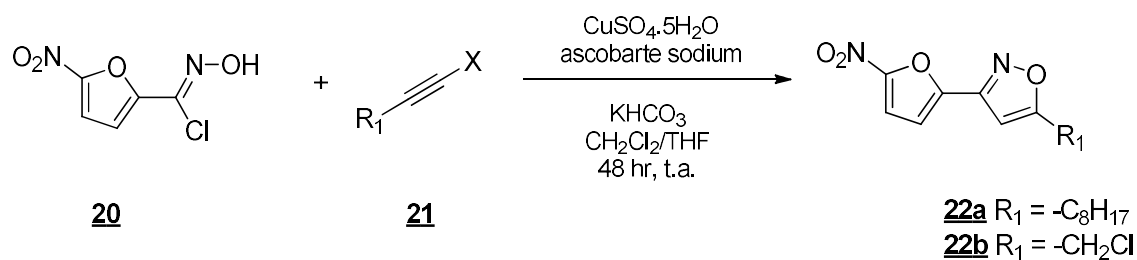


Source: L'auteur

#### 2.4.1. Isoxazole

Dans un travail réalisé par Trefzger *et al.* (2019), une série d'isoxazoles nitrofuranes a été synthétisée avec de bons rendements et a testé son activité leishmanicide, qui a montré que les composés remplacés par le chloroalkyle étaient actifs pour les formes promastigote et amastigote, soulignant l'activité du composé **22** auquel il présentait  $Cl_{50} = 0,6 \mu M$  et IS = 5,2 contre les formes amastigote. Dans la série alkyle, le composé **22b** se distingue par  $Cl_{50}$  de  $8,5 \mu M$  et IS de 8,0 pour les formes amastigote (Schéma 2)(TREFZGER *et al.*, 2019).

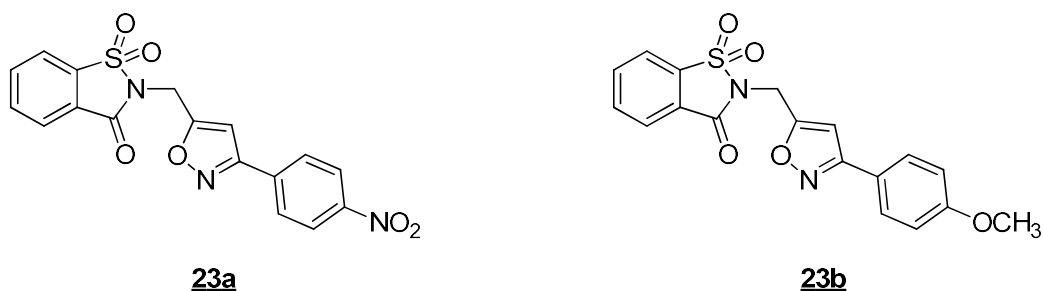
Schéma 2. Synthèse des isoxazoles nitrofuranes **22a-b**



Dans ce travail, une activité antifongique a également été évaluée, dans laquelle le composé **22b** était actif contre toutes les souches de candida testées, avec une concentration minimale inhibitrice (CMI) pour *C. krusei* et *C. glabrata* de 35,5  $\mu$ M et 17,5  $\mu$ M, respectivement, inférieure à celle du fluconazole.

Dans une étude d'évaluation antitumorale, des séries d'isoxazoles et de  $\Delta^2$ -isoxazolines liés à la structure de la saccharine (Figure 12), ont présenté une puissante activité inhibitrice des anhydrases carboniques humaines (hCA), sélective contre les hCA IX et XII (protéines membranaires surexprimées dans l'hypoxie tumorale et hCA IX absentes dans les tissus sains). Dans cette étude, les structures **23a** et **23b** étaient les inhibiteurs les plus puissants des hCA IX et XII à des concentrations nanomolaires et ne présentaient pas d'effet cytotoxique allant jusqu'à 200  $\mu$ M dans les fibroblastes humains (D'ASCENZIO *et al.*, 2020).

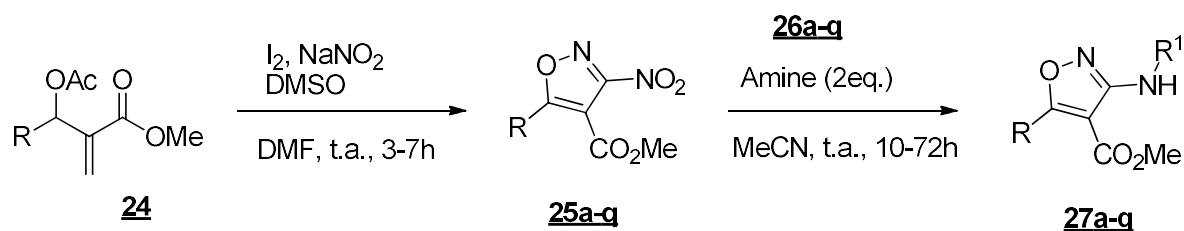
Figure 12. Série d'isoxazoles et d'isoxazolines  $\Delta^2$ -antitumorales liées à la structure de la saccharine.



Le composé **23b** a agi comme chimiosensibilisant en association avec des doses subtoxiques de doxorubicine dans le test *in vitro* contre la lignée cellulaire MCF-7 du cancer du sein, qui est un complément à l'activité antitumorale, compte tenu de la cardiotoxicité élevée de la doxorubicine à des niveaux thérapeutiques (D'ASCENZIO *et al.*, 2020).

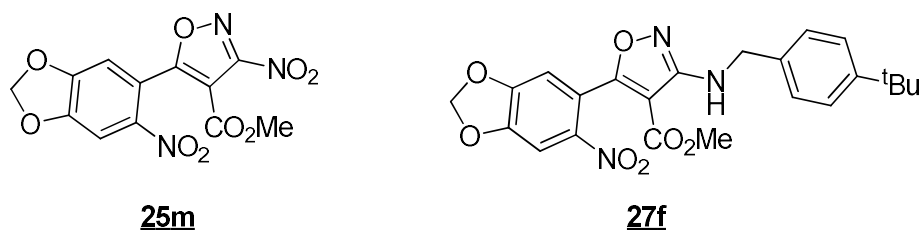
L'activité leishmanicide d'une série de dérivés 3-nitro et 3-amino-isoxazole a été réalisée par Mukhopadhyay *et al.* (2020), *in vitro* et *in vivo*, contre les protozoaires *leishmania donovani*. Les dérivés clairsemés **24a-q** du 3-nitroisoxazole ont été obtenus par cyclisation des acétates de Morita-Baylis-Hillman (MBH) remplacés en présence de  $\text{NaNO}_2$  et d'iodo moléculaire, tandis que les 3-aminoisoxazolols **25a-j** ont été obtenus par condensation avec des amines remplacées (Schéma 3)(MUKHOPADHYAY *et al.*, 2020).

Schéma 3. Synthèse de dérivés 3-nitroisoxazoles et isoxazole 3-aminés.



Dans le test *in vitro*, les 3-nitroisoxazoles présentaient principalement un  $\text{CI}_{50}$  compris entre 0,34  $\mu\text{M}$  et 2,72  $\mu\text{M}$ , contre la forme promastigote, étant équipotents ou meilleurs que celui du médicament de référence testé, la miltéfosine ( $\text{CI}_{50} = 2,52 \mu\text{M}$ ). Le composé **25m** ( $\text{R} = 6\text{-NO}_2\text{-3,4-OCH}_2\text{O-C}_6\text{H}_2$ ) présentait un  $\text{IS} = 6,51$ , une valeur supérieure à celle de la miltéfosine ( $\text{IS} = 5,76$ ), qui a été soumise à l'essai *in vivo* et présentait un pourcentage de croissance de 48% à 66% d'inhibition de la charge parasitaire, après le 7<sup>o</sup> jour pour le 28<sup>o</sup> jour de traitement oral. Parmi les 3-aminoisoxazoles, les **27f** ( $\text{R} = 6\text{-NO}_2\text{-3,4-OCH}_2\text{O-C}_6\text{H}_2$ ;  $\text{R}_1 = \text{CH}_2\text{-(4-}t\text{Bu-C}_6\text{H}_4)$ ) a présenté un  $\text{IS} = 14$  pour le test *in vitro* et un pourcentage d'inhibition de 12,7% après 28 jours de le traitement (Figure 13)(MUKHOPADHYAY *et al.*, 2020).

Figure 13. Structures chimiques de dérivés de 3-nitro et 3-amino-isoxazole à activité leishmanicide.

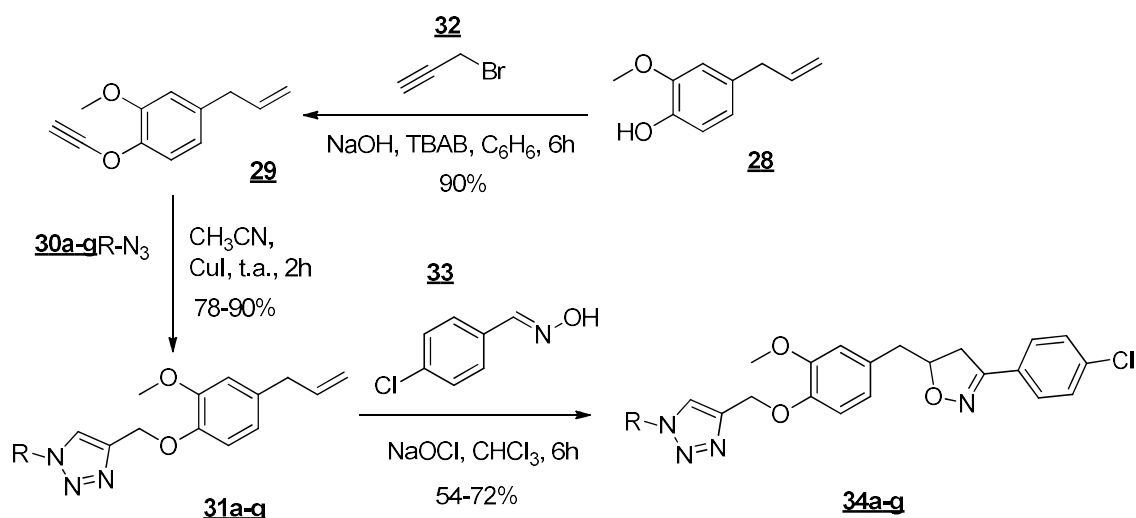


#### 2.4.2. Isoxazoline

Dans une étude menée par Taia *et al.* (2020), une série de 1,2,3-triazole- $\Delta^2$ -isoxazolines **34** ont été synthétisées par cycloaddition 1,3-dipolaire et ont démontré une activité antiproliférative contre différentes lignées cellulaires (TAIA *et al.*, 2020). Pour la synthèse du système bi-hétérocyclique du 1,2,3-triazole-isoxazoline **32a-g**, l'alkyl-eugénol **28**, obtenu par une réaction de O-alkylation de l'eugénol **29**, a été

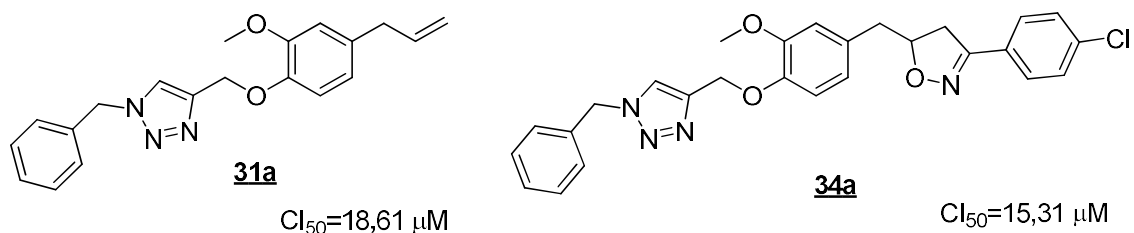
soumis à une réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire avec **30** azides substituée, donnant naissance à des monocycles **31a-g**. Celles-ci ont été soumises à d'autres réactions de cycloaddition 1,3-dipolaire, le dipôle 4-chloro-benzaldoxime et la partie alcène terminale des monocycloadducts **31** comme dipolarophiles, en formant à des bi-hétérocycliques de 1,2,3-triazole- $\Delta^2$ -isoxazoline **34a-g**. Les analyses spectroscopiques par RMN NOESY et HMBC des composés **31** et **34** ont révélé une régiosélectivité dans leur formation (Schéma 4).

Schéma 4. Synthèse du système bi-hétérocyclique du 1,2,3-triazole-isoxazoline **33a-g**



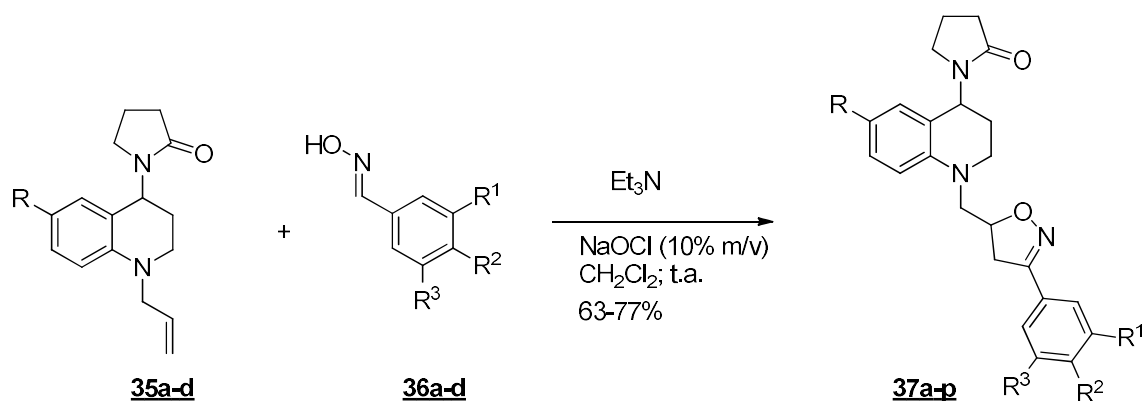
Les composés **31a-g** et **34a-g** ont été testés pour l'activité anticancéreuse *in vitro* contre les lignées cellulaires du fibrosarcome HT-1080, du carcinome pulmonaire A549 et du carcinome du sein MCF-7 et MDA-MB-231, où la plupart des molécules testées présentaient des effets inhibiteurs de croissance moyenne dans toutes les lignées cellulaires cancéreuses avec des valeurs de  $CI_{50}$  allant de 15 à 45  $\mu M$ , étant le plus puissant le bis-hétérocycle **34a**, avec un  $CI_{50}$  = 15,31  $\mu M$  devant la lignée du fibrosarcome HT-1080, tandis que son précurseur monocycloate **31a** présentait une  $CI_{50}$  = 18,61  $\mu M$ , présentant une augmentation de l'activité anticancéreuse pour cette lignée, suggérant un effet additif du noyau isoxazoline (Figure 14).

Figure 14. Activité cytotoxique contre les cellules HT-1080 du composé **31a** et de son précurseur **34a**.



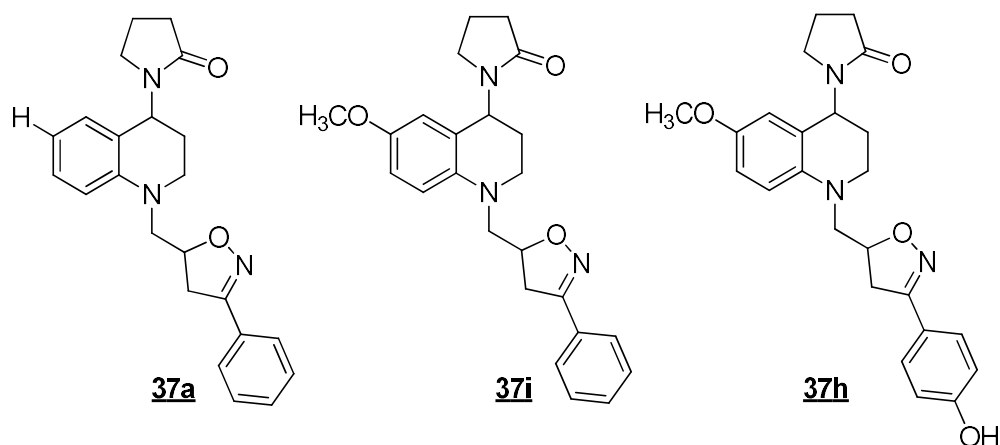
Une série d'hybrides tétrahydroquinoline-isoxazoline **37a-p** (Schéma 5) a également été synthétisée par réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire de *N*-allyl-tétrahydroquinolones **35a-d** et d'aldoximes respectifs **36a-d** avec des rendements modérés à bons (63-77%) (BERNAL *et al.*, 2020).

Schéma 5. Tétrahydroquinoline-isoxazoline **37** hybrides.



Pour l'évaluation *in vitro* de l'activité anticancéreuse, des lignées cellulaires d'adénocarcinome du sein humain (MCF-7), de carcinome du foie humain (HepG2), d'adénocarcinome pulmonaire humain (A549), de cancer du col de l'utérus (HeLa) et de mélanome murin (B16F10) ont été utilisées. Les composés **37a** ( $CC_{50} = 11,37 \mu M$ ,  $IS = 5,1$ ) et **37i** ( $CC_{50} = 21,95 \mu M$ ,  $IS > 4,6$ ) (Figure 15) ont montré les meilleures activités anticancéreuses contre les cellules de mélanome murin (B16F10) avec une sélectivité considérable. Le composé **37h** a montré la meilleure activité anticancéreuse dans les cellules cancéreuses du col de l'utérus (HeLa) ( $CC_{50} = 10,21 \mu M$ ,  $IS = 4,1$ ), et était également légèrement plus actif que l'oxaliplatine ( $CC_{50} = 14,30 \mu M$ ,  $IS = 3,60$ ), médicament de référence.

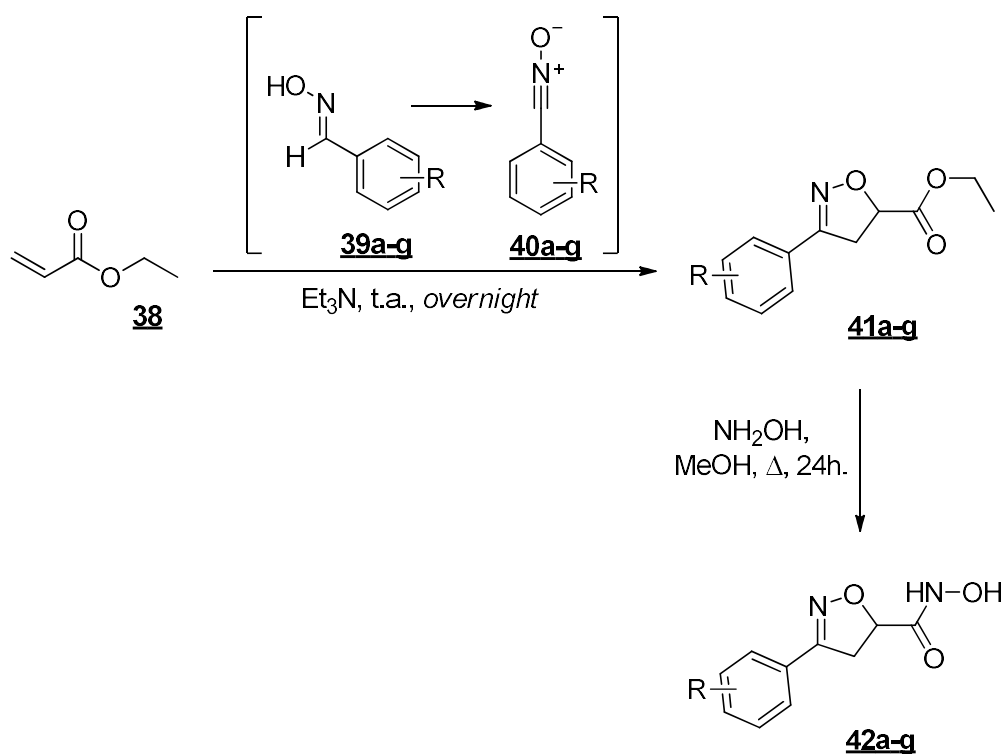
Figure 15. Structures chimiques des hybrides tétrahydroquinoléine-isoxazoline **37a**, **37i** et **37h** et leurs valeurs  $CC_{50}$  contre les cellules tumorales



( $CC_{50}$  = 11,37  $\mu$ M, IS = 5,1)    ( $CC_{50}$  = 21,95  $\mu$ M, IS > 4,6)    ( $CC_{50}$  = 10,21  $\mu$ M, IS = 4,1)

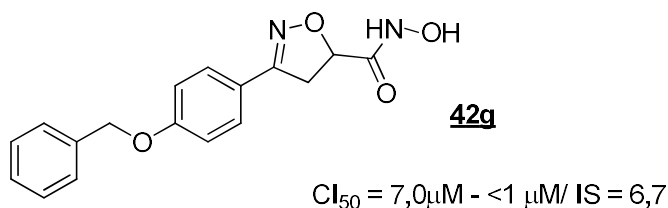
Les travaux rapportés par Rodrigues *et al.* (2013) a présenté une série de  $\Delta^2$ -isoxazolines incorporant des fractions d'hydroxamate **42a-g**, qui agissent comme inhibiteurs efficaces de l'anhydrase carbonique (AC) du *Trypanosoma cruzi* (TCCA).

La synthèse s'est produite par cycloaddition 1,3-dipolaire entre les acides hydroxamiques **39a-g**, comme dipôle et l'acrylate d'éthyle **38** comme dipolophile, formant l'ester isoxazoline **41a-g**, qui, après être resté en reflux avec l'hydroxylamine pendant 24 h, a formé l'équivalent acide hydroxamique **42a-g** (Schéma 6).

Schéma 6. Synthèse d'acides hydroxamiques **42a-g**

Les composés des séries **41** et **42** (Figure 16) ont été étudiés dans une activité anti-trypanosome cytotoxique *in vitro* contre la forme épimastigote du parasite *T. cruzi*, et le composé **41g** présentait les meilleures valeurs de  $\text{CI}_{50}$  contre la forme épimastigote, à différentes concentrations du composé (valeurs de  $\text{CI}_{50}$  de 7,0 à  $<1 \mu\text{M}$ ). L'indice de sélectivité (IS) était de 6,7 et ne montrait aucune cytotoxicité pour les cellules macrophages humaines. Les données préliminaires *in vivo* ont montré que les données préliminaires ont montré que **42g** peuvent atteindre deux protéines importantes pour le cycle de vie du parasite: l'anhydrase  $\alpha$ -carbonique (TcCA) et les métalloprotéinases, entraînant une puissante inhibition de la croissance *in vivo* et une diminution substantielle de la parasitémie chez les souris infectées par *T. cruzi*. Tous les rats traités avec ce composé ont survécu, en plus d'être plus efficaces que le benznidazole, un médicament de référence utilisé dans ce test (RODRIGUES *et al.*, 2013).

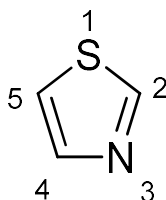
Figure 16. Structure chimique d'une hydroxamate- $\Delta^2$ -isoxazoline **42g** et valeurs de son activité antitrypanosomique.



## 2.5.Thiazole

Le thiazole (Figure 17), également appelé 1,3-thiazole, est un cycle hétéroaromatique à cinq membres contenant un atome de soufre et un atome d'azote à la position 3 de ce cycle. C'est une structure plane et son aromaticité provient de la relocalisation d'une des paires d'électrons soufrés à travers le cycle (RAM *et al.*, 2019).

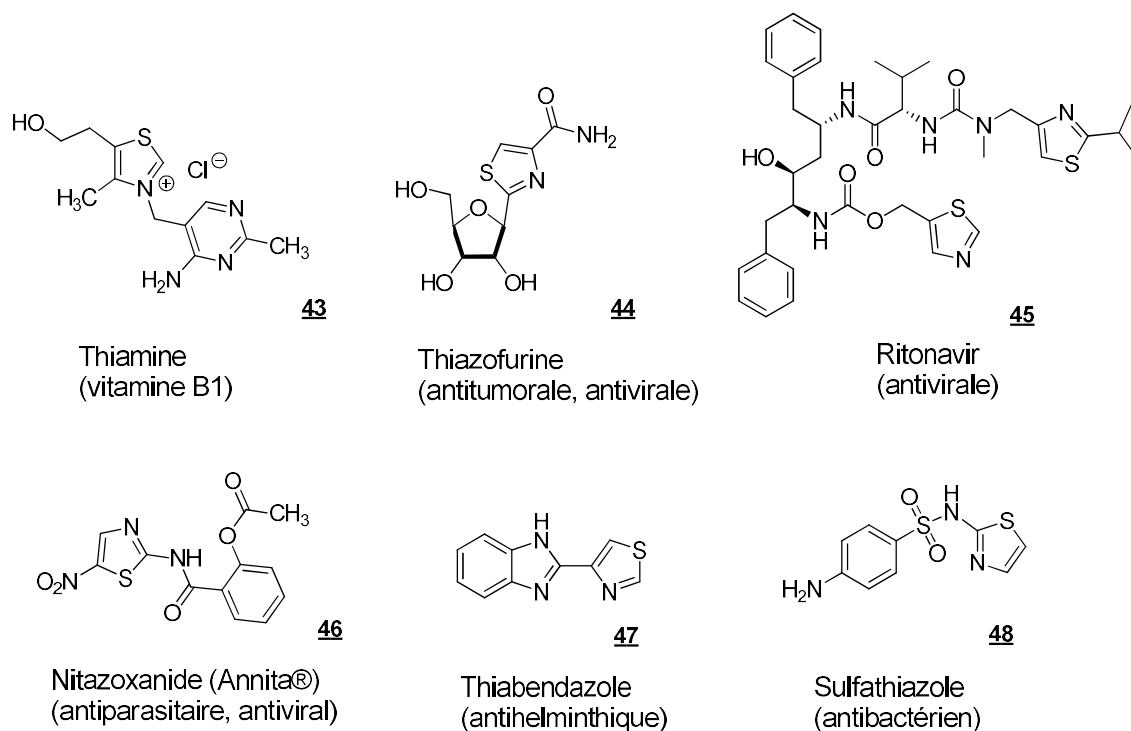
Figure 17. Représentation du thiazole



Source: L'auteur

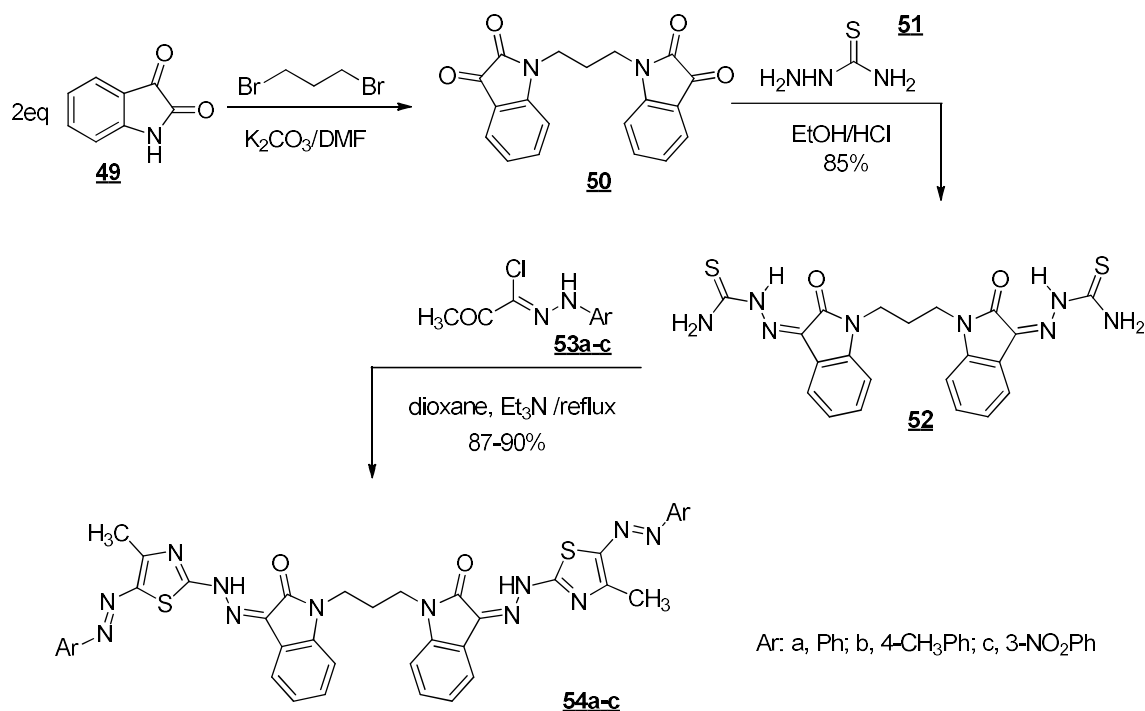
Le cycle thiazole a une activité pharmacologique largement connue. D'origine naturelle, la thiamine **43**, également connue sous le nom de vitamine B1, qui a un cycle thiazole attaché à la 2-méthylpyrimidine-4-amine sous forme de sel de chlorhydrate. Plusieurs médicaments commerciaux contiennent ce noyau, peuvent être cités comme Thiazofurine **44** (antitumorale, antivirale), Ritonavir **45** (antivirale), Nitazoxanide **46** (antiparasitaire, antivirale), Thiabendazole **47** (anthelminthique) et Sulfathiazole **48** (antibactérien) (Figure 18) (RAM *et al.*, 2019; SOUZA, 2005).

Figure 18. Médicaments commerciaux contenant le noyau thiazole.



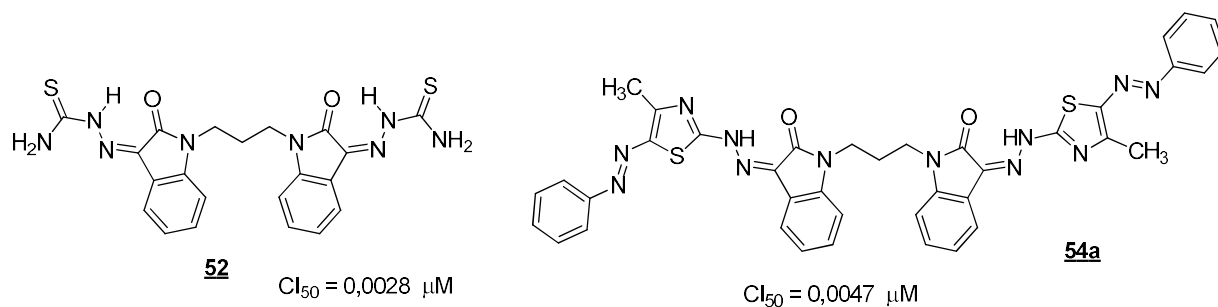
Source: L'auteur

Une série de bis-thiazoles **54a-c** a été synthétisée par condensation du dérivé de bis-thiosemicarbazone **52** avec des dérivés halogénés **53a-c** (Schéma 7), (ALTHAGAFI *et al.*, 2018). Dans cette synthèse, la bis-indoline-2,3-dione **50** a été préparée par traitement à l'isatine **49** avec du 1,3-dibromopropane dans du diméthylformamide avec agitation à température ambiante en présence d'une quantité catalytique de carbonate de potassium. Afin d'explorer l'utilité de la bis-indoline-2,3-dione **50** dans la synthèse du *scaffold*, elle a été condensée avec du thiosemicarbazide **51** dans de l'éthanol en présence d'une quantité catalytique de HCl sous reflux pendant 6 h. Ces conditions ont conduit à la bis-thiosemicarbazone **52** correspondante avec un rendement de 85%. Les dérivés cibles **54a-c** ont été synthétisés dans une réaction *one pot* du bis-thiosemicarbazide **52** avec les dérivés chlorés **53a-c** en présence de triéthylamine (Schéma 7). Les dérivés du thiazole **54a-c** ont été obtenus avec des rendements élevés (ALTHAGAFI *et al.*, 2018).

Schéma 7. Synthèse des bis-thiazoles **54**

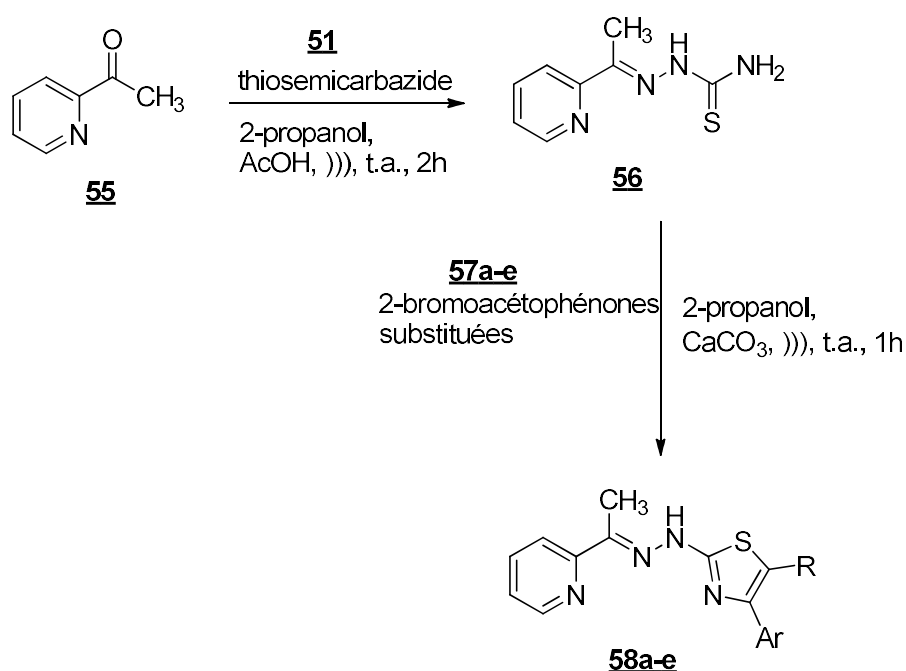
De plus, l'activité cytotoxique des dérivés produits a été retracée contre la lignée cellulaire MCF-7 (cellule cancéreuse du sein). L'activité antitumorale des composés **50**, **52**, **54a-c** (Figure 19) a été évaluée *in vitro*, où les composés **52** et **54a** ont l'impact significatif le plus élevé de  $Cl_{50}$  0,0028  $\mu$ M et 0,0047  $\mu$ M, respectivement, présentant une puissance plus élevée par rapport au médicament de référence (doxorubicine  $Cl_{50}$  = 1,2001  $\mu$ M), en plus de mettre en évidence la fonction du groupe thiosemicarbazone dans la molécule. De même, les observations recueillies à **54b** et **54c** ont montré une activité anticancéreuse modérée mais acceptable à 2,38  $\mu$ M et 2,10  $\mu$ M, respectivement (ALTHAGAFI *et al.*, 2018).

Figure 19. Structures chimiques des bis-thiazoles **52**, **54a** et leurs valeurs par rapport à l'activité cytotoxique, contre la lignée MCF-7.



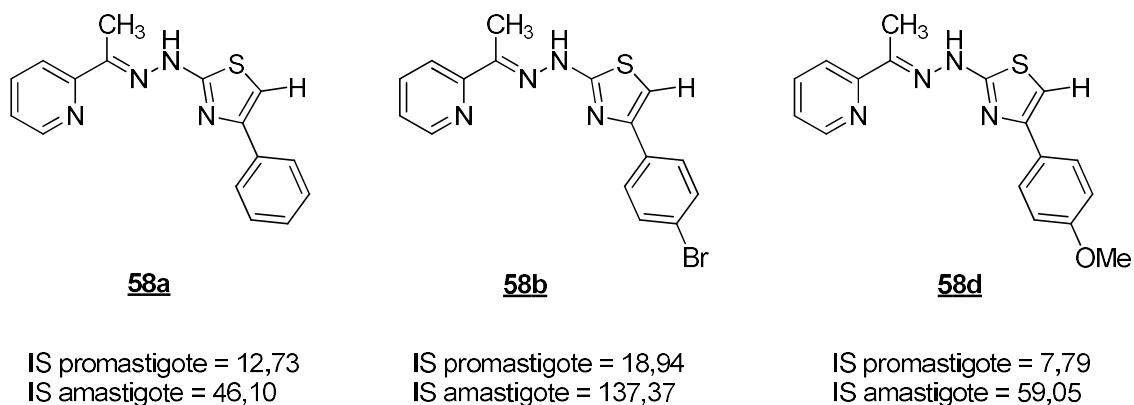
Dans une étude récente de Oliveira *et al.* (2020), les thiazolopyridines ont été soumises à une évaluation leishmanicide contre *Leishmania infantum* (OLIVEIRA *et al.*, 2020). La synthèse de la 2-pyridylsemicarbazone **56** se produit par condensation de la 2-acétylpyridine **55** avec la thiosemicarbazide **51**, qui, à l'étape suivante, réagit avec les 2-bromoacétophénonnes **57a-e**, formant ainsi des dérivés thiazoles avec l'espaceur hydrazone **58a-e** (Schéma 8).

Schéma 8. Synthèse des dérivés thiazoles **58**



Les résultats de l'activité leishmanicide *in vitro* étaient prometteurs pour les composés **58a** ( $Cl_{50}$  = 3,57  $\mu$ M ; IS = 12,73) , **58b** ( $Cl_{50}$  = 3,12  $\mu$ M ; IS = 18,94) et **58d** ( $Cl_{50}$  = 4,44  $\mu$ M ; IS = 7,79), devant la forme promastigote, et ceux-ci sont sélectionnés pour être testés par rapport à la forme amastigote, présentant les résultats suivants **58a** ( $Cl_{50}$  = 0,99  $\mu$ M ; IS = 46,10) , **58b** ( $Cl_{50}$  = 0,43  $\mu$ M ; IS = 137,37) et **58d** ( $Cl_{50}$  = 0,59  $\mu$ M ; IS = 59,05). Dans cette étude, les formes de cellules promastigotes ont été analysées par microscopie électronique à balayage (MEB), et lorsqu'elles étaient en contact avec le composé **58b** à la concentration de  $Cl_{50}$ , elles présentaient une perte de volume cellulaire avec un plissement intense de la membrane cellulaire, avec l'absence de débris cellulaires ou de dommages apparents à la membrane, suggérant une mort par apoptose (OLIVEIRA *et al.*, 2020) (Figure 20).

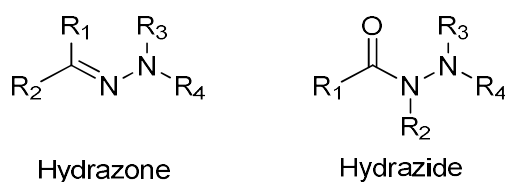
Figure 20. Structures chimiques des dérivés de thiazoles à espacement hydrazone **58a**, **58b** et **58d** avec les valeurs IS pour l'activité leishmanicide.



## 2.6. Hydrazone et hydrazides

Les hydrazones et les hydrazides (Figure 21) constituent une classe importante de composés contenant le groupe azoméline ( $-\text{NH}-\text{N}=\text{CH}-$ ) (POPIOŁEK *et al.*, 2016). Elles agissent comme des espaceurs et ces fonctions ont été mises en évidence comme des fonctions clés dans plusieurs agents bioactifs, dans différentes applications pharmaceutiques et rendant possible la synthèse de différents *scaffolds* hétérocycliques. Les hydrazones sont obtenues par condensation des hydrazines avec des cétones ou des aldéhydes, et lorsqu'elles sont avec des esters, elles forment des hydrazides (MOHAREB *et al.*, 2010).

Figure 21. Représentation des groupes hydrazone et hydrazide

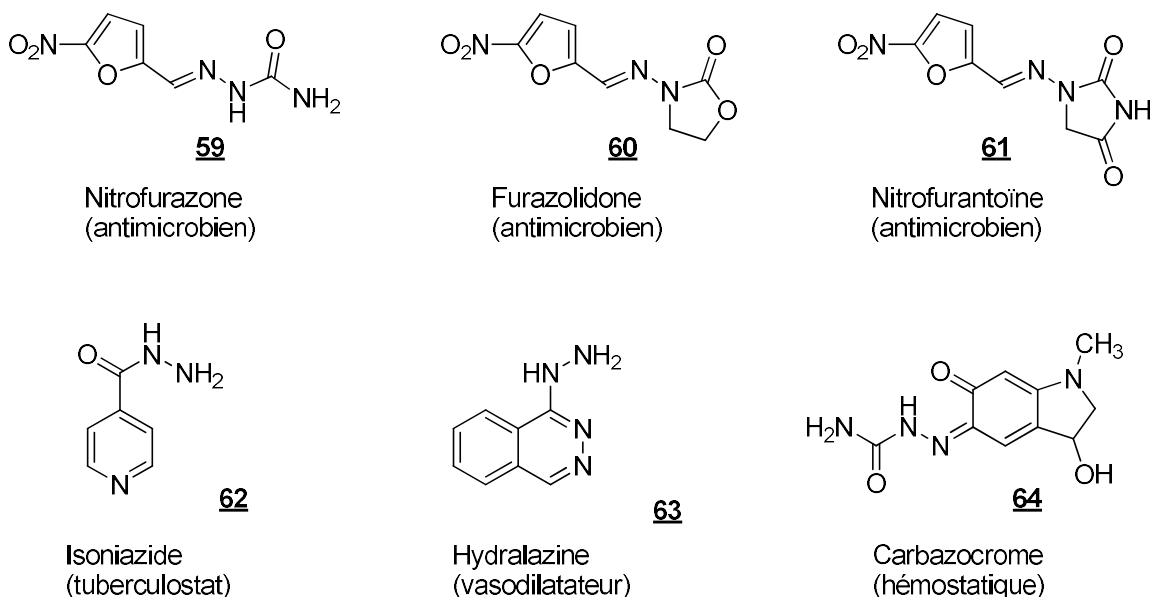


Source: L'auteur

Les hydrazones et les hydrazides ont présenté des propriétés pharmacologiques telles que les analgésiques, les antifongiques, les antibactériens, les antiviraux, les anti-inflammatoires, les anticancéreux et les leishmanicides (AMIM *et al.*, 2015; BARMAN *et al.*, 2014; LINDGREN *et al.*, 2014; RAJ *et al.*, 2007; WANG *et al.*, 2017). En outre, des médicaments tels que les antimicrobiens nitrofurazone **59**,

furazolidone **60**, nitrofurantoïne **61** et isoniazide **62**, ainsi que le vaisseau dilatateur hydralazine **63** et le carbazocrome hémostatique **64** (Figure 22) sont connus pour contenir l'hydrazide-hydrazone (POPIOŁEK *et al.*, 2016 ; THOTA *et al.*, 2018).

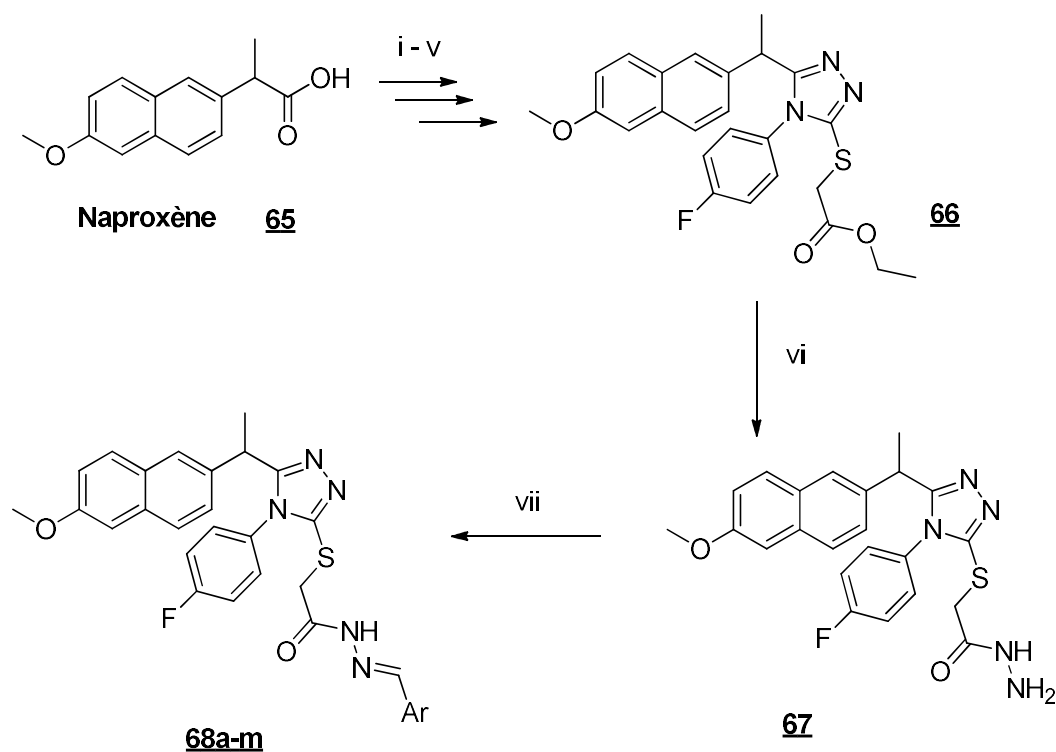
Figure 22. Médicaments commerciaux contenant des groupes hydrazone et hydrazide.



Source: L'auteur

Une étude de Han *et al.* (2019) a évalué l'activité anticancéreuse d'une nouvelle série de 1,2,4-triazoles **68a-m** dérivés du (S)-naproxène, contenant des parties d'hydrazide-hydrazone, synthétisées dans cette étude. (HAN *et al.*, 2019). Dans cette étude, le naproxène **65** a été choisi parce qu'il inhibait la phosphorylation de la protéine kinase B (Akt) et induisait l'apoptose dans les cancers de la vessie chez le rat. (KIM *et al.*, 2013). La partie carboxylique du naproxène **65** a été modulée pour obtenir le 1,2,4-triazole, qui étant estérifié **66**, a généré le composé avec l'hydrazide partie **67** par la réaction d'hydrate d'hydrazine. Le composé final avec l'hydrazide-hydrazone **68a-m** a ensuite été obtenu par la réaction avec des benzaldéhydes commerciaux (Schéma 9).

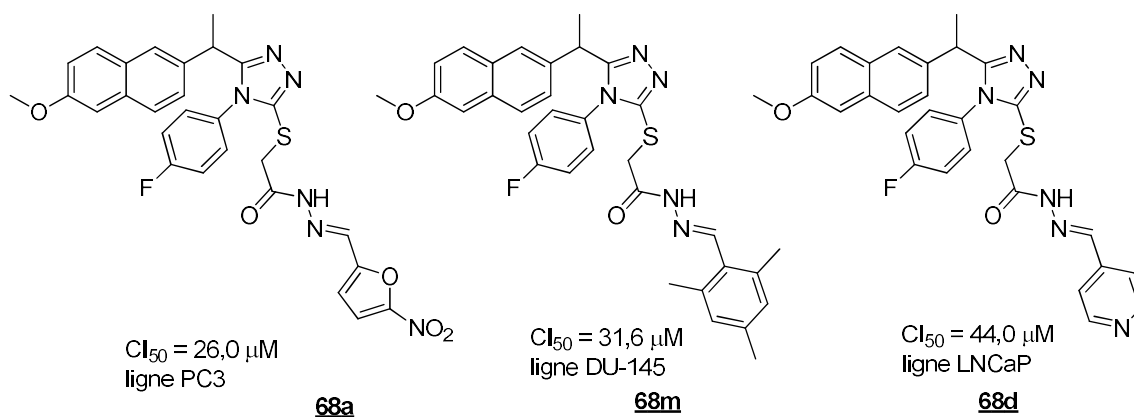
Schéma 9. Synthèse de composés 1,2,4-triazole contenant l'hydrazone-hydrazide **68** dérivés du naproxène **65**.



(i):  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{SO}_4$ , (ii)  $\text{NH}_2\text{NH}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}/\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ , (iii) 4-F- $\text{C}_6\text{H}_4\text{-NCS}/n\text{-butanol}$ , (iv) 4N NaOH, (v)  $\text{BrCH}_2\text{COOC}_2\text{H}_5$ ,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , acétone, (vi)  $\text{NH}_2\text{NH}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}/\text{EtOH}$ , (vii)  $\text{EtOH}/\text{glacial } \text{CH}_3\text{COOH}/\text{Ar-CHO}$ .

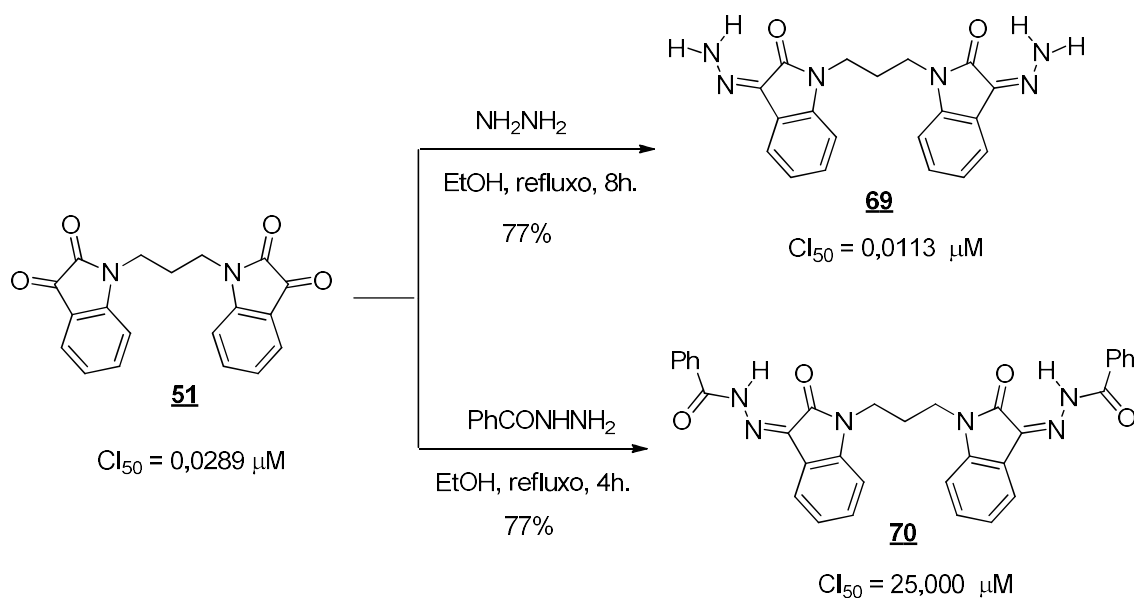
Tous les composés synthétisés ont été examinés pour l'activité anticancéreuse contre trois lignées de cellules cancéreuses de la prostate (PC3, DU-145 et LNCaP) par la méthode colorimétrique MTT. Le composé **68a** a montré la meilleure activité contre la lignée cellulaire PC3 avec des valeurs de  $\text{CI}_{50}$  de 26,0  $\mu\text{M}$ , étant meilleure que le cisplatine ( $\text{CI}_{50} = 39,9 \mu\text{M}$ ). Pour la ligne DU-145, le composé **68m** présentait une meilleure activité,  $\text{CI}_{50} = 31,6 \mu\text{M}$ , tandis que pour la lignée LNCaP, le composé **68d** présentait une meilleure activité anticancéreuse avec  $\text{CI}_{50}$  de 44,0  $\mu\text{M}$ . Des études *in vivo* ont montré que le composé **68a** peut être prometteur pour le traitement du cancer de la prostate. (Figure 23)

Figure 23. Structures chimiques des dérivés du (S)-naproxène **68a**, **68m** et **68d** contenant des portions d'hydrazide-hydrazone et valeurs de  $Cl_{50}$  respectives.



Les travaux d'Althagafi *et al.* (2018), précédemment présenté, a également testé une activité cytotoxique contre les cellules cancéreuses du sein (MCF-7) des composés bis-indoline-2,3-dionys **51** et ses produits bis-indoline-2-one-3-hydrazone **69** et bis-indoline-2-one-3-hydrazide **70**, obtenus à partir des réactions avec l'hydrazide et le bézohydrazide, respectivement (Schéma 10). Dans ce test *in vitro*, il a été possible de vérifier une activité cytotoxique des composés **51** ( $Cl_{50} = 0,0289 \mu M$ ) et **69** ( $Cl_{50} = 0,0113 \mu M$ ), supérieure au médicament de référence utilisé, la doxorubicine ( $Cl_{50} = 1,2001 \mu M$ ) et une faible activité du composé **70** ( $Cl_{50} = 25\,000 \mu M$ ), et il peut être vérifié que la présence de la partie hydrazone génère un effet additif sur l'activité cytotoxique (ALTHAGAFI *et al.*, 2018).

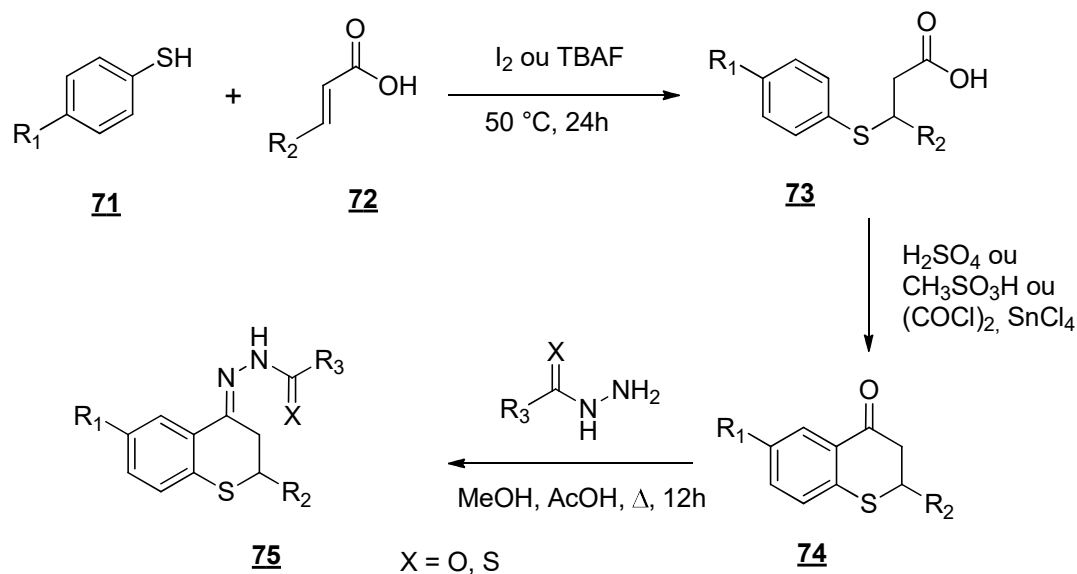
Schéma 10. Synthèse de bis-indoline-2-one-3-hydrazone **69** et de bis-indoline-2-one-3-hydrazide **70**.



Les dérivés de thiochroman-4-one acyl hydrazone ont vu leur activité leishmanicide confirmée dans les travaux de Vargas *et al.* (2017). Dans cette étude, 18 dérivés de thiochroman-4-one acyl hydrazones ont été évalués pour leur activité antileishmaniose *in vitro*, leurs formes d'amastigote intracellulaire de *Leishmania panamensis* et leur activité cytotoxique contre les monocytes humains (U-937 ATCC CRL-1593.2). (VARGAS *et al.* , 2017)

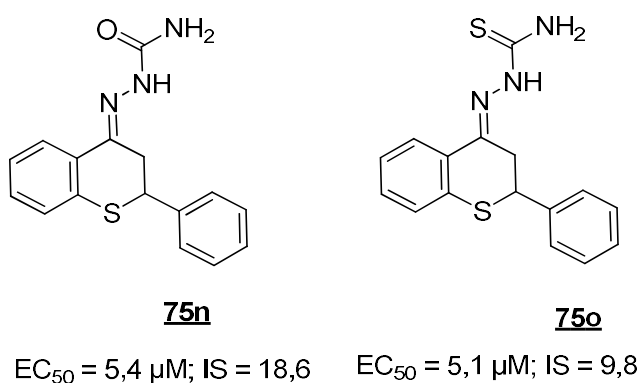
La synthèse de thiochroman-4-ones a été réalisée par addition de thiophénol ou de 4-fluorothiophénol **71** avec des acides carboxyliques  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturés **72** (acide acrylique, crotonique ou cinnamique). Les acides carboxyliques **73** obtenus ont subi une réaction de cyclisation après traitement à l'acide sulfurique ou aux méthaniens sulfoniques, générant du thiochroman-4-one **74**. Les cétones résultantes ont été condensées avec de l'acylhydrazide (hydrazide benzoïque, isonicotine-hydrazide, semi-carbazide ou thiosemicarbazide), fournissant les hydrazones acyl souhaitées **75** avec des rendements compris entre 38 et 85% (Schéma 11)(VARGAS *et al.*, 2017).

Schéma 11. La synthèse de thiochroman-4-ones acylhydrazides.



Les résultats montrent que l'insertion des acyl hydrazones ou thiochroman-4-ones augmente significativement l'activité antileishmania. Parmi les composés testés, les dérivés semi-carbazone et thiosemicarbazone de thioflavone **75n** et **75o** présentaient les activités antileishmania les plus élevées, avec des valeurs  $\text{EC}_{50}$  de 5,4 et 5,1  $\mu\text{M}$  et de faibles cytotoxicités ( $\text{CC}_{50}$  = 100,2 et 50,1  $\mu\text{M}$ , respectivement), entraînant des indices de sélectivité plus élevés ( $\text{IS}$  = 18,6 et 9,8, respectivement) (Figure 24)(VARGAS *et al.* , 2017).

Figure 24. Acyl-hydrazones avec activité antileishmania.



### 3.CHAPITRE 1 - Partie chimique - Série $\Delta^2$ -isoxazoline aza-bicyclique

#### 3.1.Objectifs

##### 3.1.1.Objectif général

Synthèse et identification de nouveaux dérivés hybrides  $\Delta^2$ -isoxazoline aza-bicyclique/thiazole, contenant hydrazone comme espaceur.

##### 3.1.2.Objectifs spécifiques

- g- Synthèse de deux séries de nouveaux hybrides isoxazolin aza-bicyclique/tiazol, contenant de l'hydrazone comme espaceur 4.
- h- Purification et détermination des propriétés physico-chimiques des nouvelles molécules hybrides 4
- i- Élucidation structurale des nouvelles molécules hybrides 4 pour le spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$ ), en infrarouge et en masses.

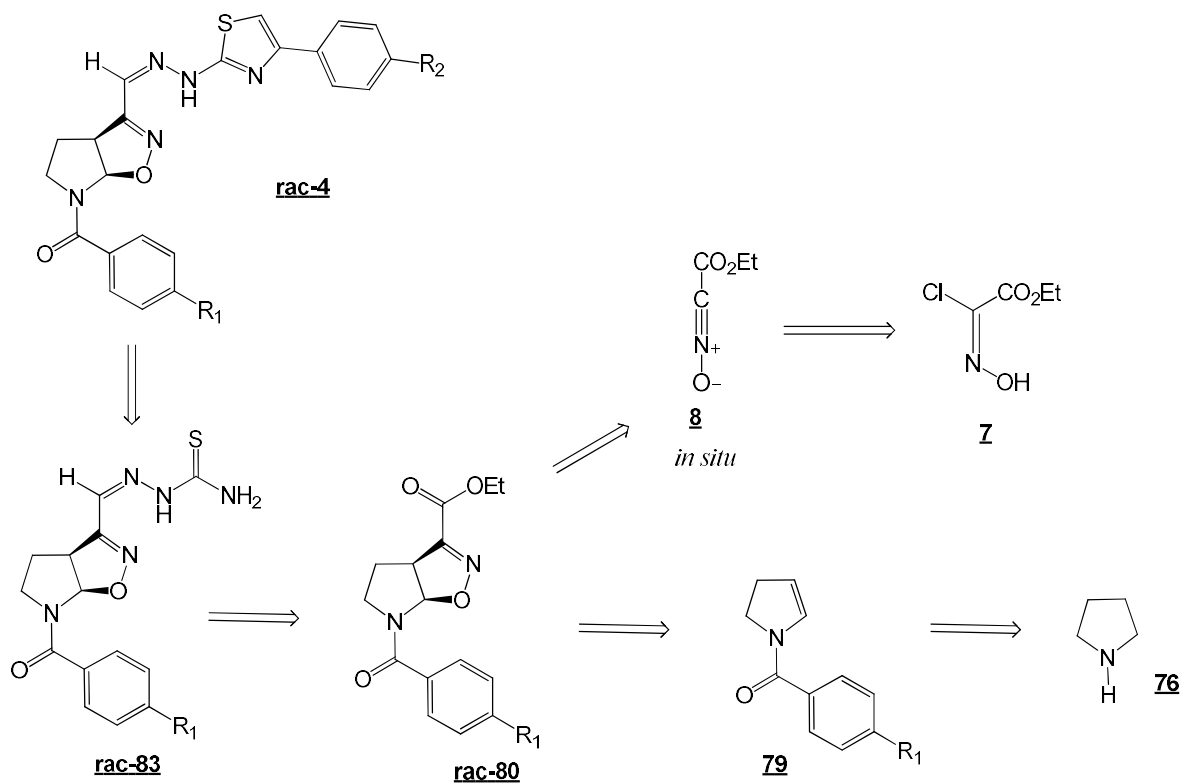
## 3.2. Stratégie Synthétique

### 3.2.1. Partie chimique

#### 3.2.1.1. Rétrosynthèse

La synthèse proposée a été initialement divisée en deux voies de réaction distinctes pour obtenir les deux séries hybrides. Cependant, en raison de difficultés réactionnelles avec la deuxième voie, a priori avec l'espaceur hydrazone se concentrera sur ce travail. La rétrosynthèse proposée est le composé synthétique initial isoxazolin aza-bicyclique **80**, qui peut être obtenu en ajoutant de l'oxyde de *N*-nitrile **8** à la double liaison du système endocyclique d'énamide **79**, qui sera obtenu en remplaçant les chlorures de benzoyle remplacés par de la pyrroline, obtenus à partir de pyrrolidine, obtenus à partir de pyrrolidine, obtenus à partir de pyrrolidine, obtenus à partir de pyrrolidines **76**. La cyclisation des tiossemicarbazones **83**, dérivée de la condensation d'un aldéhyde d'isoxazoline **82**, génère l'hybride final **4** avec espaceur d'hydrazone, et l'aldéhyde obtenu par oxydation du ester **80** (Schéma 12).

Schéma 12. Rétrosynthèse proposée pour l'isoxazoline/thiazole.

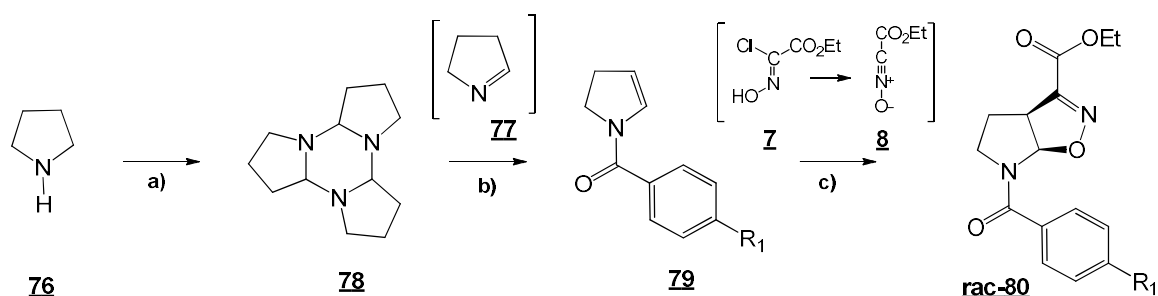


### 3.2.1.2.Voie synthétique

#### 3.2.1.2.1.Synthèse commune pour les deux séries - Dérivés intermédiaires contenant le noyau d'isoxazoline aza-bicyclique

La voie synthétique commune consistait à obtenir la synthèse de l'isoxazoline aza-bicyclique **80**, qui commence par la production de pyrrolyle trimer **78**, à partir d'une oxydation de pyrrolyline **76** (schéma 13). L'étape suivante est une réaction de détrimérisation formant le monomère pyrroline **77** suivie d'une réaction de conjugaison avec l'oxyde de *N*-nitrile (CEFNO) **8** généré *in situ*, à partir de son précurseur chloroxymidoacétate d'éthyle **7** pour finalement obtenir l'isoxazoline aza-bicyclique **80** (ALMEIDA *et al.*, 2009; REIS *et al.*, 2011).

Schéma 13. Synthèse de la série développée au Brésil, molécule aza-bicyclique d'isoxazoline **80** pour la cycloaddition.



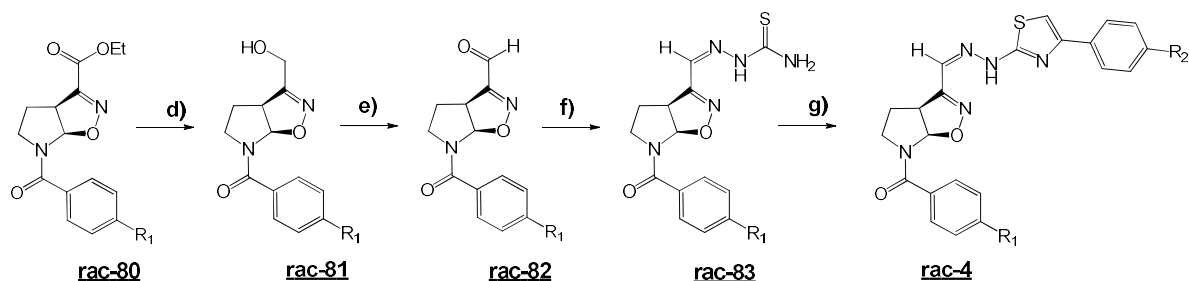
**a)**  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ,  $\text{AgNO}_3$ ,  $\text{NaOH}$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ , 1h, 0 °C après 3h, t.a.; **b)** Chlorures de benzoyle substitués, TEA, THF, 2 h, 60 °C; **c)** Acétate d'éthyle de 2-chloro-2-(hydroxyiminium), TEA, THF, 30 min, t.a.

#### 3.2.1.2.2.Synthèse d'hybrides isoxazoline aza-bicyclique/thiazoles, présentant l'hydrazone comme groupe d'espacement

L'ester formé à l'isoxazoline **80** a été réduit en alcool **81**, en utilisant l'agent réducteur  $\text{NaBH}_4$  et l'oxydation ultérieure pour l'aldéhyde **82** par réaction de Swern, car l'oxydation directe de l'ester d'isoxazoline **80** pour l'aldéhyde **82** n'a pas été obtenue correctement, générant une fonction d'acide carboxylique ou ne réagissant pas (schéma 14). La tiossemicarbazone **83** a été formée par condensation d'aldéhydes isoxazoline **82** par du thiossemicarbazide. Ensuite, les 2-bromo-

acétophénonnes ont réagi avec la thiosemicarbazone **83**, générant les hybrides de la série **4**.

Schéma 14. Obtention des hybrides de dérivés aza-bicycliques du 2-isoxazoline/thiazole avec espaceur hydrazone **4**



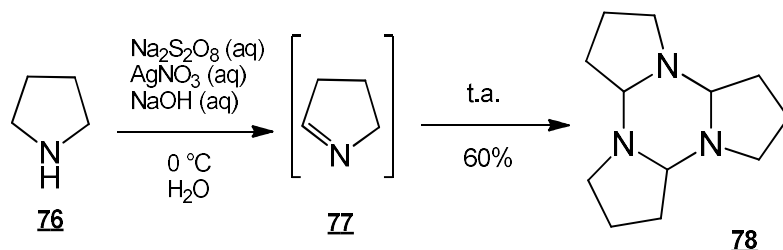
**d)** NaBH<sub>4</sub>, EtOH, 1h, 0 °C après 1h, t.a.; **e)** DMSO, (COCl)<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, TEA, 30 min, -70 °C ou MnO<sub>2</sub> activé, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 1-4 h, t.a.; **f)** thiosemicarbazide, EtOH, HCl, 2 h, 80 °C.; **g)** 2-bromoacétophénonnes, EtOH, HCl, 2 h, t.a.

### 3.3.Résultats et discussion

#### 3.3.1.Synthèse du trimère $\Delta^1$ -pyrroline **78**

La  $\Delta^1$ -pyrroline **77** a été obtenue par oxydation catalytique de la pyrrolidine **76**, par persulfate de sodium et nitrate d'argent comme catalyseur, et par réaction à 0 °C et en milieu basique. En raison de sa réactivité élevée, le monomère trimérise dans le milieu réactionnel, obtenant son trimère respectif. Dans notre groupe de recherche, une amélioration du rendement a été vérifiée par une agitation vigoureuse du milieu réactionnel (Schéma 15).

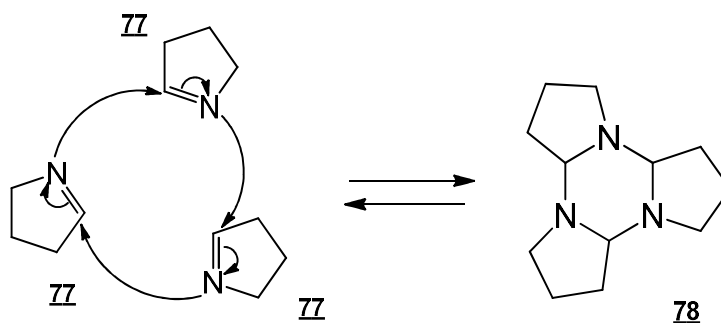
Schéma 15. Synthèse du trimère de la 1-pyrroline **78**.



Comme mentionné ci-dessus, le trimère de  $\Delta^1$ -pyrroline **78** est une structure plus stable, se formant à température ambiante, mais en fournissant de l'énergie

thermique au composé,  $\Delta^1$ -pyrroline **77** peut être obtenu à nouveau. La réactivité de  $\Delta^1$ -pyrroline **77** est due à la présence de la double liaison polarisée et de la paire d'électrons libres de l'atome d'azote, ce qui génère une grande instabilité et la formation conséquente du trimère **78** comme observé dans le schéma 16.

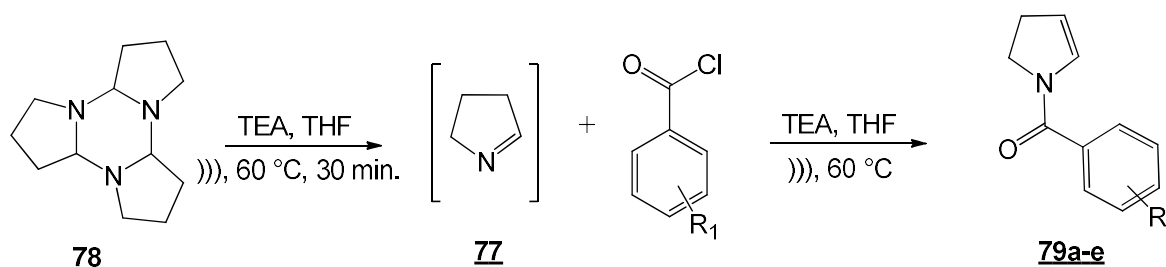
Schéma 16. Trimérisation de  $\Delta^1$ -pyrroline **77**: formation du trimer **78** à température ambiante.



### 3.3.2. Synthèse des enamides **79**

Pour la formation d'énamides endocycliques **79a-e**, une solution de  $\Delta^1$ -pyrroline **78** trimer (brut) dans le THF et le TEA a été soumise à la sonication et au chauffage pendant 30 minutes (Schéma 17). Le processus de sonication et de chauffage favorise la formation du monomère 1-pyrroline **77**, en déséminérant le trimer **78** respectif.

Schéma 17. Synthèse d'énamides endocycliques **79a-e**

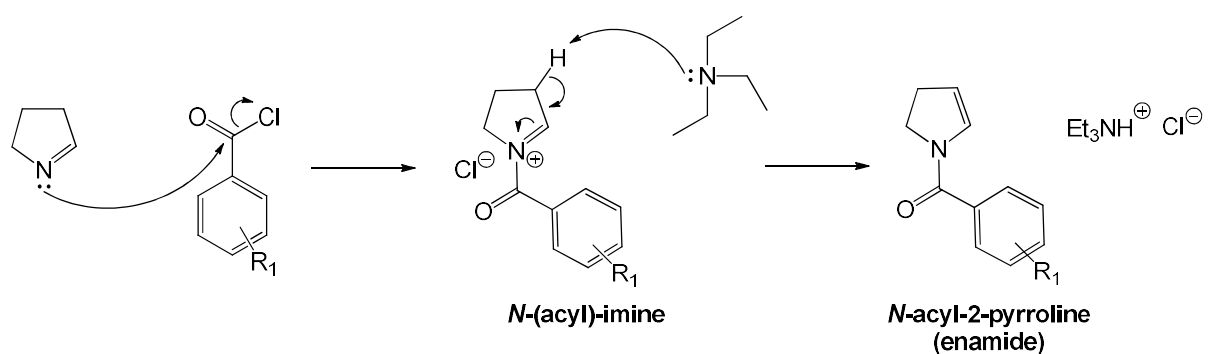


Dans des études antérieures dans notre groupe de recherche (DOS SANTOS, 2003), il a été possible de détecter que l'augmentation du temps de cette étape n'entraînait pas de changement de rendement, ce qui conduit à supposer que la détrimérisation du trimère **78** atteint l'équilibre chimique avec le monomère **77**. Il a

également été observé que les TEA sont importants pour prévenir une dégradation du monomère  $\Delta^1$ -pyrroline **77** (Schéma 18).

La deuxième étape consiste en l'ajout lent de chlorure de benzoyle *p*-substituée, encore sous sonication et chauffage. La réaction a été accompagnée pour CCM, finalisé en observant la consommation totale de chlorure de benzoyle *p*-substitué (Schéma 18).

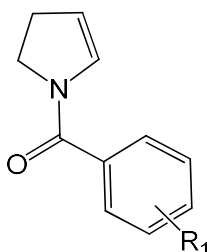
Schéma 18. Mécanisme réactionnel de formation de *N*-acyl-2-enamides **79**.



La purification a été réalisée par chromatographie sur colonne, sans extraction du sous-produit formé, le chlorure de triéthylammonium, car les tentatives précédentes avec de l'eau et de l'acétate d'éthyle ont provoqué la dégradation des enamides. (De ARAÚJO, 2019)

Les différents substituants mentionnés, les électro-attracteurs et les électro-rétracteurs, ont favorisé des rendements différents pour les enamides **79** formés, allant de 16 à 88%, comme le montre le Tableau 1.

Tableau 1. Rendements des enamides **79a-f** synthétisés.

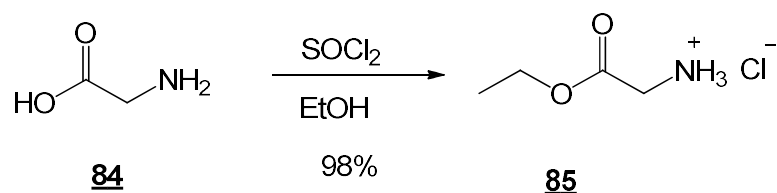


| Enamide           | R <sub>1</sub>            | Rendement (%) |
|-------------------|---------------------------|---------------|
| <b><u>79a</u></b> | <i>p</i> -Cl              | 44            |
| <b><u>79b</u></b> | <i>p</i> -Me              | 35            |
| <b><u>79c</u></b> | <i>p</i> -NO <sub>2</sub> | 8             |
| <b><u>79d</u></b> | <i>p</i> -F               | 30            |
| <b><u>79e</u></b> | <i>p</i> - <i>t</i> Bu    | 27            |
| <b><u>79f</u></b> | <i>p</i> -OMe             | 16            |

### 3.3.3. Synthèse du chlorhydrate de glycine estérifié **85**.

L'acide aminé glycine est solubilisé dans un milieu éthanolique, sous agitation et chauffage, et converti en sa forme *zwitterion*, en raison de l'abstraction de l'hydrogène carboxyle par l'amine primaire de l'ion dipolaire (schéma 19). Ensuite, il y a l'attaque nucléophile de l'ion dipolaire carboxylato sur le soufre électrophile du chlorure de thionyle (SOCl<sub>2</sub>), formant un intermédiaire, qui dans son réarrangement élimine l'ion chlorure.

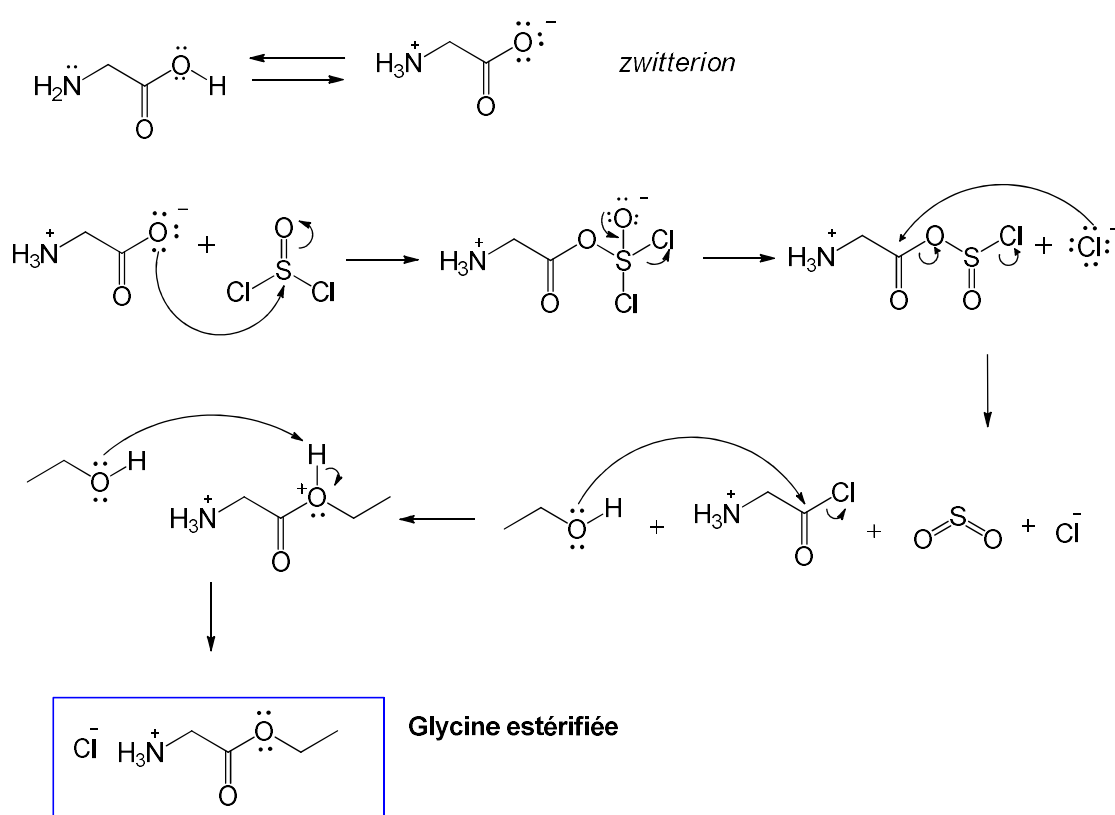
Schéma 19. Synthèse de chlorhydrate de glycine estérifié **85**



Le carbonyle de l'intermédiaire formé subit l'attaque nucléophile de l'anion chlorure, formant du chlorure d'acyle, du dioxyde de soufre et libérant un autre ion chlorure dans le milieu réactionnel.

Le chlorure d'acyle généré subit l'attaque nucléophile de l'éthanol sur son carbonyle, formant ainsi le sel de chlorure de glycine estérifié **85**. (Schéma 20)

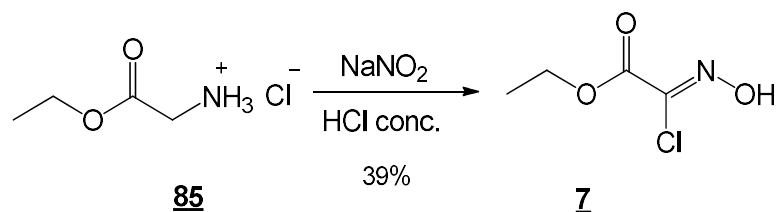
Le rendement de cette réaction était de 98%.

Schéma 20. Mécanisme de synthèse du chlorhydrate de glycine estérifié **85**.

### 3.3.4. Synthèse du chlorooxymidoacétate d'éthyle **7**, précurseur de l'oxyde de *N*-nitrile - CEFNO **8**.

Grâce à la glycine ester **85**, le chlorooxymidoacétate d'éthyle **7**, précurseur du CEFNO **8**, obtenu *in situ* dans la réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire a pu être obtenu. Sa synthèse s'est faite par oxydation du chlorhydrate de glycine estérifié **85**, ayant comme agent oxydant du nitrite de sodium ( $\text{NaNO}_2$ ), en milieu acide ( $\text{HCl}$ ) (Schéma 21).

Schéma 21. Synthèse du chlorooxymidoacétate d'éthyle **7**, précurseur de l'oxyde de *N*-nitrile - CEFNO **8**.

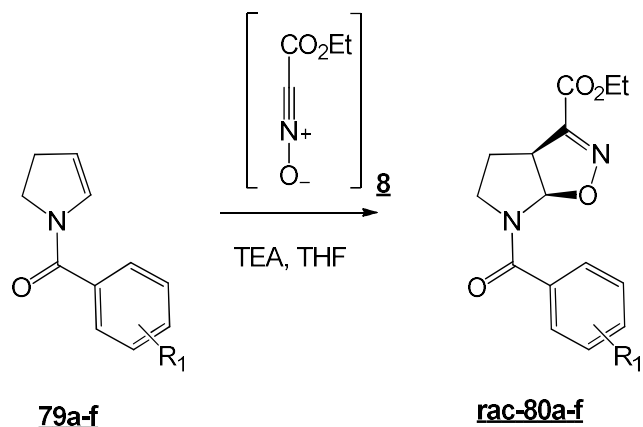


Le précurseur de l'oxyde de *N*-nitrile a une bonne stabilité, il a donc été synthétisé en plusieurs grammes et stocké pendant une longue période. Sa purification a été réalisée par recristallisation dans de l'hexane refroidi. Le rendement de cette réaction était de 39%, la plage de fusion (69 - 71 °C) a été vérifiée pour confirmer la formation du produit.

### 3.3.5. Synthèse racémique des cycloadducts isoxazoliniques **rac-80**

Cette synthèse est une étape clé en raison de la formation du groupe pharmacophorique, le noyau de la 2-isoxazoline, et cet intermédiaire est nécessaire au développement de différentes séries ayant des activités biologiques potentielles (Schéma 22).

Schéma 22. Synthèse des isoxazolines aza-bicyclique **rac-80a-f**.



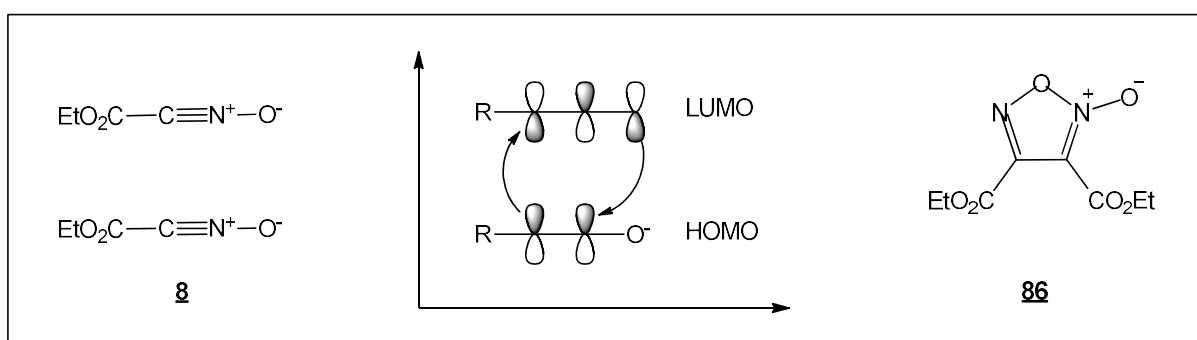
Pour la formation du noyau isoxazolinique aza-bicyclique, une cycloaddition dipolaire a été réalisée entre les inamides endocycliques **rac-80a-f** et l'oxyde de *N*-

nitrile (CEFNO) **8**, générés *in situ*, à partir de chlorooxymydoacétate d'éthyle **8** et de triéthylamine (TEA).

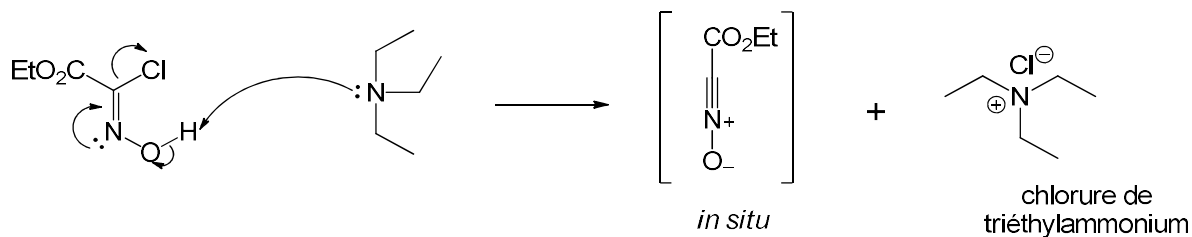
Dans cette cycloaddition, la enamide se comporte comme le dipolarophile et interagit avec le dipôle *N*-nitrile oxyde, générant le noyau 2-isoxazoline aza-bicicle et TEA agit comme une base, déprotonant le précurseur, ethyl chlorooxymydoacetate **7**. La solution précurseur a été lentement ajoutée à une solution d'énamide **79** à température ambiante, conditions importantes pour favoriser la formation du cycloaduc, car elles ont diminué la formation de dimère **86** de CEFNO **8** (figure 25).

Malgré cela, le précurseur et la TEA sont ajoutés en excès, car la dimérisation se produit facilement, en raison de la réactivité de CEFNO **8**, étant détecté ce phénomène dans les rapports de la littérature. (CECCHI; SARLO; MACHETTI, 2005)

Figure 25. Formation de le dimère du nitrile *N*-oxyde **8** représentée par la théorie des Orbitales Moléculaires Frontières (OMF)

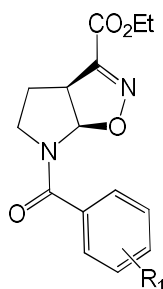


Au contact de la base TEA, la déprotonation de l'oxime se produit rapidement, a rétablir la paire d'électrons à l'oxygène, ce qui génère un composé avec une charge négative instable. Comme le chlore est un bon groupe de sortie, il est expulsé de la molécule par la formation de la deuxième liaison pi entre l'azote et le carbone  $sp^2$ , générant une charge globale négative à la molécule, la rendant neutre et stable (Schéma 23).

Schéma 23. Mécanisme de formation des oxydes de *N*-nitrile 8.

Chaque réaction a été accompagnée d'une CCM, où la formation d'isoxazolinique 80 et de dimer 86 a été vérifiée. Les rendements figurent dans le Tableau 2.

Tableau 2. Rendements des cyclo-adduits synthétisés.

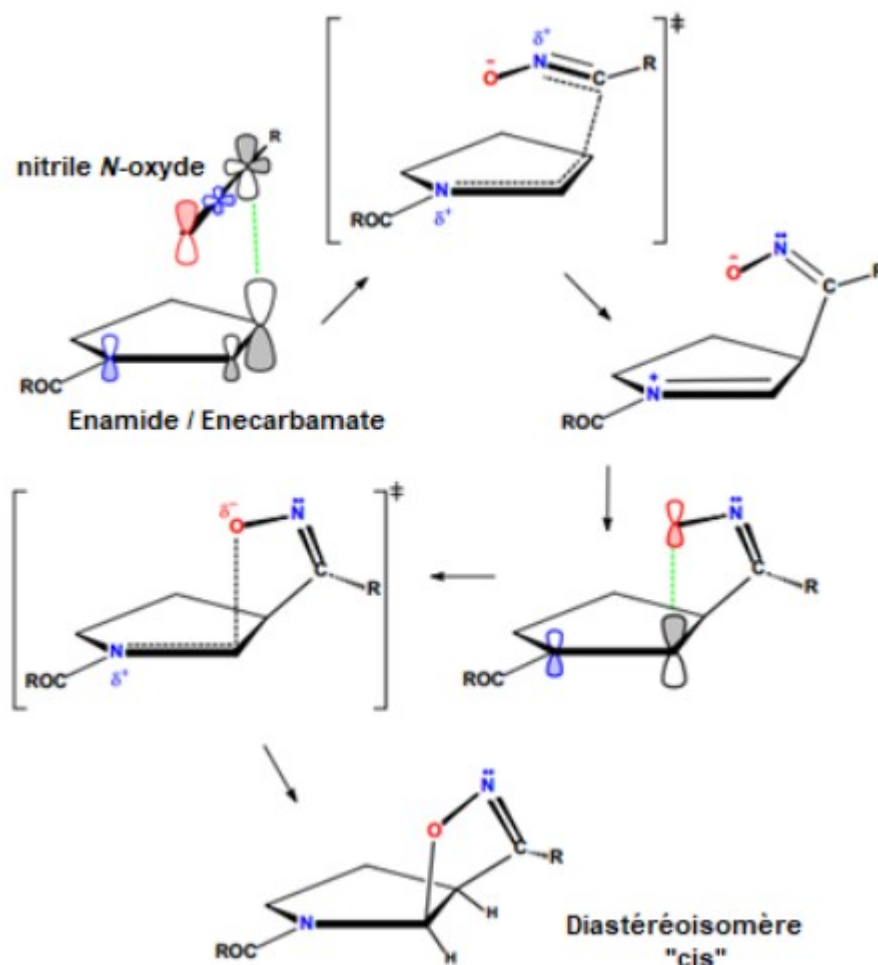


| Cycloadduct    | R <sub>1</sub>            | Rendement (%) |
|----------------|---------------------------|---------------|
| <u>rac-80a</u> | <i>p</i> -Cl              | 89            |
| <u>rac-80b</u> | <i>p</i> -Me              | 93            |
| <u>rac-80c</u> | <i>p</i> -NO <sub>2</sub> | 70            |
| <u>rac-80d</u> | <i>p</i> -F               | 83            |
| <u>rac-80e</u> | <i>p</i> - <i>t</i> Bu    | 58            |
| <u>rac-80f</u> | <i>p</i> -OMe             | 57            |

La réaction de cycloaddition à ce stade est régie par la Théorie des Orbitales Moléculaires Frontières (OMF) et en raison des caractéristiques électroniques du dipôle (oxyde de *N*-nitrile) et du dipolophile (enamides), le mécanisme le plus probable est le mécanisme non concerté, car c'est le mécanisme de réaction qui ne

se produit pas en une seule phase, passant par intermédiaire (Figure 26)(SANTOS, 2003).

Figure 26. Mécanisme de cycloaddition 1,3-dipolaire proposé entre enamides ou enecarbamates endocycliques et nitrile *N*-oxyde CEFNO.



Fonte: De Araújo, 2019

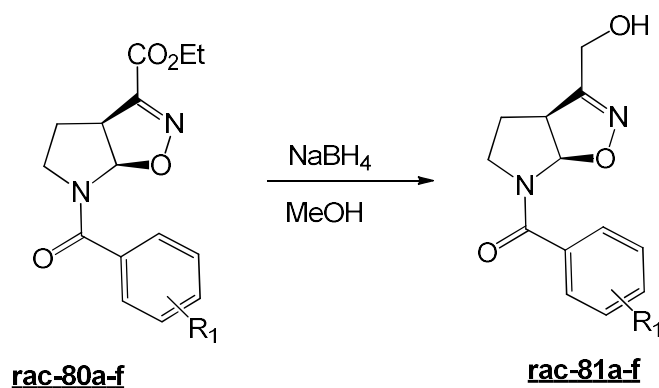
Le mécanisme spécifique de cette cycloaddition a été proposé par Dos Santos (2003). Où, en raison de la linéarité, nitrile *N*-oxyde, généré par l'hybridation *sp* dans l'atome de carbone et la polarisation de la double liaison de l'enamide (dipolarophilus), l'une des liaisons sigma (non concertées) doit se produire, formant l'intermédiaire, le *N*-acyl-inium. Avec le changement d'hybridation (de *sp* à *sp*<sup>2</sup>), il est possible d'approcher l'oxygène en carbone pyrrolidine (déficient en électrons), formant ainsi la deuxième liaison sigma et la formation conséquente d'isoxazoline aza-bicyclique (SANTOS, 2003).

Des calculs d'études cinétiques sont nécessaires pour la confirmation du mécanisme, mais s'il est concerté, il doit être désynchronisé en raison des caractéristiques mentionnées ci-dessus.

### 3.3.6. Synthèse de l'alcool **rac-81**

Pour la formation de l'hybride isoxazoline/thiazole à fonction hydrazone, nous favoriserions une réduction directe de la fonction ester en C3 en aldéhyde **rac-82**, générant un carbonyle sensible à l'attaque nucléophile de thiosemicarbazone.

Schéma 24. Synthèse de l'alcool isoxazoline **rac-81**.

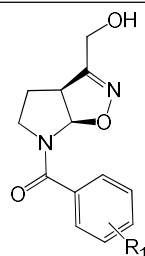


Cependant, dans des études antérieures du groupe de recherche, il a été vérifié expérimentalement que la tentative de réduire la fonction de l'ester C3 pour la fonction aldéhyde en utilisant DIBAL-H ou superhydrure  $[(\text{Et}_3\text{AlH})\text{Li}]$ , réducteurs légers, était inefficace, restant intact les esters isoxazoliniques (REIS, 2011). L'utilisation d'un réducteur plus puissant, tel que  $\text{LiAlH}_4$ , ne serait pas idéale pour réduire également la fonction amide (provenant initialement des enamides). (schéma 24)

Pour résoudre ce problème, la réduction de cet ester à son alcool respectif a été réalisée, à l'aide du taux de réduction  $\text{NaBH}_4$ , pour une oxydation légère ultérieure en aldéhyde **rac-82**, selon la méthodologie analogue développée pour les isoxazolines (SANTOS, 2003) et les résultats dans la littérature permettant une séquence dans la voie synthétique pour obtenir l'hybride isoxazoline/thiazole **4**. Lors de la réduction de l'ester éthylique **rac-80a-f**, l'apparition de la formation d'ester méthylique a pu être vérifiée. En raison de la transestérification et de la qualité du borohydrate, également influencée par le temps de stockage, il est nécessaire d'ajouter un excès de l'agent réducteur. Les sycoses isoxazoliniques respectives **rac-81a-f** sont formées avec de bons rendements, comme le montre le tableau 3.

Tableau 3. Rendements de l'alcools synthétisés

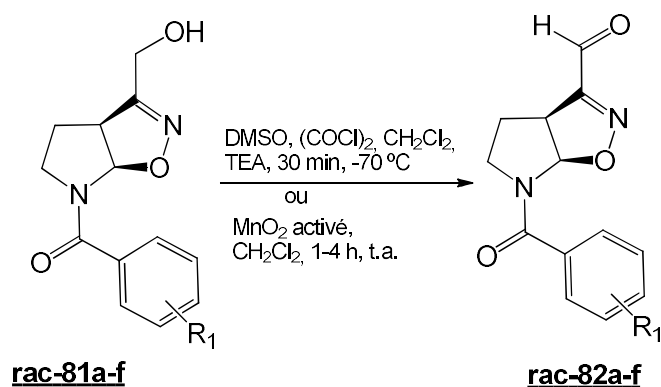
| Alcools               | R <sub>1</sub>            | Rendement (%) |
|-----------------------|---------------------------|---------------|
| <b><u>rac-81a</u></b> | <i>p</i> -Cl              | 96            |
| <b><u>rac-81b</u></b> | <i>p</i> -Me              | 89            |
| <b><u>rac-81c</u></b> | <i>p</i> -NO <sub>2</sub> | 96            |
| <b><u>rac-81d</u></b> | <i>p</i> -F               | 87            |
| <b><u>rac-81e</u></b> | <i>p</i> - <i>t</i> Bu    | 83            |
| <b><u>rac-81f</u></b> | <i>p</i> -OMe             | 73            |



### 3.3.7. Synthèse d'aldéhydes isoxazoliniques **rac-82**

La formation d'aldéhyde, à partir de l'alcool primaire formé en C3, a été réalisée, dans un premier temps, par la réaction de Swern (Schéma 25), car elle présentait également des rendements satisfaisants dans notre groupe de recherche, pour les alcools isoxazoliniques de 5 membres (REIS et al., 2011; De ARAÚJO, 2019) , ainsi que pour les alcools isoxazoliniques à 6 membres (ALMEIDA, 2010; MESQUITA, 2018).

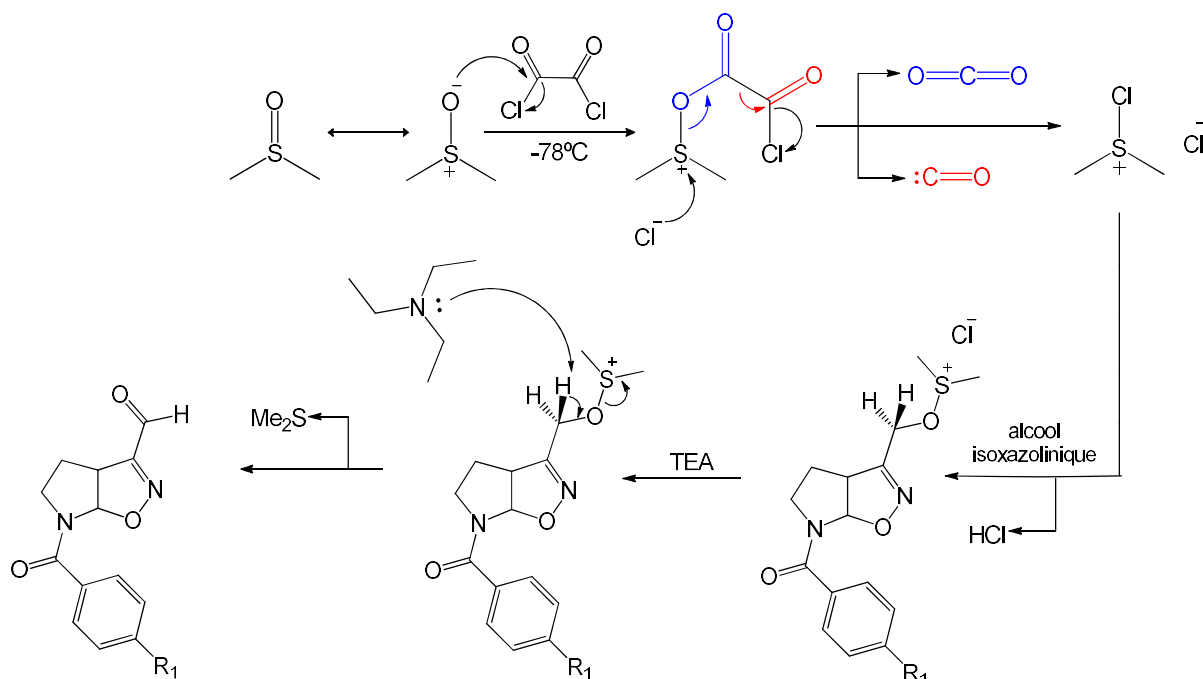
Schéma 25. Synthèse de l'aldéhyde isoxazolinique **rac-82**.



Cette réaction est connue pour sa légère oxydation en alcools et se produit dans un premier temps la réaction du DMSO avec le chlorure d'oxalila, dans laquelle ce dernier se décompose, libérant du monoxyde et du dioxyde de carbone, libérant du chlorure de diméthylchlorosulfonique, du DMSO activé. Ensuite, il y a l'attaque nucléophile de l'alcool **rac-81a-f** à l'anion chlore diméthylsulfonique, formant l'ion alcoxissulfonique, venant consécutivement l'action de la base de triéthylamine, qui induit la formation de la liaison pi et l'élimination du diméthylsulfure, générant l'aldéhyde isoxazoline **rac-82a-f**. L'ensemble de la réaction a été réalisée dans une atmosphère anhydre et d'argon, avec la formation de sous-produits du chlorure de triéthylammonium et de diméthylsulfure avec une forte odeur caractéristique (OMURA; SWERN, 1978; MANCUSO; Huang, Huang, SWERN, 1978).

Le schéma 26 présente le mécanisme possible pour obtenir des aldéhydes isoxazoliniques **rac-82a-f**.

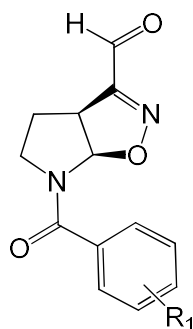
Schéma 26. Mécanisme de réaction de Swern, oxydation des alcools isoxazoliniques en aldéhydes isoxazoliniques respectifs



Une autre voie de synthèse pour obtenir des aldéhydes isoxazoliniques consistait à utiliser de l'oxyde de manganèse activé ( $\text{MnO}_2$  activé) comme agent oxydant. Un tel choix est pour la difficulté logistique d'obtenir de la glace carbonique, nécessaire pour obtenir la température dans la réaction de Swern, en plus de la non-nécessité d'une réaction anhydre.

Les aldéhydes synthétisés ont été purifiés par chromatogrfia dans une colonne *flash*, avec des rendements compris entre 53% et 86% pour les substituants décrits dans le tabala 4, décrit ci-dessous.

Tableau 4. Rendements d'aldéhydes synthétisés.



| Aldéhyde              | R <sub>1</sub>            | Rendement (%) |
|-----------------------|---------------------------|---------------|
| <b><u>rac-82a</u></b> | <i>p</i> -Cl              | 74*/69**      |
| <b><u>rac-82b</u></b> | <i>p</i> -Me              | 76*/86**      |
| <b><u>rac-82c</u></b> | <i>p</i> -NO <sub>2</sub> | 84*/53**      |
| <b><u>rac-82d</u></b> | <i>p</i> -F               | 96*/71**      |
| <b><u>rac-82e</u></b> | <i>p</i> - <i>t</i> Bu    | 45*/68**      |
| <b><u>rac-82f</u></b> | <i>p</i> -OMe             | 56*           |

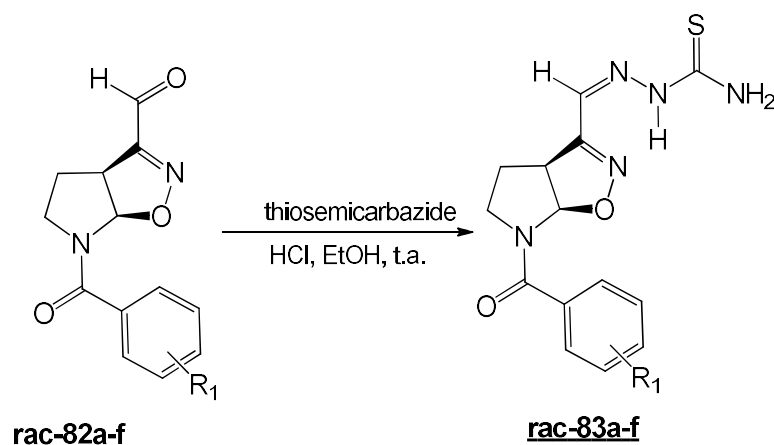
\*oxydation via Swern / \*\*oxydation via MnO<sub>2</sub>

La variation des rendements, présentée dans le tableau 4, montre qu'il n'est pas possible de comparer en termes de rendement quelle est la meilleure méthodologie, car les deux méthodologies présentent un succès synthétique avec des rendements satisfaisants, présentant des avantages tels que des réactions plus propres via Swern et une plus grande praticité dans des conditions réactionnelles, via MnO<sub>2</sub>.

### 3.3.8.Synthèse de thiosemicarbazones **rac-83**

La condensation des aldéhydes isoxazoliniques synthétisés avec du thiosemicarbazide a généré les premières molécules inédites de ce travail, les thiosemicarbazones izoxazoline-aza-bicycliques à 5 membres (Schéma 27).

Schéma 26. Synthèse de l'isoxazoline thiosemicarbazone **rac-83**.



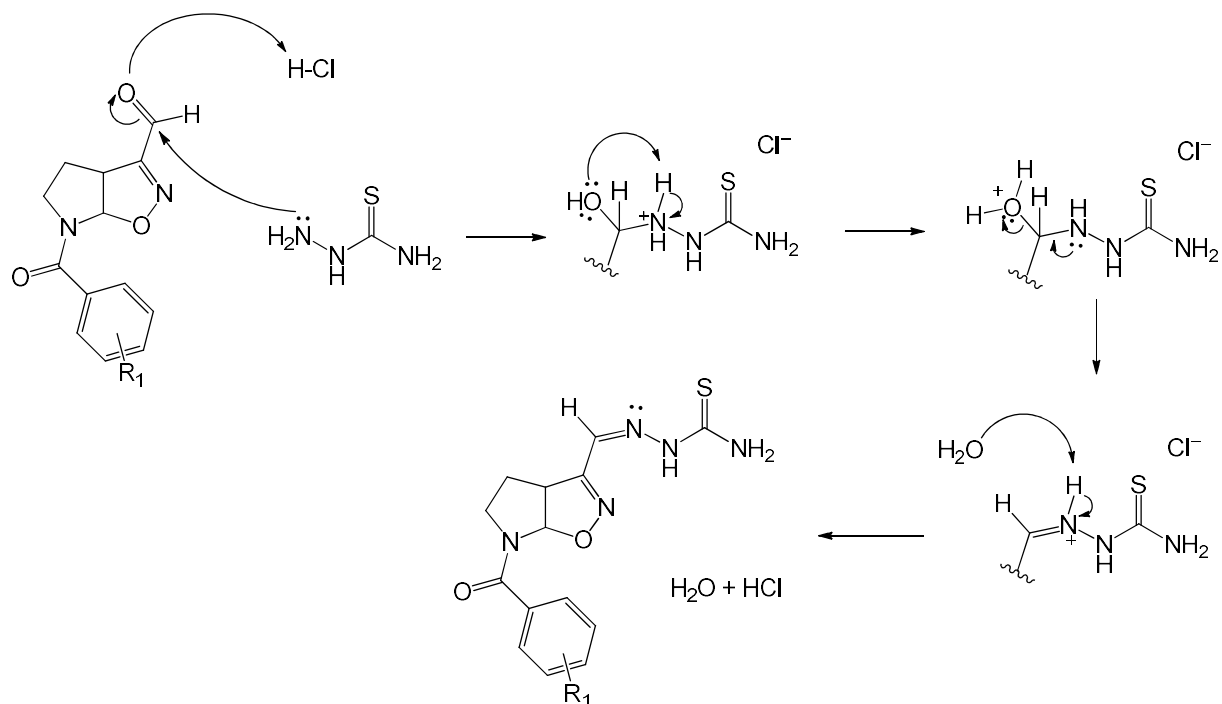
Les réactions de condensation entre les différents aldéhydes **rac-82a-f** et avec le thiosemicarbazide, survenues dans un milieu acide, étaient basées sur l'étude de revue menée par Tenório *et al* (2005), qui présente plusieurs voies pour obtenir des thiosemicarbazones, en plus des méthodologies présentées par Pishawikar et More (2017) et Reis, C. *et al.* (2011) (PISHAWIKAR; PLUS, 2017; KINGS, C. *et al.* , 2011; TENÓRIO *et al*, 2005).

Les thiosemicarbazones peuvent être obtenues par deux méthodes: obtention directe, en utilisant le thiosemicarbazide et peuvent réagir avec les aldéhydes ou les cétones; et l'obtention indirecte, à l'aide d'hydrazine et d'autres réactifs, avec condensation ultérieure d'un dérivé carbonyle spécifique. La méthode utilisée dans ce travail était d'obtenir directement, pour lequel, selon la littérature, de meilleurs rendements sont obtenus avec l'acidification du milieu. Cela est dû au fait que les étapes de réaction sont réversibles, de sorte que le pH idéal est compris entre 4 et 5 (TENÓRIO *et al.* , 2005). Cette réaction est bien connue pour sa chimioélectivité, sa polyvalence et sa vitesse élevées, présentant des rendements généralement élevés, présentant des activités biologiques dans la littérature. (BAKHERAD *et al.* , 2019; ANAND *et al.* , 2020; TENÓRIO *et al.*, 2005).

Dans l'hypothèse réactionnelle, similaire à celle proposée par Vekariya *et al.* (2017), la paire d'électrons présents dans le NH<sub>2</sub> plus distante du C=S dans le thiosemicarbazide, favorise une attaque nucléophile sur le carbonyle de l'aldéhyde isoxazolinique, et l'oxygène carbonyle est préalablement protoné par la présence d'un catalyseur d'acide chlorhydrique (VEKARIYA *et al.*, 2017). Vient ensuite, une déshydratation se produit, la formation de la liaison pi, générant l'ion iminium et la

formation consécutive de l'hydrazone par élimination de proton, générant le dérivé thiosemicarbazone (Schéma 28).

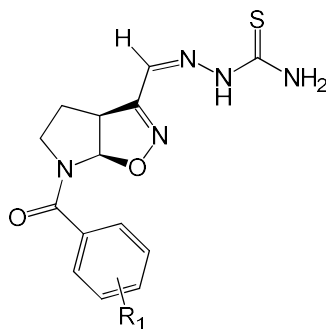
Schéma 27. Mécanisme d'addition nucléophile pour la formation de thiosemicarbazones isoxazoliniques aux aldéhydes isoxazoliniques respectifs.



Les thiosemicarbazones **rac-83a-f** ont été synthétisées à partir de leurs aldéhydes respectifs, qui ont été solubilisés dans l'éthanol et dans un milieu catalytique acide (pH = 4 - 5), et le thiosemicarbazide a ensuite été ajouté à la solution. Les rendements se trouvent dans le Tableau 5.

Le processus de purification a eu lieu par des lavages consécutifs à l'éthanol et au méthanol, et la méthode de lavage et de recristallisation avec les mêmes solvants peut être utilisée.

Tableau 5. Rendements des thiosemicarbazones synthétisées



| Thiosemicarbazone     | R <sub>1</sub>            | Rendement (%) |
|-----------------------|---------------------------|---------------|
| <b><u>rac-83a</u></b> | <i>p</i> -Cl              | 68            |
| <b><u>rac-83b</u></b> | <i>p</i> -Me              | 80            |
| <b><u>rac-83c</u></b> | <i>p</i> -NO <sub>2</sub> | 76            |
| <b><u>rac-83d</u></b> | <i>p</i> -F               | 42            |
| <b><u>rac-83e</u></b> | <i>p</i> -tBu             | 30            |
| <b><u>rac-83f</u></b> | <i>p</i> -OMe             | 35            |

L'analyse RMN est présentée, de manière représentative, pour la molécule **rac-83d**. Les Figures 27 et 28 montrent la structure de l'isoxazoline thiosemicarbazone **rac-83d** à titre d'illustration représentative, contenant tous les signaux RMN du <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C, respectivement. Les signes diagnostiques de l'hétérobicycle, qui confirment la formation du cycle 2-isoxazoline aza-bicyclique apparaissent les rotamères à 6,19 ppm et à 6,69 ppm en RMN du <sup>1</sup>H et 91,9 et 94,7 ppm en RMN de <sup>13</sup>C. Les signes caractéristiques des hydrogènes méthyléniques à 2,18 et 2,23 ppm et 3,03 et 3,37 ppm; 3,40 et 3,37 ppm; confirment le noyau de cinq membres (Figures 29 e 30). D'autres molécules synthétisées dans des études antérieures ont obtenu des déplacements chimiques similaires pour l'hétérobicycle (REIS et al., 2011; DE ARAÚJO, 2019), et la formation du cycle 2-isoxazolinique aza-bicyclique à 5 membres a été confirmée.

Figure 27. Données spectrométriques RMN de  $^1\text{H}$  600 MHz de l'isoxazoline thiosemicarbazone **rac-83d**.

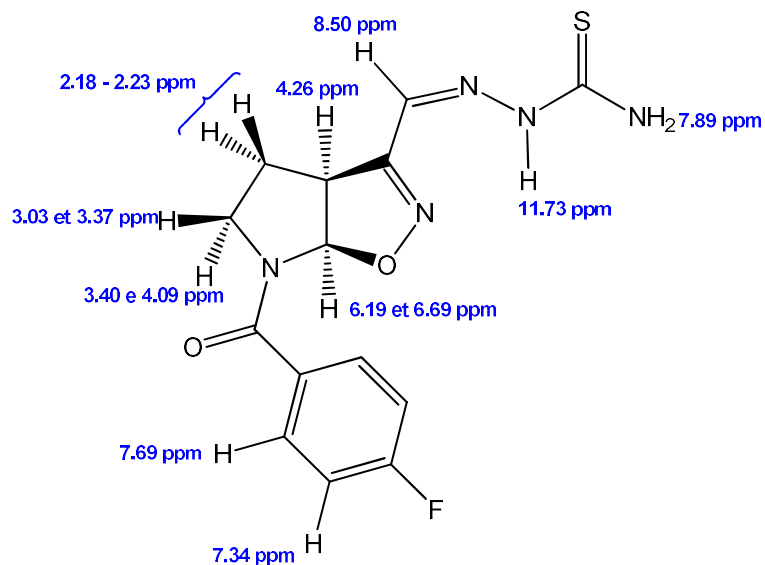


Figure 28. Données spectrométriques RMN de  $^{13}\text{C}$  150 MHz de l'isoxazoline thiosemicarbazone **rac-83d**.

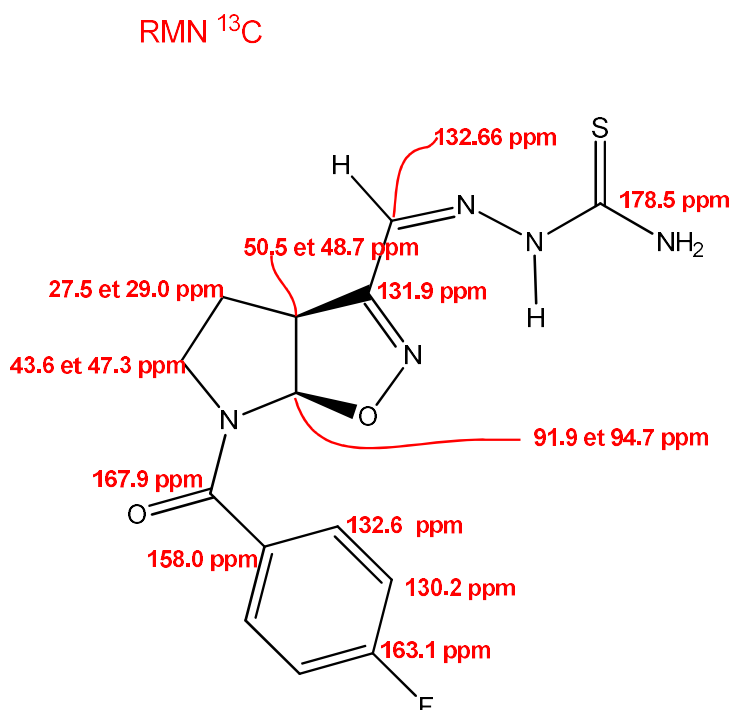


Figure 29. Spectre RMN  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ ; 600 MHz) de l'isoxazoline thiosemicarbazone **rac-83d**

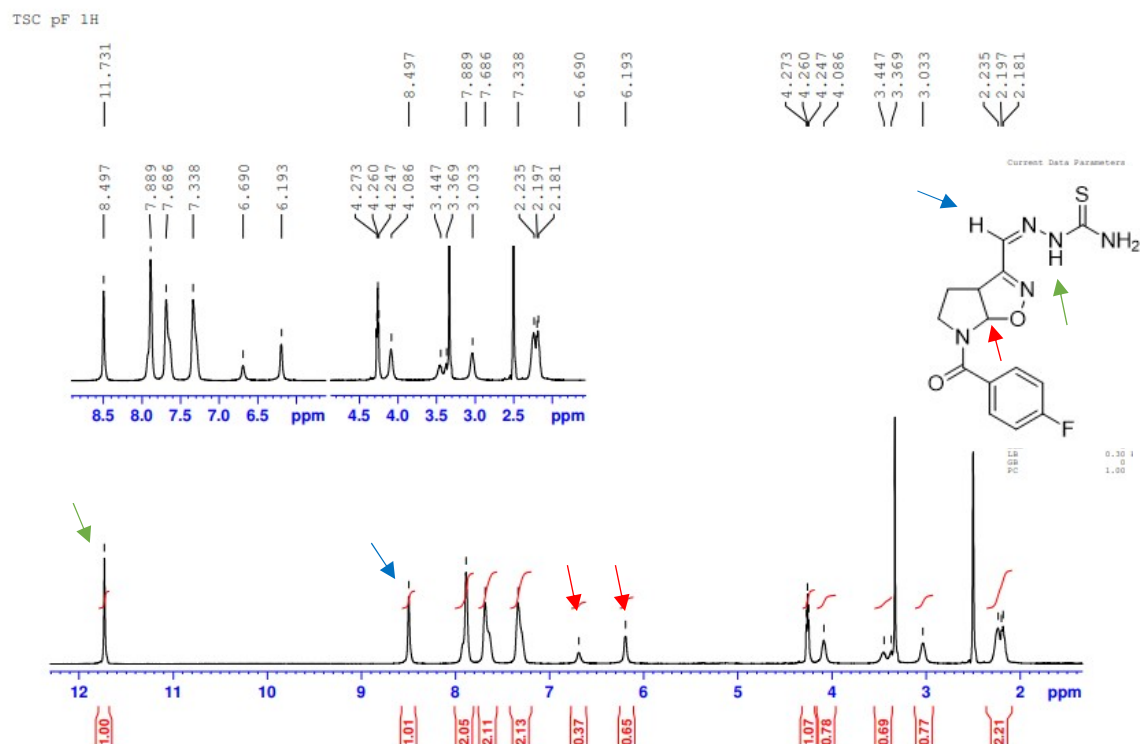
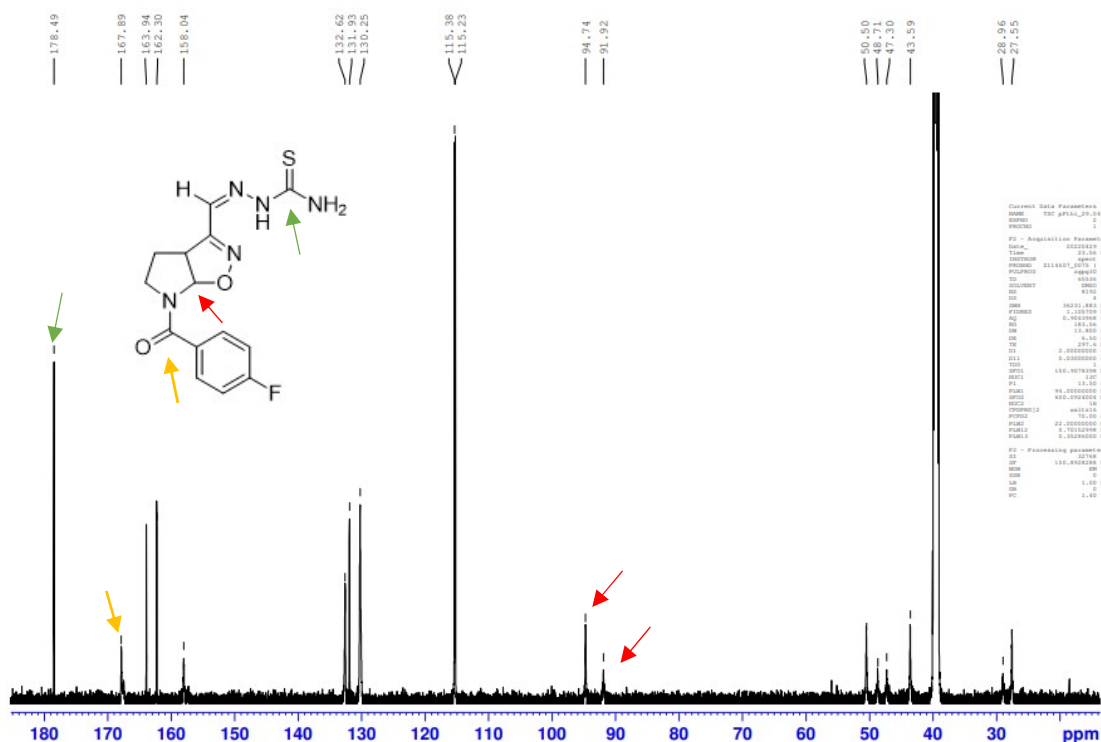


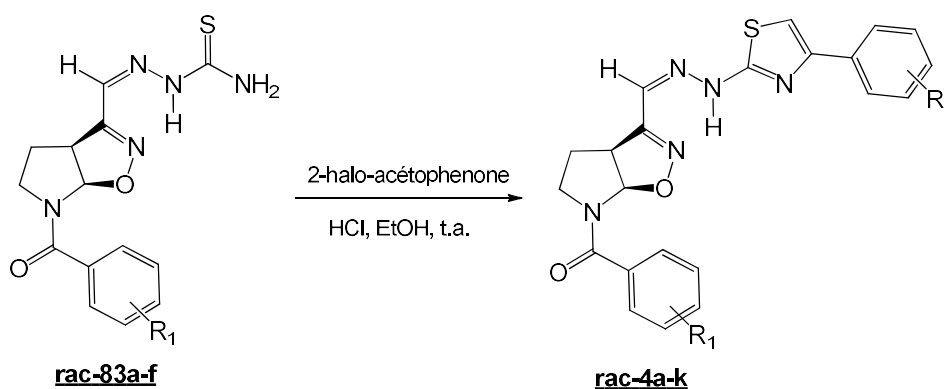
Figure 30. Spectre RMN de  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ ; 150 MHz) de l'isoxazoline thiosemicarbazone **rac-83d**



### 3.3.9. Synthèse de l'hybride thiazole/isoxazoline - hydrazone

Enfin, la synthèse de l'hybride inédit 2-isoxazoline-aza-bicyclique/thiazole avec l'espaceur d'hydrazone **rac-4** a été réalisée par la synthèse classique de Hantzsch (1889), qui favorise la condensation des  $\alpha$ -halocétones avec des thioamides. (HANTZSCH, 1889; DONOHUE *et al.*, 2012) (Schéma 29)

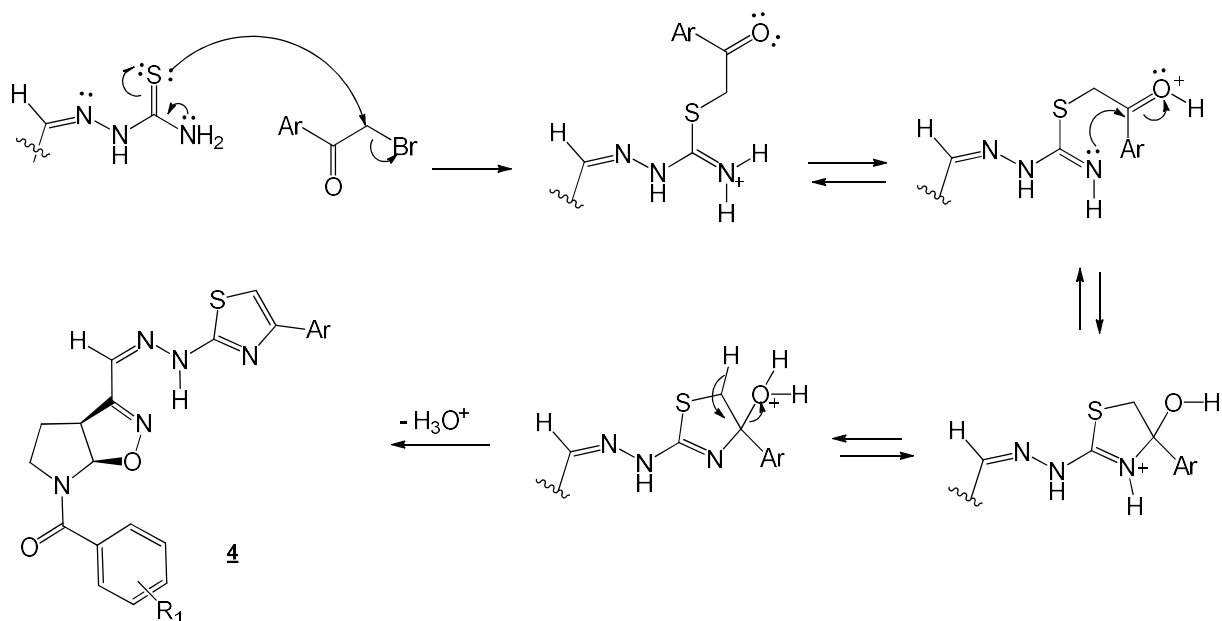
Schéma 28. Synthèse de 2-isoxazoline/thiazole avec l'espaceur hydrazone **rac-4**.



Cette dernière étape réactionnelle s'est produite et un moyen catalysé par l'acide est similaire aux méthodologies appliquées dans la littérature, où 11 hybrides non publiés peuvent être obtenus. (ALTHAGAFI *et al.*, 2018; BOUHERROU *et al.*, 2017; SOUZA, 2005)

Le mécanisme de réaction est basé sur la synthèse classique de Hantzsch (1889) (Schéma 30), qui consiste en l'attaque nucléophile de l'atome de soufre du thioamide au carbone alpha de  $\alpha$ -halocarbonil, avec la formation d'un composé intermédiaire, qui par déshydratation conséquent conduit au thiazole correspondant (HANTZSCH, 1889; BORCEA *et al.*, 2021, ER *et al.*, 2014).

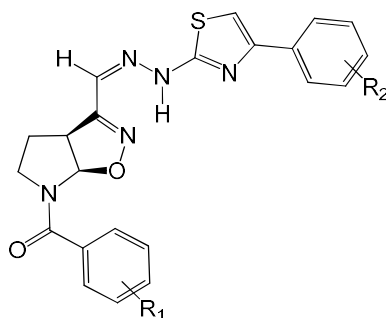
Schéma 29. Le mécanisme de synthèse du thiazole de Hantzsch pour la formation d'hybrides thiazole/isoxazoliniques avec espaceur d'hydrazone.



Les réactions ont été réalisées avec différentes thiosemicarbazones isoxazoliniques **rac-83** et  $\alpha$ -halo-acétophénones substituées, dans éthanol à pH 4, à température ambiante. Le temps de réaction variait entre 30 min et 2 h, et la progression de la réaction était suivie par CCM.

La purification a été réalisée par lavage à l'éthanol et à l'éther diéthylique, pour donner entre 40 et 86% de rendement, présenté dans le tableau 6 et étant similaire à celui trouvé dans la littérature pour la formation du thiazole, dans des conditions similaires (BOUHERROU *et al.*, 2017; SOUZA, 2005).

Tableau 6. Rendement de l'hybride thiazole/isoxazoline - hydrazone.



| Hybride               | Code de structure | R <sub>1</sub>            | R <sub>2</sub>            | Rendement (%) |
|-----------------------|-------------------|---------------------------|---------------------------|---------------|
| <b><u>rac-4b</u></b>  | FC-02             | <i>p</i> -Me              | <i>p</i> -NO <sub>2</sub> | 48            |
| <b><u>rac-4c</u></b>  | FC-03             |                           | <i>p</i> -Cl              | 39            |
| <b><u>rac-4d</u></b>  | FC-04             |                           | <i>p</i> -F               | 59            |
| <b><u>rac-4a*</u></b> | FC-01             | <i>p</i> -Cl              | <i>p</i> -NO <sub>2</sub> | 40            |
| <b><u>rac-4e</u></b>  | FC-05             |                           | <i>p</i> -Cl              | 81            |
| <b><u>rac-4f</u></b>  | FC-06             |                           | <i>p</i> -F               | 67            |
| <b><u>rac-4g</u></b>  | FC-07             | <i>p</i> -NO <sub>2</sub> | <i>p</i> -NO <sub>2</sub> | 84            |
| <b><u>rac-4h</u></b>  | FC-08             |                           | <i>p</i> -Cl              | 86            |
| <b><u>rac-4i</u></b>  | FC-09             |                           | <i>p</i> -F               | 70            |
| <b><u>rac-4j</u></b>  | FC-10             | <i>p</i> -F               | <i>p</i> -NO <sub>2</sub> | 79            |
| <b><u>rac-4k</u></b>  | FC-11             | <i>p</i> -tBu             | <i>p</i> -NO <sub>2</sub> | 85            |

\* Le changement de position de **4a** dans ce tableau vise à mieux grouper R<sub>1</sub>.

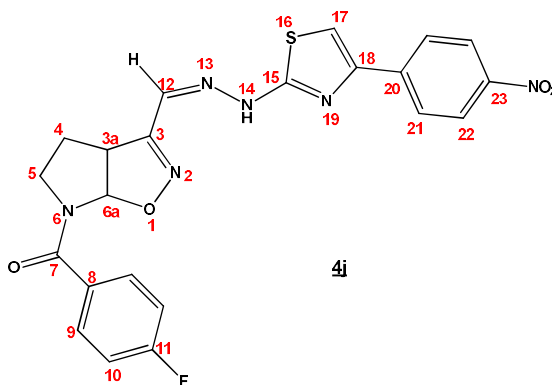
De manière représentative, l'élucidation structurale de l'hybride isoxazoline azabicyclique/thiazole **rac-4j** par résonance magnétique nucléaire est présentée, par RMN <sup>1</sup>H de 600 MHz et RMN <sup>13</sup>C de 150 MHz. Les spectres ont été obtenus en une dimension (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C et DEPT) et en deux dimensions (COSY, HSQC et HMBC).

Une caractéristique importante était la présence de signes d'hydrogène et de rotamères de carbone proches de la fonction amide, présentant des signaux en double.

Le spectre DEPT a conduit à la désignation des types de carbone (C, CH, CH<sub>2</sub>), tandis que COSY a confirmé les couplages attendus. L'analyse du spectre HSQC a conduit à la corrélation des carbones avec les hydrogènes respectifs qui y sont attachés. Le spectre HMBC a permis d'analyser les corrélations à deux et trois

liaisons, permettant d'établir les corrélations des carbones quaternaires principalement (Figure 31).

Figure 31. Structure de l'hybride isoxazoline **rac-4j** avec numérotation attribuée.

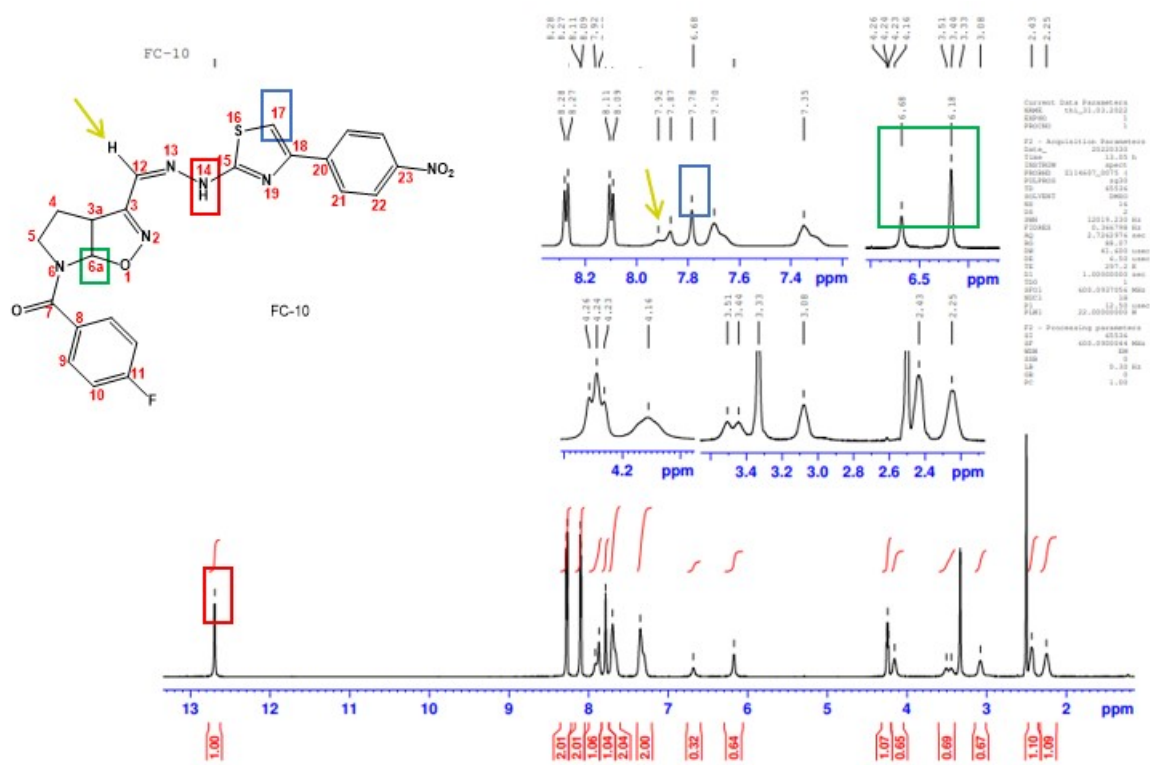
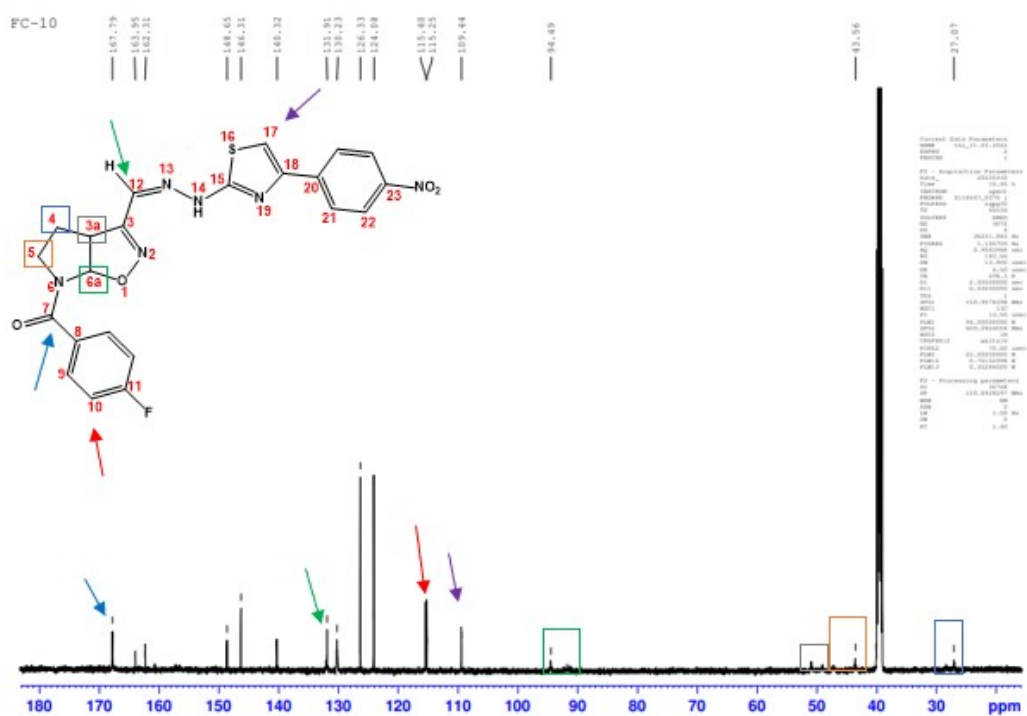


En analysant les spectres du  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$ , l'isoxazoline aza-bicyclique a montré des signes caractéristiques, confirmant sa présence dans la structure. À 6,18 ppm et 6,68 ppm (rotamères), l'hydrogène H6a apparaît comme un signal large s'intégrant à 1H. Le carbone C6a respectif, à partir de la jonction des cycles, apparaît à 94,5 ppm et 92,0 ppm (rotamères). Le H3a apparaît comme un triplet large à 4,24 ppm ( $J = 9$  Hz). Le carbone C3a apparaît à 51,0 ppm et 49,1 ppm (rotamères).

En ce qui concerne la fonction hydrazone, l'hydrogène caractéristique HN14 apparaît à 12,70 ppm comme un simplet, s'intégrant à 1H, tandis que l'hydrogène de l'imine H12 apparaît avec un signal élargi à 7,89 ppm, tandis que le carbone C12 respectif apparaît à 131,9 ppm.

En conclusion, le thiazole substitué par l'aryle présente l'hydrogène C17 comme un simplet à 7,78 ppm, s'intégrant à 1H, tandis que le carbone C17 apparaît à 109,4 ppm. (Figures 32 et 33)

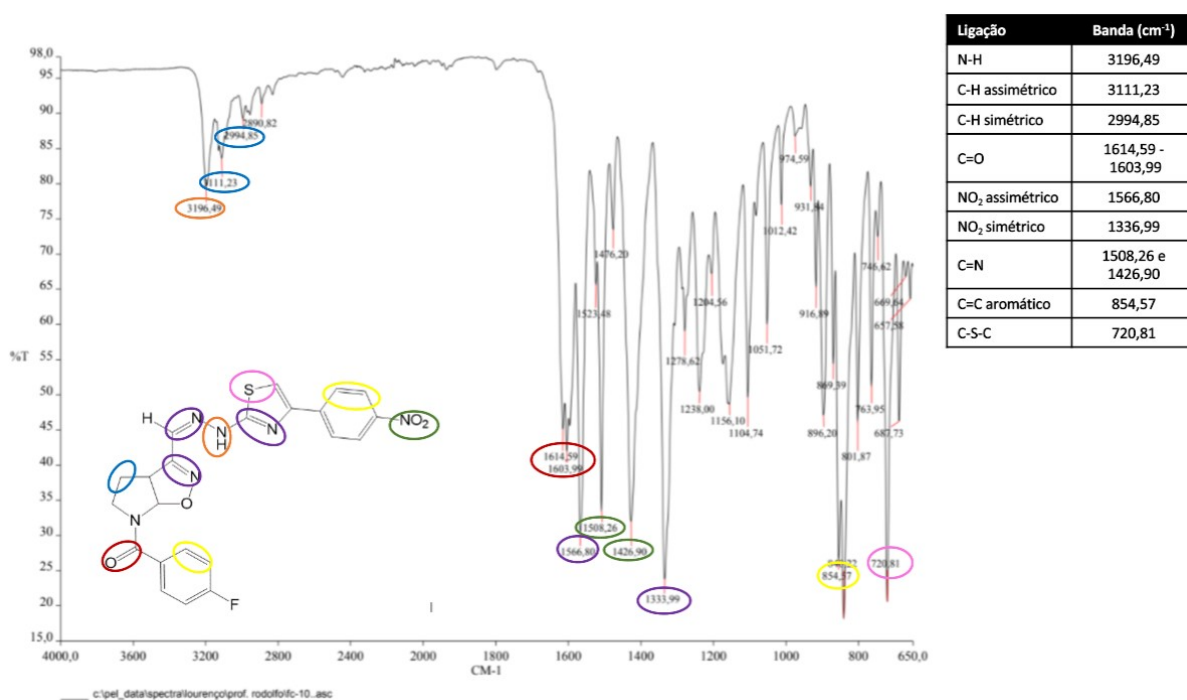
Une analyse similaire a été effectuée pour les autres molécules de la série et tous les spectres, ainsi que la liste des déplacements chimiques sont disponibles dans les matériaux et les méthodes.

Figure 32. Spectre RMN de  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ ; 600 MHz ) d'hybride isoxazoline/thiazole **rac-4j**Figure 33. Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ ; 150 MHz) de d'hybride isoxazoline/thiazole **rac-4j**

Les spectres infrarouges ont été obtenus par la méthodologie ATR, à la fois pour la molécule **rac-4j** et pour les hybrides de la série.

Le spectre ATR de la molécule **rac-4j**, un hybride contenant le groupe p-Cl en R<sub>1</sub> et NO<sub>2</sub> en R<sub>2</sub>, est représenté à la Figure 34.

Figure 34. Spectre infrarouge de d'hybride isoxazoline/thiazole **rac-4j**



L'attribution des bandes du spectre IR-FT ATR est indiquée dans le spectre lui-même, marqué par différentes couleurs, ainsi que dans le tableau à côté des principales bandes.

## 4. CHAPITRE 2 - Partie chimique - Série diaryl-isoxazole

### 4.1. Objectifs

#### 4.1.1. Objectif général

Synthèse et identification de nouveaux dérivés hybrides diaryl-isoxazoles **10** et **11**.

#### 4.1.2. Objectifs spécifiques

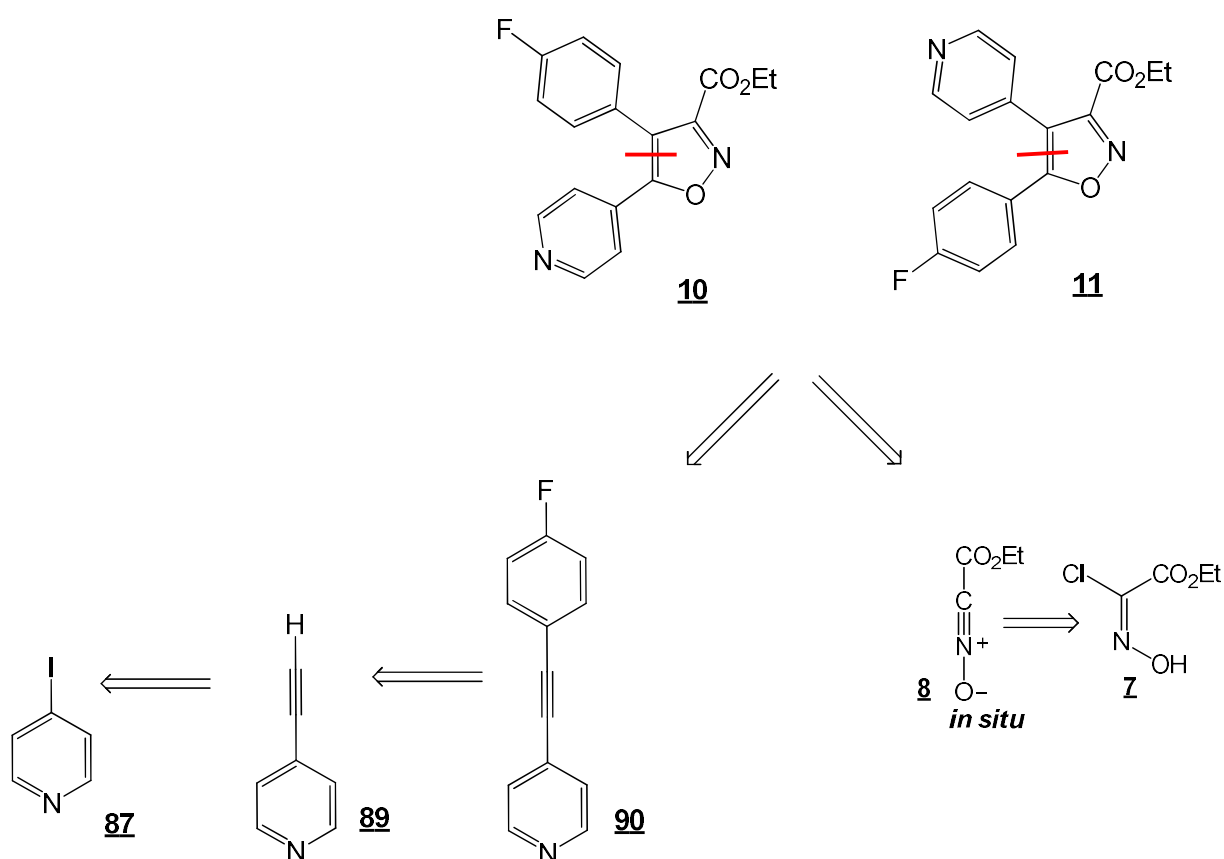
- j- Synthèse de la série des dérivés diaryl-isoxazole **10** et **11**.
- k- Purification et détermination des propriétés physico-chimiques des nouvelles molécules **10** et **11**.
- l- Élucidation structurale des nouvelles molécules hybrides **10** et **11**. spectroscopie par résonance magnétique nucléaire ( $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$ ), infrarouge et spectrométrie de masse.

## 4.2. Stratégie synthétique

### 4.2.1. Rétrosynthèse des diaryl-isoxazoles **10** et **11**

La rétrosynthèse proposée est dans le schéma 31 et consistait à obtenir les diaryl-isoxazoles **10** et **11**, à partir de la cycloaddition du 4-[(4-fluorophényl)éthynyl]pyridine **90** avec le CEFNO **8** généré *in situ*. Le 4-[(4-fluorophényl)éthynyl]pyridine **90** serait obtenu par condensation du 4-fluoriodobenzène avec la 4-éthynylpyridine **89**, résultant de la déprotection du (triméthylsilyl)-4-éthynylpyridine. Ce dernier composé provient de la 4-iodopyridine **87**, réactif initial.

Schéma 30. Rétrosynthèse proposée des diaryl-isoxazoles **10** et **11**.



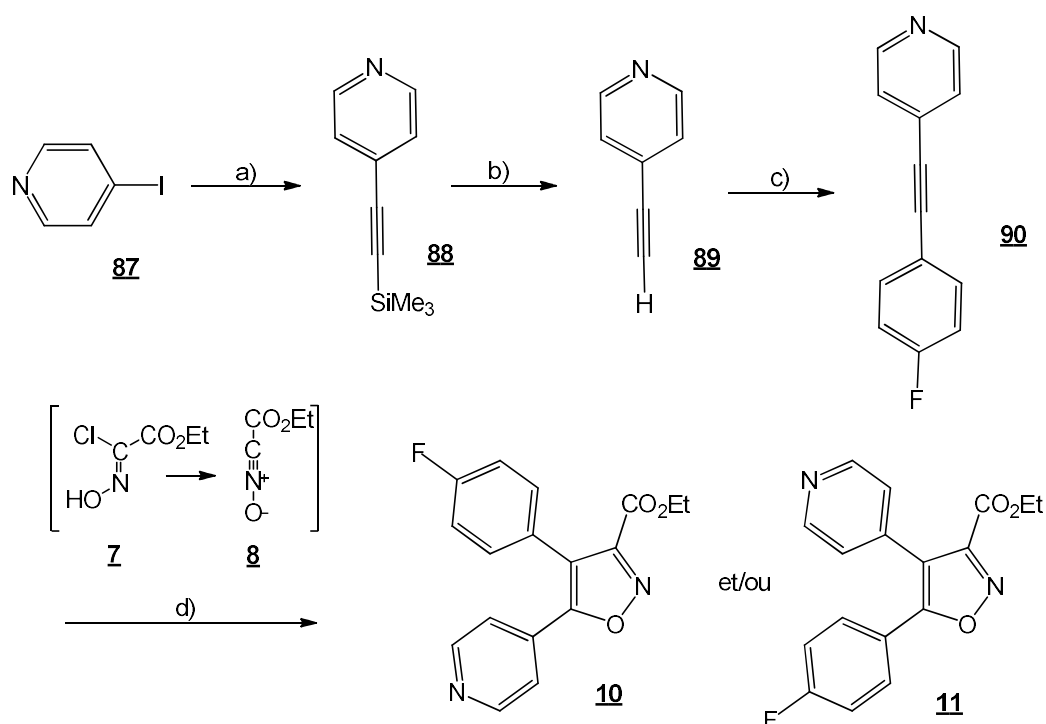
## 4.2.2.Voie synthétique

### 4.2.2.1.Synthesis via cycloaddition

La voie de réaction utilisée consistait à obtenir diaryl-isoxazole **10** et **11**.

La première voie synthétique proposée commence par la production de 4-(triméthylsilyl)éthynylpyridine **88** à partir d'un couplage à la 4-iodopyridine **87** (schéma 32). Dans l'étape suivante, une réaction de déprotection s'est produite formant la 4-éthynylpyridine **89** (produit volatil) et après une réaction de couplage avec le 4-fluoro-iodobenzène, le système diaryl-acétylène **90** a été généré. Une réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire avec le CEFNO **8** généré *in situ*, à partir de son précurseur **7**, conduit à la formation du noyau isoxazole.

Schéma 31. Réactifs et conditions pour la synthèse des diaryl-isoxazoles.



**a)** triméthylsilylacétylène, CuI, Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, Et<sub>3</sub>N, acétonitrile, MW, 120 °C, 10min;  
**b)** TBAF, THF, -15 °C, 30min; **c)** 4-fluoro-iodobenzène, Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, CuI, Et<sub>3</sub>N, MW, 120 °C, 5 min. ; **d)** KF, 1,2-DME, 80°C, 18h.

En raison des difficultés rencontrées et de plusieurs tentatives, d'autres voies synthétiques ont été proposées, cherchant la synthèse de la molécule finale. La

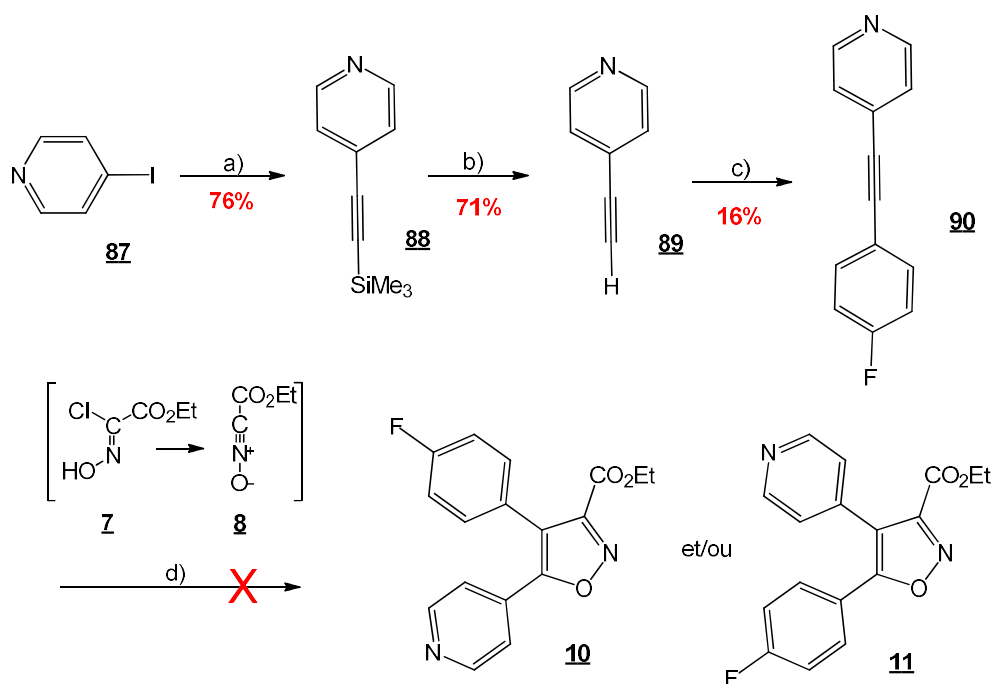
cyclisation du  $\beta$ -céto-énol est l'une des voies synthétiques et sera présentée plus loin dans les résultats.

### 4.3. Résultats et discussion

#### 4.3.1. Synthesis via cycloaddition

La synthèse commence par la production de 4-(triméthylsilyl)éthynylpyridine **88** à partir d'un couplage avec la 4-iodopyridone **87** (schéma 33). Dans l'étape suivante, une réaction de déprotection s'est produite formant la 4-éthynylpyridine **89** (produit volatil), suivie d'un couplage avec le 4-fluoro-iodobenzène, qui provenait du 4-(4-fluorophényle)éthynylpyridine **90**. Ce dernier a été soumis à une réaction de cycloaddition dipolaire de 1,3 avec CEFNO, mais sans succès synthétique.

Schéma 32. Synthèse de diaryl-isoxazoles jusqu'au composé **90**.



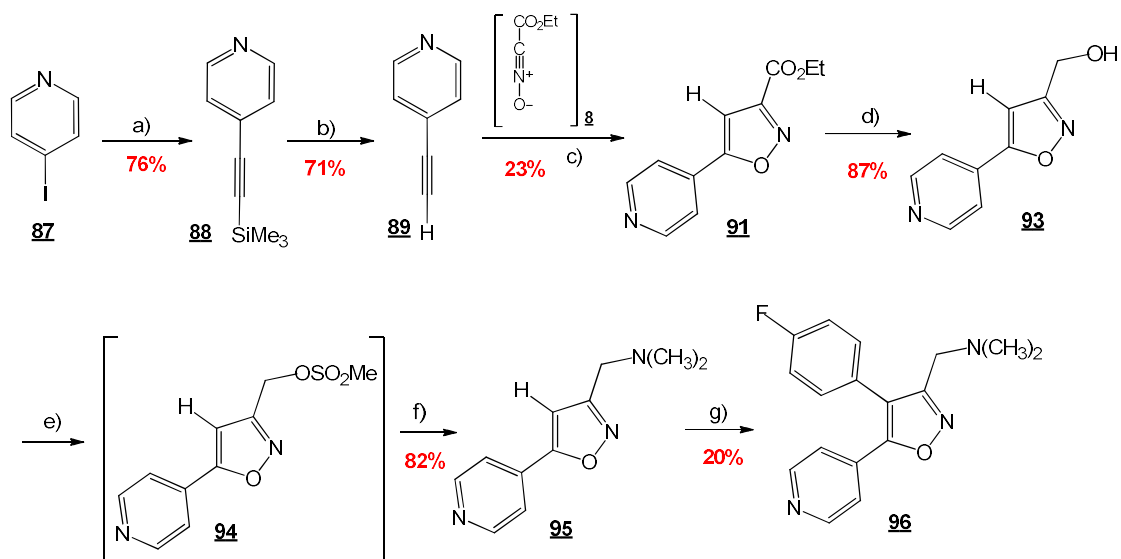
**a)** triméthylsilylacétylène, CuI, Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, Et<sub>3</sub>N, acétonitrile, MW, 120 °C, 10min; **b)** TBAF, THF, -15 °C, 30min; **c)** 4-fluoro-iodobenzène, Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, CuI, Et<sub>3</sub>N, MW, 120 °C, 5 min. ; **d)** KF, 1,2-DME, 80°C, 18h.

La synthèse a été suivie par UPLC-MS, mais la formation du produit n'a pas été observée et la non-conversion du réactif de départ a été vérifiée dans la réaction. Même avec des changements dans la méthodologie, le diaryl-isoxazole **10** et/ou **11** n'ont pas été formés, ce qui nous a amené à considérer l'obstacle stérique possible du diarylacétylène **90** sur CEFNO **8**, rendant impossible l'approche et par conséquent la formation du cycle isoxazole.

Cette hypothèse a été confirmée par le changement de méthodologie, où la cycloaddition 1,3-dipolaire de la 4-éthynylpyridine **89** avec CEFNO **8** a été traitée avec succès, obtenant l'isoxazole **91**. Suite au changement méthodologique, après purification de l'ester de l'isoxazole **91**, plusieurs tentatives d'halogénéation en C4 du cycle isoxazole ont été effectuées, afin de favoriser l'introduction du 4-fluorobenzène, par une réaction de Suzuki et la formation subséquente de diaryl-isoxazole **10**, cependant, dans aucune d'entre elles le produit a été obtenu, comme présenté dans le schéma 34.

Après plusieurs tentatives d'optimisation, le composé **10** a été obtenu avec succès, mais avec de faibles rendements. La voie de synthèse commence par l'obtention de la 4-(triméthylsilyl)éthynylpyridine **88**. L'étape suivante est une réaction de déprotection formant de la 4-éthynylpyridine **89** (produit volatil) suivie d'une réaction cycloaddition 1,3-dipolaire avec de l'oxyde de carbéthoxyformonitrile **8** (CEFNO) généré *in situ*, à partir de son précurseur chloroximidoacétate d'éthyle, favorisant la formation du noyau isoxazole avec une fonction de ester en C3 et installant de la 4-pyridine en C5 (composé **91**). Ensuite, l'ester a été réduit en alcool pour favoriser l'insertion de diméthylamine dans une réaction de *one pot* via le mésylate intermédiaire **94**. Cette stratégie de synthèse a permis d'obtenir du 4-pyridyl-isoxazole **95** qui subit une réaction d'arylation directe présence de 4-fluoro-iodobenzène pour aboutir au composé souhaité avec un faible rendement de 20%.

Malgré le succès de la synthèse, une petite quantité de produit a été obtenue avec une faible efficacité de réaction, pour le seul composé obtenu. En raison des conditions imposées par la pandémie, cette série n'est pas terminée.

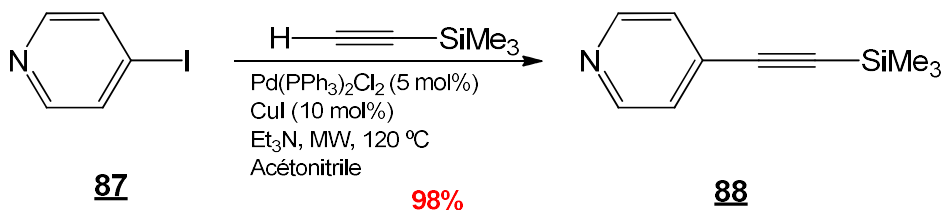
Schéma 33. Synthèse du composé **96** par cycloaddition.

[a] triméthylsilylacétylène, CuI, Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, E3N, acétonitrile, MW, 120 °C, 10 min; **b** TBAF, THF, -15 °C, 30 min; **c**) chloroximidoacétate d'éthyle, CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O, ascorbate de sodium, KHCO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O/tBuOH (1:1), t.a., 4h; **d** NaBH<sub>4</sub>, EtOH, 1h, 0 °C, et *pendant la nuit* à t.a. ; et chlorure de méthanesulfonyle, TEA, THF, 5 °C et 1 h à t.a.; **f**) NH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, DIPEA, ACN, t.a., 30 min; **g**) 4-fluoro-iodobenzène, PPh<sub>3</sub>, Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Pd(OAc)<sub>2</sub>, DMF, 3,5 h à 85 °C puis *pendant la nuit*, t.a.).

Dans cette étape synthétique, il y avait l'engagement d'accéder à l'analogue du composé **105** (qui sera cité plus tard), à savoir le composé **96**, en inversant les positions du la 4-pyridine et du 4-fluorophényle dans le noyau de l'isoxazole, afin de compléter l'étude de la relation structure activité.

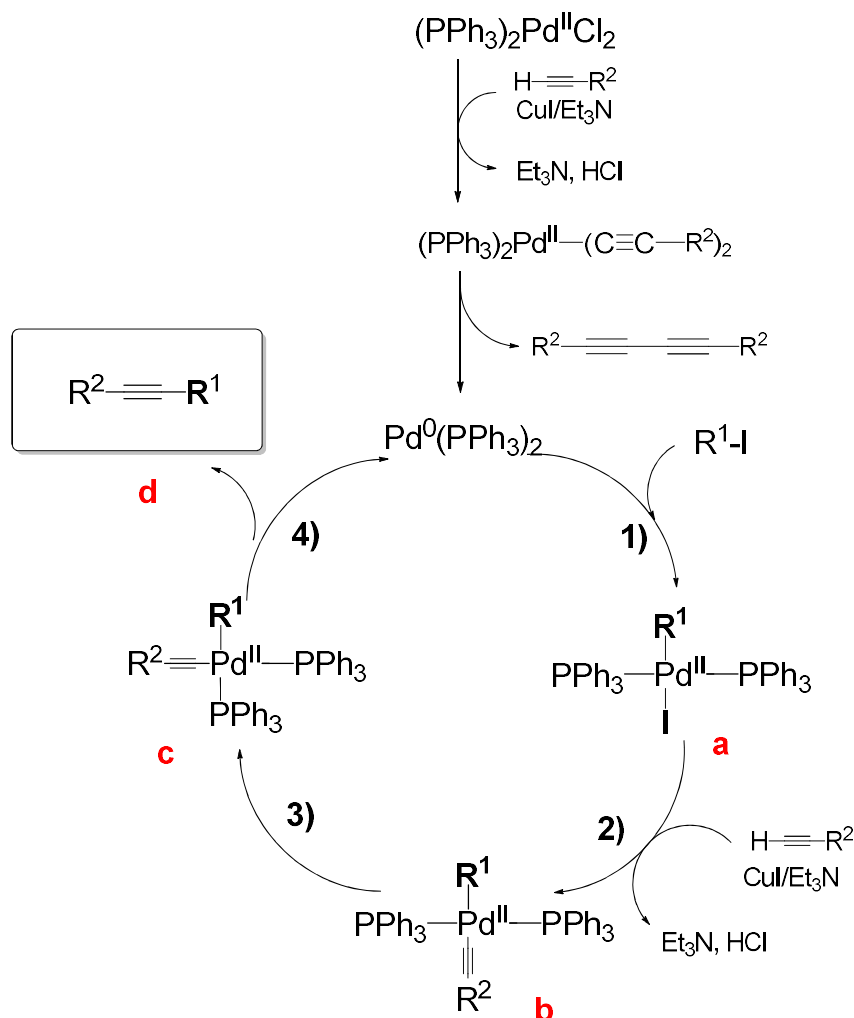
#### 4.3.1.1. Synthèse de la 4-(triméthylsilyl)éthynylpyridine **88**

La synthèse de la 4-(triméthylsilyl)éthynylpyridine **88** était basée sur la réaction classique de couplage croisé de Sonogashira *et al.* (1975), où les halogénures d'aryles peuvent être couplés avec des alcynes vrais pour la formation d'alciynes bi-substitués (SONOGASHIRA; TOHDA; HAGIHARA, 1975)(Schéma 36). Cette réaction a l'avantage d'être réalisée dans des conditions plus douces et un bon rendement par rapport à la réaction de couplage de Castro (STEPHENS; CASTRO, 1963).

Schéma 34. Synthèse de la 4-(triméthylsilyl)éthynylpyridine **88**.

Le mécanisme de réaction consiste en deux cycles catalytiques, l'un au palladium et l'autre au cuivre. Il est proposé que, à partir d'un complexe de chlorure de palladium II, il se forme du palladium de degré d'oxydation 0, qui est le catalyseur actif. Après la formation du complexe chlorure de palladium II ( $\text{PdCl}_2$ ), l'étape d'addition oxydante **1**) se produit dans le cycle du Pd, où il y a l'insertion de  $\text{Pd}^0$  dans la liaison halogénure d'aryle, fournissant le complexe palladium II ( $\text{Pd}^{\text{II}}$ ) (**a**). Un cycle latéral soutenu par le cuivre comme co-catalyseur ( $\text{CuI}$ ) développe le réactif organométallique  $\sigma$ -alkynyle pour l'étape de transmétallation **2**) avec le complexe (**a**). L'intermédiaire  $\sigma$ -alcinylpalladium II (**b**) est produit et subit le processus d'isomérisation **3**) formant l'intermédiaire (**c**). L'élimination réductive **4**) se produit finalement pour fournir le produit de couplage (**d**) et régénérer le catalyseur  $\text{Pd}^0$  actif (Schéma 36).

Schéma 35. Cycle catalytique de la réaction de couplage Sonogashira

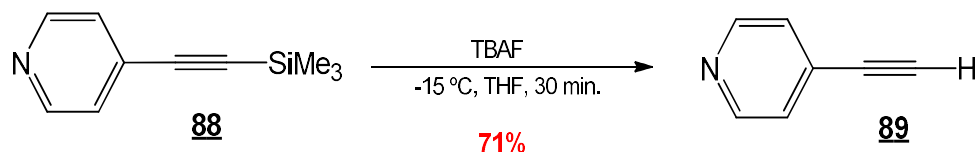


Source: L'auteur

Bien que la synthèse soit décrite à température ambiante, cette étape a été réalisée à l'aide du micro-ondes pour une synthèse plus rapide, en utilisant une période de 10 minutes seulement (SALIH; BAQI, 2019).

#### 4.3.1.2. Synthèse de la 4-éthynylpyridine

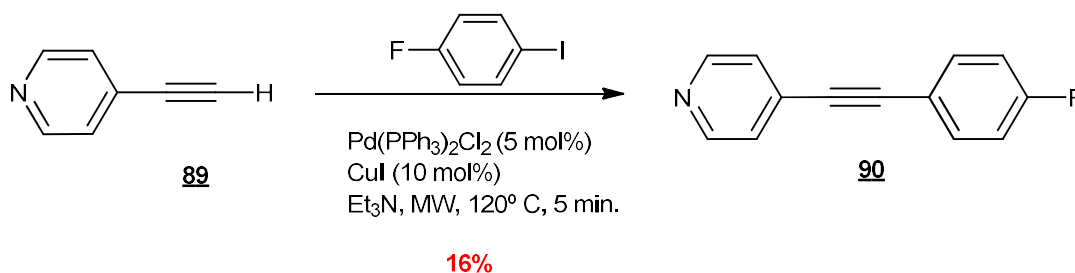
La déprotection pour la formation de 4-éthynylpyridine **89** a été réalisée par hydrolyse alcaline avec du fluorure de tetrabutylammonium tel que présenté dans la littérature (DAWOOD *et al.*, 2014), étant à une température de  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ . La réaction s'est produite en seulement 30 minutes, la conversion de 95 % du réactif de départ en produit par UPCL/MS (Schéma 37).

Schéma 36. Synthèse de la 4-éthynylpyridine **89**.

Cependant, après purification par chromatographie flash automatisée, le produit n'a pas été détecté. Après d'autres tentatives de purification, y compris la lyophilisation, après purification C18, pour éviter le contact avec la silice de la colonne chromatographique. Pour cette raison, pour la purification par colonne flash le dichlorométhane a été utilisé comme solvant de la phase mobile, pour l'évaporation du solvant sans utilisation de vide dans l'évaporateur rotatif, uniquement avec la température du bain-marie (55 °C).

#### 4.3.1.3. Synthèse de la 4-[(4-fluorophényl)éthynyl]pyridine **90**

Les étapes précédentes jusqu'à la synthèse de cet alcyne bisubstitué, à base d'halogénures, sont décrites dans certaines études (DAWOOD *et al.*, 2014; ELANGO VAN; Wang, Wang, HO, 2003), parmi lesquels la thèse de doctorat de puget (2003), réalisée dans le groupe de recherche IICiMed, Université de Nantes. (PUGET, 2003) L'utilisation des micro-ondes dans cette réaction est décrite dans la revue de Battle, Sagrillo et Gama (2014) (BATTLE; SAGRILLO; GAMA, 2014).

Schéma 37. Synthèse de 4-[(4-fluorophényl)éthynyl]pyridine **90**

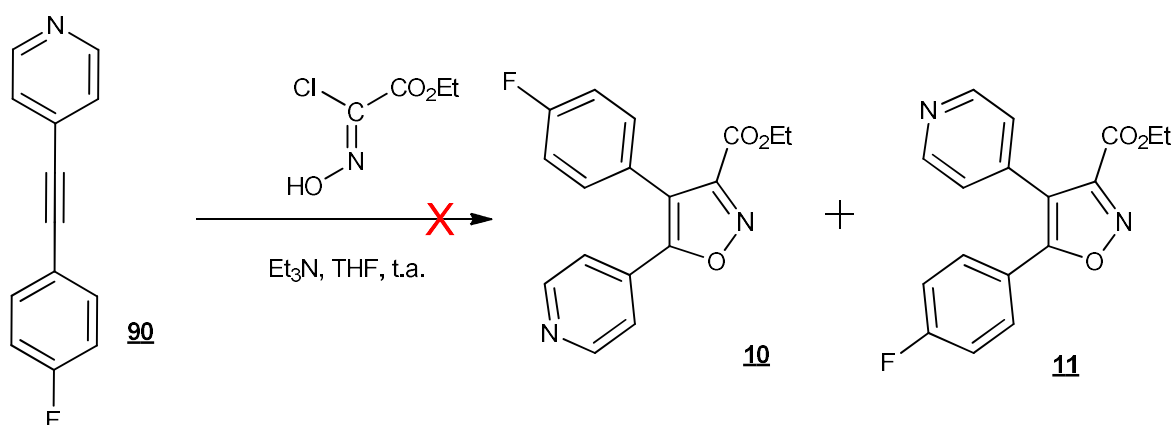
Cette synthèse se produit par couplage catalytique de Sonogashira *et al.* (1975) dans les mêmes conditions que le premier couplage avec la 4-iodopyridine et le triméthylsilylacétylène, mentionnés ci-dessus. Le mécanisme est le même que

celui trouvé dans le schéma 36, dans la rubrique 4.6.1.1 modifiant les réactifs. Malgré le faible rendement, cela a été soumis à la réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire, pour un gain de temps stratégique dans cette recherche.

#### 4.3.1.4.Cycloaddition 1,3 dipolaire

##### 4.3.1.4.1.Alcyne disubstitué dipolophile 90

Schéma 38. Synthèse du système ortho-diphényl-isoxazole



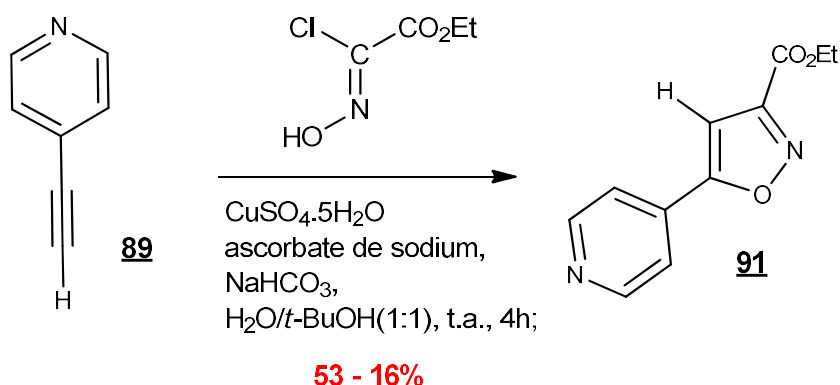
La cycloaddition du 4-[(4-fluorophényl)éthynyl]pyridine 90 a été réalisée selon la même méthodologie proposée par Almeida, V. *et coll.* (2009) pour la formation du noyau de l'isoxazoline. Comme il n'y aurait pas de différenciation électronique significative entre les carbones sp de la triple liaison, il pourrait y avoir la formation de 2 isomères d'isoxazole. Cependant, la réaction a été infructueuse, même avec les changements dans la méthodologie. (CHULKY, *et coll.* 2016; KANKALA *et al.*, 2011) L'hypothèse de l'obstacle stérique causé par le nuage électronique dense près de la triple liaison, qui empêcherait l'approximation du dipôle CEFNO.

##### 4.3.1.4.2.Dipolarophile alcyne monosubstitué 89

La méthodologie qui a présenté le meilleur rendement pour la synthèse du cycloadduit était Himo F. *et al.* (2005), où le cycle isoxazole est obtenu à partir de la cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen (1963) entre un azoture et une alcyne

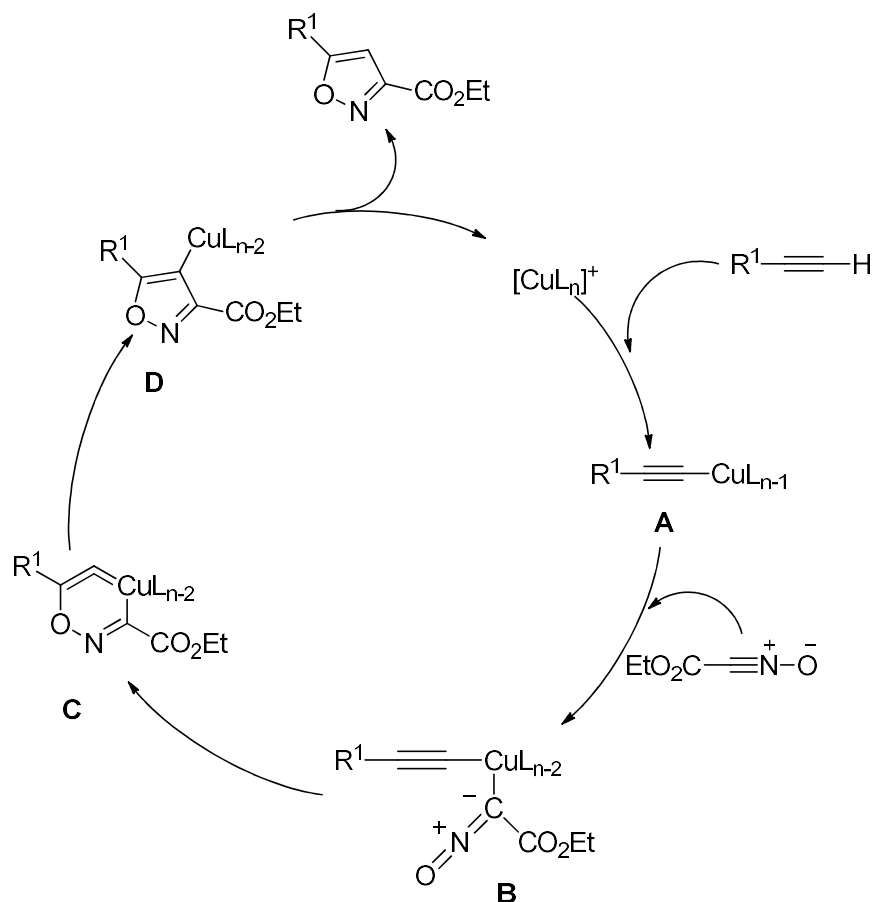
terminale, avec le catalyseur du sulfate de cuivre (II) en présence d'ascorbate de sodium. La réaction se produit à température ambiante entraînant la formation sélective d'un seul régioisomère, le 3,5-isoxazole-disubstitué (HIMO *et al.* , 2005) (Schéma 40).

Schéma 39. Synthèse du cycle phényl-isoxazole **91**.



En présence d'acétylure de cuivre (I), les NO réagissent avec les alcynes fournissant des isoxazoles 3,5-disubstitués. La séquence catalytique commence par la coordination de l'alcyne avec les espèces réactives de Cu (I)  $[\text{CuLn}]^+$  en déplaçant l'un des ligands L, en l'occurrence l'ascorbate (intermédiaire A). Dans l'étape suivante, le NO remplace l'un des ligands et se lie à l'atome de cuivre à travers le carbone lié à l'azote, formant l'intermédiaire B. Ensuite, aucun oxygène dans B n'attaque le carbone C-2 à partir de l'acétylure, formant le cycle métallique C de cuivre à six membres. À partir de C, la contraction du cycle se produit pour former le dérivé de cuivre D. La protéolyse de D libère le produit isoxazole, complétant ainsi le cycle catalytique. Les étapes de ce cycle ont été confirmées par des méthodes de calcul. (ROSCALES; PLUMET, 2018) (schéma 41)

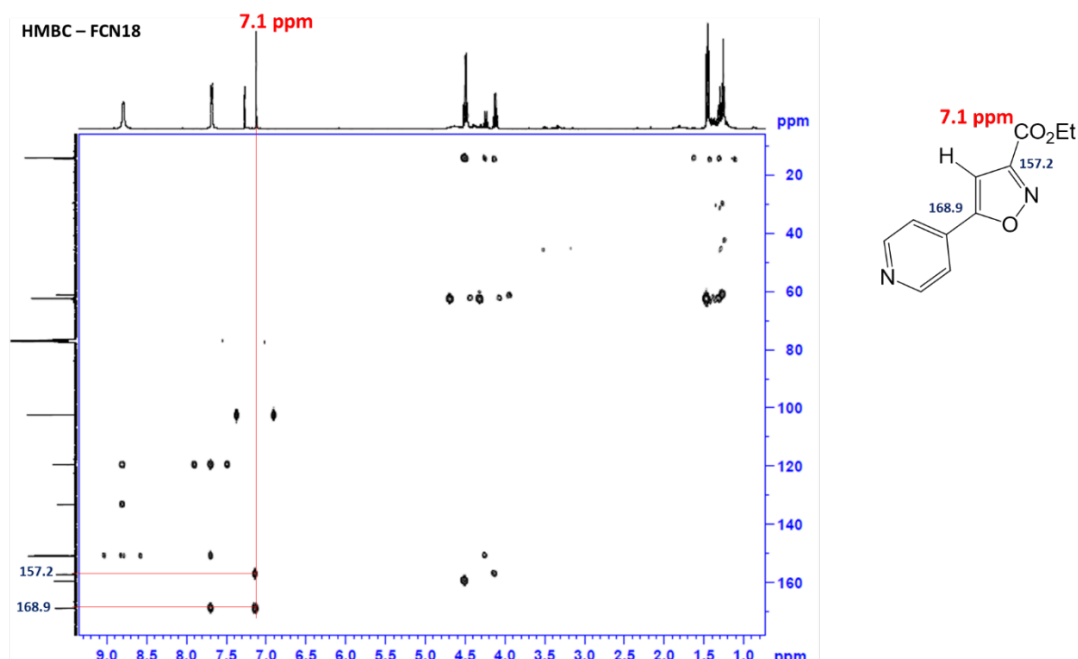
Schéma 40. Mécanisme de réaction proposé pour le catalyseur Cu(I) de la cycloaddition 1,3-dipolaire entre les NO et les alcynes.



Source : Roscales et Plumet (2018). Adapté.

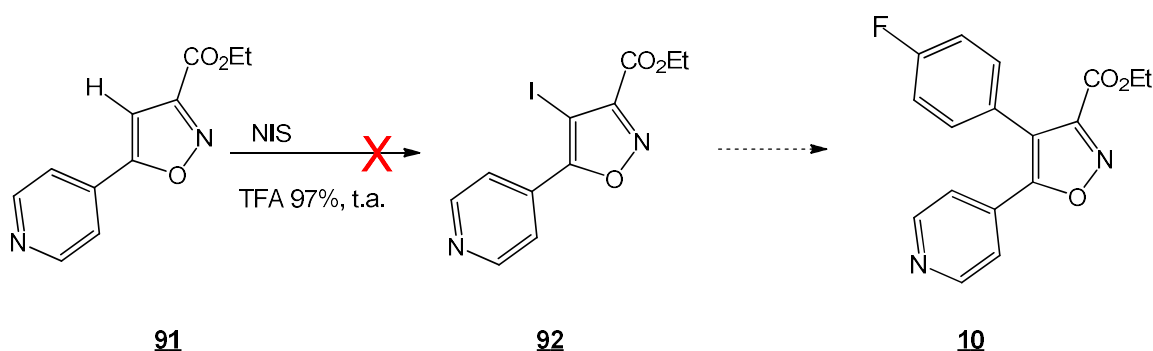
L'analyse RMN  $^1\text{H}$  a confirmé la formation d'isoxazole par la présence du singulet à 7,125 ppm appartenant au H du cycle isoxazole, du triplet et du quadruplet à 1,45 ppm ( $J = 7,2$  Hz) et 4,50 ( $J = 7,2$  Hz) ppm, appartenant respectivement au H de l'ester. Les signaux correspondant au H aromatique sont observés en 7,68 ppm ( $J = 6,0$  Hz, d) et les déblindés, à 8,79 ppm ( $J = 3,6$  Hz, sl).

La détermination de la pyridine dans l'isoxazole en C-5 a pu être confirmée par l'analyse du spectre RMN bidimensionnel du HMBC, où H à 7,1 ppm effectue un couplage  $J^2$  avec C à 157,2 ppm attaché à l'ester, qui ne présente que ce couplage du H, et le signal à 168,9 ppm connecté à la pyridine, qui présente également un couplage  $J^2$  comme méta-H par rapport à n, comme on peut le voir à la figure 35.

Figure 35. Spectre de RMN HMBC 400 MHz du composé isoxazole **91**

#### 4.3.1.5. Halogénéation

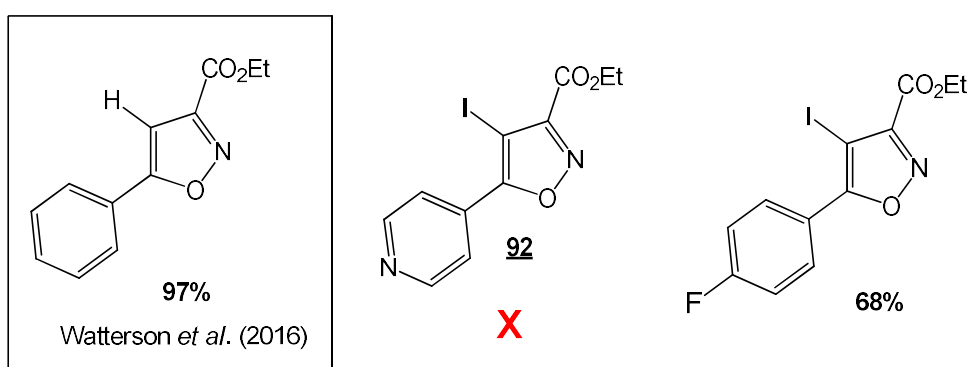
Avec le changement de la voie synthétique pour la formation de l'isoxazole, une modification méthodologique était nécessaire pour la formation du *scaffold* diaryl-isoxazole **10** (Schéma 42), et une halogénéation en C-4 a été choisie pour l'insertion ultérieure du 4-fluorobenzène dans cette position par réaction de couplage croisé de Suzuki-Miyaura (1979) (SUZUKI-MIYAUURA *et al.*, 1979).

Schéma 41. Halogénéation en C-4 du composé **91**.

L'halogénéation était basée sur les travaux de Watterson *et al.* (2016), où une structure similaire a été halogénée en C3, avec un rendement de 97% en présence

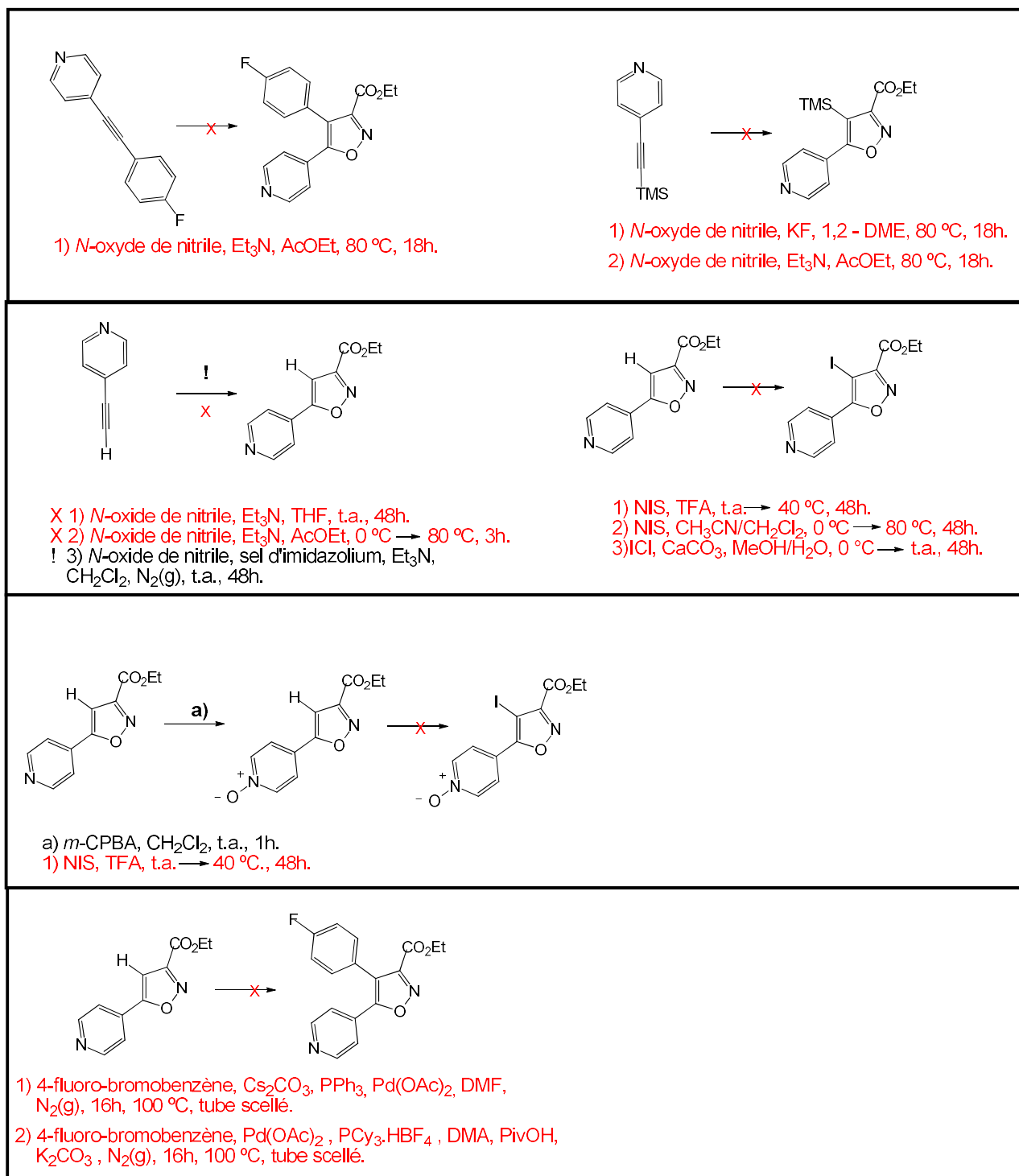
d'acide trifluoroacétique (TFA) et de *N*-iodosuccinimide (NIS). Cette structure est un isoxazole avec un aryle en C-3, étant différencié uniquement le substitut phényle en C-5. Même avec la similitude structurelle, notre cycloadduit isoxazole-ester **96** avec la pyridine en C-5 est resté intact, sans formation du produit halogéné. Dans le présent doctorat, d'autres voies synthétiques ont favorisé la formation d'ester d'isoxazole avec du 4-fluorophényle en C-5, et l'halogénéation ultérieure a été réalisée avec succès et un rendement de 68%, avec les mêmes réactifs, comme le montre la figure 36.

Figure 36. Rendements d'isoxazoles halogénés avec différents substituants.



D'autres méthodologies ont été appliquées afin de contourner ce problème, y compris l'halogénéation directe. Cependant, dans ce dernier cas, il y a eu la dégradation du produit de départ et aucune d'autres méthodologies appliquées n'ont montré de résultat efficace dans l'obtention du diaryl-isoxazole, comme on peut le vérifier dans le schema 43.

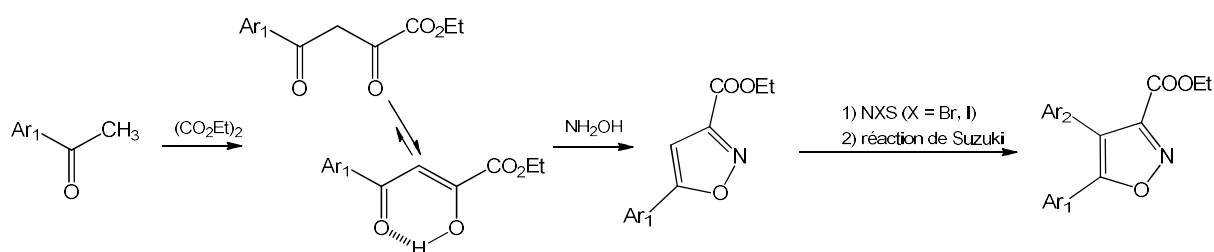
Face aux difficultés synthétiques qui ont été présentées, une autre façon d'obtenir le diaryl-isoxazole **11** a été proposée et exécutée en parallèle, ce qui, on peut le dire à l'avance, nous a conduit à la formation de notre produit final.

Schéma 42. Essais pour obtenir des molécules avec scaffold diaryl-isoxazole **10**

### 4.3.2. Synthèse par la cyclisation

Afin de poursuivre la synthèse, une autre voie synthétique a été planifiée et exécutée selon les travaux de Banoglu *et al.* (2016) et Brough *et al.* (2008), où le  $\beta$ -céto-ester a été cyclisé, formant le noyau isoxazole di-substitué et soumis à une halogénéation et à un couplage Suzuki ultérieurs (Schéma 44)(BANOGLU *et al.* , 2016; BROUGH *et al.* ; 2008).

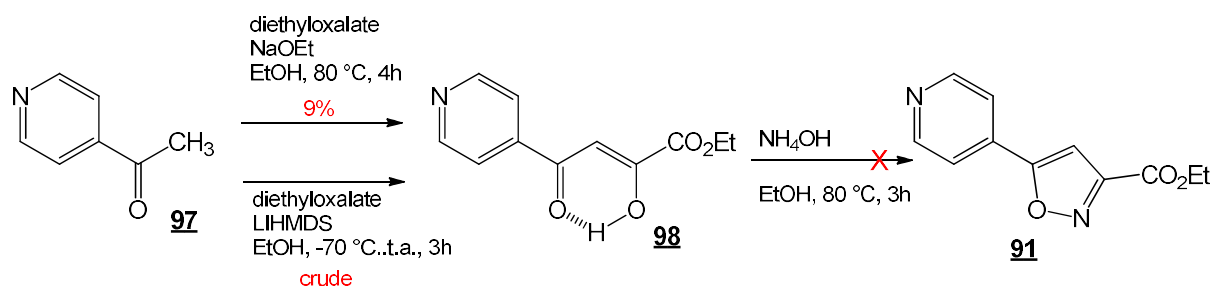
Schéma 43. Obtention de diaryl-isoxazole par cyclisation  $\beta$ -céto-ester.



#### 4.3.2.1. Cyclisme à partir de l'acétylpyridine

La formation d'isoxazole avec la pyridine en C5, via la cyclisation, a été testée par les méthodes de Banoglu *et al.* (2016) et Brough *et coll.* (2008) avec l'obtention de 9% de rendement en  $\beta$ -céto-ester après lavage dans l'éthanol, mais avec la dégradation de l'énolate dans la réaction de cyclisation avec de l'hydroxyde d'ammonium.

Schéma 44. Obtention de l'isoxazole à partir de l'acétylpyridine, par cyclisation.

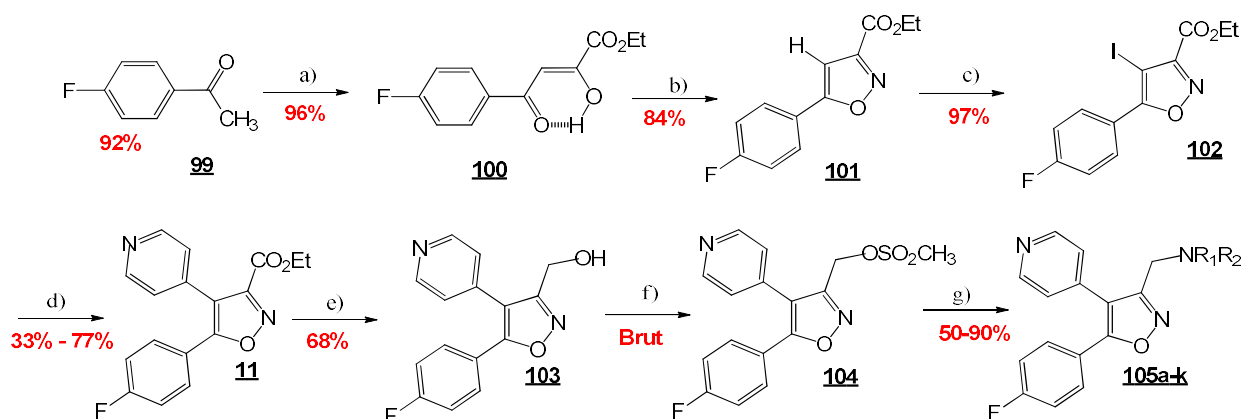


La méthodologie appliquée par Okawa T., *et al.* (2017), utilise l'acétylpyridine elle-même comme produit de départ et la base LIHMDS à -70 °C pour la formation de  $\beta$ -céto-ester (Schéma 45). Celle-ci a été soumise à la cyclisation sous sa forme brute, la formation du noyau isoxazole étant préférable à la formation de ce noyau par cycloaddition 1,3-dipolaire (BANOGLU *et al.* , 2016; BROUGH *et al.* , 2008; OKAWA *et al.* , 2017).

#### 4.3.2.2. Cyclisme à partir de l'acétyl-4-fluorobenzène

Le 5-(4-fluorophényl)-4-(pyridine-4-yl)isoxazole-3-carboxylate d'éthyle **101** a été synthétisé à partir de la réaction de la 1-(4-fluorophényl)éthanone **99** avec le diéthylxalate et la cyclisation ultérieure du 4-(4-fluorophényle)-2-hydroxy-4-oxobut-2-énoate **100**. Ces deux réactions, après plusieurs optimisations, ont présenté des rendements élevés et réduit en 1 étape l'obtention de la molécule **105**, obtenant sa purification par lavage à l'eau. Le noyau isoxazole a ensuite été halogéné sur le carbone 4 avec du *N*-iodosuccinimide et soumis au couplage Suzuki. Il a été observé dans cette réaction que le produit de départ n'était pas complètement consommé et qu'après plusieurs tentatives d'augmentation du rendement, l'acide pyridine-4-boronique s'est avéré peu soluble dans le milieu réactionnel. Puis l'ester en C3 a été converti en alcool par réduction avec du borohydrure de sodium, puis, un bon groupe partant, le mésylate, a été introduit et la première molécule finale, **105a** a été obtenue, avec insertion de l'amine secondaire (schéma 46).

Schéma 45. Obtention de l'isoxazole à partir de la 4-fluoro-acétophénone, par cyclisation

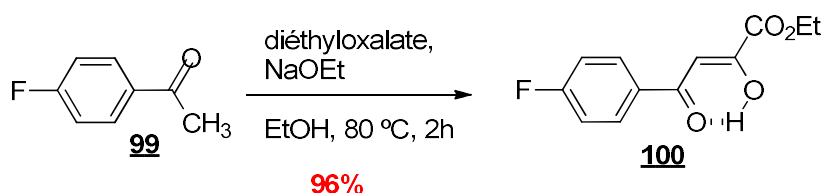


a) diéthylxalate, NaOEt, EtOH, 80 °C, 2h; b) NH<sub>2</sub>OH, EtOH, 80 °C, 2h; c) NIS, TFA, t.a., 2h; d) acide pyridine-4-boronique, Pd(dppf)Cl<sub>2</sub>, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, THF/H<sub>2</sub>O, MW, 120 °C, 20 min; e) NaBH<sub>4</sub>, EtOH, 30min à 0 °C après 1,5 h à c.t.a.; f) chlorure de mésyle, TEA, THF, 5 °C après 1 h à t.a.; g) NHR<sub>1</sub>R<sub>2</sub>, ACN, t.a., 30 min.

#### 4.3.2.3. Synthèse de $\beta$ -céto-énol

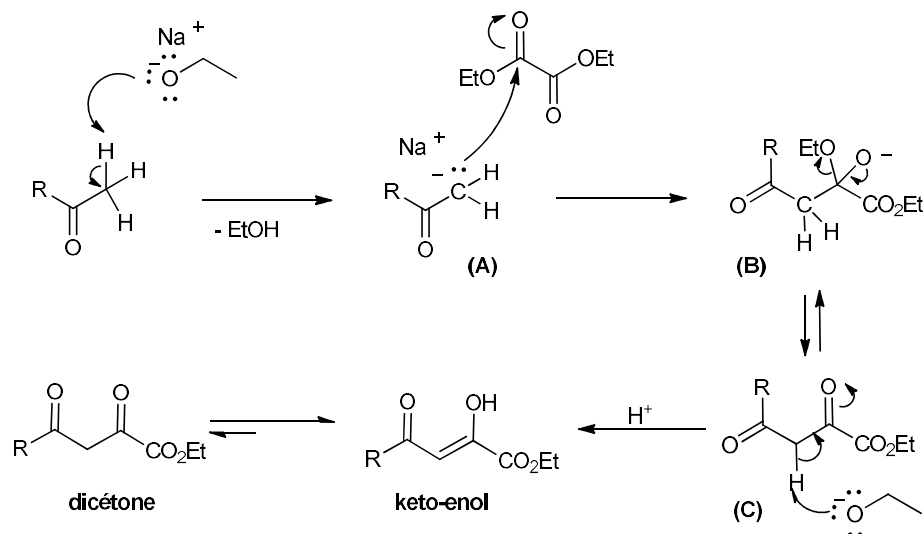
L'obtention de  $\beta$ -céto-énol-4-fluorophényl **100** a été réalisée par la méthodologie trouvée dans les travaux de Banoglu *et al.* (2016) et Brough *et al.* (2008) avec modification du réactif de départ et de la méthode de purification. Il y avait la condensation du diéthylxalate avec le 1-(4-fluorophényl)éthanone **99** en utilisant l'éthoxyde de sodium comme base. La purification a été réalisée avec lavage à l'eau, obtenant un rendement de 96% (Schéma 47).

Schéma 46. Obtention de  $\beta$ -céto-énol à partir de 4-fluoro-acétophénone.



La synthèse a commencé par la formation d'un énolate de cétone nucléophile en ajoutant la 1-(4-fluorophényl)éthanone **99** goutte à goutte à une solution d'éthoxyde de sodium à 21% à température ambiante. Le système est chauffé et l'énolate (A) formé effectue une attaque nucléophile dans le diéthylxalate qui est ajouté, produisant un intermédiaire tétraédrique (B).

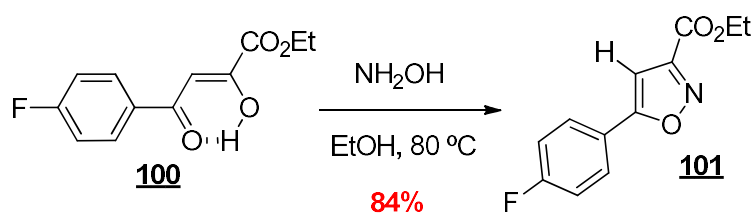
L'expulsion de l'ion éthylate de l'intermédiaire tétraédrique instable de l'adduit de Claisen initial a produit une  $\beta$ -dicétone (C). La base expulsée (éthylate de sodium) élimine ensuite un proton d'acide alpha de la  $\beta$ -dicétone. Après ajustement du pH = 5, le système céto-énol se forme et s'équilibre avec une dicétone, le premier étant de plus grande proportion. Le mécanisme de formation se trouve dans le schéma 48 ci-dessous. (RADI *et al.*, 2015)

Schéma 47. Mécanisme d'obtention du  $\beta$ -céto-énolAdapté Radi *et al.* (2015). Adapté

## 4.3.2.4. Synthèse de l'isoxazole par cyclisation

Le  $\beta$ -céto-énol formé est dissous dans l'éthanol et sur cette solution est ajouté  $NH_2OH$ .  $HCl$  favorisera la déshydratation du composé et la formation du noyau de l'isoxazole, la méthodologie procède selon le modèle présenté par Banoglu *et al.* (2016) et Brough *et al.* (2008) (Schéma 49).

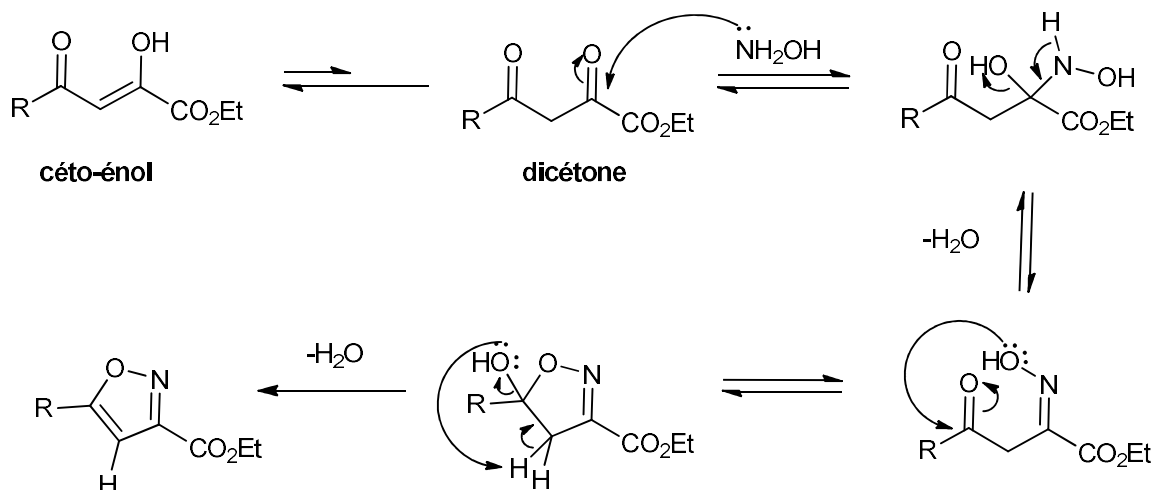
Schéma 48. Obtention de l'isoxazole à partir de la 4-fluoro-acétophénone, par cyclisation



Dans le mécanisme d'action proposé par Kumar et Kaur (2015), l'attaque nucléophile de l'hydroxylamine au carbonyle le plus électrophile lié au groupe ester se produit dans la première étape. La première déshydratation se produit avec réarrangement intramoléculaire pour la formation de la liaison pi entre l'azote hydroxylamine et le tétracarbone remplacé. Une autre attaque nucléophile se produit

par hydroxyle au carbonyle lié au R restant (4-fluoro-benzène), en raison de son électrophile plus grande par rapport à l'ester. La dernière étape se produit avec la deuxième déshydratation et la formation de la double liaison, qui génère le noyau de l'isoxazole. (schéma 50)

Schéma 49. Condensation de la diketone avec l'hydroxylamine pour la formation du noyau d'isoxazole.



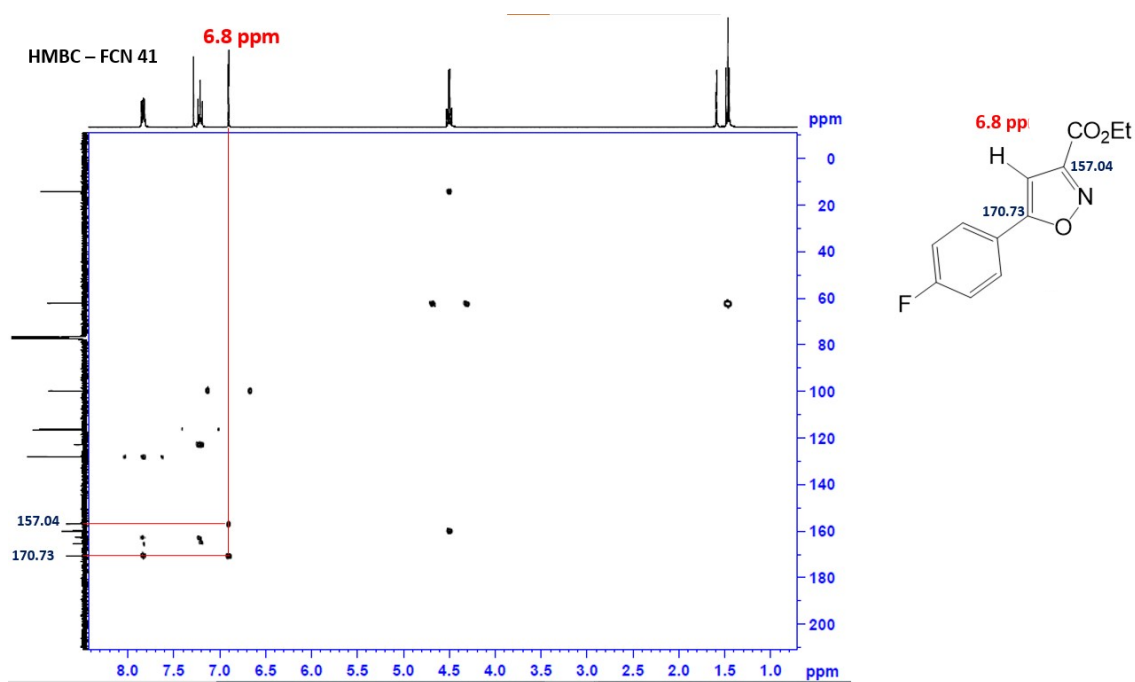
Source :Kumar et Kaur, 2015. Adapté

La purification se faisait par lavage dans un fritté avec seulement de l'eau avec un rendement élevé de 84%. Les lavages avec d'autres solvants tels que le méthanol et / ou l'éther diéthylique ont entraîné la dissolution du produit et une baisse du rendement, et le produit a ensuite été porté au dessiccateur pendant 24 heures pour éliminer l'eau restante.

Le 5-(4-fluorophényl)-isoxazole-3-carboxylate **101** a été vérifié par UPLC/MS avec la masse correspondante. L'analyse RMN  $^1\text{H}$  a confirmé la formation d'isoxazole par la présence du singulet à 6,8 ppm appartenant au H du cycle isoxazole, du triplet et du quadruplet à 1,45 ppm (t,  $J = 7,1$  Hz, 3H) et 4,49 (q,  $J = 7,2$  Hz, 2H) ppm, respectivement, appartenant au H de l'ester. Les signaux correspondant à H aromatique sont observés à 7,20 ppm (t,  $J = 8,6$  Hz, 2H) et les plus déblindés, à 7,82 ppm (dd,  $J = 8,9$  et 5,2 Hz, 2H).

La détermination du 4-fluorobenzène dans l'isoxazole en C-5 a pu être confirmée par l'analyse du spectre RMN bidimensionnel du HMBC, où H à 6,8 ppm effectue un couplage  $J^2$  avec C à 157,04 ppm attaché à l'ester, qui ne présente que ce couplage du H, et le signal à 170,73 ppm lié à la pyridine, qui présente également un couplage  $J^2$  comme méta-H par rapport au substituant F, comme on peut le voir à la Figure 37.

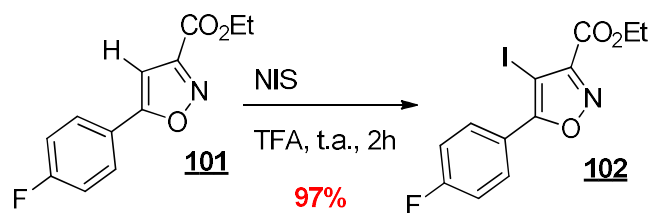
Figure 37. Spectre RMN HMBC ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) du composé isoxazole **101**



#### 4.3.2.5. Halogénéation

Au début, l'halogénéation a été réalisée par la méthodologie de Banoglu et al. (2016), en utilisant du *N*-bromosuccinimide (NBS) en présence de nitrate d'ammonium (CAN) en quantité catalytique, mais la réaction a duré 20 h. La méthodologie watterson et al a ensuite été appliquée. (2016), où le *N*-iodosuccinimide (NIS) a été utilisé en présence d'acide trifluoroacétique (TFA) à température ambiante, avec une durée de réaction de seulement 2h, avec un rendement de 68% (Schéma 51).

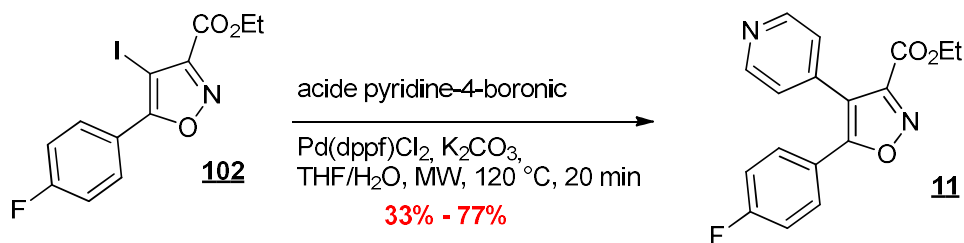
Schéma 50. Halogénéation en C-4.



Après la recrystallisation du NIS, le rendement est passé à 97% après purification en colonne chromatographique. (WATTERSON *et al.*, 2016).

#### 4.3.2.6. Couplage de Suzuki-Miyaura

Cette étape réactionnelle a été réalisée par couplage catalytique par Suzuki *et al.* (1979) et avec les conditions trouvées dans les travaux de Brough *et al.* (2008). La formation du diaryl-isoxazole **11** a été réalisée par addition d'acide pyridine-4-boronique et catalysée par Pd(dppf)Cl<sub>2</sub> à l'aide d'une synthèse micro-ondes à 150 watts et 120 °C en 20 minutes (Schéma 52)(BROUGH *et al.* ; 2008).

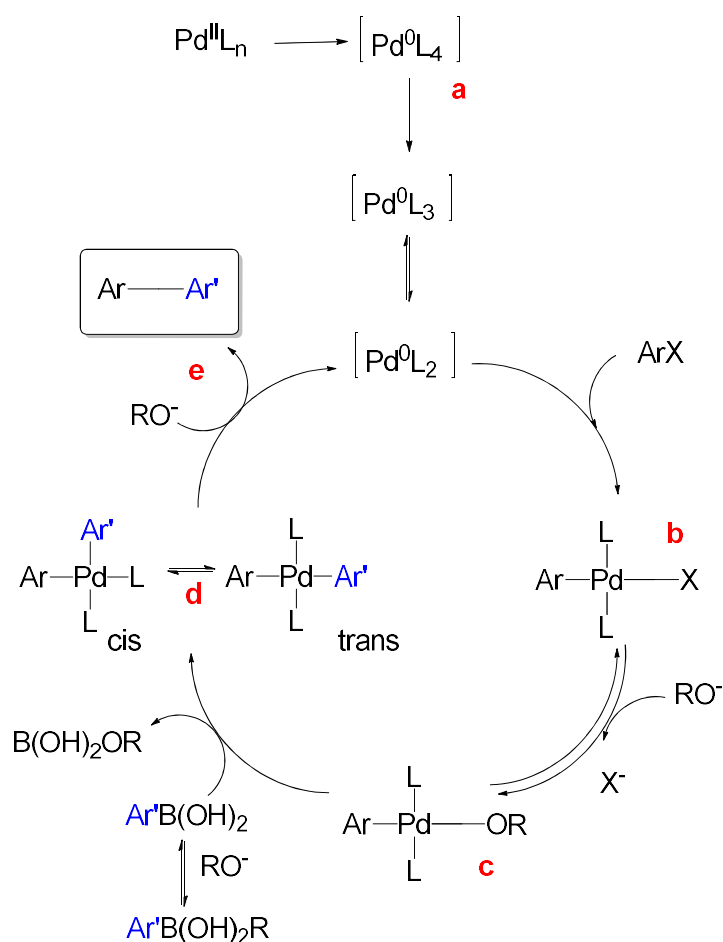
Schéma 51. Couplage Suzuki pour la formation du diaryl-isoxazole **5**

Dans cette synthèse, le composé halogéné à **102** a été visualisé dans l'UPLC/MS même après la fin de la réaction, diminuant ainsi le rendement en diaryl-isoxazole **11**. Pour contourner ce problème, il y a eu plusieurs changements dans la température, la puissance et le temps de la réaction dans le micro-ondes, ainsi que l'utilisation de Pd(0), qui n'ont pas entraîné de changements dans les rendements ou dans la consommation totale du réactif de départ, avec un temps de plus de 40 minutes capable de dégrader la réaction. Dans des conditions plus douces de température et de puissance, il n'y a pas eu d'augmentation des rendements, avec le

rendement le plus élevé de 77% dans les conditions 110w, 12 min et 120 °C, sans le même succès avec répétition.

Le cycle catalytique de Suzuki-Miyaura est similaire à celui du couplage Sonogashira, avec les stades d'addition oxydative, de transmission et d'élimination réductrice. Après la formation de l'espèce catalytique palladium (0) (**a**), générée in situ à partir de palladium (II) ou directement à partir de dérivés de (0), l'addition oxydative d'halogénure d'aryle (notre isoxazole-halogéné **102**) conduit au complexe palladium [ArPdXLn] (**b**). L'étape de transmission se produit en convertissant l'halogénure de palladium [ArPdXLn] en présence de base RO<sup>-</sup> (K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) en un complexe nucléophile d'alcool palladium [ArPdORLn] (**c**) qui réagit ensuite avec un composé organoboré neutre Ar'OB(OH)<sub>2</sub> pour fournir le complexe diary [Ar'PdAOLn] (**d**) dans un équilibre cis– trans. L'élimination réductrice de la forme cis donne le dérivé diaryle Ar-Ar'(**e**) et Pd(0) (schéma 53). (HERVÉ *et al.* , 2014)

Schéma 52. Cycle catalytique de la réaction de couplage Suzuki-Miyaura

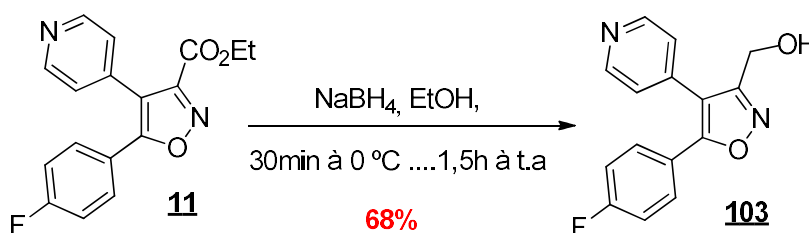


Source : Hervé *et al.* (2014). Adapté

#### 4.3.2.7.Synthèse de l'alcool en C3

La réduction se produit en présence de l'agent réducteur de borohydrure de sodium ( $\text{NaBH}_4$ ) dans l'éthanol. Le réactif est inséré dans la proportion molaire de 3 équivalents en raison d'une transestérification rapportée par Almeida, V. *et al.* (2008), et la méthodologie est basée sur cette étude. L'agent réducteur a été ajouté à 0 °C et en petites parties en raison de sa réactivité. Après 30 minutes, la réaction s'est produite pendant encore 1,5 h à température ambiante, entraînant une consommation totale d'isoxazole-ester et la formation de son dérivé alcool primaire. Après évaporation du solvant, l'excès de borohydrure de sodium a été éliminé par extraction en solution saturée de NaCl et d'acétate d'éthyle. (ALMEIDA, V. *et al.* ; 2008) (schéma 54)

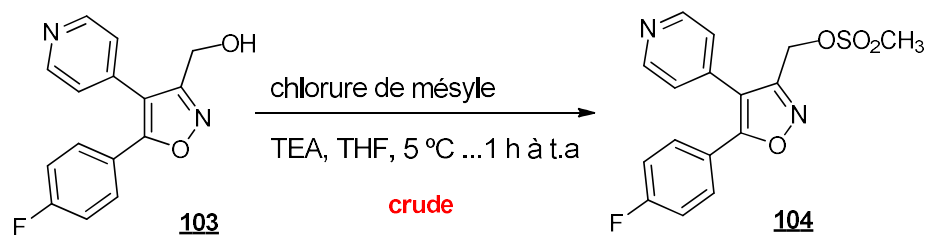
Schéma 53. Synthèse de l'alcool isoxazolique **103**.



#### 4.3.2.8.Synthèse du mésylate **104**

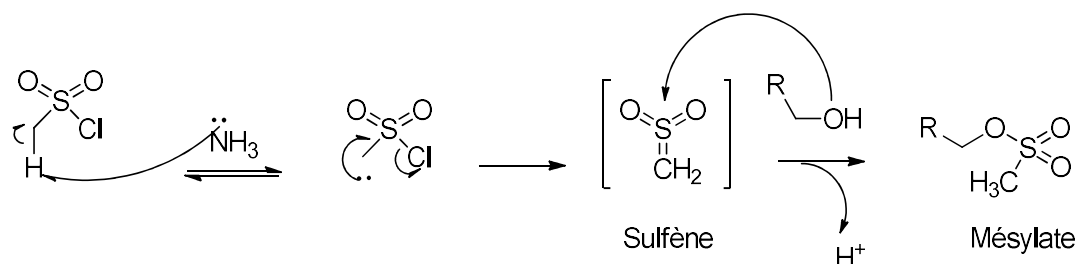
Cette étape consistait en la formation d'un excellent groupe sortant, le mésylate, qui a été obtenu par attaque nucléophile de l'hydroxyle de l'alcool sur chlorure de méthane sulfonyle (Schéma 55)(VASTRA; SAINT-JALMES, 2006). La réaction s'est produite en 1h et en raison du faible rendement après purification par colonne chromatographique, le produit a été utilisé brut, et la réaction a été effectuée *one pot*.

Schéma 54. Synthèse du mésylate d'isoxazole **104**.



Dans la première étape du mécanisme d'action se produit la formation du carbonium primaire par la capture de l'un des hydrogènes du  $\text{CH}_3$  du chlorure de mésyle par la base de triéthylamine. Ensuite, le chlorure est éliminé par la formation de l'intermédiaire sulfène. Sur cet intermédiaire se produit l'attaque nucléophile de l'alcool et après réarrangement, il y a la formation de mésylate. (schéma 56)

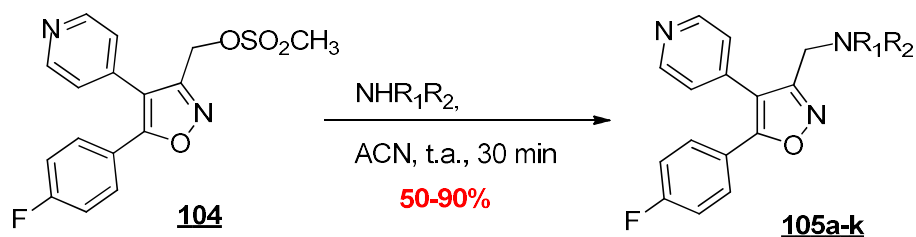
Schéma 55. Mécanisme de formation du mésylate d'isoxazole **104**.



#### 4.3.2.9. Synthèse de l'isoxazole final **105**

La formation du produit final, le diaryl-isoxazole avec l'amine tertiaire en C3 **105** a été réalisée par réaction  $\text{S}_{\text{N}}2$  (Schéma 57) en utilisant différentes amines secondaires pour nucléophiles et l'acétonitrile comme solvant aprotique, formant à ce jour 10 composés distincts, comme le montre le Tableau 7, avec leurs rendements respectifs.

Schéma 56. Synthèse du diaryl-isoxazole avec l'amine tertiaire **105a-k**.



La purification a été réalisée par chromatographie sur colonne, dans un mélange d'acétonitrile et de méthanol, et il est nécessaire d'utiliser 100% de méthanol à la fin de la purification, en raison de la polarité élevée du produit formé (Schéma 58).

Schéma 57. Mécanisme  $S_N2$  pour la formation du produit final **105a-k**.

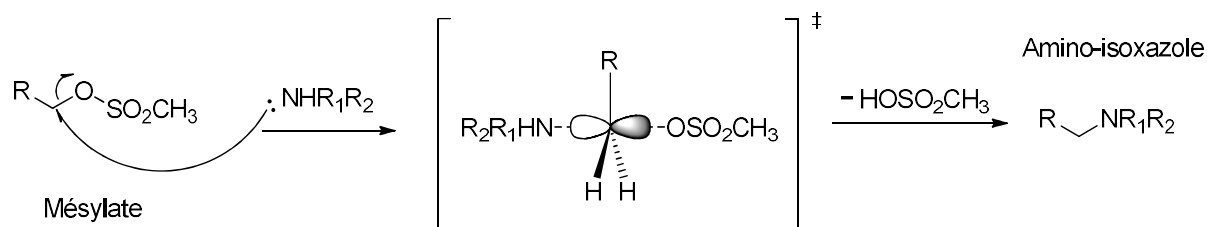
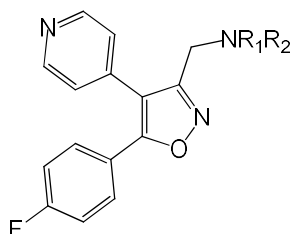
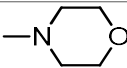
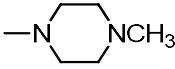
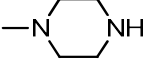
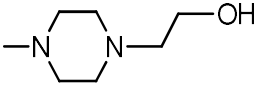
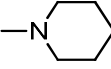
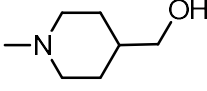


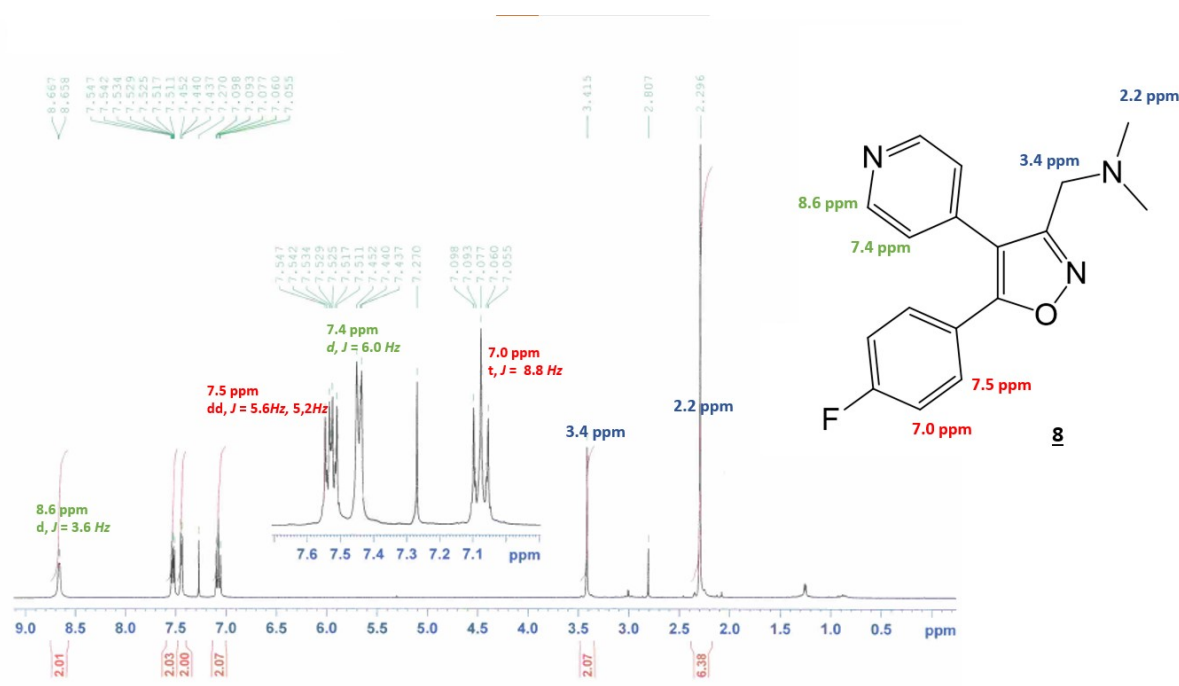
Tableau 7. Rendements des diaryl-isoxazoles synthétisés



| Composé     | NR <sub>1</sub> R <sub>2</sub>                                                      | Rendement (%) |
|-------------|-------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| <b>105a</b> | -N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>                                                   | 82            |
| <b>105b</b> | -NH <sub>2</sub>                                                                    | 48            |
| <b>105c</b> | -NHCH <sub>3</sub>                                                                  | 59            |
| <b>105d</b> | -NHCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>                                                  | 81            |
| <b>105e</b> | -NHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>                                  | 70            |
| <b>105f</b> |  | 85            |
| <b>105g</b> |  | 54            |
| <b>105h</b> |  | 82            |
| <b>105i</b> |  | 90            |
| <b>105j</b> |  | 40            |
| <b>105k</b> |  | 64            |

Le composé **105a** a été analysé de manière représentative dans l'analyse de la RMN  $^1\text{H}$ , confirmant la formation de diaryl-isoxazole par la disparition du singulet à 6,8 ppm appartenant au H isoxazole, et deux signaux ont été vérifiés à 8,6 ppm (dl,  $J = 3,6$  Hz, 2H) et 7,4 ppm (d,  $J = 6,0$  Hz, 2H), appartenant à la pyridine de la réaction de Suzuki. Il y a aussi la présence de singlets dans 3,4 ppm (s, 2H) et 2,2 ppm (s, 3H) appartenant respectivement à  $\text{CH}_2$  et  $\text{CH}_3$  de l'amine tertiaire formée. Les signaux correspondant au fluorobenzène aromatique H4 sont observés à 7,5 ppm (dd,  $J = 5,6$  Hz, 5,2 Hz, 2H) et à 7,0 ppm (t,  $J = 8,0$  Hz, 2H) comme on peut le voir sur la Figure 38.

Figure 38. Spectre RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) du composé isoxazole **105a**



Les 11 composés synthétisés ont été envoyés pour analyse biologique dans des tests leishmanicides et des tests anticancéreux sous la direction du professeur Teresinha Gonçalves.

## 5.CHAPITRE 3 - Évaluation du potentiel biologique des molécules

### 5.1.Objectifs

#### 5.1.1.Objectif général

Évaluer l'activité antiparasitaire, *anti-Trypanosoma cruzi* et *anti-Leishmania* des nouveaux dérivés synthétisés et la cytotoxicité de ceux-ci sur des cellules cancéreuses humaines et cellules non cancéreuses.

#### 5.1.2.Objectifs spécifiques.

- a - Évaluer l'activité anti-*Leishmania* des composés **105a-k** et **4a-k** par rapport aux espèces *L. amazonensis* et *L. infantum*, dans toutes les formes évolutives de parasites;
- b - Évaluer l'activité trypanocide des composés **105a-k** et **4a-k** par rapport à toutes les formes évolutives de *T. cruzi*;
- c - Évaluer la cytotoxicité des composés **105a-k** et **4a-k** contre les cellules cancéreuses MCF-7, NCI-H292, Jukart et HT-29 et les cellules normales VERO.

## 5.2.Méthodologie

### 5.2.1.Évaluation de l'activité anti-*Leishmania*

#### 5.2.1.1. Essais avec des promastigotes de *L. amazonensis* et *L. infantum*

Formes promastigotes de *L. amazonensis* (souche WHO/00 LTB 0016) et *L. infantum* (souche MHOM/MA/67/ITMAP-263) a été maintenu à 26 °C dans le milieu de Schneider (Sigma) complété par 10 % de sérum fœtal bovin (milieu complet). Les parasites dans la phase exponentielle de croissance ont été utilisés dans toutes les expériences. Pour le dosage de l'activité leishmanicide, les parasites ont été comptés et dilués dans un milieu de Schneider complète dans la concentration de  $1 \times 10^6$  cellules/mL. Les parasites ont été incubés à 26 °C en présence de différentes concentrations des composés (1,5 à 200 µg/mL) pendant 72 h. Les parasites incubés uniquement avec le milieu de culture et avec le véhicule ont été utilisés comme contrôle négatif. Après incubation, les puits ont été lavés et une solution de CPRG a été ajoutée (500 µM, 0,5 % de Nonidet P-40 dans du PBS), suivie d'une réincubation pendant 10 minutes à 22 °C. L'absorbance a été lue à 570 nm dans le spectrophotomètre Thermo Scientifique Multiskan FC. L'activité leishmanicide des composés a été vérifiée par la diminution du nombre de promastigotes dans les cultures traitées par rapport à la culture contrôle sans traitement. La miltéfosine a été utilisée comme contrôle positif. Les valeurs  $CI_{50}$  ont été calculées par analyse de régression à l'aide du logiciel GraphPad Prism. Chaque essai a été réalisé en double exemplaire.

#### 5.2.1.2.Essais avec des amastigotes de *L. amazonensis* et *L. infantum*

Pour cette évaluation, des macrophages RAW 264,7 ( $3 \times 10^5$  cellules/mL) ont été incubés pour une adhérence pendant 1 h, à 37 °C et une atmosphère avec 5 % de CO<sub>2</sub>. Après cette première incubation, des promastigotes de *L. amazonensis* et *L. infantum* ont été ajoutées en proportion de 15 parasites/macrophages, pendant une période de 6 h, à 37 °C et 5 % de CO<sub>2</sub>. Les parasites non internalisés ont été

éliminés par lavage et la culture a été incubée à nouveau en présence de différentes concentrations des composés (3,125 à 100  $\mu\text{g/mL}$ ) pendant 24 h, à 37 °C et 5 % de  $\text{CO}_2$ . Les amastigotes incubés uniquement avec un milieu de culture et la miltéfosine ont été utilisés comme contrôle négatif et positif, respectivement. Après incubation, les puits ont été lavés et une solution de CPRG a été ajoutée (500  $\mu\text{M}$ , 0,5 % de Nonidet P-40 dans du PBS), suivie d'une réincubation pendant 18 h à 22 °C. L'absorbance a été lue à 570 nm dans le spectrophotomètre thermo scientifique multiskan FC. L'activité leishmanicide des composés a été vérifiée par la diminution du nombre d'amastigotes intracellulaires dans les cultures traitées par rapport à la culture contrôle sans traitement. Les valeurs  $\text{CI}_{50}$  ont été calculées par analyse de régression à l'aide du logiciel *GraphPad Prism*. Chaque essai a été réalisé en double exemplaire.

### 5.2.2.Cytotoxicité

La cytotoxicité des cellules de mammifères a été évaluée par des tests MTT. Ce test est basé sur la réduction des sels de tétrazolium jaune par les réductases mitochondriales des cellules métaboliquement actives. Des cristaux de formazan se forment à l'intérieur de ces cellules, qu'ils doivent être lissés pour la solubilisation et l'analyse ultérieure par spectrophotométrie. Étant donné que la quantité de formazan produite est directement proportionnelle au nombre de cellules viables, plus la viabilité cellulaire est élevée, plus la proportion de réduction du MTT est élevée et plus l'absorbance est grande.

Les fibroblastes de la lignée L929 ont été plaqués dans des plaques de 96 puits, à fond droit et incubés pendant 24 h, à 37°C et sous atmosphère avec 5% de  $\text{CO}_2$ , pour l'adhérence. Après ce temps, les composés ont été ajoutés à des concentrations de 6,25 à 200  $\mu\text{g/mL}$  et incubés à nouveau pendant une période de 48h. Les puits n'ont été utilisés qu'avec un milieu de culture comme contrôle négatif. Après incubation, 25  $\mu\text{L}$  de MTT (3-(4,5-diméthylalazole-2-il)-2,5-bromure diphenylthétrazolium ont été ajoutés à 5 mg/mL dans le PBS, suivis d'une nouvelle incubation pendant 2h, à 37°C et sous lumière. Une partie du milieu de culture ainsi que le reste du MTT ont été aspirés et 100  $\mu\text{L}$  de DMSO ont été ajoutés par puits pour la solubilisation des cristaux de formazan résultant de la réduction du MTT. L'absorbance a été lue à 570 nm dans le spectrophotomètre thermo scientifique

multiskan FC. La concentration cytotoxique pour 50% de la culture ( $CC_{50}$ ) a été déterminée par une analyse de régression par un logiciel GraphPad Prism. Chaque essai a été réalisé en double exemplaire.

### 5.2.3. Essais *in vitro* et *in vivo* pour l'identification de composés avec activité anti-*Trypanosoma cruzi*

#### 5.2.3.1. Dosage anti-*Trypanosoma cruzi* utilisant la souche Tulahuen- $\beta$ -galactosidase

Le dosage de la  $\beta$ -galactosidase développé par Buckner et al (1996), avec des modifications (Rodeha et al., 2010), utilise la souche Tulahuen de *T. cruzi* qui exprime le gène *Escherichia coli* bêta-galactosidase et a été utilisé pour déterminer l'activité trypanocidaire des composés. Brièvement, pour la réalisation des essais, les fibroblastes de souris L929 ont été semés dans des plaques de 96 puits et incubés pendant 24 heures à 37 °C pour l'adéation et l'infection ultérieure avec 10 parasites / cellules. Après 2 h, le milieu contenant les parasites extracellulaires a été remplacé par un nouveau milieu et la plaque a de nouveau été incubée à 37 °C pendant 48 heures. Après cette période, le milieu de culture a été remplacé par un nouveau milieu, en plus des composés à des concentrations décroissantes, à partir de 100  $\mu$ g/mL, jusqu'à ce que  $CI_{50}$  soit atteint. Après 96 heures d'incubation, le substrat CPRG a été ajouté, la plaque a été incubée à 37 °C et la lecture a été effectuée après 16-20 h dans un spectrophotomètre à l'aide d'un filtre de 570 nm. Le benznidazole dans sa  $CI_{50}$  (1 g/mL = 3,81 M $\mu$ ) a été utilisé comme contrôle positif. Les résultats ont été exprimés en pourcentage d'inhibition de la croissance parasitaire. Les  $CI_{50}$  sur les formes amastigote et trypanomastigote de *T. cruzi* ont été déterminées par interpolation linéaire.

#### 5.2.3.2. Dosage de cytotoxicité sur des cellules vertébrées

Les composés ayant une activité trypanocide identifiés dans le test avec la souche Tulahuen transfectée avec la  $\beta$ -galactosidase ont été testés contre des cellules L929 pour la détermination de la cytotoxicité (Rodeha et al., 2010). La viabilité des cellules soumises aux traitements a été déterminée à l'aide de l'indicateur de viabilité des cellules alamarBlue TM. Les échantillons ont été testés

à des concentrations croissantes de le  $CI_{50}$  trouvé sur le parasite, en utilisant le même nombre de cellules, le même temps de développement cellulaire et le même temps d'exposition aux composés utilisés dans le test de la bêta-galactosidase. Après l'ajout d'AlamarBlue™, la plaque a été incubée pendant 4 à 6 h et la lecture a été effectuée à 570 et 600 nm. Les résultats ont été exprimés en pourcentage de différence dans la réduction entre les cellules traitées et non traitées. Les  $CC_{50}$  sur les cellules L929 ont été déterminés par interpolation linéaire.

#### 5.2.3.3 Détermination de l'indice de sélectivité

L'indice de sélectivité (IS) est utilisé pour définir les composés qui doivent être testés dans des essais *in vivo*. Il est déterminé au moyen du rapport  $CC_{50}$  sur L929 /  $IC_{50}$  sur *T. cruzi*. Seuls les composés dont l'IS est  $\geq 50$  sont recommandés pour les essais *in vivo* (Roha et al., 2010).

#### 5.2.3.4 Toxicité aiguë chez la souris

Afin de déterminer la dose maximale tolérée (DMT) des composés sélectionnés pour les essais *in vivo*, deux souris suisses ont été utilisées pour chaque composé, un mâle et une femelle, non infectés, à l'âge de six semaines. Le jour 1, chaque souris a été administrée, par voie orale ou intrapéritonéale, à des doses croissantes et toutes les 2 heures, les composés dissous dans du DMSO et dilués dans un tampon phosphate-solution saline (PBS) avec 20% de PEG 400 et 0,05% Tween 80. La dose initiale était de 5 mg/kg. Après 2 h, une dose supplémentaire de 15 mg/kg a été administrée (entraînant une dose accumulée (MA) de 20 mg/kg). Après 2 h, une nouvelle dose de 30 mg/kg a été administrée (DA = 50 mg/kg). Après 2 heures supplémentaires, 50 mg/kg (DA = 100 mg/kg), et enfin après 2 h supplémentaires, 100 mg/kg (DA = 200 mg/kg) ont été administrés. Le jour 2, les souris ont été inspectées pour détecter les signes cliniques toxiques et sous-toxiques conformément aux règles de l'Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE) (Walum, 1998). Plus tard, ces composés seront testés chez des souris infectées par la souche Y de *T. cruzi*, en utilisant la DMT.

Cette méthodologie devait être approuvée par un comité d'éthique avec la numérotation suivante : **CEUA IAM/FIOCRUZ numéro 162/2020**.

#### 5.2.4. Activité cytotoxique sur les cellules tumorales

Les lignées cellulaires humaines utilisées étaient : NCI-H292 (carcinome épidermoïde du poumon), MCF-7 (cancer du sein humaine), Jurkat (leucémie aiguë à cellules T humaine), HT-29 (cancer du côlon humaine) maintenus dans le laboratoire de culture cellulaire du Département des antibiotiques, UFPE. Le criblage anticancéreux *in vitro* des composés synthétisés a été effectué à l'aide de la méthode MTT, le bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium (ALLEY, M.C., 1983; MOSMANN, 1983). Les lignes cellules ont été plaquées à la concentration appropriée pour chaque type de cellule, étant maintenues à 370 °C dans une atmosphère humide enrichie de 5% de CO<sub>2</sub>. Les composés ont été solubilisés dans le DMSO (1 %), puis dilués en série dans le milieu de culture et plaqués à la concentration unique finale de 25 µg/mL et incubés pendant 72 h. Après cette période, 25 µL de MTT (5 mg/mL) ont été ajoutés et après 3 h d'incubation, le milieu de culture a été aspiré et 100 µL de DMSO ont été ajoutés à chaque puits. L'absorbance a été mesurée dans un lecteur de microplaques à la longueur d'onde de 560 nm et le pourcentage d'inhibition calculé. Après le dépistage initial, les dérivés qui ont montré une inhibition de la croissance cellulaire supérieure à 75% ont été testés à plusieurs concentrations pour déterminer la concentration qui inhibe 50% de la prolifération cellulaire (CI<sub>50</sub>). Le pourcentage d'inhibition, le CI<sub>50</sub> et les intervalles de confiance (IC à 95 %) ont été calculés dans graphpadprism 5.0. Les expériences ont été réalisées en trois exemplaires dans trois essais indépendants.

### 5.3.Résultats et discussion

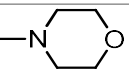
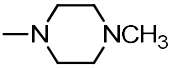
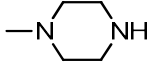
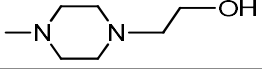
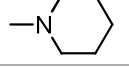
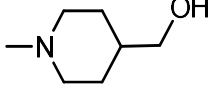
#### 5.3.1.Activité leishmanicide et cytotoxicité

La détermination de l'activité leishmanicide contre les espèces *L. amazonensis* et *L. infantum* ainsi que la détermination de la cytotoxicité contre les fibroblastes de la souche L929, en double.

##### 5.3.1.1.Série diaryl-isoxazole (Série **105a-105k**)

Les résultats obtenus dans la détermination de la concentration inhibitrice 50 % (CI<sub>50</sub>) contre les espèces *L. amazonensis* et *L. infantum* (formes promastigote et amastigote) et de la concentration cytotoxique de 50 % (CC<sub>50</sub>) contre les fibroblastes des souches L929 de la série de composés diaryl-isoxazoles **105a-105k** sont présentés dans le Tableau 8.

Tableau 8. Activité *in vitro* leishmanicide (CI<sub>50</sub>) de la série diaryl-isoxazole **105a-105k** et sa cytotoxicité (CI<sub>50</sub>) et son indice de sélectivité (IS).

| Activité leishmanicide (μM) |                                                                                     |                                 |                                       |                                     |                                       |                                     |
|-----------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------|-------------------------------------|
| Composé                     | R <sup>1</sup>                                                                      | L929                            | <i>L. amazonensis</i>                 |                                     | <i>L. Infantum</i>                    |                                     |
|                             |                                                                                     | fibroblaste<br>CC <sub>50</sub> | promastigote<br>CI <sub>50</sub> (IS) | amastigote<br>CI <sub>50</sub> (IS) | promastigote<br>CI <sub>50</sub> (IS) | amastigote<br>CI <sub>50</sub> (IS) |
| <b>105a</b>                 | -N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>                                                   | 201,5                           | 212<br>(0,95)                         | 193,7<br>(1,04)                     | 222,3<br>(0,90)                       | 192<br>(1,10)                       |
| <b>105b</b>                 | -NH <sub>2</sub>                                                                    | 263,3                           | 23,8<br>(11,0)                        | 155,2<br>(1,69)                     | 53,5<br>(4,90)                        | 125,2<br>(0,19)                     |
| <b>105c</b>                 | -NHCH <sub>3</sub>                                                                  | 299,7                           | 191<br>(1,56)                         | 68,1<br>(4,40)                      | 221,7<br>(1,35)                       | 102<br>(1,87)                       |
| <b>105d</b>                 | -NHCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>                                                  | 86,8                            | 168,8<br>(0,51)                       | 72,6<br>(1,19)                      | 199,1<br>(0,43)                       | 103,9<br>(1,62)                     |
| <b>105e</b>                 | -NHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>                                  | 129,1                           | 85,4<br>(1,51)                        | 30,8<br>(4,19)                      | 76,1<br>(1,69)                        | 50,4<br>(1,69)                      |
| <b>105f</b>                 |  | 129,4                           | 124,6<br>(1,03)                       | 168<br>(0,77)                       | 139,7<br>(0,92)                       | 166,2<br>(0,74)                     |
| <b>105g</b>                 |  | 231,3                           | 53,6<br>(4,31)                        | 34,6<br>(6,68)                      | 64,4<br>(3,59)                        | 41,1<br>(1,30)                      |
| <b>105h</b>                 |  | 163,1                           | 71,5<br>(2,28)                        | 21,9<br>(7,44)                      | 113,5<br>(1,43)                       | 24,2<br>(2,95)                      |
| <b>105i</b>                 |  | 124,5                           | 39,5<br>(3,15)                        | 72,4<br>(1,71)                      | 50,5<br>(2,46)                        | 77,1<br>(0,51)                      |
| <b>105j</b>                 |  | 104,3                           | 37,9<br>(2,75)                        | 54,2<br>(1,92)                      | 42,1<br>(2,47)                        | 88,9<br>(0,42)                      |
| <b>105k</b>                 |  | 96,6                            | 144,2<br>(0,66)                       | 121,1<br>(0,79)                     | 178<br>(0,54)                         | 139,9<br>(1,03)                     |
| Miltéfosine                 | -                                                                                   | 60,8                            | 10,1<br>(6,02)                        | 6,9<br>(8,81)                       | 17,2<br>(3,53)                        | 1,7<br>(5,94)                       |

Tous les composés diaryl-isoxazoles étaient inactifs contre les espèces *L. amazonensis* et *L. infantum*, à la fois sous forme de promastigote et d'amastigote. Les concentrations les plus faibles enregistrées ont été trouvées avec les molécules **105b**, avec CI<sub>50</sub> de 23,8 μM contre la forme promastigote de *L. amazonenses*, et

**105h** contre la forme amastigote, avec  $CI_{50}$  de 21,9  $\mu M$  pour *L. amazonensis* et 24,2  $\mu M$  pour *L. infantum*, toutes les autres valeurs étant supérieures à celles-ci.

La concentration cytotoxique 50% ( $CC_{50}$ ) contre les fibroblastes de la lignée L929 a mis en évidence des composés de la série à faible cytotoxicité, avec toutes les valeurs supérieures à la miltéfosine, un médicament de référence dans le test antileishmanien.

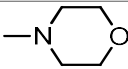
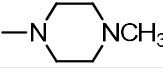
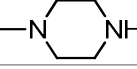
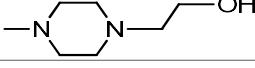
### 5.3.2. Activité anti-*T. cruzi* et cytotoxicité

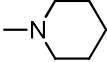
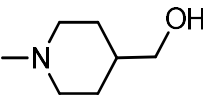
La détermination de l'activité anti-*T. cruzi* a été effectuée à l'aide de la souche Tulahuen de *T. cruzi* et la détermination de la cytotoxicité contre les fibroblastes à l'aide de la souche L929 (en utilisant la méthode alamarBlue™). Les essais ont été effectués en utilisant une concentration quadruple de chaque composé.

#### 5.3.2.1. Série Diaryl-isoxazole (Série **105a-105k**)

Les résultats obtenus dans la détermination de la concentration inhibitrice de 50% ( $CI_{50}$ ) contre les formes trypomastigote et amastigote, ainsi que de la concentration cytotoxique de 50% ( $CC_{50}$ ) par rapport aux fibroblastes L929 de la série de composés diaryl-isoxazoles **105a-105k** sont présentés dans le Tableau 9.

Tableau 9. Activité anti-*T. cruzi* ( $CI_{50}$ ) *in vitro* de la série diaryl-isoxazole (**105a-105k**) et sa cytotoxicité ( $CC_{50}$ ) et son indice de sélectivité (IS)

| Comp.       | R <sup>1</sup>                                                                      | L929                                 | <i>Trypanosoma cruzi</i>                           | IS     |
|-------------|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|----------------------------------------------------|--------|
|             |                                                                                     | fibroblaste<br>$CC_{50}$ ( $\mu M$ ) | trypomastigote/amastigote<br>$CI_{50}$ ( $\mu M$ ) |        |
| <b>105a</b> | -N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>                                                   | >336,33                              | 67,94±17,2                                         | > 4,9  |
| <b>105b</b> | NH <sub>2</sub>                                                                     | >371,37                              | 28,22±26,4                                         | > 13,1 |
| <b>105c</b> | -NHCH <sub>3</sub>                                                                  | >352,98                              | 121,07±22,6                                        | > 2,9  |
| <b>105d</b> | -NHCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>                                                  | >336,33                              | 297,99±0,0                                         | > 1,1  |
| <b>105e</b> | -NHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>                                  | 321,18                               | 59,74±27,6                                         | 5,4    |
| <b>105f</b> |  | >294,67                              | 104,90±48,0                                        | > 2,8  |
| <b>105g</b> |  | >283,76                              | 171,68±8,8                                         | > 1,6  |
| <b>105h</b> |  | 295,53                               | 95,75±8,0                                          | 3,1    |
| <b>105i</b> |  | >261,49                              | 195,33±1,0                                         | > 1,3  |

|                     |                                                                                   |         |             |       |
|---------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|---------|-------------|-------|
| <b>105j</b>         |  | 296,39  | 46,83±10,4  | 6,3   |
| <b>105k</b>         |  | >272,17 | 109,68±16,6 | > 2,5 |
| <b>Benznidazole</b> | -                                                                                 | 2401,54 | 3,81        | 630   |

Parmi les composés testés, seul le **105b** a montré une activité anti-*T. cruzi*, avec une  $Cl_{50}$  de 28,2  $\mu$ M. Tous les autres de la série **105a-105k** étaient peu puissants pour cette activité.

Pour le test de cytotoxicité sur fibroblastes, l'ensemble des composés est resté non toxique. Même sans activité trypanocide significative, **105b** présentait la valeur de  $Cl_{50}$  inférieur (28,2  $\mu$ M), avec  $R^1 = NH_2$ . En analysant le schéma de substitution de  $R^1$ , il n'a pas été possible de déterminer une relation de structure d'activité (RSA) puisque les composés sont restés inactifs.

#### 5.3.2.2.Série isoxazoline aza-bicyclique (série **4a-4k**)

Les résultats obtenus dans la détermination de la concentration inhibitrice de 50% ( $Cl_{50}$ ) contre *T. cruzi* en utilisant les formes évolutives tryomastigote et amastigote et ceux obtenus dans la détermination de la concentration cytotoxique 50% ( $CC_{50}$ ) contre les fibroblastes de la lignée L929 de la série de composés hybrides isoxazolines aza-bicycliques/thiazoles **4a-4k** et les thiosemicarbazones isoxazolines **83a-83f** sont présentés dans le Tableau 10.

Tableau 10. Activité anti-*T. cruzi* (Cl<sub>50</sub>) *in vitro* de la série des isoxazolines aza-bicycliques (**4a-4k**) et de sa cytotoxicité (CC<sub>50</sub>) et de son indice de sélectivité (IS).

| Composés     | R <sup>1</sup>            | R <sup>2</sup>            | L929                                 | <i>T. cruzi</i>                                    | IS                                 |
|--------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------------------|----------------------------------------------------|------------------------------------|
|              |                           |                           | Fibroblaste<br>CC <sub>50</sub> (μM) | trypomastigote/amastigote<br>Cl <sub>50</sub> (μM) | CC <sub>50</sub> /Cl <sub>50</sub> |
| <b>4a</b>    | <i>p</i> -Cl              | <i>p</i> -NO <sub>2</sub> | >201,58                              | 3,3±0,1                                            | > 62,5                             |
| <b>4b</b>    | <i>p</i> -Me              | <i>p</i> -NO <sub>2</sub> | >210,03                              | 6,09±4,8                                           | > 34,5                             |
| <b>4c</b>    | <i>p</i> -Me              | <i>p</i> -Cl              | >107,50                              | 45,80±19,1                                         | > 2,3                              |
| <b>4d</b>    | <i>p</i> -Me              | <i>p</i> -F               | >222,65                              | 11,13±10,2                                         | > 20                               |
| <b>4e</b>    | <i>p</i> -Cl              | <i>p</i> -Cl              | >206,16                              | 6,39±0,4                                           | > 32,2                             |
| <b>4f</b>    | <i>p</i> -Cl              | <i>p</i> -F               | >213,18                              | 5,54±0,0                                           | > 38,5                             |
| <b>4g</b>    | <i>p</i> -NO <sub>2</sub> | <i>p</i> -NO <sub>2</sub> | >197,20                              | 4,14±0,6                                           | > 47,6                             |
| <b>4h</b>    | <i>p</i> -NO <sub>2</sub> | <i>p</i> -Cl              | >201,58                              | 1,19±0,0                                           | > 169,5                            |
| <b>4i</b>    | <i>p</i> -NO <sub>2</sub> | <i>p</i> -F               | >208,29                              | 4,06±0,1                                           | > 51,3                             |
| <b>4j</b>    | <i>p</i> -F               | <i>p</i> -NO <sub>2</sub> | >208,29                              | 5,62±1,2                                           | > 37                               |
| <b>4k</b>    | <i>p</i> -tBu             | <i>p</i> -NO <sub>2</sub> | >192,99                              | 0,29±0,0                                           | > 666,7                            |
| <b>83a</b>   | <i>p</i> -Cl              | -                         | >284,85                              | 74,63±8,8                                          | > 3,8                              |
| <b>83b</b>   | <i>p</i> -Me              | -                         | >302,01                              | 73,09±61,6                                         | > 4,1                              |
| <b>83c</b>   | <i>p</i> -NO <sub>2</sub> | -                         | >276,18                              | 83,96±0,6                                          | > 3,3                              |
| <b>83d</b>   | <i>p</i> -F               | -                         | >298,43                              | 169,51±56,4                                        | > 1,8                              |
| <b>83e</b>   | <i>p</i> -tBu             | -                         | 142,57                               | 8,31±9,6                                           | 17,2                               |
| <b>83f</b>   | <i>p</i> -OMe             | -                         | >288,09                              | 137,42±61,4                                        | > 2,1                              |
| Benznidazole | -                         | -                         | 2401,54                              | 3,84±0,0                                           | 630                                |

La série d'hybrides isoxazoline aza-bicyclique/thiazole a montré d'excellents résultats pour l'activité anti-*T. cruzi*. Comme vérifié dans le Tableau 10, les composés **4a**, **4b**, **4d**, **4e**, **4f**, **4g**, **4h**, **4i**, **4j**, **4k** et **83d** étaient actifs et très actifs. Selon Romaña *et al.* (2010), les composés dont la sélectivité (IS) est supérieure ou égale à 50 sont recommandés pour les essais *in vivo*. Ainsi, les hybrides **4a**, **4h**, **4i** et **4k** ont été choisis pour la séquence d'études anti-*T. cruzi in vivo*.

Parmi les hybrides sélectionnés pour l'évaluation *in vivo*, le **4k**, avec le radical tert-butyl (tBu) en R<sup>1</sup> et le nitro (NO<sub>2</sub>) en R<sup>2</sup>, a montré une puissance plus élevée dans l'activité trypanocide, avec un Cl<sub>50</sub> de 0,29 μM, en plus d'une sélectivité

supérieure à 666,7. Cette valeur était supérieure à celle du benznidazole (IS = 630), un médicament de référence dans les tests *in vitro* et *in vivo*.

Parmi les trois autres hybrides sélectionnés pour l'évaluation *in vivo*, **4a**, **4h**, **4i**, ( $R^1 = \text{p-NO}_2 / R^2 = \text{p-Cl}$ ) présentait la deuxième valeur la plus basse de  $\text{Cl}_{50}$  (1,19  $\mu\text{M}$ ), étant un isomère de position de l'hybride **4a** ( $R^1 = \text{p-Cl} / R^2 = \text{p-NO}_2$ ), la troisième valeur la plus basse de  $\text{Cl}_{50}$  (3,23  $\mu\text{M}$ ), mais il y a une baisse de sélectivité de 2,5 fois (**4a** IS > 62.5). En observant l'hybride **4k**, il est possible de vérifier que la présence du radical tert-butyl (tBu) en  $R^1$  est responsable de l'activité trypanocide mise en évidence, étant 11 fois plus puissante que l'hybride **4a** ( $R^1 = \text{p-Cl}$ ).

L'hybride **4i** ( $R^1 = \text{p-NO}_2 / R^2 = \text{p-F}$ ), également choisi pour l'évaluation *in vivo*, présentait un  $\text{Cl}_{50} = 4,06 \mu\text{M}$  et IS > 51,3. Par rapport à **4h** ( $R^1 = \text{p-NO}_2 / R^2 = \text{p-Cl}$ ) il y a un changement de  $R^2 = \text{p-Cl}$  à  $R^2 = \text{p-F}$ , générant une diminution de puissance de 3 fois, par rapport à la  $\text{Cl}_{50}$ .

L'hybride **4j** ( $R^1 = \text{p-F} / R^2 = \text{p-NO}_2$ ) avait une  $\text{Cl}_{50}$  de 5,62  $\mu\text{M}$  (IS > 37) étant moins puissant par rapport à son isomère de position, hybride **4i** ( $R^1 = \text{p-NO}_2 / R^2 = \text{p-F}$ ). Malgré cela, **4j** a montré une activité anti-*T. cruzi* puissante. L'hybride **4c** ( $R^1 = \text{p-Me} / R^2 = \text{p-Cl}$ ) a montré une activité réduite avec  $\text{Cl}_{50}$  de 45,80  $\mu\text{M}$ , valeur 4 fois supérieure à **4d** ( $R^1 = \text{p-Me} / R^2 = \text{p-F}$ ), qui a montré une valeur élevée de  $\text{Cl}_{50}$  11,13  $\mu\text{M}$ .

Les précurseurs thiosemicarbazones **83a-83f** ont également été testés, étant peu puissants dans l'essai pour évaluer l'activité trypanocide, à l'exception de **83d**, qui présentait  $\text{Cl}_{50}$  de 8,31 M. Les autres présentaient  $\text{Cl}_{50} > 70 \mu\text{M}$ , étant vérifié que la présence du groupe thiazole est essentiel pour l'activité antichagasique dans tous les hybrides, générant une potentialisation de l'activité pour **83d**, comme vérifié dans l'hybride **4k**.

#### 5.3.2.3.Détermination de la dose maximale tolérée (DMT)

Avant de procéder à l'évaluation *in vivo* des composés **4a**, **4h**, **4i** et **4k**, le test DMT a été effectué, vérifiant qu'il n'y avait aucun signe de toxicité à la concentration égale à 200 mg/kg par voies orale et intrapéritonéale, ce qui a révélé une faible toxicité de ces composés chez la souris.

### 5.3.3. L'activité cytotoxique contre les cellules tumorales

Les résultats de l'activité cytotoxique contre les cellules tumorales sont décrits dans les documents suivants Tableau 11.

Tableau 11. L'activité cytotoxique des composés **4a-4k** et **83a-83f**, contre les cellules normales et cancéreuses représentée en pourcentage d'inhibition de la croissance. Les valeurs représentent le pourcentage d'inhibition de la croissance cellulaire avec 72 h

| Comp.        | <i>R</i> <sup>1</sup>     | <i>R</i> <sup>2</sup>     | VERO                                                       | MCF-7    | NCI-H292  | Jukart    | HT-29    |
|--------------|---------------------------|---------------------------|------------------------------------------------------------|----------|-----------|-----------|----------|
|              |                           |                           | Inhibition % de la croissance cellulaire ± écart-type (SD) |          |           |           |          |
| <b>4a</b>    | <i>p</i> -Cl              | <i>p</i> -NO <sub>2</sub> | 34,7±3,9                                                   | 45,2±0,3 | 60,6±4,9  | 77,3±0,3  | 49,4±2,2 |
| <b>4b</b>    | <i>p</i> -Me              | <i>p</i> -NO <sub>2</sub> | 60,6±4,1                                                   | 21,7±2,0 | 47,2±1,1  | 69,0±1,9  | 41,5±6,2 |
| <b>4c</b>    | <i>p</i> -Me              | <i>p</i> -Cl              | 41,8±1,0                                                   | 53,2±4,9 | 60,5±3,7  | 72,4±4,8  | 69,5±1,3 |
| <b>4d</b>    | <i>p</i> -Me              | <i>p</i> -F               | 48,3±1,7                                                   | 51,3±1,9 | 62,2±1,2  | 59,6±2,9  | 51,2±0,3 |
| <b>4e</b>    | <i>p</i> -Cl              | <i>p</i> -Cl              | 38,3±1,3                                                   | 48,5±4,0 | 70,8±1,3  | 55,5±6,5  | 66,8±4,7 |
| <b>4f</b>    | <i>p</i> -Cl              | <i>p</i> -F               | 35,3±6,2                                                   | 44,6±2,0 | 58,4±0,08 | 87,0±0,9  | 54,5±0,7 |
| <b>4g</b>    | <i>p</i> -NO <sub>2</sub> | <i>p</i> -NO <sub>2</sub> | 49,1±1,4                                                   | 55,0±4,3 | 71,1±1,3  | 45,8±7,6  | 47,7±5,6 |
| <b>4h</b>    | <i>p</i> -NO <sub>2</sub> | <i>p</i> -Cl              | 46,4±3,1                                                   | 70,0±1,0 | 86,8±1,4  | 44,7±6,5  | 67,4±2,2 |
| <b>4i</b>    | <i>p</i> -NO <sub>2</sub> | <i>p</i> -F               | 52,4±0,6                                                   | 31,8±2,8 | 70,6±2,3  | 58,9±5,5  | 38,7±2,8 |
| <b>4j</b>    | <i>p</i> -F               | <i>p</i> -NO <sub>2</sub> | 51,2±4,1                                                   | 44,0±2,5 | 54,1±1,8  | 54,7±1,2  | 69,7±0,8 |
| <b>4k</b>    | <i>p</i> - <i>t</i> Bu    | <i>p</i> -NO <sub>2</sub> | 42,2±1,7                                                   | 41,3±2,1 | 57,2±2,3  | 28,5±2,1  | 44,1±5,5 |
| <b>83a</b>   | <i>p</i> -Cl              | -                         | 46,5±2,5                                                   | 21,5±0,2 | 20,5±4,8  | 9,1±5,5   | 25,1±2,7 |
| <b>83b</b>   | <i>p</i> -Me              | -                         | 45,2±1,1                                                   | 24,9±3,6 | 4,6±2,4   | 44,9±3,4  | 10,4±4,3 |
| <b>83c</b>   | <i>p</i> -NO <sub>2</sub> | -                         | 37,8±1,5                                                   | 10,4±1,9 | 27,1±1,8  | *N.A      | 19,9±2,4 |
| <b>83d</b>   | <i>p</i> - <i>t</i> Bu    | -                         | 17,3±4,9                                                   | 23,0±1,7 | 36,8±2,8  | *N.A      | 3,4±4,0  |
| <b>83e</b>   | <i>p</i> -F               | -                         | 26,6±2,4                                                   | 15,6±3,1 | 27,1±1,4  | *N.A      | 29,1±5,1 |
| <b>83f</b>   | <i>p</i> -OMe             | -                         | 45,2±1,5                                                   | 45,3±0,9 | 20,8±3,2  | 30,4±18,5 | 20,1±4,5 |
| Doxorubicine |                           |                           | 33,4±1,4                                                   | 94,5±0,6 | 92,0±1,6  | 81,4±3,7  | 66,6±0,8 |

d'incubation.

Cellules NCI-H292 (carcinome pulmonaire épidermoïde), MCF-7 (cancer du sein), Jurkat (leucémie aiguë à cellules T), HT-29 (cancer du côlon), L929 (fibroblastes murins) et VERO (rein de singe).

Concentration unique = 25 µg/mL

\*N.O. = Non actif

Pour le screening initial, une échelle d'intensité a été utilisée pour évaluer le potentiel cytotoxique des échantillons testés : Échantillons présentant une activité élevée (inhibition de 91 à 100 %), une activité modérée (inhibition de la croissance cellulaire allant de 70 à 90 %), une faible activité cytotoxique (inhibition de la croissance de 51 à 69 %) et sans activité (inhibition de la croissance inférieure à 50 %) (RODRIGUES *et al.*, 2014).

Pour les cellules MCF-7, aucun des hybrides n'a présenté une activité inhibitrice supérieure à 75%, avec la valeur la plus élevée de 70% pour **4h**. Pour la lignée cellulaire de Jurkat, les composés **4a** et **4f** présentaient un pourcentage d'inhibition de 77 % et 87 %, respectivement, et **4f** a été sélectionné pour la détermination de  $CI_{50}$ , ce qui a donné une  $CI_{50}$  de 7,15 µM contre les cellules Jurkat, inférieur à la doxorubicine ( $CI_{50}$  = 13,06 µM). L'hybride **4h** présente une  $CI_{50}$  de 0,96 µM contre la lignée cellulaire NCI-H292 (doxorubicine,  $CI_{50}$  = 0,46 µM).

Pour la lignée cellulaire HT-29, quatre composés présentaient un pourcentage similaire d'inhibition : **4c**, **4e**, **4h** et **4j** avec une inhibition moyenne de 67%, les autres, une inhibition plus faible.

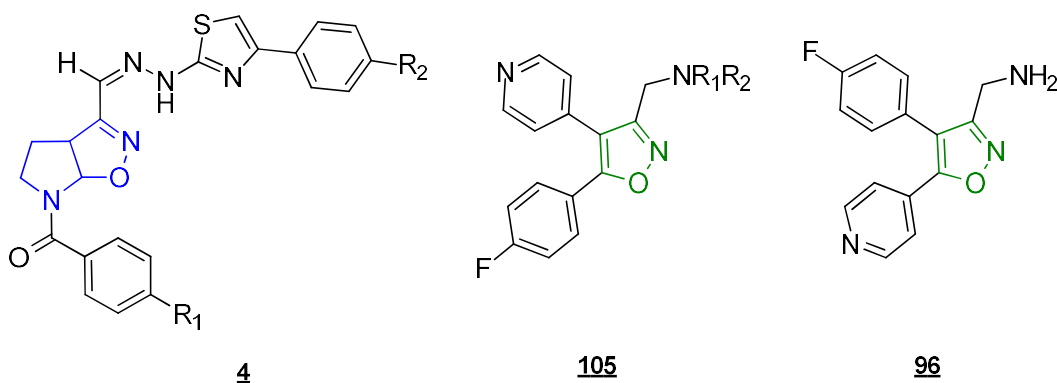
Concernant les résultats sur les composés dans la cellule normale VERO, aucun composé n'a montré une cytotoxicité pertinente, selon la classification de Rodrigues *et al.* (2014). Pour l'étude cytotoxique initiale contre des cellules normales, la souche VERO a été testée. Dans les résultats présentés, il est intéressant de noter le faible pourcentage d'inhibition pour les composés **4f** et **4k**, qui étaient respectivement de 24% et 17%, démontrant une faible cytotoxicité contre les cellules saines. Le composé **4h**, qui a montré une activité antitumorale contre NCI-H292 ( $CI_{50}$  = 0,96 µM), a montré une cytotoxicité élevée par rapport à L929, avec un pourcentage d'inhibition de 77%, mais face à la lignée VERO, il y avait une diminution significative à 46%.

Quant aux thiosemicarbazones testées, aucune n'a présenté une activité inhibitrice supérieure à 56%. En observant les résultats, est possible de vérifier que

le noyau thiazole a favorisé une augmentation de l'activité cytotoxique chez les hybrides formés **4a-4k**, démontrant un rôle important de cette activité, par rapport au précurseur **83a-83f**, les thiosemicarbazones hybrides.

## 6.CONCLUSIONS

La synthèse proposée dans ce projet a pu être réalisée avec succès pour les deux séries, à savoir l'hybride isoxazoline/thiazole **4** avec un espaceur hydrazone et le système diaryl-isoxazole **105**.



Les hybrides originaux  $\Delta^2$ -isoxazoline/thiazole **4a-k** ont été synthétisés, totalisant 11 hybrides, et élucidés par spectroscopie de RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C unidimensionnelle et bidimensionnelle et IR-FT, démontrant l'efficacité synthétique dans l'obtention de nouveaux composés par cette voie, à travers les réactions de cycloaddition 1,3-dipolaire entre le CEFNO et les enamides endocycliques substitués. L'utilisation du MnO<sub>4</sub> activé pour la formation d'aldéhydes a été efficace avec des rendements similaires à ceux de la réaction de Swern, en plus d'avoir comme avantage la praticité de la réaction. Les thiosemicarbazones synthétisées ont également vu leurs structures élucidées par RMN et IR-FT, et ont également été soumises à des évaluations biologiques. L'analyse de masse est toujours en cours.

De la série de diaryl-isoxazoles, 11 composés **105a-k** et le composé **96** ont été synthétisés et caractérisés par les spectroscopies de RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C unidimensionnelle et bidimensionnelle et IR-FT et par spectrométrie de masse, en plus de ses propriétés physicochimiques déterminées. Parmi les voies synthétiques testées, la cyclisation des  $\beta$ -cétos-énols a été celle qui a fourni les meilleurs

rendements dans la série **105**, formant des structures où le cycle pyridine est en C4 du cycle isoxazole. Pour la série **96**, la même voie synthétique n'a pas favorisé la formation du noyau de l'isoxazole, il est possible d'obtenir par voie de cycloaddition 1,3-dipolaire entre l'oxyde de carboxyéthoxyformonitrile (CEFNO) et la 4-éthynylpyrridine, catalysée par le cuivre, formant du diaryl-isoxazole avec de la pyridine en position C5 du cycle, mais avec de faibles rendements, ce qui ne justifiait qu'un composé synthétisé final. Plusieurs autres tentatives ont été faites pour contourner la réactivité de la pyridine dans les réactions, mais sans succès, dans ce travail.

Pour l'évaluation de l'activité du leishmanicide *in vitro*, seuls les composés de la série diaryl-isoxazole ont été soumis à l'activité contre les formes promastigote et amastigote des espèces *L. amazonensis* et *L. infantum*. Le résultat a été exprimé par  $CI_{50}$  des composés, étant inactifs par rapport aux formes évolutives des espèces testées. L'évaluation cytotoxique contre les fibroblastes L929 a démontré une faible cytotoxicité de la série diaryl-isoxazole avec des valeurs  $CC_{50}$  supérieures à celles de la miltéfosine.

Pour l'activité *in vitro* anti-*T. cruzi*, les deux séries, diaryl-isoxazole **105a-105k** et  $\Delta^2$ -isoxazoline/thiazole **4a-4k**, ont été soumises au test contre les formes trypomastigote et amastigote de la souche Tulahuen de *T. cruzi*, évaluant la diminution de la charge parasitaire, de manière conjointe, dans les deux sens, en mimant ce qui se passe chez l'hôte vertébré. L'évaluation de la cytotoxicité visait des cellules non infectées, c'est-à-dire des fibroblastes de la lignée L929.

L'évaluation anti-*T. cruzi* de la série diaryl-isoxazole a été exprimée en  $CI_{50}$ , démontrant l'inactivité des composés ou une faible activité lorsqu'il s'agit de **105b**. Ces composés ne présentaient pas de cytotoxicité même à la concentration maximale testée et d'autres essais devraient être effectués pour déterminer cette évaluation. Pour la série  $\Delta^2$ -isoxazoline/thiazole, les composés ont montré une activité trypanocide puissante sans cytotoxicité pour la concentration maximale testée. Les valeurs de  $CI_{50}$ , avec les données obtenues, ont permis de choisir les composés **4a**, **4h**, **4i** et **4k** pour l'évaluation *in vivo*, avec un IS de **4k** supérieur au benznidazole et sa  $CI_{50}$  13 fois supérieure au médicament de référence. Pour poursuivre l'évaluation *in vivo*, la dose de tolérance maximale a été déterminée, en

vérifiant la non-toxicité des composés **4a**, **4h**, **4i** et **4k** même à une concentration de 200 mg/kg.

Les composés des séries isoxazoline aza-bicycliques **4a-4k** et **83a-83f** ont été soumis à une évaluation antitumorale contre les cellules cancéreuses des souches NCI-H292 (épidermoïde pulmonaire du carcinome du mucus), MCF-7 (cancer du sein), Jurkat (leucémie aiguë à cellules T), HT-29 (cancer du côlon) et VERO. Pour les cellules cancéreuses, le composé **4f** présente une IC<sub>50</sub> de 7,15 µM contre les cellules de Jurkat et l'hybride **4h** a présenté une CI<sub>50</sub> de 0,96 µM contre la lignée cellulaire NCI-H292.

En général, 2 nouvelles séries chimiques, les isoxazolines aza-bicycliques et diaryl-isoxazoles ont été synthétisées, totalisant 29 molécules finales, dont certaines présentaient des activités cytotoxiques contre les cellules cancéreuses et l'activité anti-*T. cruzi* pour la série isoxazoline aza-bicyclique.

## 7. ARTICLE PUBLIÉ

Titre: Antinociceptive Effects of Aza-Bicyclic Isoxazoline-Acylhydrazone Derivatives in Different Models of Nociception in Mice.

MOTA, Fernanda Virginia Barreto; **COUTINHO, Felipe Neves**; CARVALHO, Vanessa Mylenna Florêncio de; CORREIA, Julyanne Cunha de Assis; BASTOS, Isla Vanessa Gomes Alves; MARCELINO-NETO, Pedro Paulo; XIMENES, Rafael Matos; BRONDANI, Dalci José; FARIA, Antônio Rodolfo de; MARCHAND, Pascal. Antinociceptive Effects of Aza-Bicyclic Isoxazoline-Acylhydrazone Derivatives in Different Models of Nociception in Mice. **Current Topics In Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 22, n. 4, p. 247-258, fev. **2022**. Bentham Science Publishers Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2174/1568026622666220105102508>.

## REFERÊNCIAS

1. ALLOCCO, John J. *et al.* Inhibitors of casein kinase 1 block the growth of Leishmania major promastigotes in vitro. **International Journal For Parasitology**, [S.L.], v. 36, n. 12, p. 1249-1259, out. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2006.06.013>.
2. A DESJARDINS, Christopher *et al.* Genomic and functional analyses of Mycobacterium tuberculosis strains implicate ald in D-cycloserine resistance. **Nature Genetics**, [S.L.], v. 48, n. 5, p. 544-551, 11 abr. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/ng.3548>.
3. AGRAWAL, Neetu; MISHRA, Pradeep. The synthetic and therapeutic expedition of isoxazole and its analogs. **Medicinal Chemistry Research**, [S.L.], v. 27, n. 5, p. 1309-1344, 27 fev. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00044-018-2152-6>.
4. AL-KAMEL, Mohamed Ahmed Naif. Leishmaniasis and Malignancy: a review and perspective. **Clinical Skin Cancer**, [S.L.], v. 2, n. 1-2, p. 54-58, 6 dez. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.clsc.2017.10.003>.
5. ALMEIDA, Gleybson Correia de. **Síntese e avaliação preliminar da atividade antimicrobiana e antichagásica de novas isoxazolil-aril-semicarbazonas, e tiossemicarbazonas e isoxazolil-nitrofurfuril-hidrazonas**. 2010. 166 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2010.
6. ALMEIDA, Valderes Moraes de *et al.* Synthesis of new aza-bicyclic 2-isoxazolines by 1,3-dipolar cycloaddition of endocyclic enecarbamates and enamides with nitrile oxides. **Tetrahedron Letters**, [S.L.], v. 50, n. 6, p. 684-687, fev. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tetlet.2008.11.096>.
7. ALTHAGAFI, Ismail I. *et al.* Novel Nano-sized bis-indoline Derivatives as Antitumor Agents. **Journal Of Heterocyclic Chemistry**, [S.L.], v. 56, n. 2, p. 391-399, 22 nov. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jhet.3410>.
8. AMIM, Raquel S. *et al.* Cytotoxicity and Leishmanicidal Activity of Isoniazid-Derived Hydrazones and 2-Pyrazineformamide Thiosemicarbazones. **Journal**

- Of The Brazilian Chemical Society**, [S.L.], p. 771-777, 2015. Sociedade Brasileira de Quimica (SBQ). <http://dx.doi.org/10.5935/0103-5053.20150330>.
9. ANAND, Selvam Athavan Alias *et al.* Synthesis, characterization and antitumor activities of some novel thiazinones and thiosemicarbazones derivatives. **Phosphorus, Sulfur, And Silicon And The Related Elements**, [S.L.], v. 195, n. 10, p. 821-829, 12 maio 2020. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/10426507.2020.1757672>.
  10. BAKHERAD, Zohreh *et al.* Anti-cancer, anti-oxidant and molecular docking studies of thiosemicarbazone indole-based derivatives. **Research On Chemical Intermediates**, [S.L.], v. 45, n. 5, p. 2827-2854, 27 fev. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11164-019-03765-9>.
  11. BANOGLU, Erden *et al.* 4,5-Diarylisoaxazol-3-carboxylic acids: a new class of leukotriene biosynthesis inhibitors potentially targeting 5-lipoxygenase-activating protein (flap). **European Journal Of Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 113, p. 1-10, maio 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.02.027>
  12. BARMAD, Mahesh A. *et al.* Medicinal Chemistry Perspective of Fused Isoxazole Derivatives. **Current Topics In Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 16, n. 26, p. 2863-2883, 2 set. 2016. Bentham Science Publishers Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2174/1568026616666160506145700>.
  13. BARMAN, Sanmitra *et al.* Exploring naphthyl-carbohydrazides as inhibitors of influenza A viruses. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 71, p. 81-90, jan. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.10.063>.
  14. BAZIN, Marc-Antoine *et al.* In vitro identification of imidazo[1,2-a]pyrazine-based antileishmanial agents and evaluation of L. major casein kinase 1 inhibition. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 210, p. 112956-00, jan. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112956>.
  15. BENAMROUZ, S. *et al.* Parasites and malignancies, a review, with emphasis on digestive cancer induced by *Cryptosporidium parvum* (Alveolata: apicomplexa). **Parasite**, [S.L.], v. 19, n. 2, p. 101-115, 15 maio 2012. EDP Sciences. <http://dx.doi.org/10.1051/parasite/2012192101>.
  16. BERA, Pradip *et al.* Synthesis, structure elucidation and dft study of a new thiazole-pyridine anchored nnn donor and it's cobalt(II) complex: in-vitro antitumor activity against u937 cancer cells, dna binding property and molecular docking study. **Journal Of Molecular Structure**, [S.L.], v. 1224, n. 00, p. 129015-00, jan. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molstruc.2020.129015>.

17. BERNAL, Cristian C. *et al.* Synthesis and anticancer activity of new tetrahydroquinoline hybrid derivatives tethered to isoxazoline moiety. **Medicinal Chemistry Research**, [S.L.], v. 29, n. 4, p. 675-689, 27 jan. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00044-020-02513-8>.
18. BORCEA, Anca-Maria *et al.* An Overview of the Synthesis and Antimicrobial, Antiprotozoal, and Antitumor Activity of Thiazole and Bisthiazole Derivatives. **Molecules**, [S.L.], v. 26, n. 3, p. 624, 25 jan. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules26030624>.
19. BOUHERROU, Houria *et al.* Synthesis and Biological Evaluation of New Substituted Hantzsch Thiazole Derivatives from Environmentally Benign One-Pot Synthesis Using Silica Supported Tungstosilicic Acid as Reusable Catalyst. **Molecules**, [S.L.], v. 22, n. 5, p. 757, 7 maio 2017. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules22050757>
20. BRACCI, L *et al.* Immune-based mechanisms of cytotoxic chemotherapy: implications for the design of novel and rationale-based combined treatments against cancer. **Cell Death & Differentiation**, v. 21, n. 1, p. 15-25, 21 jun. 2013. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/cdd.2013.67>.
21. BRASIL – Ministério da Saúde/Chagas. Governo Federal (org.). 2022. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/noticias/2022/abril/ministerio-da-saude-lanca-campanha-para-combater-a-transmissao-da-doenca-de-chagas-no-brasil>> Acesso em: 15/05/2022
22. BUCKNER, F s *et al.* Efficient technique for screening drugs for activity against *Trypanosoma cruzi* using parasites expressing beta-galactosidase. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, [S.L.], v. 40, n. 11, p. 2592-2597, nov. 1996. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aac.40.11.2592>.
23. BURZA, Sakib; CROFT, Simon L; BOELAERT, Marleen. Leishmaniasis. **The Lancet**, [S.L.], v. 392, n. 10151, p. 951-970, set. 2018. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(18\)31204-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(18)31204-2).
24. CARDONA-G, Wilson; YEPES, Andres F.; HERRERA-R, Angie. Hybrid Molecules: promising compounds for the development of new treatments against leishmaniasis and chagas disease. **Current Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 25, n. 30, p. 3637-3679, 27 set. 2018. Bentham Science Publishers Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2174/0929867325666180309111428>.
25. CASPER, Corey; FITZMAURICE, Christina. Infection-related cancers: prioritising an important and eliminable contributor to the global cancer burden. **The Lancet Global Health**, [S.L.], v. 4, n. 9, p. 580-581, 25 jul. 2016. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s2214-109x\(16\)30169-3](http://dx.doi.org/10.1016/s2214-109x(16)30169-3).

26. CASTRO, J A, and E G Diaz de Toranzo. "Toxic effects of nifurtimox and benznidazole, two drugs used against American trypanosomiasis (Chagas' disease)." *Biomedical and environmental sciences : BES* vol. 1,1 (1988): 19-33.
27. CDC/Chagas – Center for Disease Control and Prevention. 2019. <<https://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>> Acesso em: 15/05/2022
28. CECCHI, Luca; SARLO, Francesco de; MACHETTI, Fabrizio. Isoxazoline derivatives from activated primary nitrocompounds and tertiary diamines. **Tetrahedron Letters**, [S.L.], v. 46, n. 46, p. 7877-7879, nov. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tetlet.2005.09.110>.
29. CHIKKULA, Krishna Veni; S., Raja. ISOXAZOLE–A POTENT PHARMACOPHORE. **International Journal Of Pharmacy And Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 9, n. 7, p. 13-24, 19 maio 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.22159/ijpps.2017v9i7.19097>
30. COUTINHO, Felipe Neves. **Síntese e avaliação das atividades citotóxica e antiinflamatória de novos derivados híbridos oxadiazolínicos, potenciais inibidores da ciclooxigenase 2**. 2018. 158 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2018.
31. CUNHA, Ademir Batista da; CUNHA, Delma Maria. Revisiting the History of Chagas Disease. **International Journal Of Cardiovascular Sciences**, [S.L.], p. 267-282, 22 dez. 2021. Sociedade Brasileira de Cardiologia. <http://dx.doi.org/10.36660/ijcs.20200199>.
32. D'ASCENZIO, Melissa *et al.* 1,3-Dipolar Cycloaddition, HPLC Enantioseparation, and Docking Studies of Saccharin/Isoxazole and Saccharin/Isoxazoline Derivatives as Selective Carbonic Anhydrase IX and XII Inhibitors. **Journal Of Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 63, n. 5, p. 2470-2488, 23 jan. 2020. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b01444>.
33. DE ARAÚJO Neta, Marlene Saraiva. **Planification, synthèse et activité tripanocide et leishmanicide de nouveaux dérivés hybrides à partir de 2-isoxazoline aza-bicyclique et 5,6,7,8-tétrahydroimidazo[1,2-a]pyrazine**. 2019. 365 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências Farmacêuticas, Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco - Université de Nantes, Recife, 2019.
34. DNDi – Drugs for Neglected Diseases *initiative*. 2022. Disponível em: <[https://dndi.org/diseases/chagas/facts/?gclid=Cj0KCQjwspKUBhCvARIsAB2lYusxx8M5sZ4RmOgCSchVCx4dnjvulBuBjpx21B7vA44PwulddpNeq8laAu\\_oEALw\\_wcB](https://dndi.org/diseases/chagas/facts/?gclid=Cj0KCQjwspKUBhCvARIsAB2lYusxx8M5sZ4RmOgCSchVCx4dnjvulBuBjpx21B7vA44PwulddpNeq8laAu_oEALw_wcB)> Acesso em: 15/05/2022

35. DONOHOE, Timothy J. *et al.* Direct preparation of thiazoles, imidazoles, imidazopyridines and thiazolidines from alkenes. **Org. Biomol. Chem.**, [S.L.], v. 10, n. 5, p. 1093-1101, 2012. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c1ob06587d>.
36. DURIEU, Emilie *et al.* From Drug Screening to Target Deconvolution: a target-based drug discovery pipeline using leishmania casein kinase 1 isoform 2 to identify compounds with antileishmanial activity. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, [S.L.], v. 60, n. 5, p. 2822-2833, 22 fev. 2016. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aac.00021-16>
37. ER, Mustafa *et al.* Synthesis and Characterization of Novel 1,3-Thiazole and 2-Amino-1,3,4-Thiadiazole Derivatives. **Macedonian Journal Of Chemistry And Chemical Engineering**, [S.L.], v. 33, n. 2, p. 189, 24 nov. 2014. Society of Chemists and Technologists of Macedonia. <http://dx.doi.org/10.20450/mjcce.2014.522>.
38. FARES, Jawad *et al.* Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited. **Signal Transduction And Targeted Therapy**, [S.L.], v. 5, n. 1, p. 00-00, 12 mar. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41392-020-0134-x>.
39. FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz. 2013. Disponível em: <<https://agencia.fiocruz.br/doen%C3%A7as-negligenciadas>> Acessado em: 26/01/2021
40. FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz. 2017. Disponível em: <<http://chagas.fiocruz.br/sessao/historia/>> Acessado em: 15/05/2022
41. GHORBANI, Masoud; FARHOUDI, Ramin. Leishmaniasis in humans: drug or vaccine therapy?. **Drug Design, Development And Therapy**, [S.L.], v. 12, p. 25-40, dez. 2017. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.2147/dddt.s146521>.
42. GONÇALVES, Itamar L *et al.* The use of isoxazoline and isoxazole scaffolding in the design of novel thiourea and amide liquid-crystalline compounds. **Beilstein Journal Of Organic Chemistry**, [S.L.], v. 16, p. 175-184, 6 fev. 2020. Beilstein Institut. <http://dx.doi.org/10.3762/bjoc.16.20>.
43. GONTIJO, Vanessa Silva *et al.* Molecular Hybridization as a Tool in the Design of Multi-target Directed Drug Candidates for Neurodegenerative Diseases. **Current Neuropharmacology**, [S.L.], v. 18, n. 5, p. 348-407, 20 maio 2020. Bentham Science Publishers Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2174/1385272823666191021124443>.
44. GUICHARD, Nicolas *et al.* Antineoplastic drugs and their analysis: a state of the art review. **The Analyst**, [S.L.], v. 142, n. 13, p. 2273-2321, 10 mar. 2017. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c7an00367f>.
45. HAN, Muhammed I. *et al.* Synthesis, molecular modeling, in vivo study, and anticancer activity of 1,2,4-triazole containing hydrazide–hydrazones derived

from ( S )-naproxen. **Archiv Der Pharmazie**, [S.L.], v. 352, n. 6, p. 1800365, 22 maio 2019. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/ardp.201800365>.

46. HANTZSCH, A. **Ann. Chem.**, 1889, 250 – 257
47. IARC - International Agency for Research on Cancer/WHO.2020. Disponível em: <<https://gco.iarc.fr/today/fact-sheets-cancers>> Acessado em: 28/01/2020
48. INCA – Instituto Nacional de Câncer. 2020. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/o-que-e-cancer>> Acessado em: 28/01/2020
49. INCA. Instituto Nacional de Câncer. 2020. Disponível em:<<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/cancer> > Acesso :25/01/2021.
50. KIM, Mi-Sung *et al.* Naproxen Induces Cell-Cycle Arrest and Apoptosis in Human Urinary Bladder Cancer Cell Lines and Chemically Induced Cancers by Targeting PI3K. **Cancer Prevention Research**, [S.L.], v. 7, n. 2, p. 236-245, 10 dez. 2013. American Association for Cancer Research (AACR). <http://dx.doi.org/10.1158/1940-6207.capr-13-0288>.
51. KOCYIGIT, Abdurrahim *et al.* Increased DNA damage and oxidative stress in patients with cutaneous leishmaniasis. **Mutation Research/genetic Toxicology And Environmental Mutagenesis**, [S.L.], v. 585, n. 1-2, p. 71-78, 13 abr. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2005.04.012>.
52. LEITE, Franco Henrique A. *et al.* Structure-guided discovery of thiazolidine-2,4-dione derivatives as a novel class of Leishmania major pteridine reductase 1 inhibitors. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 123, n. 00, p. 639-648, nov. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.07.060>.
53. LEWINSOHN, Rachel. Carlos Chagas (1879–1934): the discovery of trypanosoma cruzi and of american trypanosomiasis (foot-notes to the history of chagas's disease). **Transactions Of The Royal Society Of Tropical Medicine And Hygiene**, [S.L.], v. 73, n. 5, p. 513-523, jan. 1979. Oxford University Press (OUP). [http://dx.doi.org/10.1016/0035-9203\(79\)90042-7](http://dx.doi.org/10.1016/0035-9203(79)90042-7)
54. Lima JR de. Estudo prospectivo de pacientes com leishmaniose tegumentar Americana em Manaus (AM): fatores imunológicos envolvidos no curso terapêutico com antimonial pentavalente. 2017. 146f. Dissertação (Mestrado em Biologia Parasitária) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, 2017. <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/22948>
55. LINDGREN, Eric B. *et al.* Synthesis and anticancer activity of (E)-2-benzothiazole hydrazones. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 86, p. 12-16, out. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.08.039>.

56. LIVINGSTON, David M.. Toward Mechanism-Based Cancer Care. **Jama**, [S.L.], v. 285, n. 5, p. 588, 7 fev. 2001. American Medical Association (AMA). <http://dx.doi.org/10.1001/jama.285.5.588>.
57. LOBATO, César. A HISTÓRIA DA CIÊNCIA COMO “REMÉDIO” NO ENSINO DE QUÍMICA: episódio - estudo sobre a invenção da teoria atômico-molecular moderna. **Química Nova**, v. 43, n. 00, p. 1350-1361, 2020. Sociedade Brasileira de Química (SBQ). <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170595>.
58. LUZ, João Gabriel Guimarães *et al.* Visceral leishmaniasis in a Brazilian endemic area: an overview of occurrence, HIV coinfection and lethality. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, [S.L.], v. 60, p. e12, 8 mar. 2018. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1678-9946201860012>.
59. MANCUSO, Anthony J.; HUANG, Shui-Lung; SWERN, Daniel. Oxidation of long-chain and related alcohols to carbonyls by dimethyl sulfoxide. **The Journal Of Organic Chemistry**, [S.L.], v. 43, n. 12, p. 2480-2482, jun. 1978. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jo00406a041>
60. MANO-SOUSA, Brayan Jonas; GOMES, Letícia Maria Silva; BUSATTI, Haendel Gonçalves Nogueira Oliveira. Parasitic diseases as risk factors for the development of cancer. **Revista Médica de Minas Gerais**, Divinópolis, v. 29, e-2040, 01 jan. 2019.
61. MARCHAND, Pascal *et al.* Synthesis, antileishmanial activity and cytotoxicity of 2,3-diaryl- and 2,3,8-trisubstituted imidazo[1,2-a]pyrazines. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 103, p. 381-395, out. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.09.002>.
62. MARHADOUR, Sophie *et al.* Synthesis and biological evaluation of 2,3-diarylimidazo[1,2-a]pyridines as antileishmanial agents. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 58, p. 543-556, dez. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2012.10.048>.
63. MCKINNEY, Andrew R *et al.* The metabolism of anabolic-androgenic steroids in the greyhound. **Bioanalysis**, [S.L.], v. 5, n. 7, p. 769-781, abr. 2013. Future Science Ltd. <http://dx.doi.org/10.4155/bio.13.40>.
64. MICHELOT, Didier; MELENDEZ-HOWELL, Leda Maria. Amanita muscaria: chemistry, biology, toxicology, and ethnomycology. **Mycological Research**, [S.L.], v. 107, n. 2, p. 131-146, fev. 2003. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1017/s0953756203007305>.
65. MOHAREB, Rafat M. *et al.* Novel Synthesis of Hydrazide-Hydrazone Derivatives and Their Utilization in the Synthesis of Coumarin, Pyridine, Thiazole and Thiophene Derivatives with Antitumor Activity. **Molecules**, [S.L.], v. 16, n. 1, p. 16-27, 23 dez. 2010. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules16010016>.

66. MOHEBALI, Mehdi *et al.* The diagnostic accuracy of direct agglutination test for serodiagnosis of human visceral leishmaniasis: a systematic review with meta-analysis. **Bmc Infectious Diseases**, [S.L.], v. 20, n. 1, p. 946-00, dez. 2020. Springer Science and Business Media LLC.  
<http://dx.doi.org/10.1186/s12879-020-05558-7>.
67. MSF – Médicos Sem Fronteiras. Doença de Chagas. 2022.  
<[https://www.msf.org.br/o-que-fazemos/atividades-medicas/doenca-de-chagas/?utm\\_source=adwords\\_msf&utm\\_medium=&utm\\_campaign=doencas\\_geral\\_comunicacao&utm\\_content=\\_exclusao-saude\\_brasil\\_39923&gclid=Cj0KCQjwspKUBhCvARIsAB2IYuvC7YohhBZnkMM4qBoFreOOk7VGZKunTaW19Mv8AMG6bPwO5np6nn4aAvLfEALw\\_wcB.](https://www.msf.org.br/o-que-fazemos/atividades-medicas/doenca-de-chagas/?utm_source=adwords_msf&utm_medium=&utm_campaign=doencas_geral_comunicacao&utm_content=_exclusao-saude_brasil_39923&gclid=Cj0KCQjwspKUBhCvARIsAB2IYuvC7YohhBZnkMM4qBoFreOOk7VGZKunTaW19Mv8AMG6bPwO5np6nn4aAvLfEALw_wcB.)>  
Acesso em: 15/05/2022
68. MUKHOPADHYAY, Sushobhan *et al.* Antileishmanial assessment of isoxazole derivatives against *L. donovani*. **Rsc Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 11, n. 9, p. 1053-1062, 2020. Royal Society of Chemistry (RSC).  
<http://dx.doi.org/10.1039/d0md00083c>.
69. NCI – Nacional Cancer Institute. 2015. Disponível em:  
<<https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer.>>  
Acessado em: 28/01/2020
70. NHI. National Cancer Institute. 2020. Disponível em:<<https://www.cancer.gov/research/annual-plan/scientific-topics/drug-resistance>> Acesso :25/01/2021.
71. NUSSBAUMER, Susanne *et al.* Analysis of anticancer drugs: a review. **Talanta**, [S.L.], v. 85, n. 5, p. 2265-2289, out. 2011. Elsevier BV.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2011.08.034>.
72. OLIVEIRA, Vinícius Vasconcelos Gomes de *et al.* Study of in vitro biological activity of thiazoles on *Leishmania (Leishmania) infantum*. **Journal Of Global Antimicrobial Resistance**, [S.L.], v. 22, p. 414-421, set. 2020. Elsevier BV.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jgar.2020.02.028>.
73. OMURA, Kanji; SWERN, Daniel. Oxidation of alcohols by “activated” dimethyl sulfoxide. a preparative, steric and mechanistic study. **Tetrahedron**, [S.L.], v. 34, n. 11, p. 1651-1660, jan. 1978. Elsevier BV.  
[http://dx.doi.org/10.1016/0040-4020\(78\)80197-5](http://dx.doi.org/10.1016/0040-4020(78)80197-5).
74. PAHO – Pan America Health Organization. 2021. Disponível em:  
<<https://www.paho.org/en/topics/leishmaniasis>> Acessado em: 26/01/2021
75. PAHO – Pan American Health Organization. Chagas Diseases. 2022  
<<https://www.paho.org/en/topics/chagas-disease>>. Acesso em: 15/05/2022
76. PISHAWIKAR, Sachin A.; MORE, Harinath N.. Synthesis, docking and in-vitro screening of mannich bases of thiosemicarbazide for anti-fungal

- activity. **Arabian Journal Of Chemistry**, [S.L.], v. 10, p. 2714-2722, maio 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2013.10.016>.
77. PITASSE-SANTOS, Paulo *et al.* 1,2,4- and 1,3,4-Oxadiazoles as Scaffolds in the Development of Antiparasitic Agents. **Journal Of The Brazilian Chemical Society**, [S.L.], v. 29, n. 3, p. 435-456, 23 nov. 2017. Sociedade Brasileira de Quimica (SBQ). <http://dx.doi.org/10.21577/0103-5053.20170208>.
  78. PLUMMER, Martyn *et al.* Global burden of cancers attributable to infections in 2012: a synthetic analysis. **The Lancet Global Health**, [S.L.], v. 4, n. 9, p. e609-616, set. 2016. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s2214-109x\(16\)30143-7](http://dx.doi.org/10.1016/s2214-109x(16)30143-7).
  79. POPIOŁEK, Łukasz *et al.* Hydrazide–hydrazones as potential antimicrobial agents: overview of the literature since 2010. **Medicinal Chemistry Research**, [S.L.], v. 26, n. 2, p. 287-301, 25 nov. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00044-016-1756-y>.
  80. RACHIDI, Najma *et al.* Pharmacological Assessment Defines Leishmania donovani Casein Kinase 1 as a Drug Target and Reveals Important Functions in Parasite Viability and Intracellular Infection. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, [S.L.], v. 58, n. 3, p. 1501-1515, 23 dez. 2013. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aac.02022-13>.
  81. RAJ, K.K. Vijaya *et al.* Synthesis of some bioactive 2-bromo-5-methoxy-N'-[4-(aryl)-1,3-thiazol-2-yl]benzohydrazide derivatives. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 42, n. 3, p. 425-429, mar. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2006.09.010>.
  82. RAM, Vishnu Ji *et al.* Five-Membered Heterocycles. **The Chemistry Of Heterocycles**, [S.L.], p. 149-478, 2019. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-08-101033-4.00005-x>.
  83. REIS, Sílvia Leandro Gonçalves Bomfim *et al.* Síntese e avaliação preliminar da atividade antinociceptiva de novas isoxazolidil-aryl-hidrazonas. **Química Nova**, [S.L.], v. 34, n. 1, p. 76-81, 2011. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422011000100015>.
  84. REITHINGER, Richard *et al.* Cutaneous leishmaniasis. **The Lancet Infectious Diseases**, [S.L.], v. 7, n. 9, p. 581-596, set. 2007. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1473-3099\(07\)70209-8](http://dx.doi.org/10.1016/s1473-3099(07)70209-8).
  85. RODRIGUES, Giseli Capaci *et al.* Design, Synthesis, and Evaluation of Hydroxamic Acid Derivatives as Promising Agents for the Management of Chagas Disease. **Journal Of Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 57, n. 2, p. 298-308, 13 dez. 2013. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jm400902y>.
  86. ROMANHA, Alvaro José *et al.* In vitro and in vivo experimental models for drug screening and development for Chagas disease. **Memórias do Instituto**

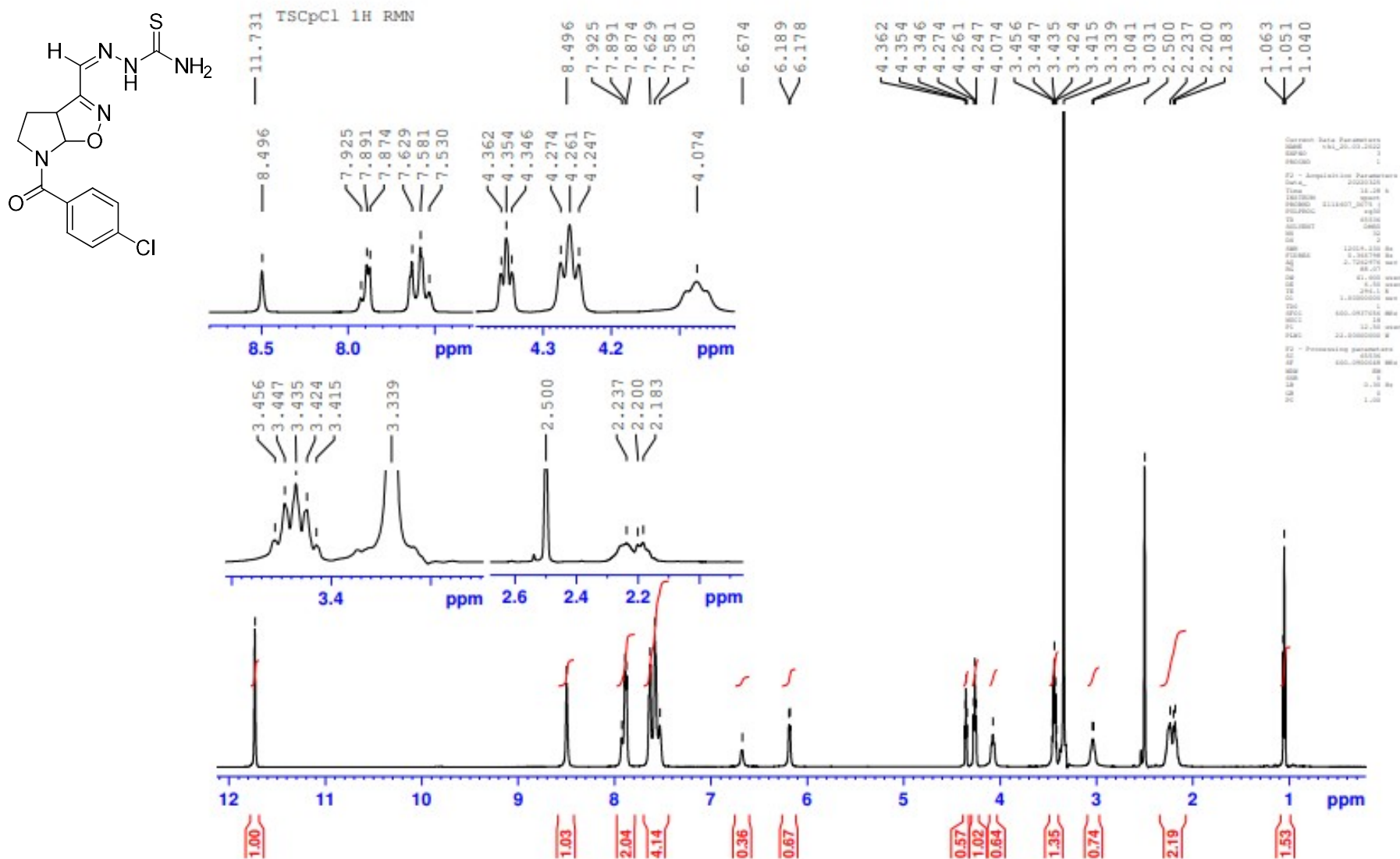
- Oswaldo Cruz**, [S.L.], v. 105, n. 2, p. 233-238, mar. 2010. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0074-02762010000200022>.
87. SANTOS, Emily F. *et al.* Acute Chagas disease in Brazil from 2001 to 2018: a nationwide spatiotemporal analysis. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [S.L.], v. 14, n. 8, p. 8445-8456, 3 ago. 2020. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0008445>.
  88. SCHADICH, Ermin *et al.* Assessing different thiazolidine and thiazole based compounds as antileishmanial scaffolds. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, [S.L.], v. 30, n. 23, 127616, dez. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2020.127616>.
  89. SILVA JÚNIOR, Eufrânio N. da *et al.* Anti-Trypanosoma cruzi Compounds: our contribution for the evaluation and insights on the mode of action of naphthoquinones and derivatives. **Journal Of The Brazilian Chemical Society**, [S.L.], v. 25, n. 10, p. 17-1798, 01 ago. 2014. Sociedade Brasileira de Química (SBQ). <http://dx.doi.org/10.5935/0103-5053.20140180>
  90. SHAIK, Afzal *et al.* Antimicrobial, Antioxidant, and Anticancer Activities of Some Novel Isoxazole Ring Containing Chalcone and Dihydropyrazole Derivatives. **Molecules**, [S.L.], v. 25, n. 5, p. 1047-1058, 26 fev. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules25051047>.
  91. SILVA, Dahara Keyse Carvalho *et al.* In Vitro, In Vivo and In Silico Effectiveness of LASSBio-1386, an N-Acyl Hydrazone Derivative Phosphodiesterase-4 Inhibitor, Against Leishmania amazonensis. **Frontiers In Pharmacology**, [S.L.], v. 11, n. 00, p. 00-00, 16 dez. 2020. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fphar.2020.590544>.
  92. SMITH, Alexander P.; DUEBER, Julie C.; ALLISON, Derek B.. A diagnostic review of carcinomas and sarcomas of the mediastinum: making the diagnosis on fine-needle aspiration and core needle biopsy specimens. **Seminars In Diagnostic Pathology**, [S.L.], v. 37, n. 4, p. 187-198, jul. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1053/j.semdp.2020.04.007>.
  93. SNELL, Noel. Apothecaries' Hall—Promoting the History, Philosophy, and Ethics of Medicine and Pharmacy for 60 Years. **Pharmaceutical Medicine**, v. 33, n. 6, p. 449-449, 20 nov. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s40290-019-00315-x>.
  94. SOUZA, Marcus Vinícius Nora de. Synthesis and biological activity of natural thiazoles: an important class of heterocyclic compounds. **Journal Of Sulfur Chemistry**, [S.L.], v. 26, n. 4-5, p. 429-449, 1 ago. 2005. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/17415990500322792>.
  95. SWIFT, Lucy; GOLSTEYN, Roy. Genotoxic Anti-Cancer Agents and Their Relationship to DNA Damage, Mitosis, and Checkpoint Adaptation in Proliferating Cancer Cells. **International Journal Of Molecular Sciences**,

- [S.L.], v. 15, n. 3, p. 3403-3431, 25 fev. 2014. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms15033403>.
96. TAIA, Abdelmaoujoud *et al.* Synthesis, characterization, and biological evaluation of new heterocyclic systems 1, 2, 3-triazole-isoxazoline from eugenol by the mixed condensation reactions. **Synthetic Communications**, [S.L.], v. 50, n. 13, p. 2052-2065, 6 maio 2020. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/00397911.2020.1762224>.
  97. TENÓRIO, Rômulo P. *et al.* Tiossemicarbazonas: métodos de obtenção, aplicações sintéticas e importância biológica. **Química Nova**, [S.L.], v. 28, n. 6, p. 1030-1037, dez. 2005. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422005000600018>. (TENÓRIO *et al.*, 2005)
  98. THOTA, Sreekanth *et al.* N-Acylhydrazones as drugs. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, [S.L.], v. 28, n. 17, p. 2797-2806, set. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2018.07.015>.
  99. TREFZGER, Ozildéia S. *et al.* Design, synthesis, antileishmanial, and antifungal biological evaluation of novel 3,5-disubstituted isoxazole compounds based on 5-nitrofurans scaffolds. **Archiv Der Pharmazie**, [S.L.], v. 353, n. 2, p. 1900241-00, 16 dez. 2019. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/ardp.201900241>.
  100. UMAPATHI, Akhela *et al.* Curcumin and isonicotinic acid hydrazide functionalized gold nanoparticles for selective anticancer action. **Colloids And Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, [S.L.], v. 607, n. 00, p. 125484-00, dez. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfa.2020.125484>.
  101. VARGAS, Esteban *et al.* Hydrazone Derivatives Enhance Antileishmanial Activity of Thiochroman-4-ones. **Molecules**, [S.L.], v. 23, n. 1, p. 70-00, 29 dez. 2017. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules23010070>.
  102. VEKARIYA, Rajesh H. *et al.* A one pot, three component synthesis of coumarin hybrid thiosemicarbazone derivatives and their antimicrobial evolution. **Journal Of The Association Of Arab Universities For Basic And Applied Sciences**, [S.L.], v. 23, n. 1, p. 10-19, jun. 2017. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaubas.2016.04.002>.
  103. VRIES, Henry J. C. de; REEDIJK, Sophia H.; SCHALLIG, Henk D. F. H.. Cutaneous Leishmaniasis: recent developments in diagnosis and management. **American Journal Of Clinical Dermatology**, [S.L.], v. 16, n. 2, p. 99-109, 17 fev. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s40257-015-0114-z>.
  104. WANG, Shi-Meng *et al.* Synthesis of benzo[d]thiazole-hydrazone analogues: molecular docking and SAR studies of potential H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase inhibitors and

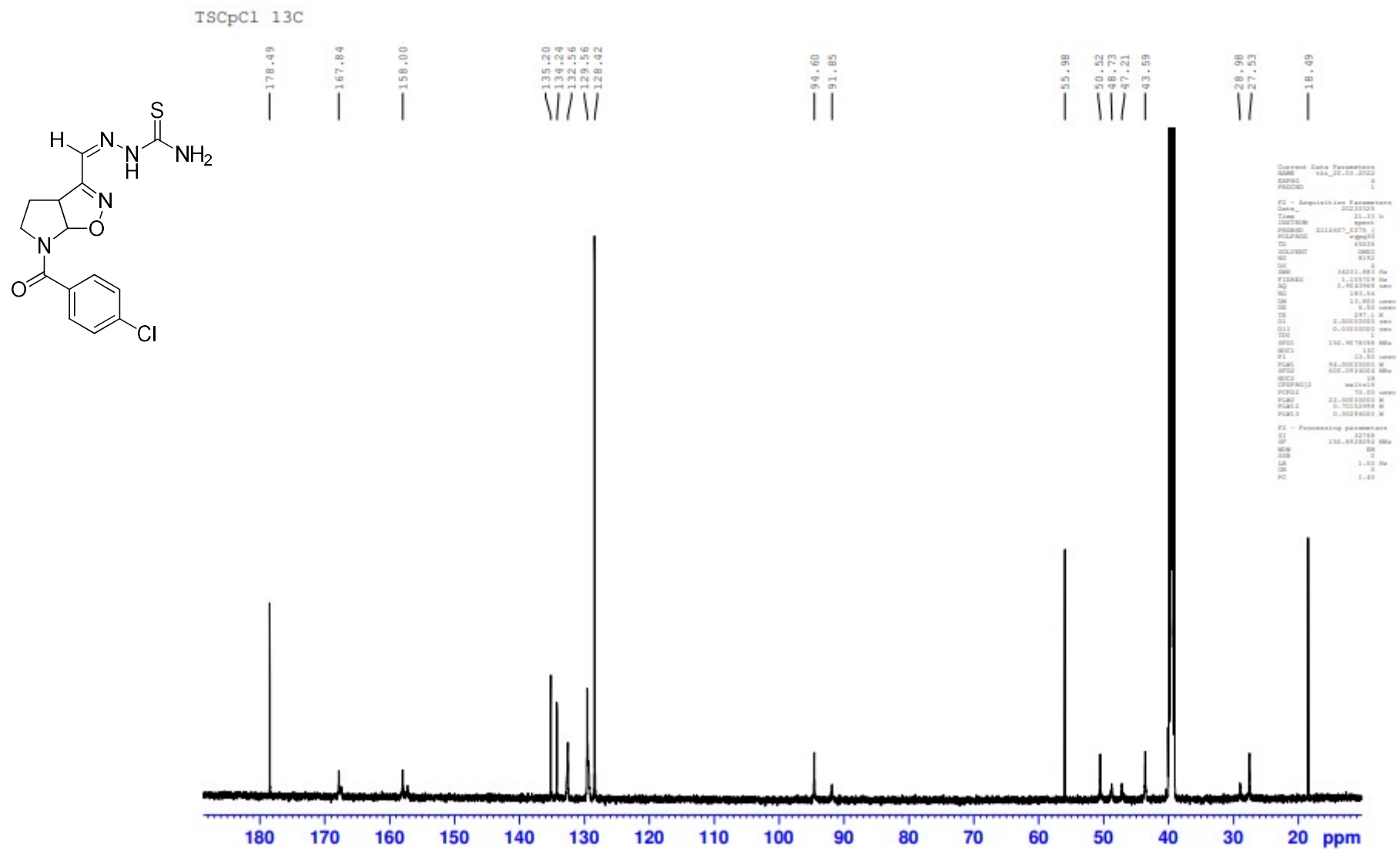
- anti-inflammatory agents. **Medchemcomm**, [S.L.], v. 8, n. 6, p. 1173-1189, 2017. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c7md00111h>.
105. WALUM, E. Acute oral toxicity. **Environmental Health Perspectives**, [S.L.], v. 106, n. 2, p. 497-503, abr. 1998. Environmental Health Perspectives. <http://dx.doi.org/10.1289/ehp.98106497>
  106. WARD, Laura Sterian. Entendendo o Processo Molecular da Tumorigênese. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, [S.L.], v. 46, n. 4, p. 351-360, ago. 2002. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0004-27302002000400006>.
  107. WHO. World Health Organization. 2021. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>> Acesso em 25/01/2021
  108. ZEBBICHE, Zineddine *et al.* Synthesis and anticancer properties of novel hydrazone derivatives incorporating pyridine and isatin moieties. **Archiv Der Pharmazie**, [S.L.], v. 00, n. 00, p. 00-00, 28 dez. 2020. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/ardp.202000377>.
  109. ZIMECKI, Michał *et al.* Isoxazole Derivatives as Regulators of Immune Functions. **Molecules**, [S.L.], v. 23, n. 10, p. 2724-00, 22 out. 2018. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules23102724>.
  110. ZOU, Xunzhong *et al.* Two metal complex derivatives of pyridine thiazole ligand: synthesis, characterization and biological activity. **Transition Metal Chemistry**, [S.L.], v. 00, n. 00, p. 00-00, 3 jan. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11243-020-00442-4>.

## APÊNDICES

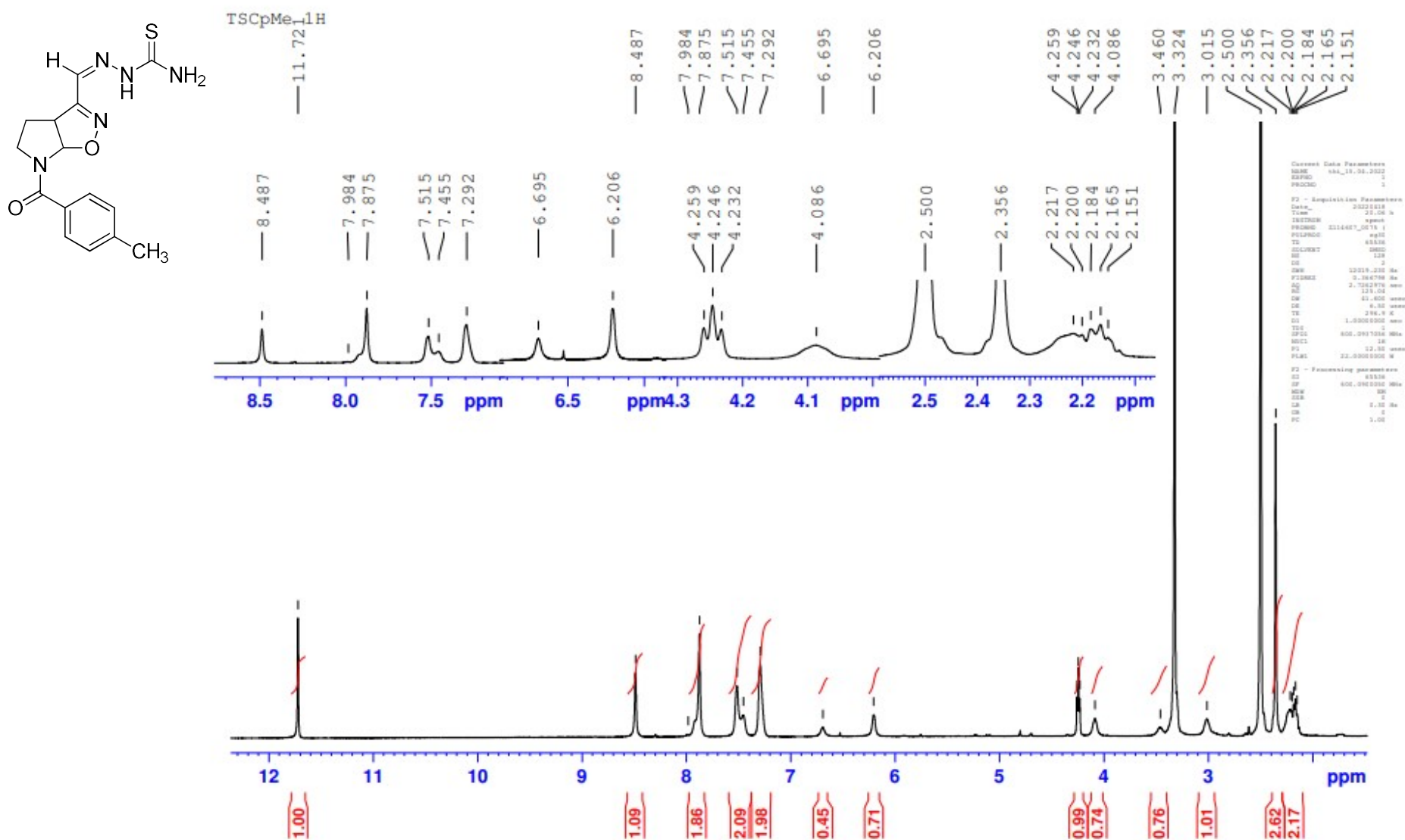
|              |                                  |
|--------------|----------------------------------|
| A – AH ..... | série híbrido isoxazolina/tiazol |
| AI – BX..... | série diaril-soxazol             |

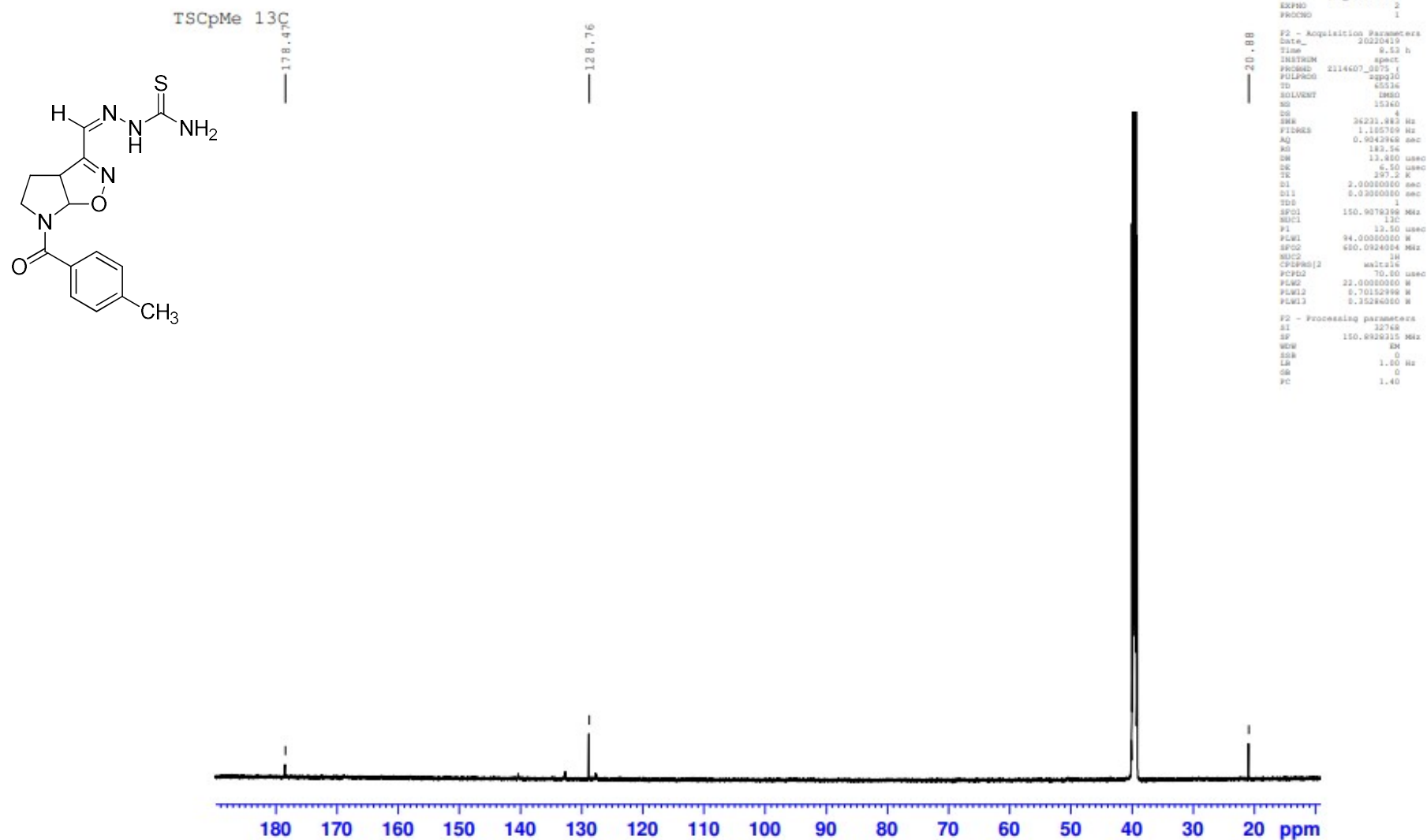
APÊNDICE A – ISOXAZOLINA/TIOSSEMICARBAZONA **83a** – RMN  $^1\text{H}$  600 MHz


APÊNDICE B – ISOXAZOLINA/TIOSSEMICARBAZONA **83a** – RMN  $^{13}\text{C}$  150 MHz

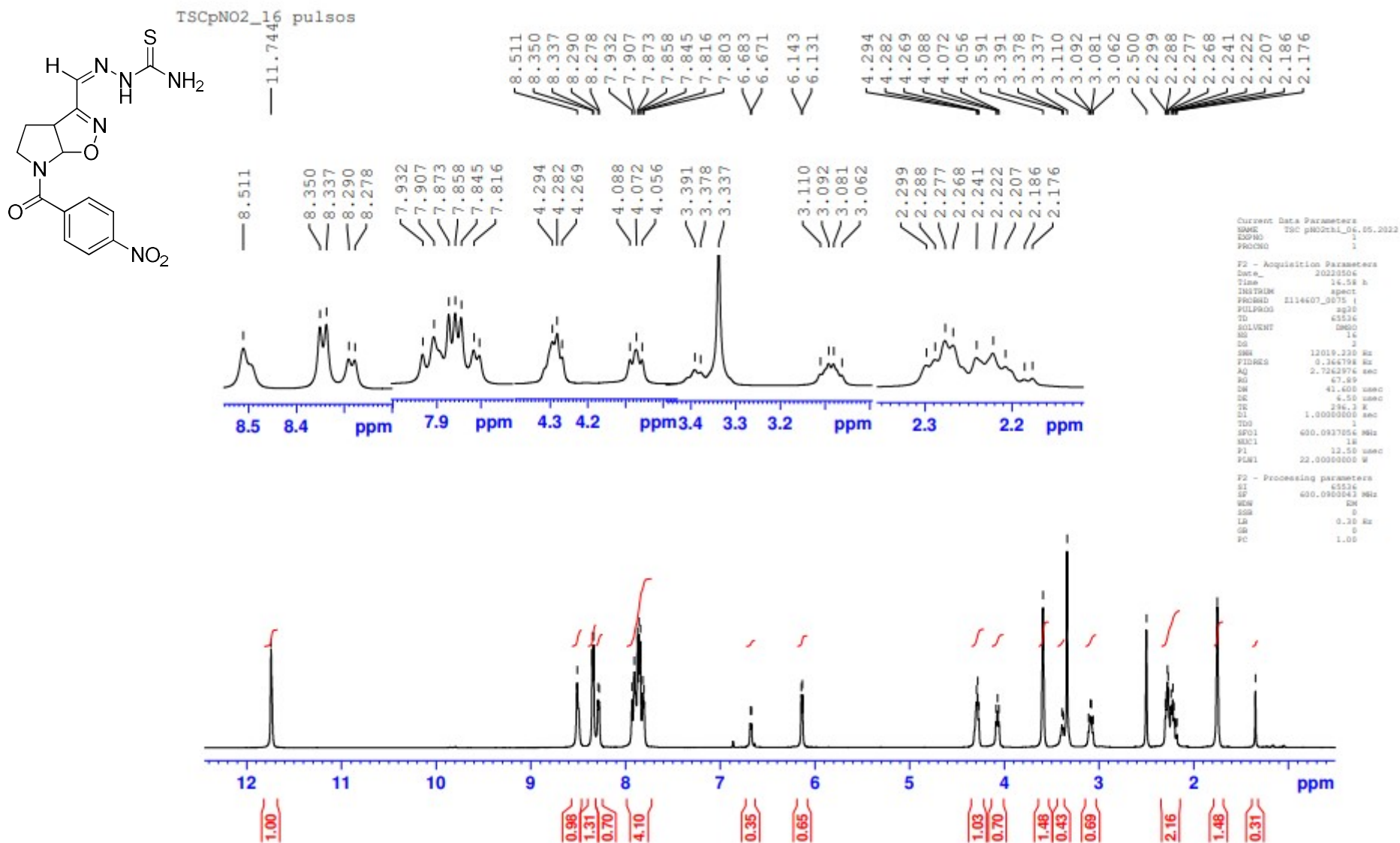


APÊNDICE C – ISOXAZOLINA/TIOSSEMICARBAZONA **83b** – RMN  $^1\text{H}$  600 MHz

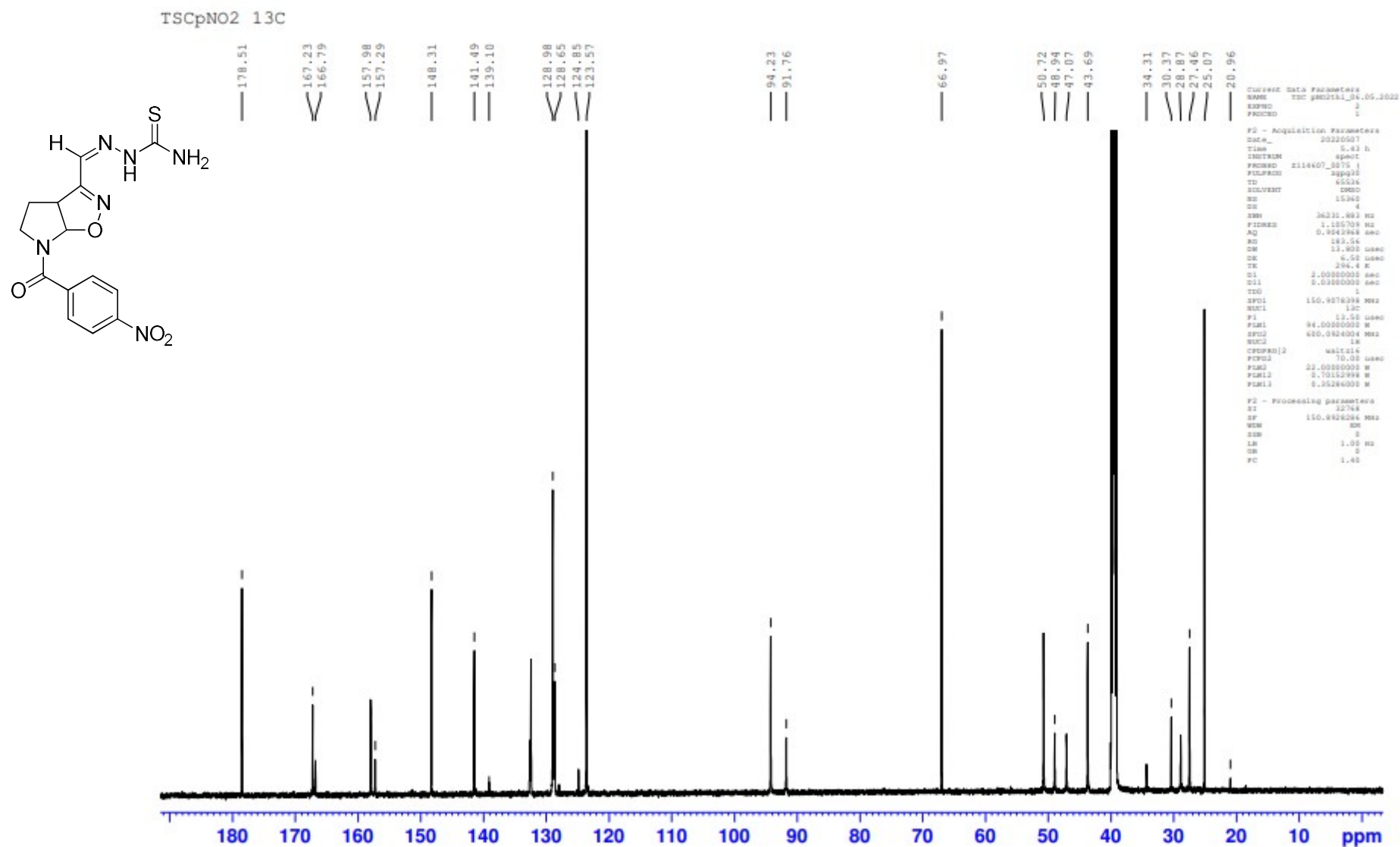


APÊNDICE D – ISOXAZOLINA/TIOSSEMICARBAZONA **83b** – RMN <sup>13</sup>C 150 MHz

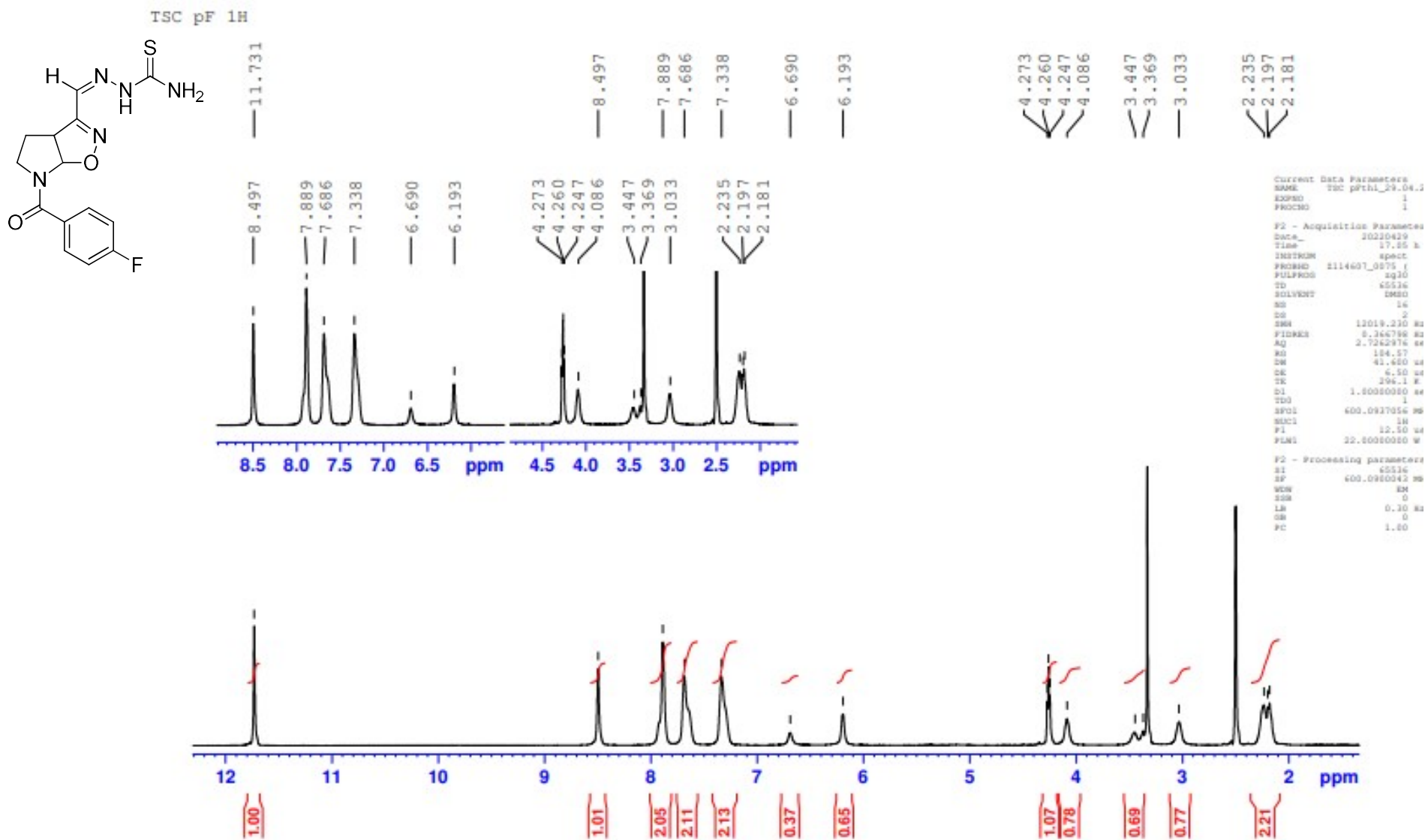
APÊNDICE E – ISOXAZOLINA/TIOSSEMICARBAZONA **83c** – RMN  $^1\text{H}$  600 MHz

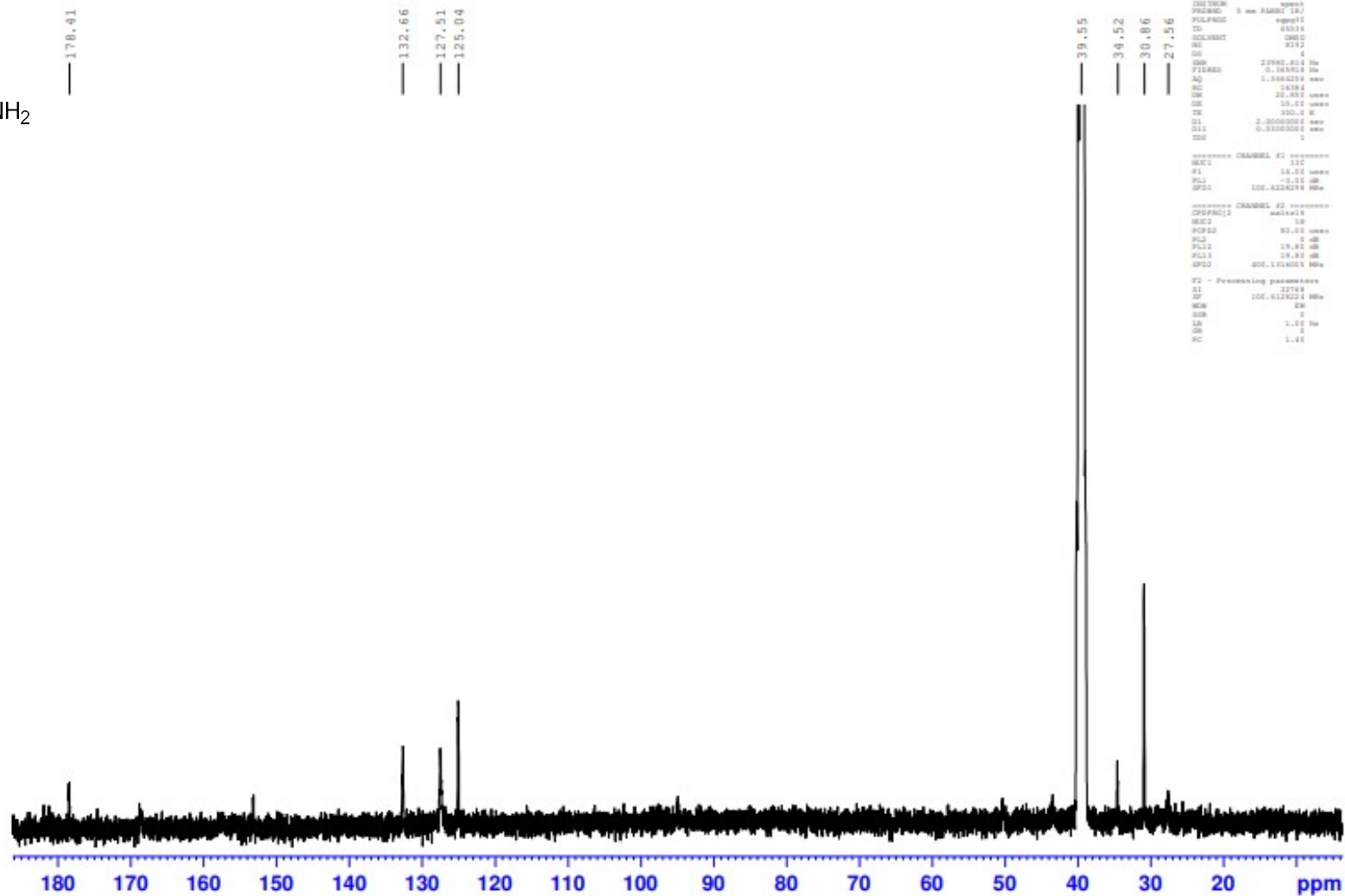
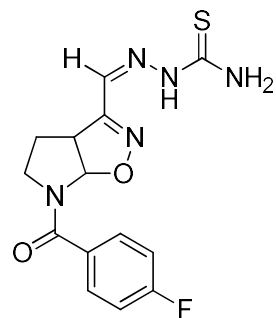


APÊNDICE F – ISOXAZOLINA/TIOSSEMICARBAZONA **83c** – RMN  $^{13}\text{C}$  150 MHz

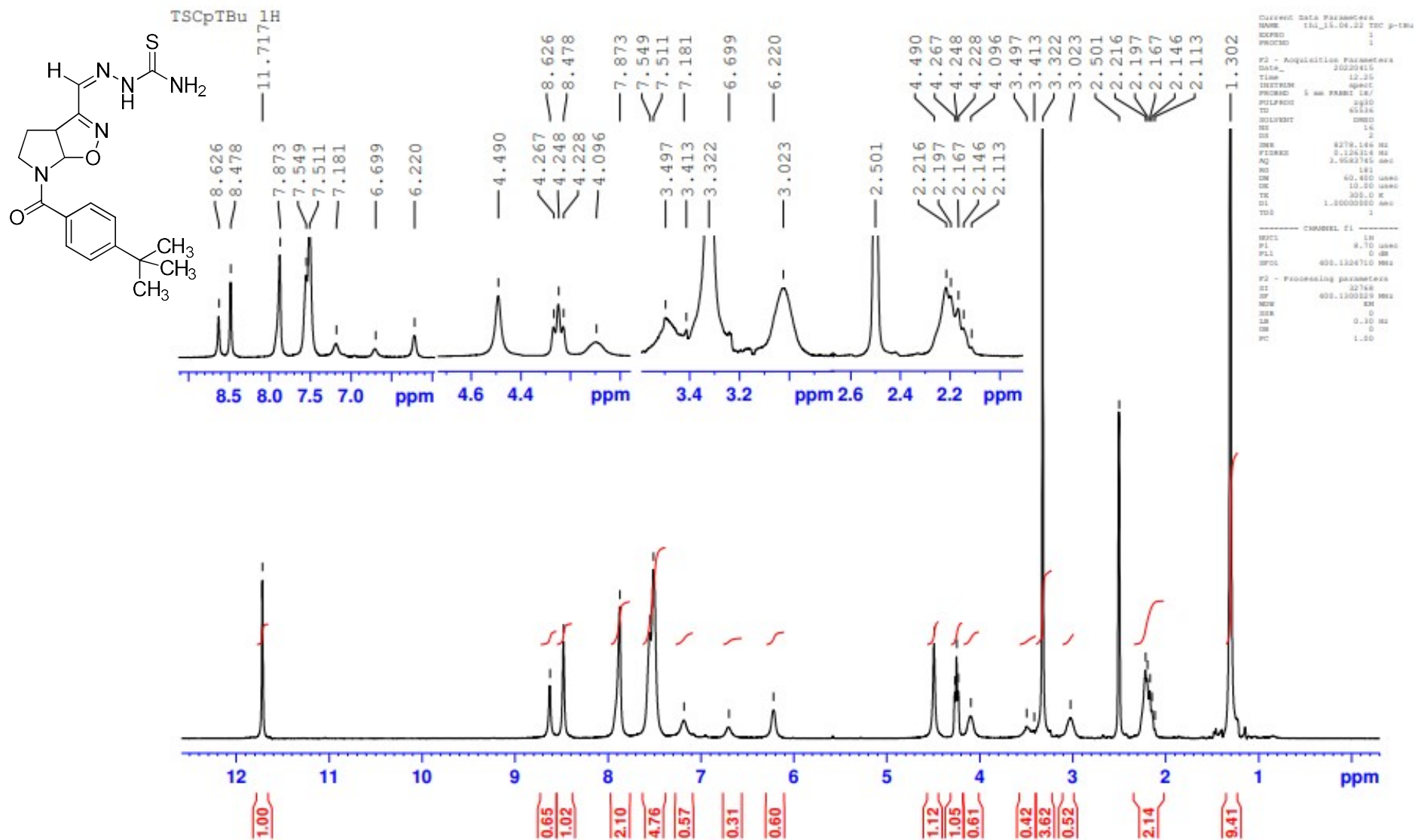


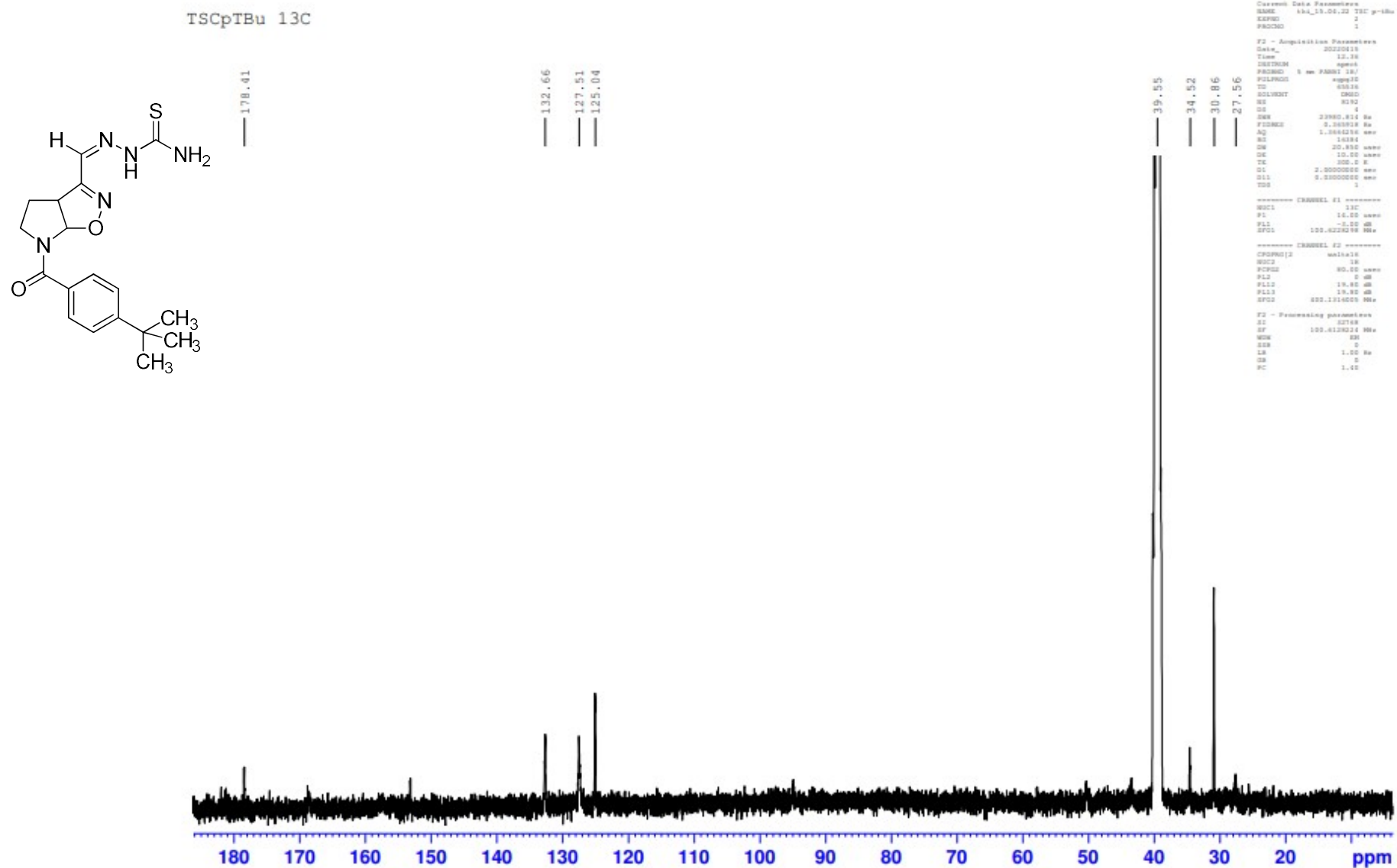
APÊNDICE G – ISOXAZOLINA/TIOSSEMICARBAZONA **83d** – RMN  $^1\text{H}$  600 MHz



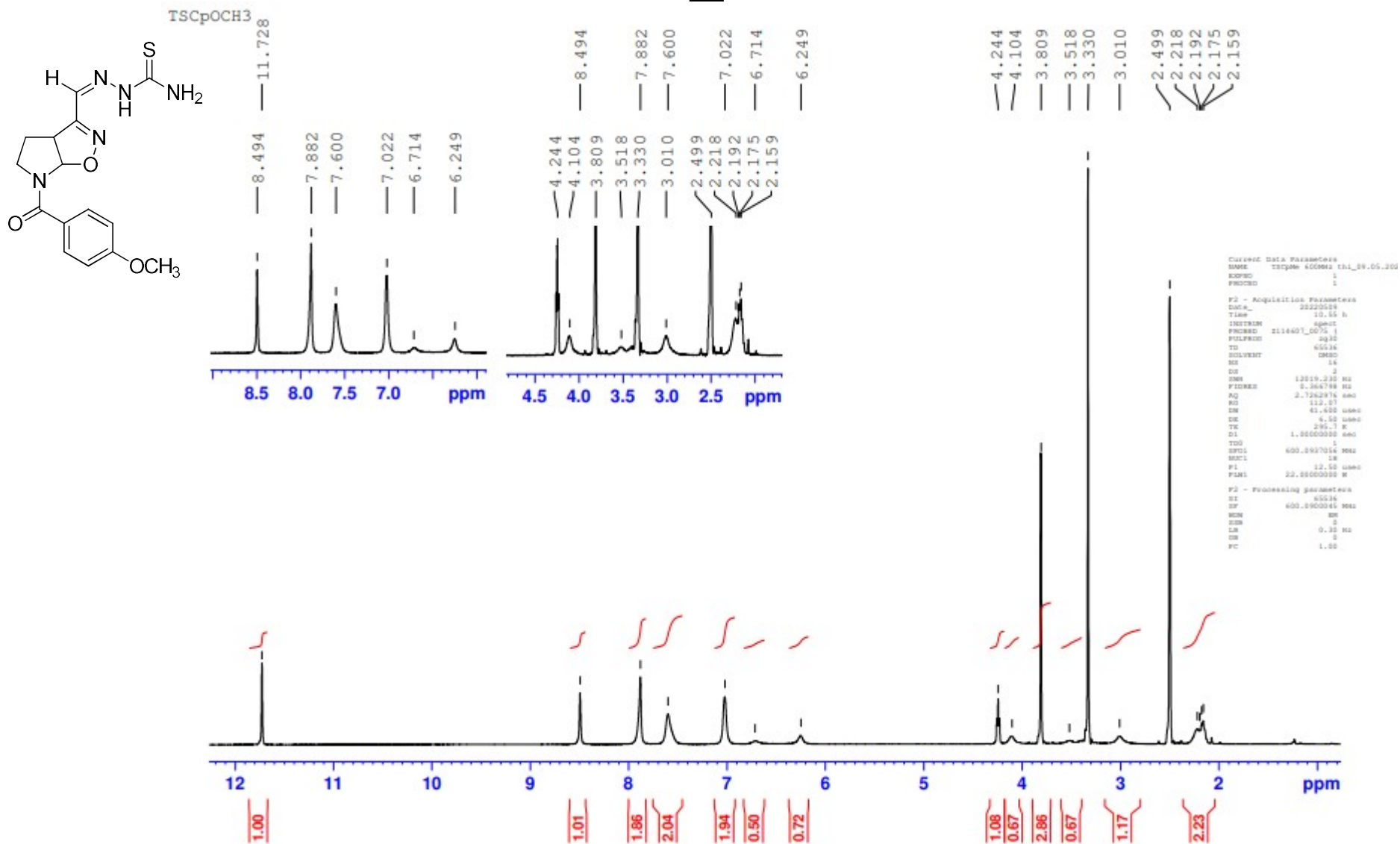
APÊNDICE H – ISOXAZOLINA/TIOSSEMICARBAZONA **83d** – RMN  $^{13}\text{C}$  150 MHzTSCpTBu  $^{13}\text{C}$ 

APÊNDICE I – ISOXAZOLINA/TIOSSEMICARBAZONA **83e** – RMN  $^1\text{H}$  600 MHz

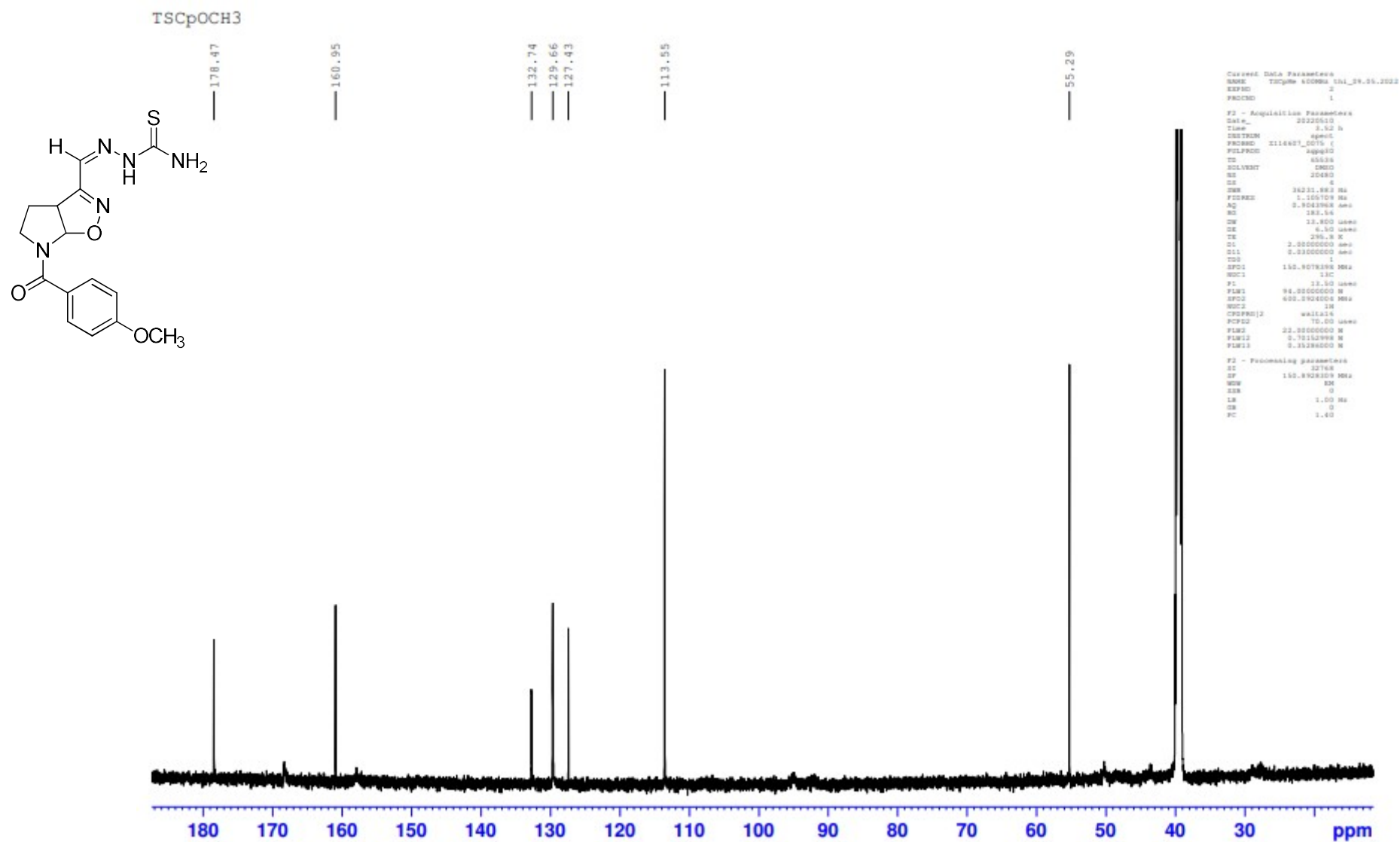


APÊNDICE J – ISOXAZOLINA/TIOSSEMICARBAZONA **83e** – RMN  $^{13}\text{C}$  150 MHz

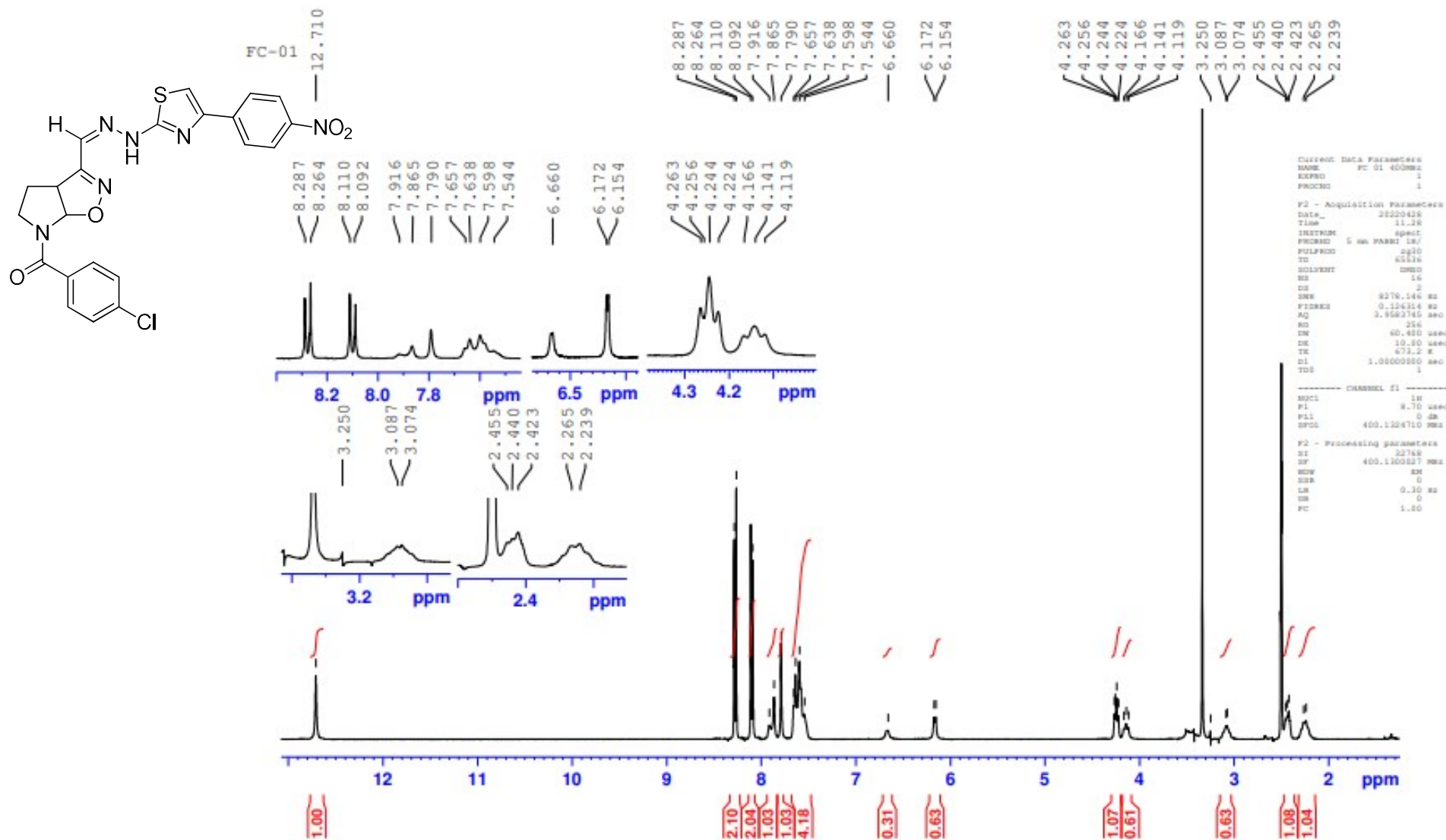
APÊNDICE K – ISOXAZOLINA/TIOSSEMICARBAZONA **83f** – RMN  $^1\text{H}$  600 MHz



APÊNDICE L – ISOXAZOLINA/TIOSSEMICARBAZONA **83f** – RMN  $^{13}\text{C}$  150 MHz

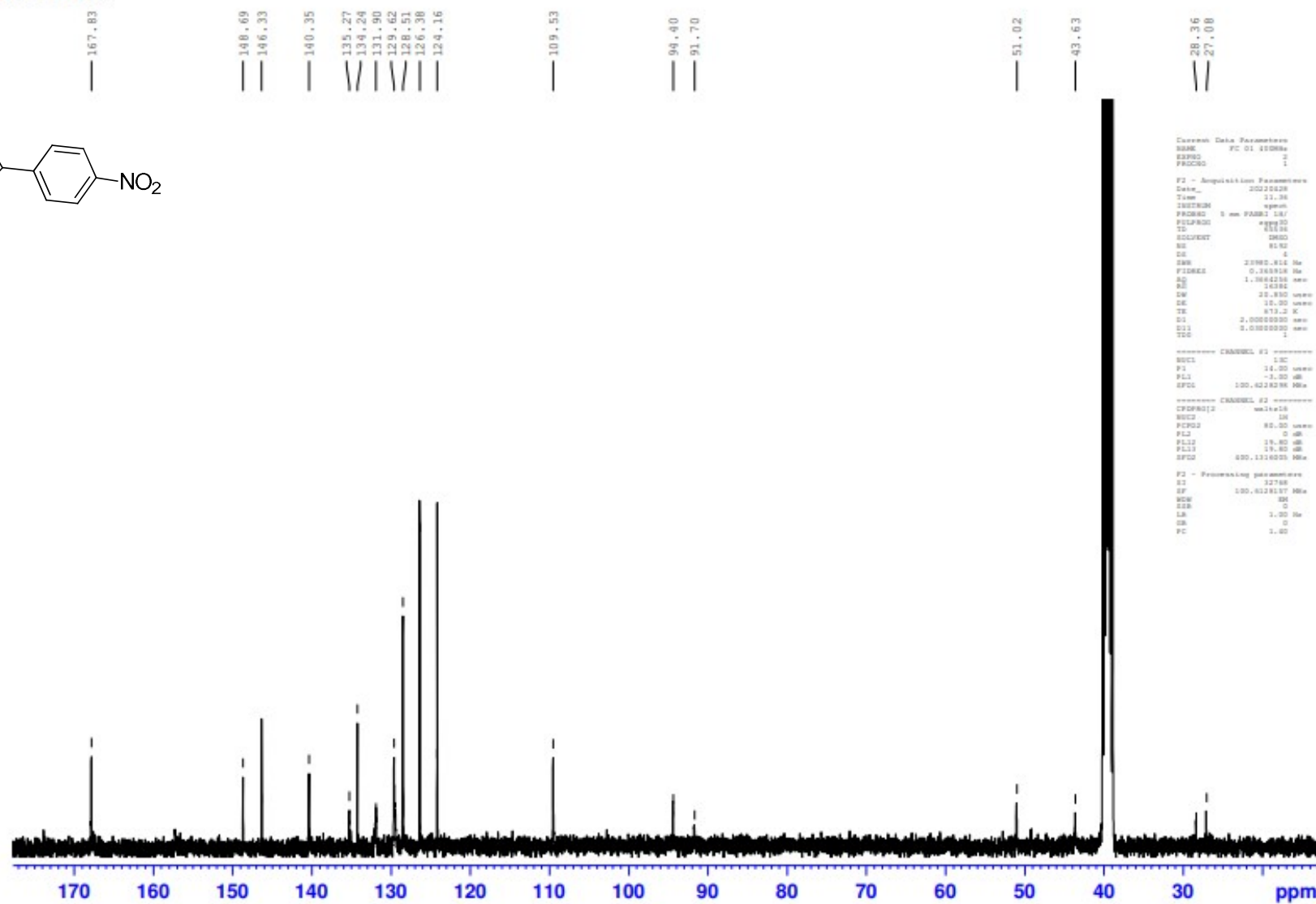
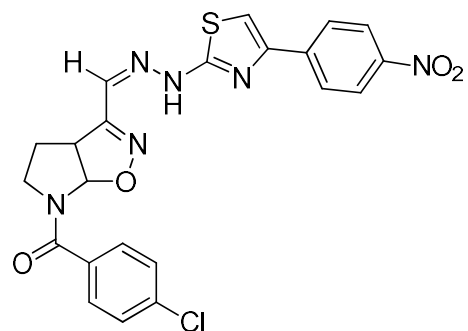


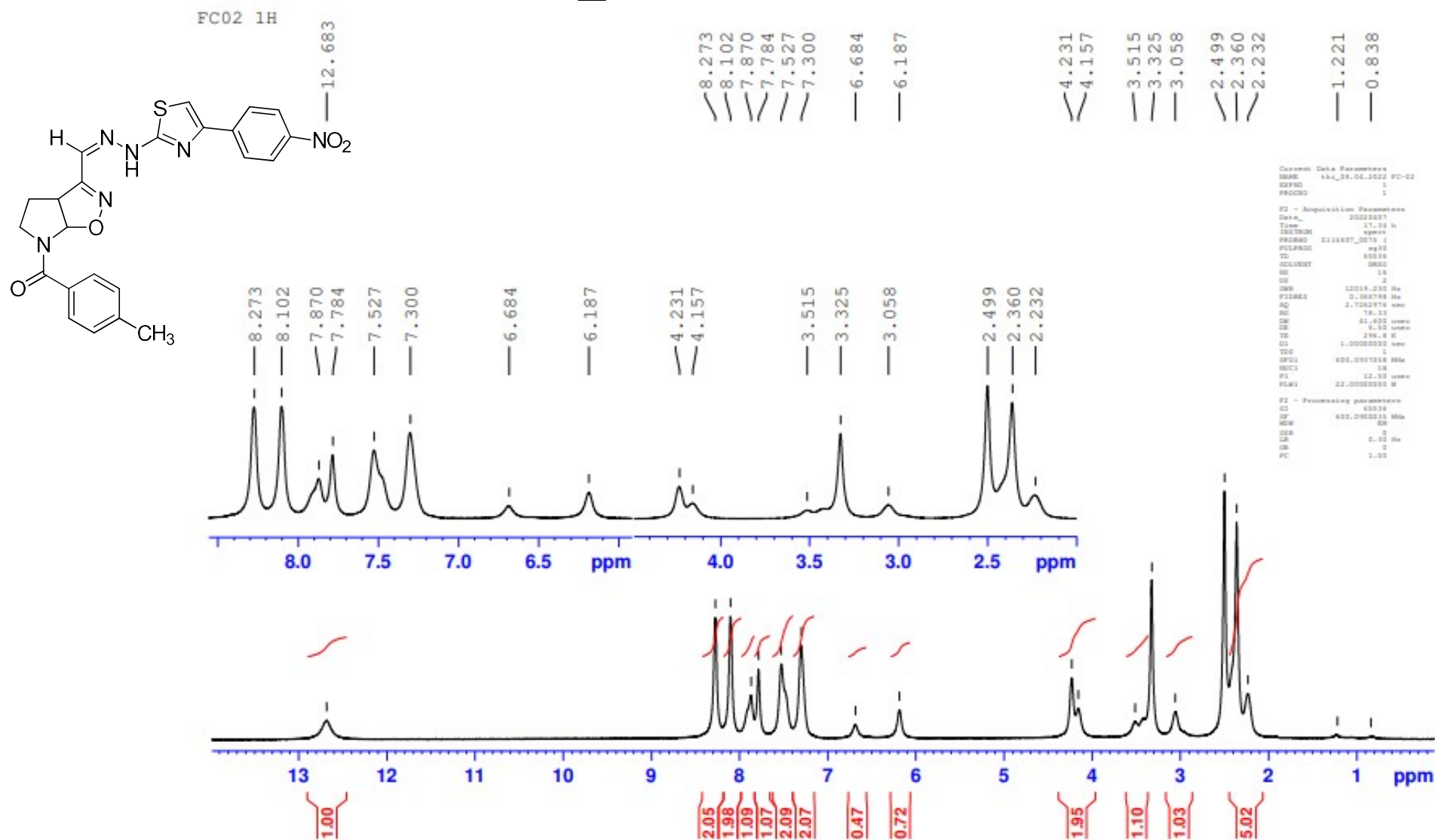
APÊNDICE M – HÍBRIDO ISOXAZOLINA/TIAZOL **4a** – RMN  $^1\text{H}$  600 MHz



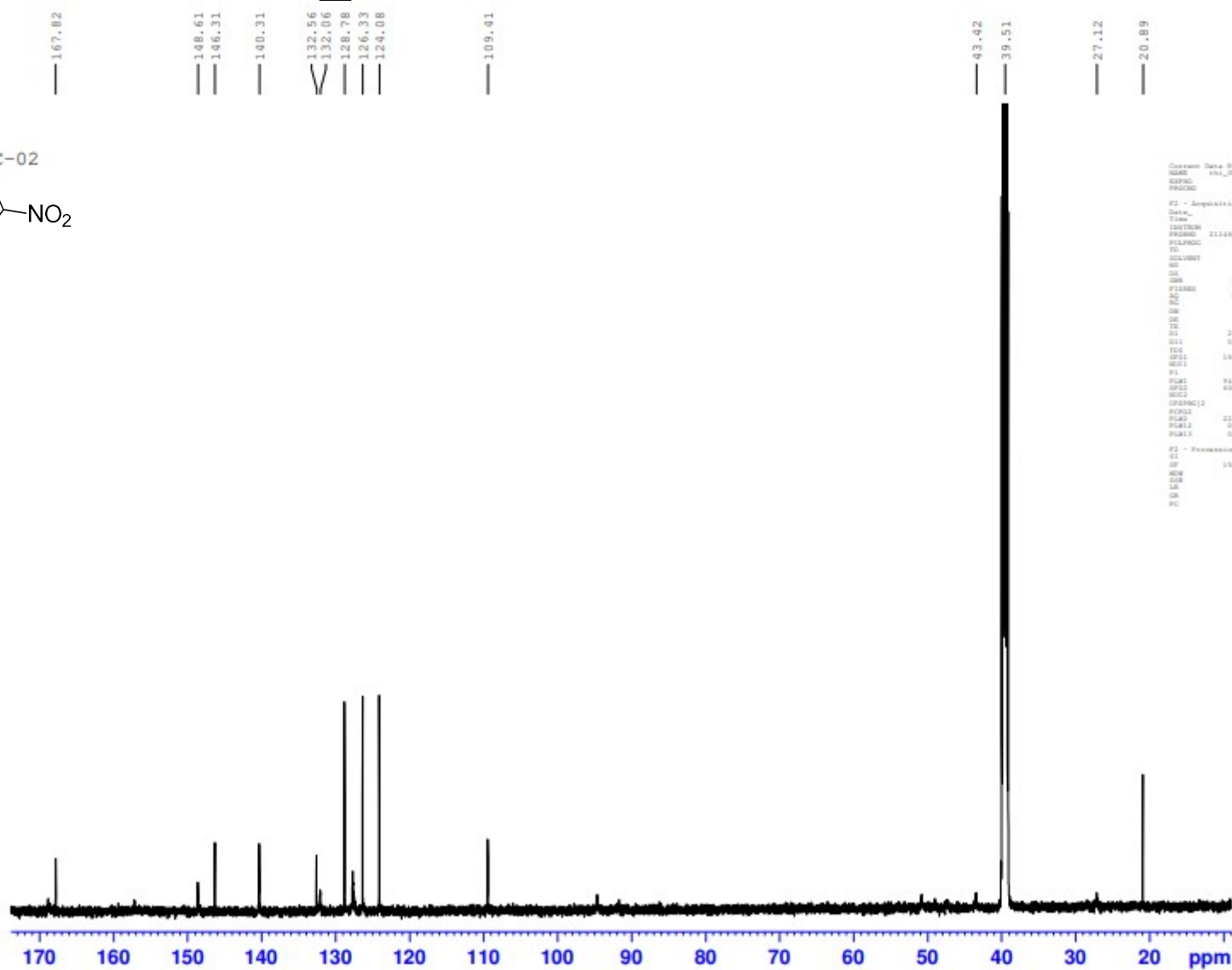
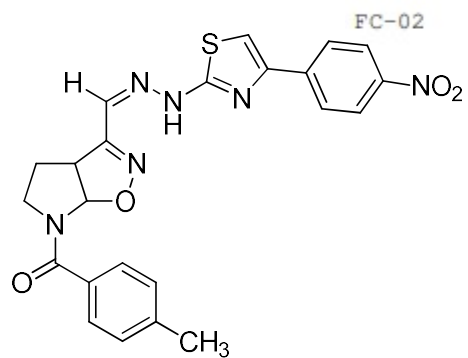
APÊNDICE N – HÍBRIDO ISOXAZOLINA/TIAZOL **4a** – RMN  $^{13}\text{C}$  150 MHz

FC-01  $^{13}\text{C}$



APÊNDICE O – HÍBRIDO ISOXAZOLINA/TIAZOL **4b** – RMN  $^1\text{H}$  600 MHz


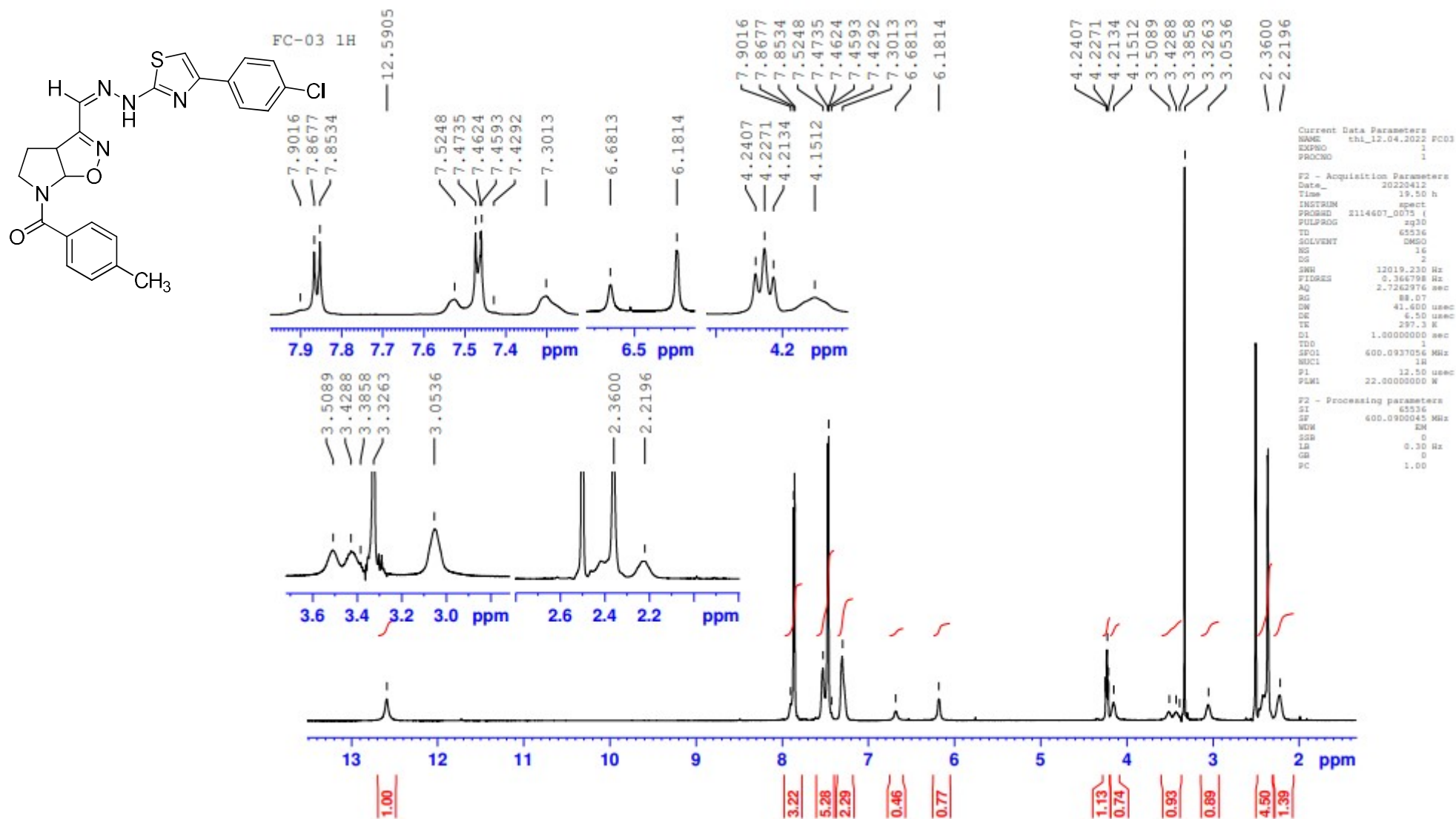
APÊNDICE P – HÍBRIDO ISOXAZOLINA/TIAZOL **4b** – RMN  $^{13}\text{C}$  150 MHz



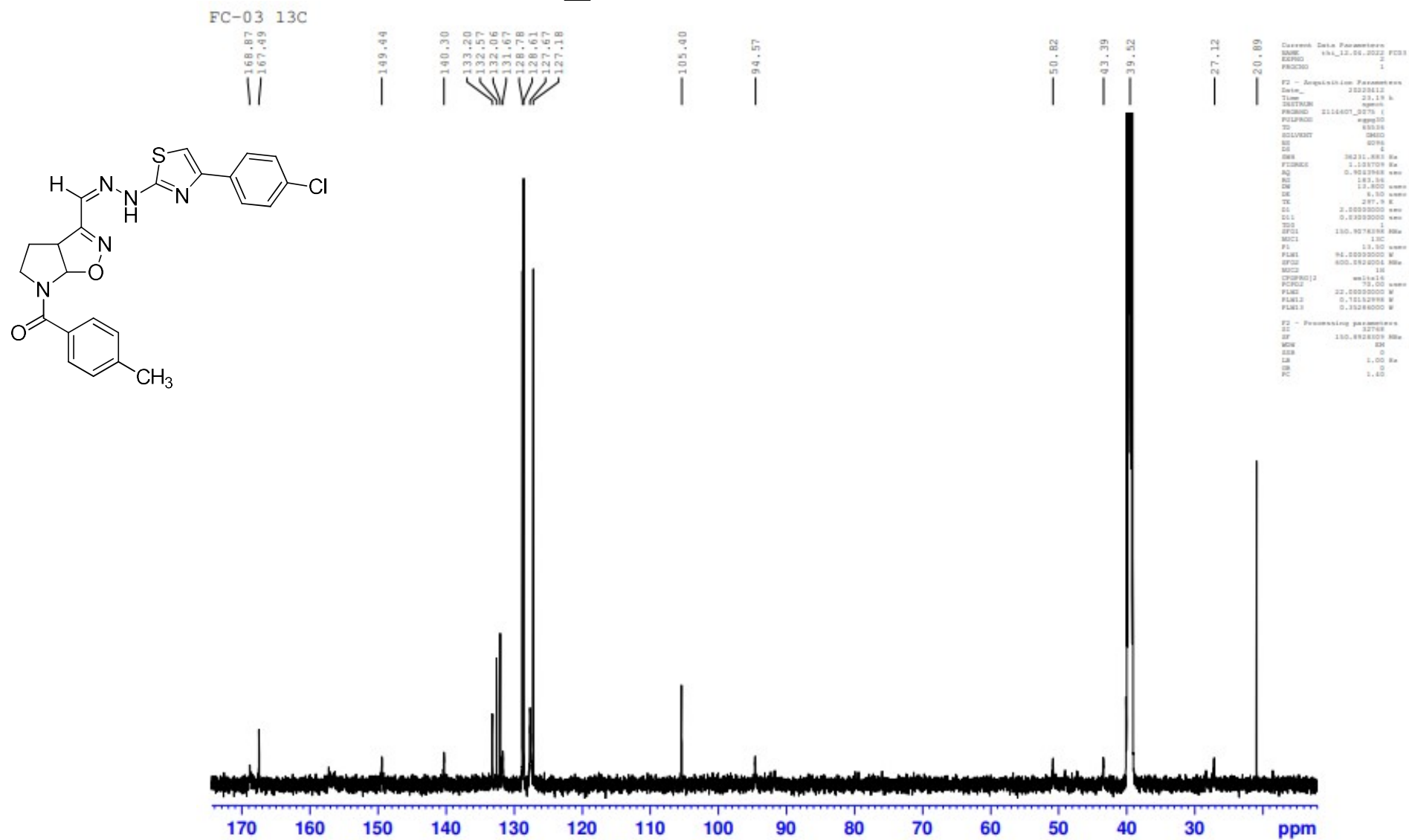
Current Data Parameters  
NAME: 4b\_01\_01\_2022 FC-02  
EXPNO: 2  
PROCNO: 1

F2 - Acquisition Parameters  
Date\_: 20220101  
Time: 22.58  
INSTRUM: spect  
PROBHD: 51401-015  
PULPROG: zgpg30  
TD: 65536  
SOLVENT: CDCl3  
NS: 4096  
DS: 4  
SWH: 16231.840 Hz  
F2FREQ: 125.761500 MHz  
NUC1: 13C  
NUC2: 1H  
DE: 15.00000000 MHz  
SE: 6.50000000 MHz  
TE: 300.2 K  
D1: 2.000000000 sec  
D11: 0.250000000 sec  
TD0: 1  
AQ1: 1.00.0078196 MHz  
AQ2: 1.00  
F1: 125.761500 MHz  
F1A1: 92.00000000 MHz  
F1A2: 800.00000000 MHz  
F1A3: 0.00000000 MHz  
CPDPRG2: waltz16  
PCPD1: 15.00000000 MHz  
PCPD2: 22.00000000 MHz  
PCPD3: 0.76000000 MHz  
PCPD4: 0.00000000 MHz

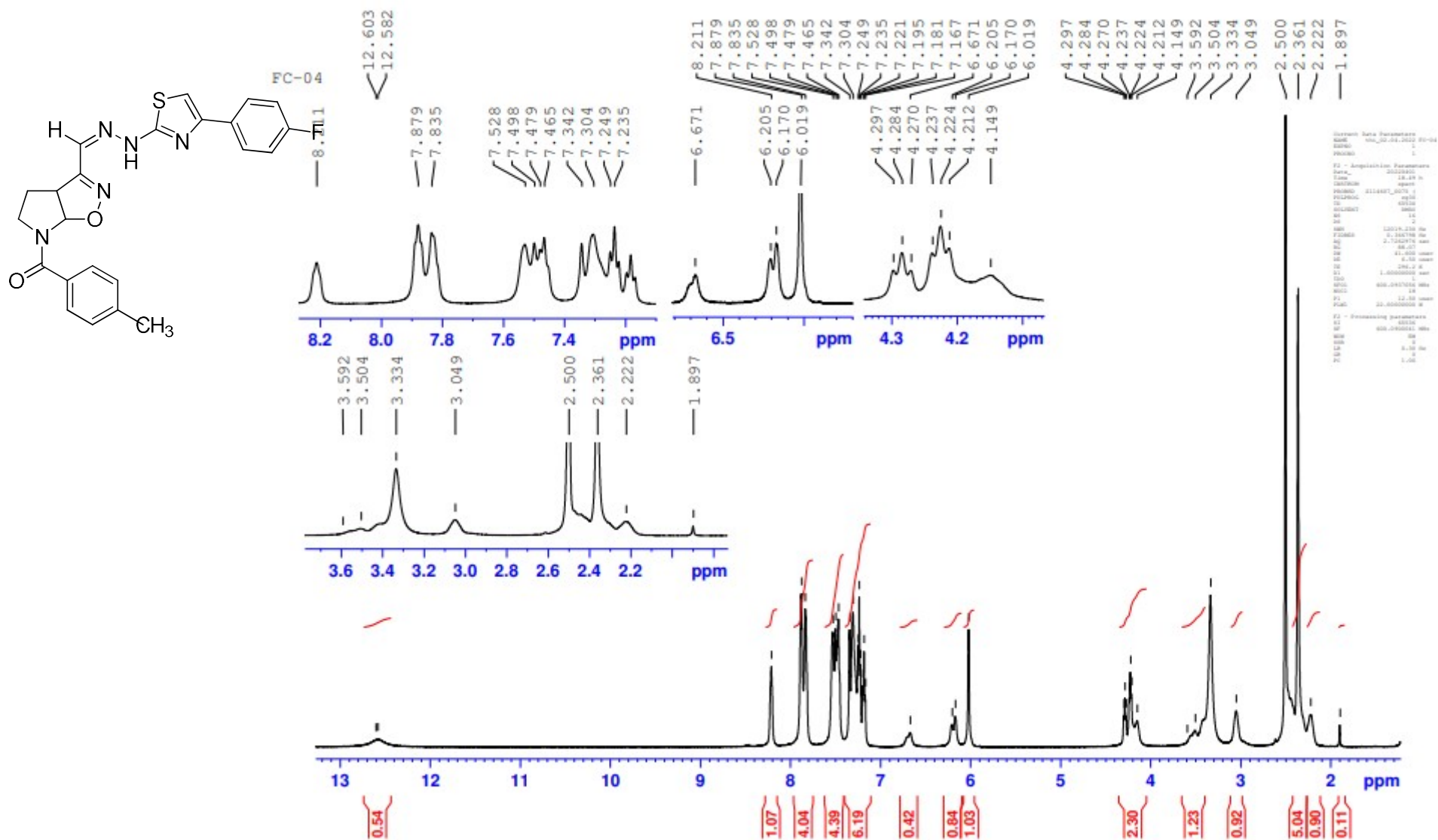
F2 - Processing parameters  
SI: 32768  
SF: 125.7615000 MHz  
WDW: EM  
SSB: 0  
LB: 1.00 Hz  
GB: 0  
PC: 0.00

APÊNDICE Q – HÍBRIDO ISOXAZOLINA/TIAZOL **4c** – RMN  $^1\text{H}$  600 MHz

APÊNDICE R – HÍBRIDO ISOXAZOLINA/TIAZOL **4c** – RMN  $^{13}\text{C}$  150 MHz

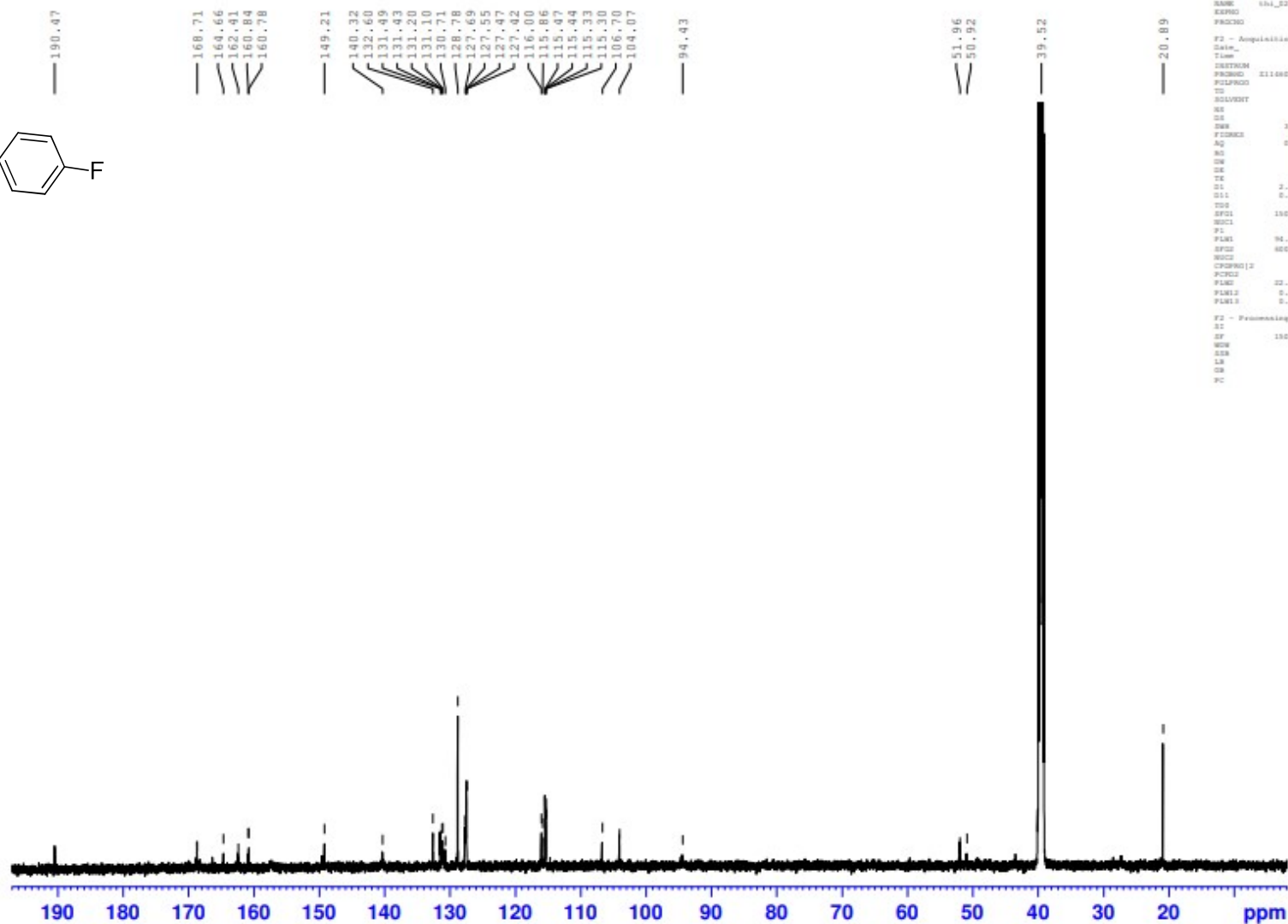
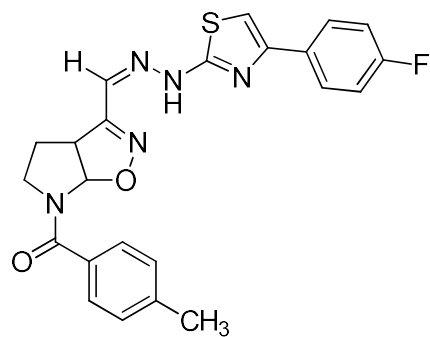


APÊNDICE S – HÍBRIDO ISOXAZOLINA/TIAZOL **4d** – RMN  $^1\text{H}$  600 MHz

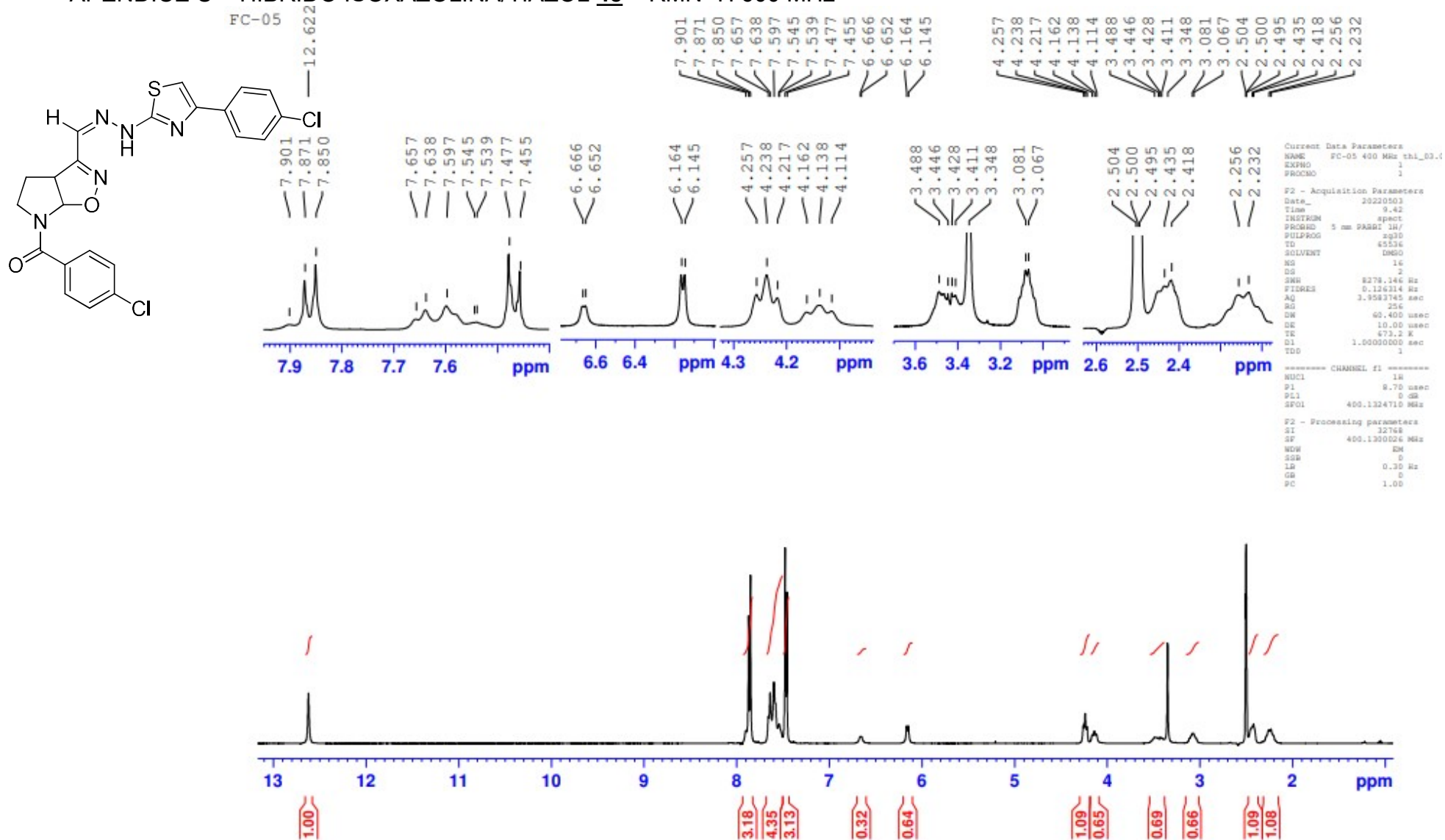


APÊNDICE T – HÍBRIDO ISOXAZOLINA/TIAZOL **4d** – RMN  $^{13}\text{C}$  150 MHz

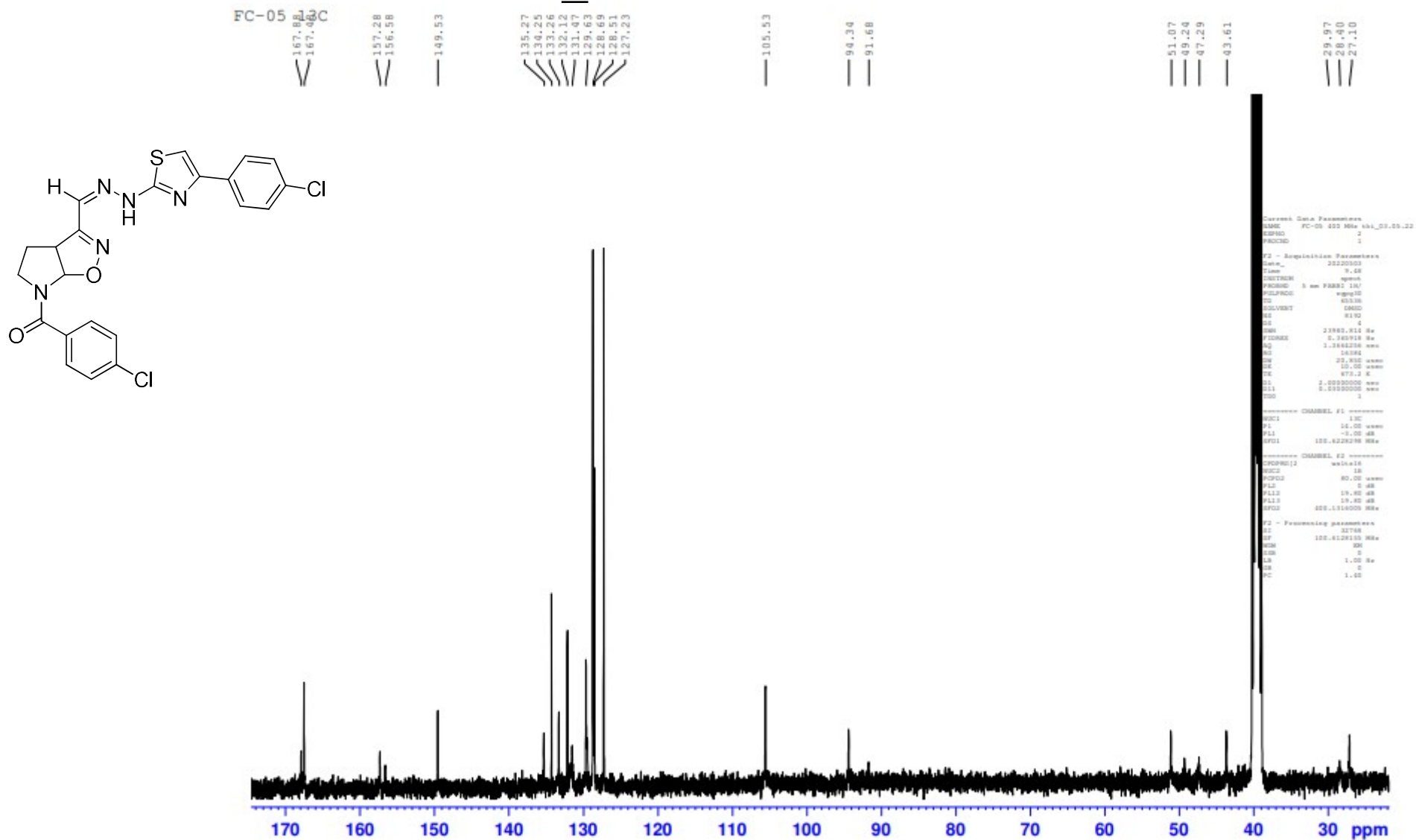
FC-04  $^{13}\text{C}$

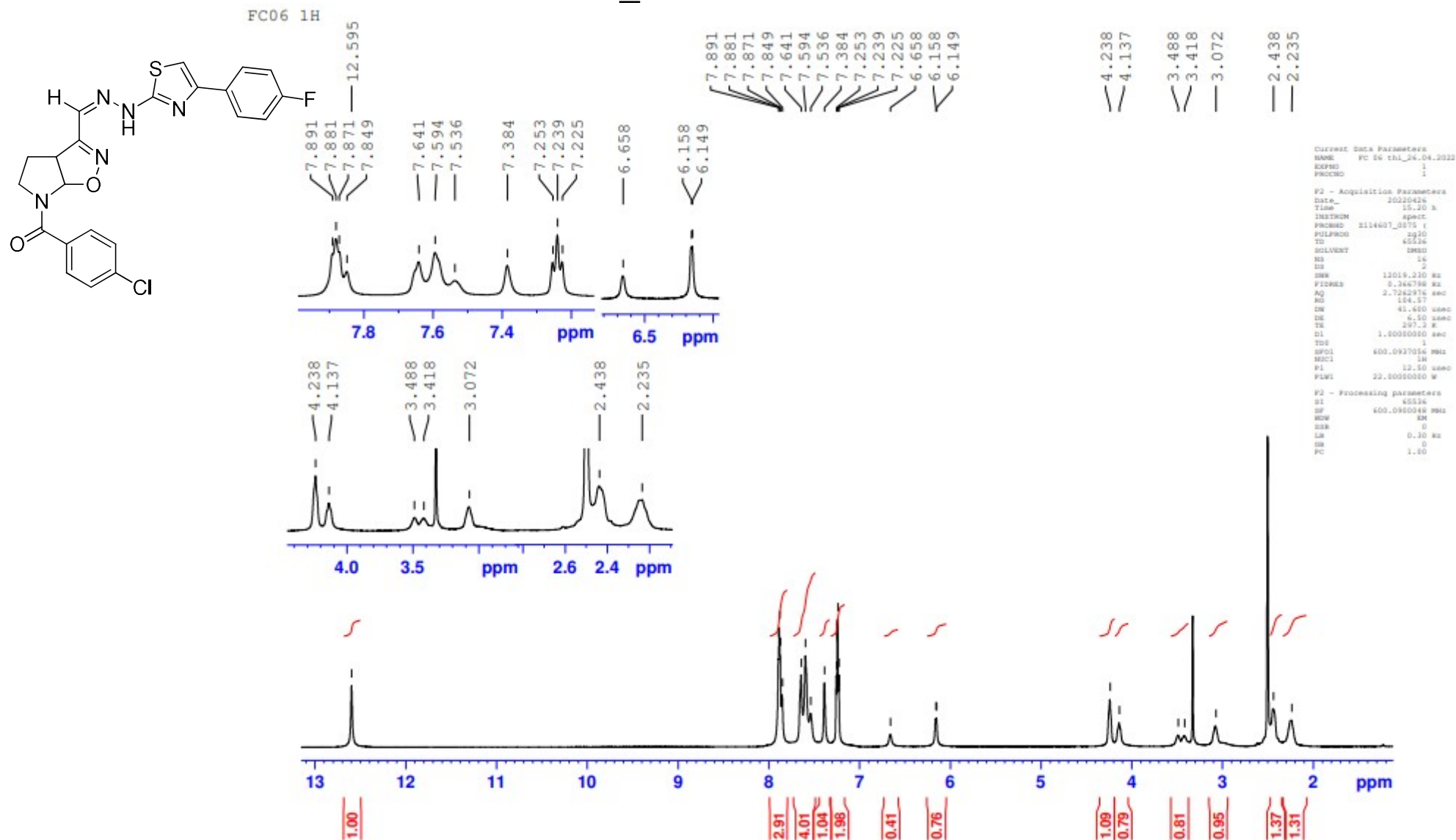


APÊNDICE U – HÍBRIDO ISOXAZOLINA/TIAZOL **4e** – RMN  $^1\text{H}$  600 MHz

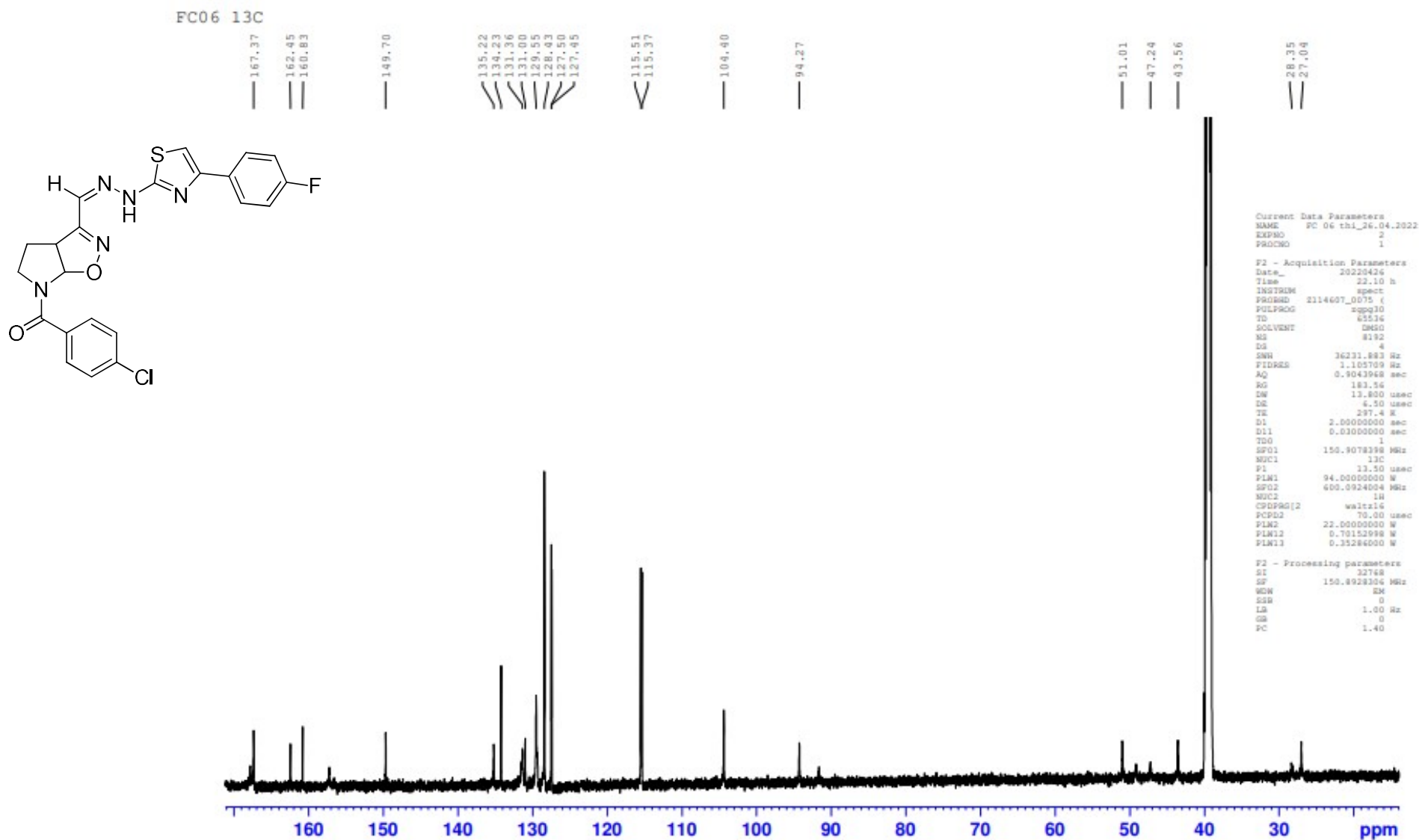


APÊNDICE V – HÍBRIDO ISOXAZOLINA/TIAZOL **4e** – RMN  $^{13}\text{C}$  150 MHz

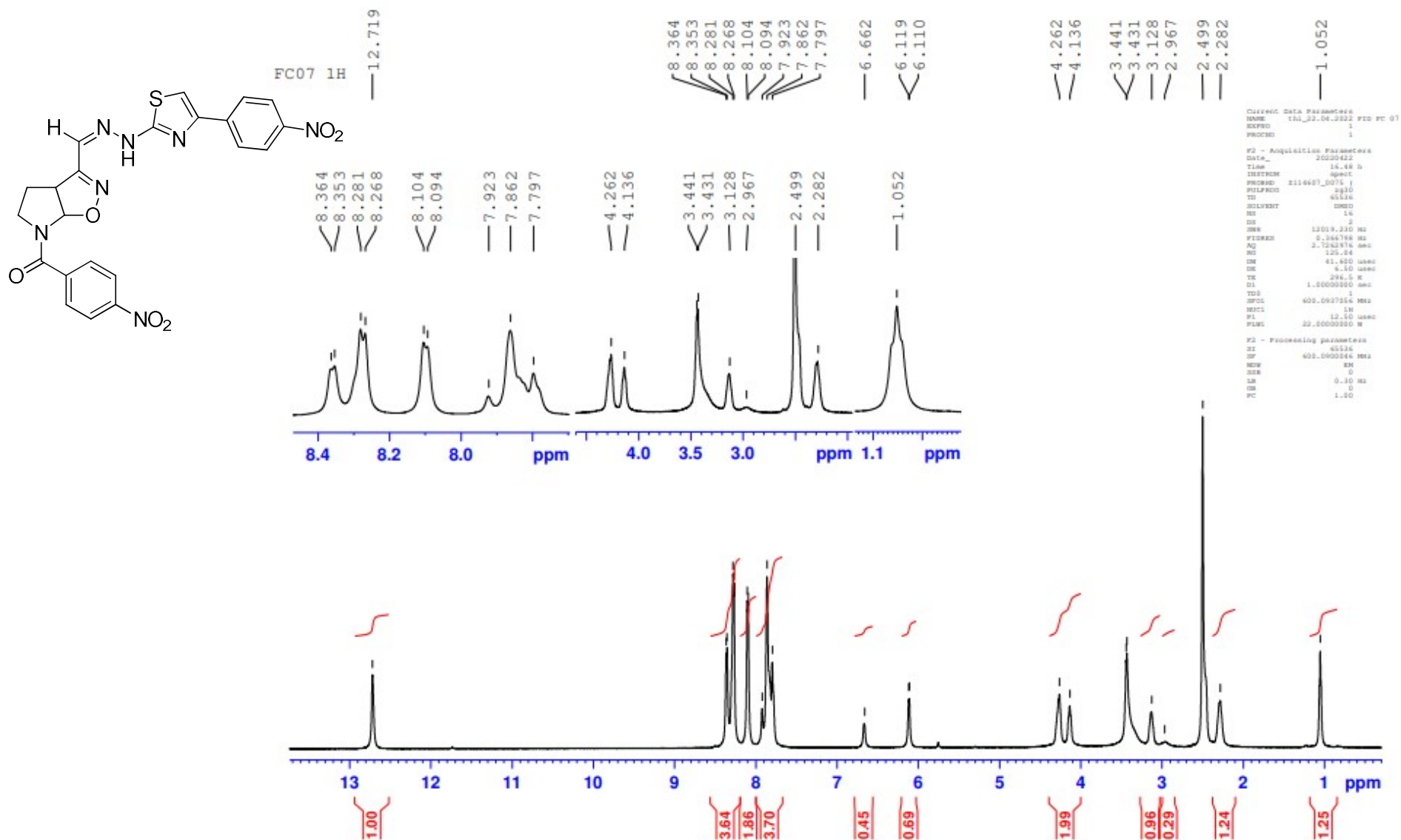


APÊNDICE W – HÍBRIDO ISOXAZOLINA/TIAZOL **4f** – RMN  $^1\text{H}$  600 MHz

APÊNDICE X – HÍBRIDO ISOXAZOLINA/TIAZOL **4f** – RMN  $^{13}\text{C}$  150 MHz

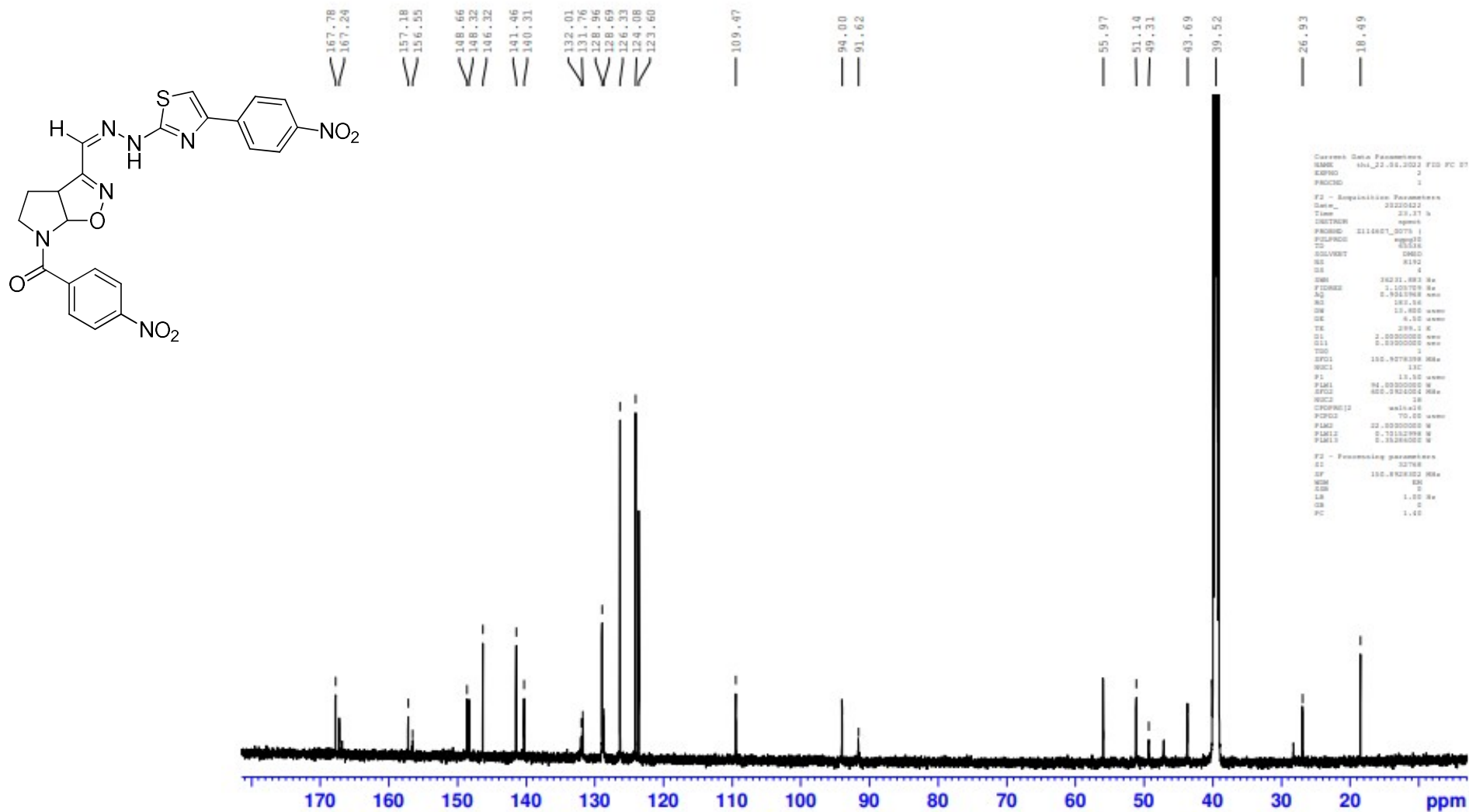


APÊNDICE Y – HÍBRIDO ISOXAZOLINA/TIAZOL **4g** – RMN  $^1\text{H}$  600 MHz

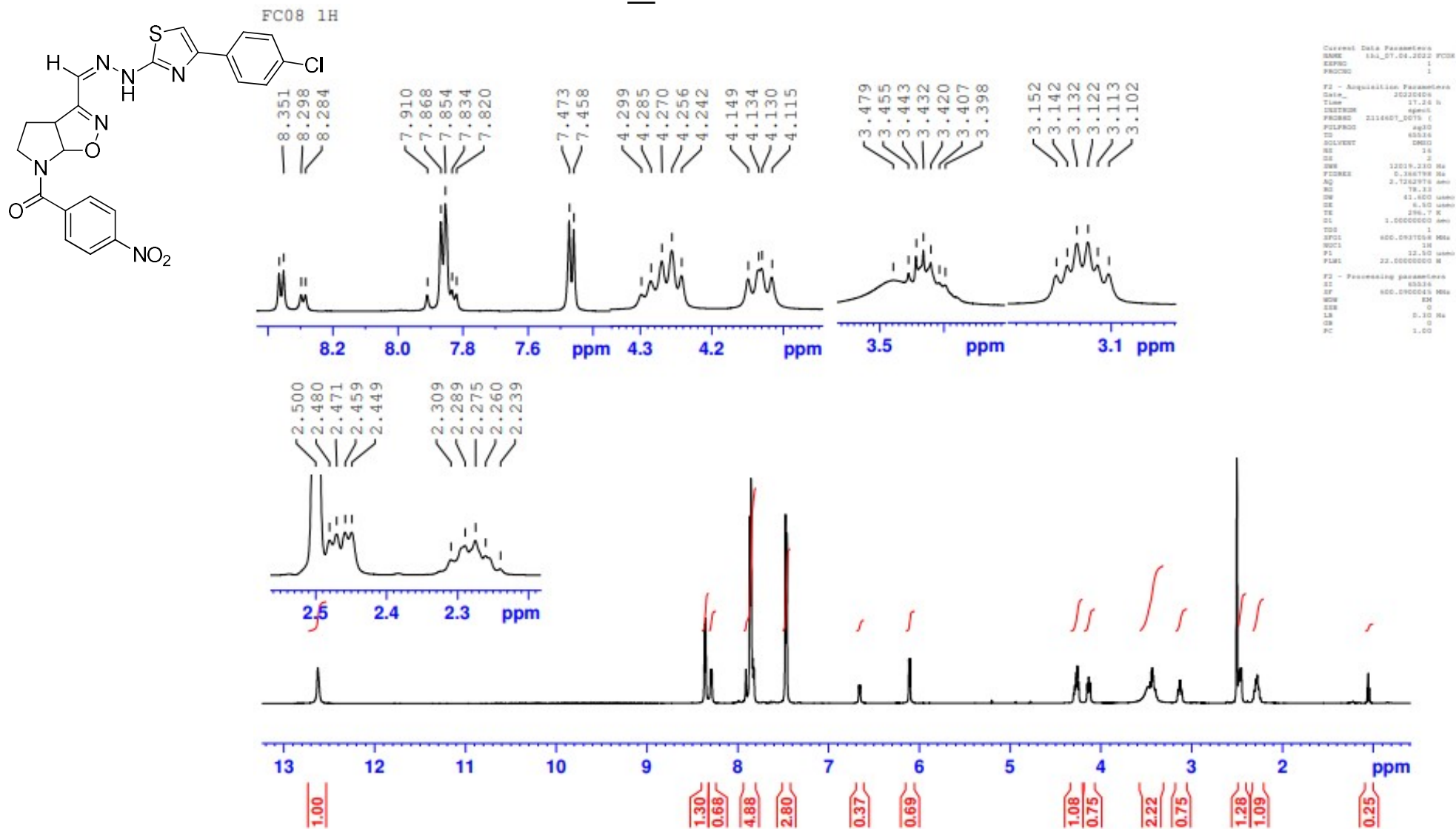


APÊNDICE Z – HÍBRIDO ISOXAZOLINA/TIAZOL **4g** – RMN  $^{13}\text{C}$  150 MHz

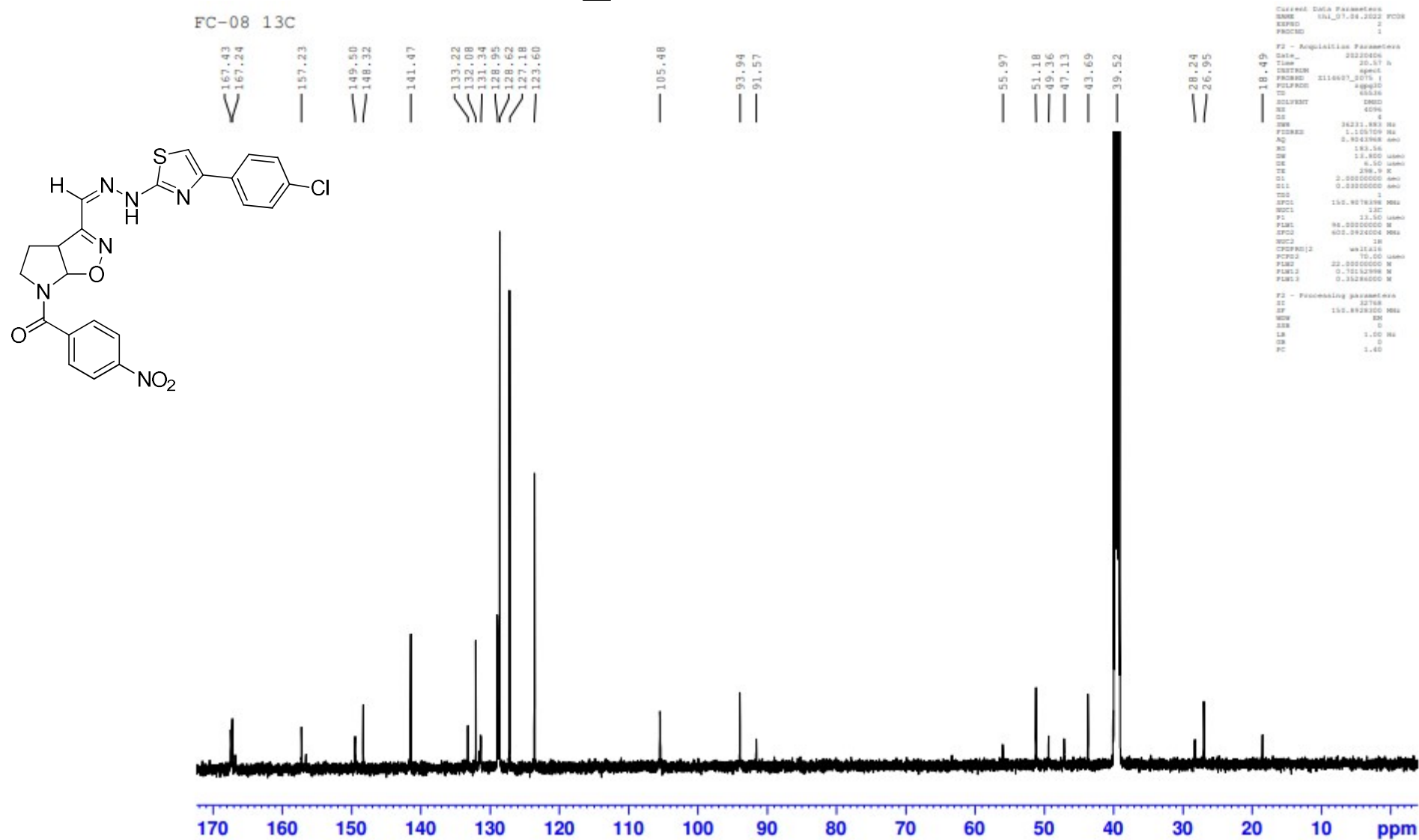
FC07 13C



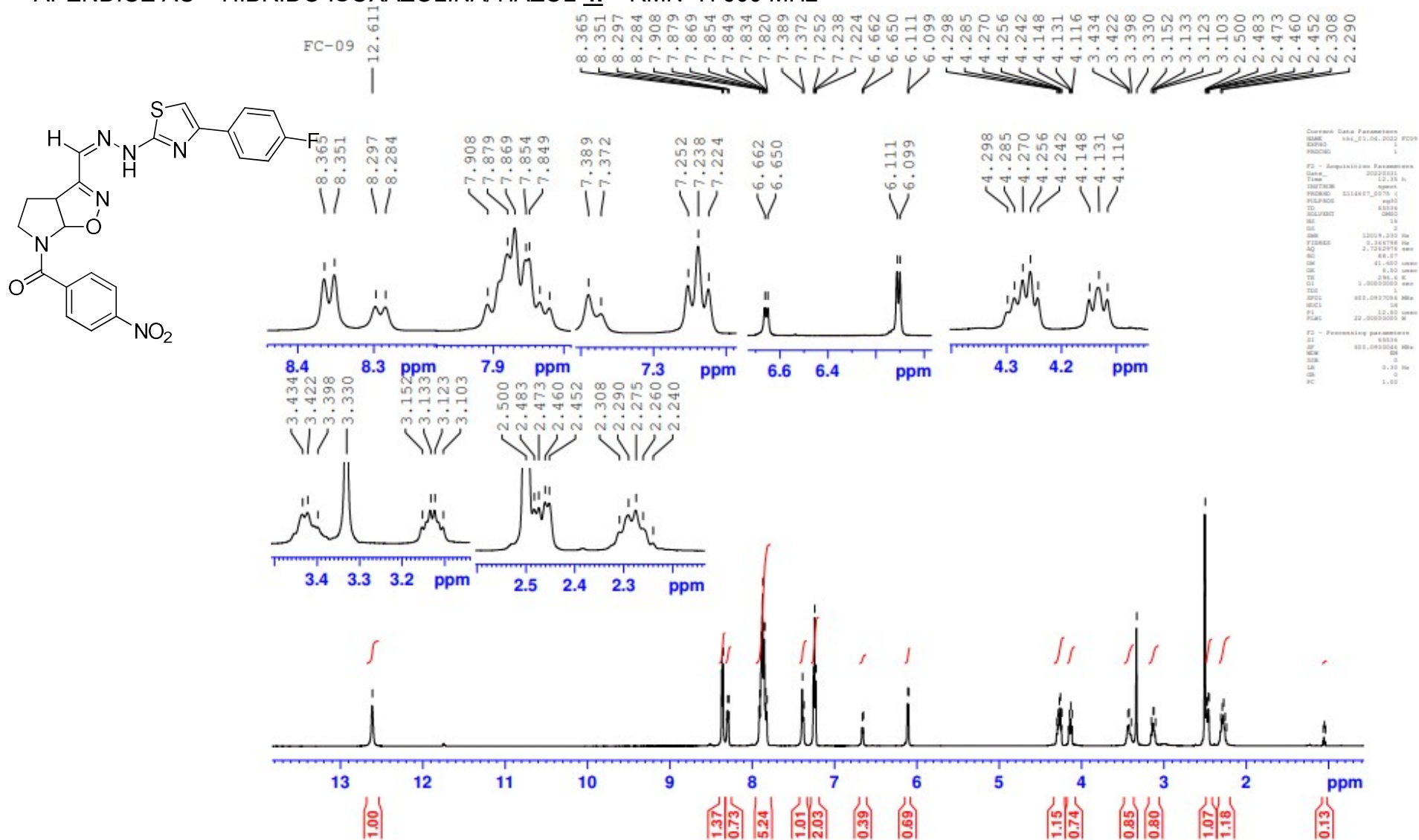
APÊNDICE AA – HÍBRIDO ISOXAZOLINA/TIAZOL **4h** – RMN  $^1\text{H}$  600 MHz



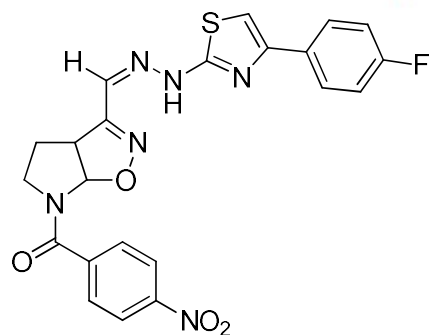
APÊNDICE AB – HÍBRIDO ISOXAZOLINA/TIAZOL **4h** – RMN  $^{13}\text{C}$  150 MHz



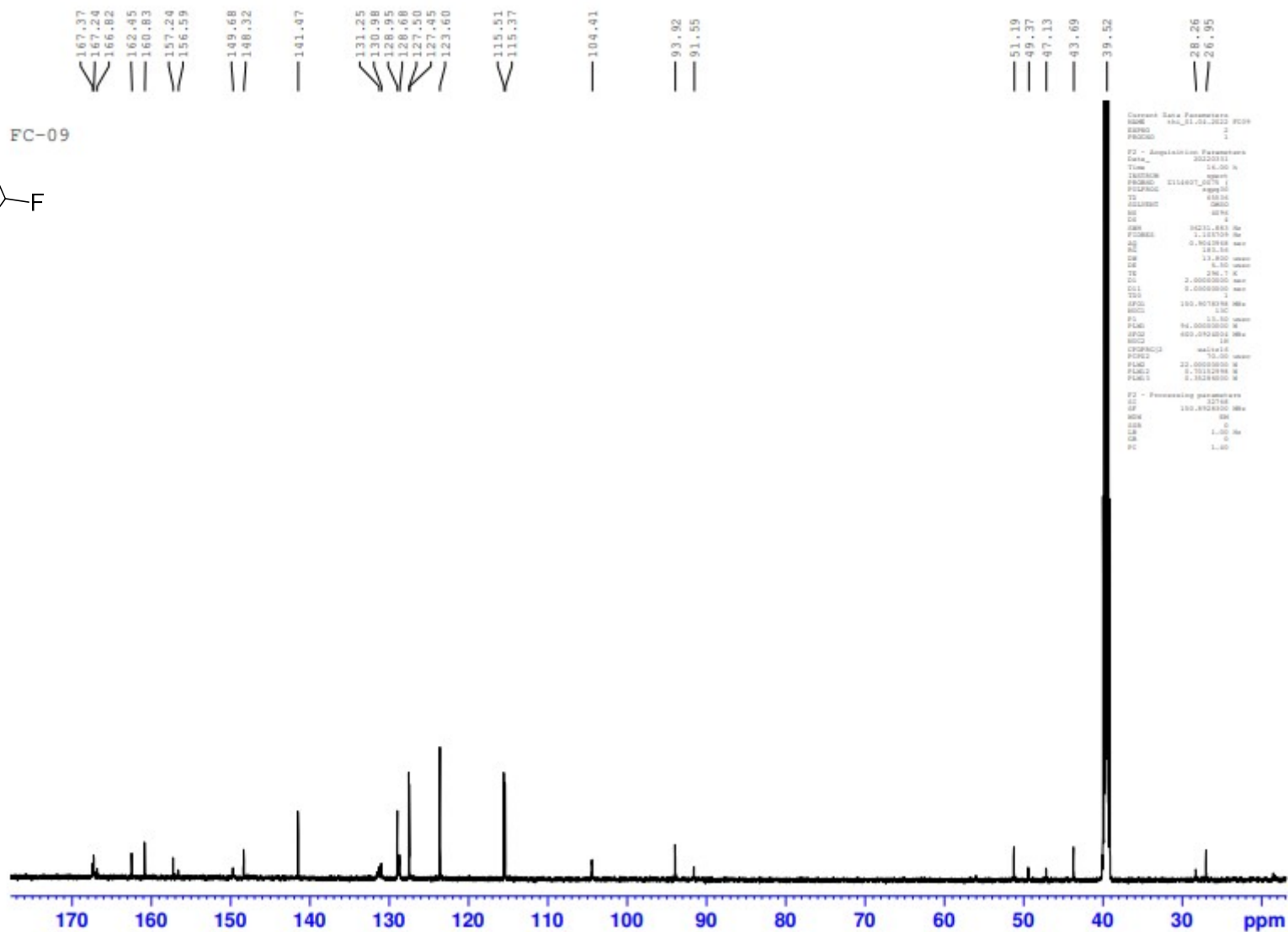
APÊNDICE AC – HÍBRIDO ISOXAZOLINA/TIAZOL **4i** – RMN  $^1\text{H}$  600 MHz



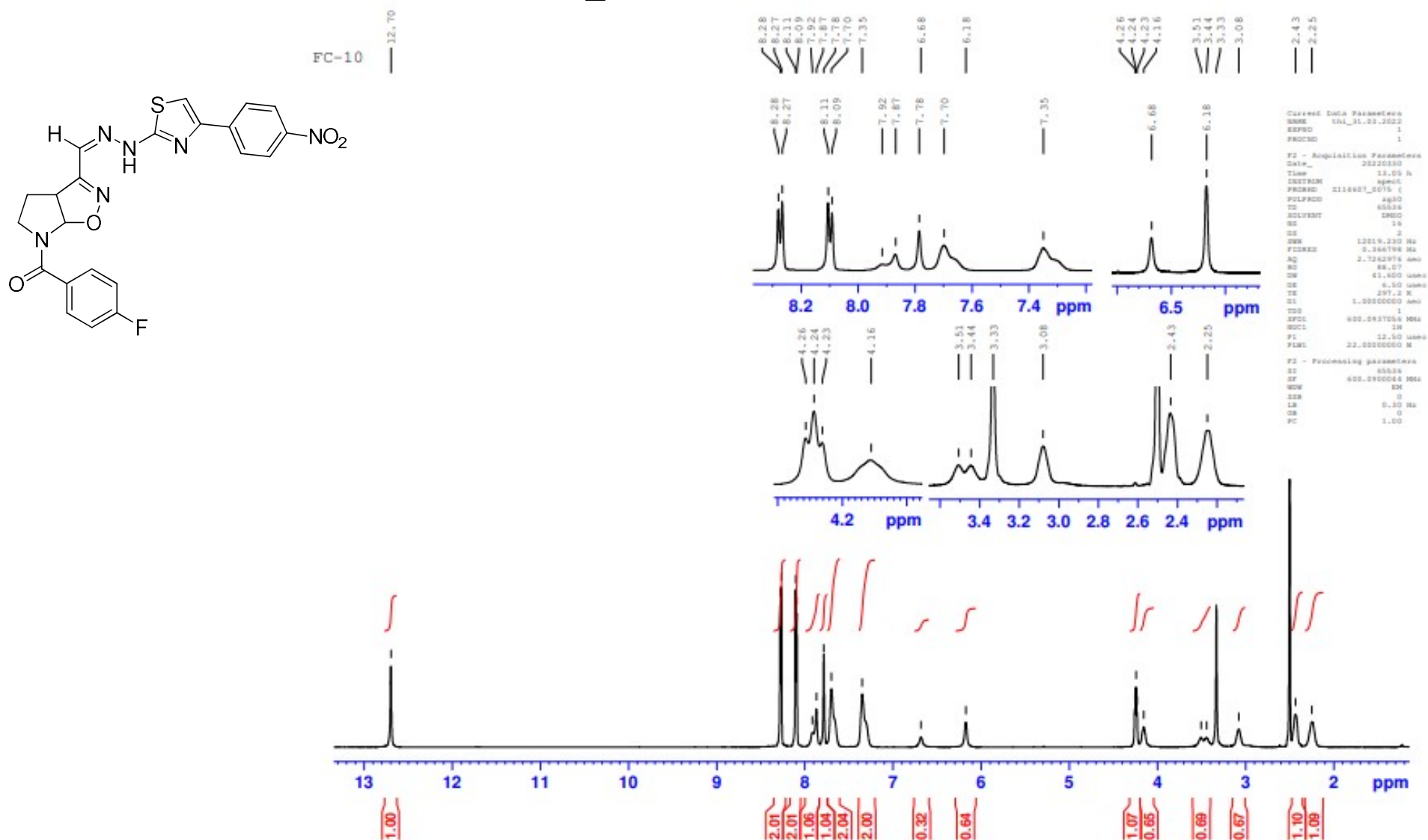
APÊNDICE AD – HÍBRIDO ISOXAZOLINA/TIAZOL **4i** – RMN <sup>13</sup>C 150 MHz



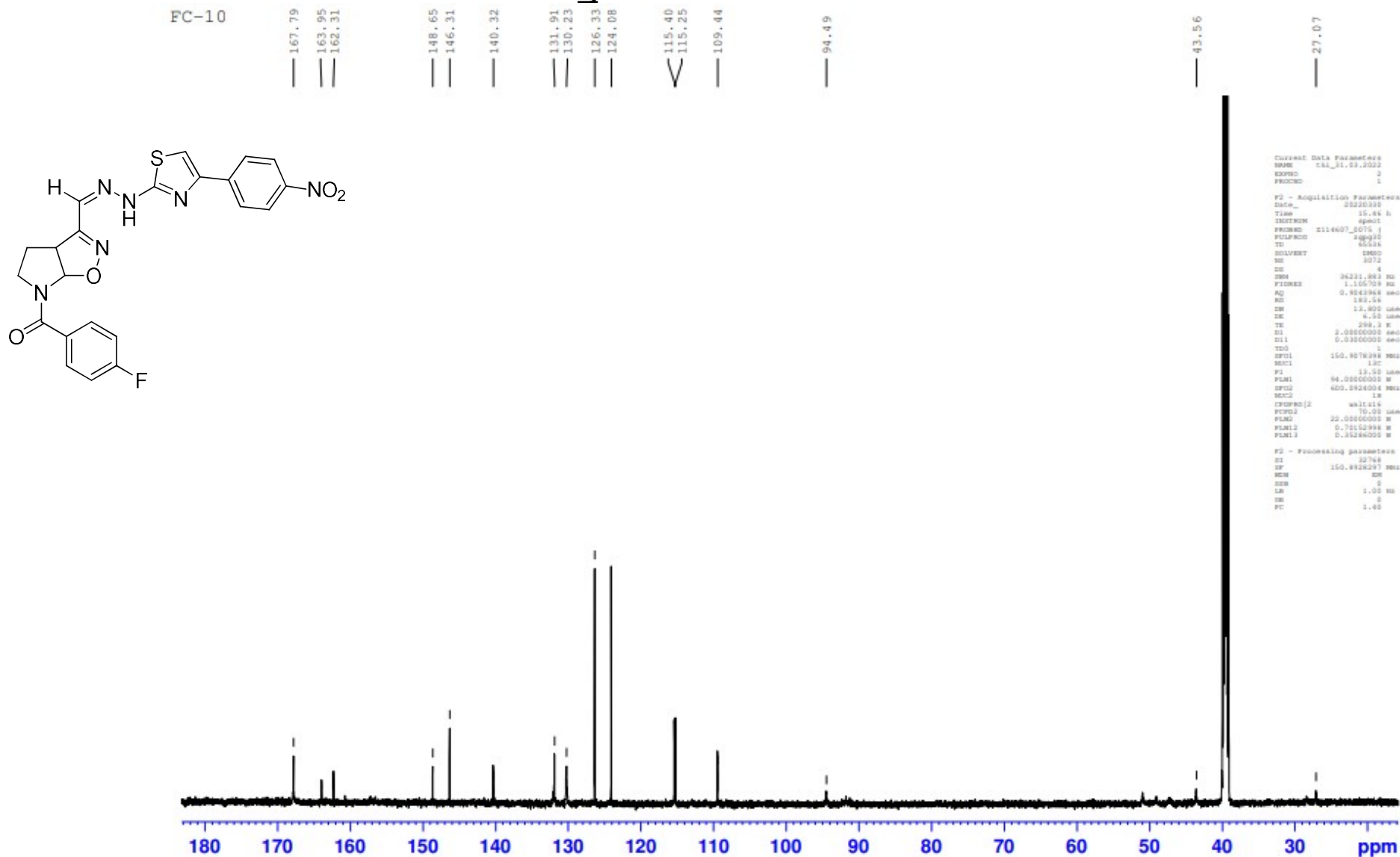
FC-09



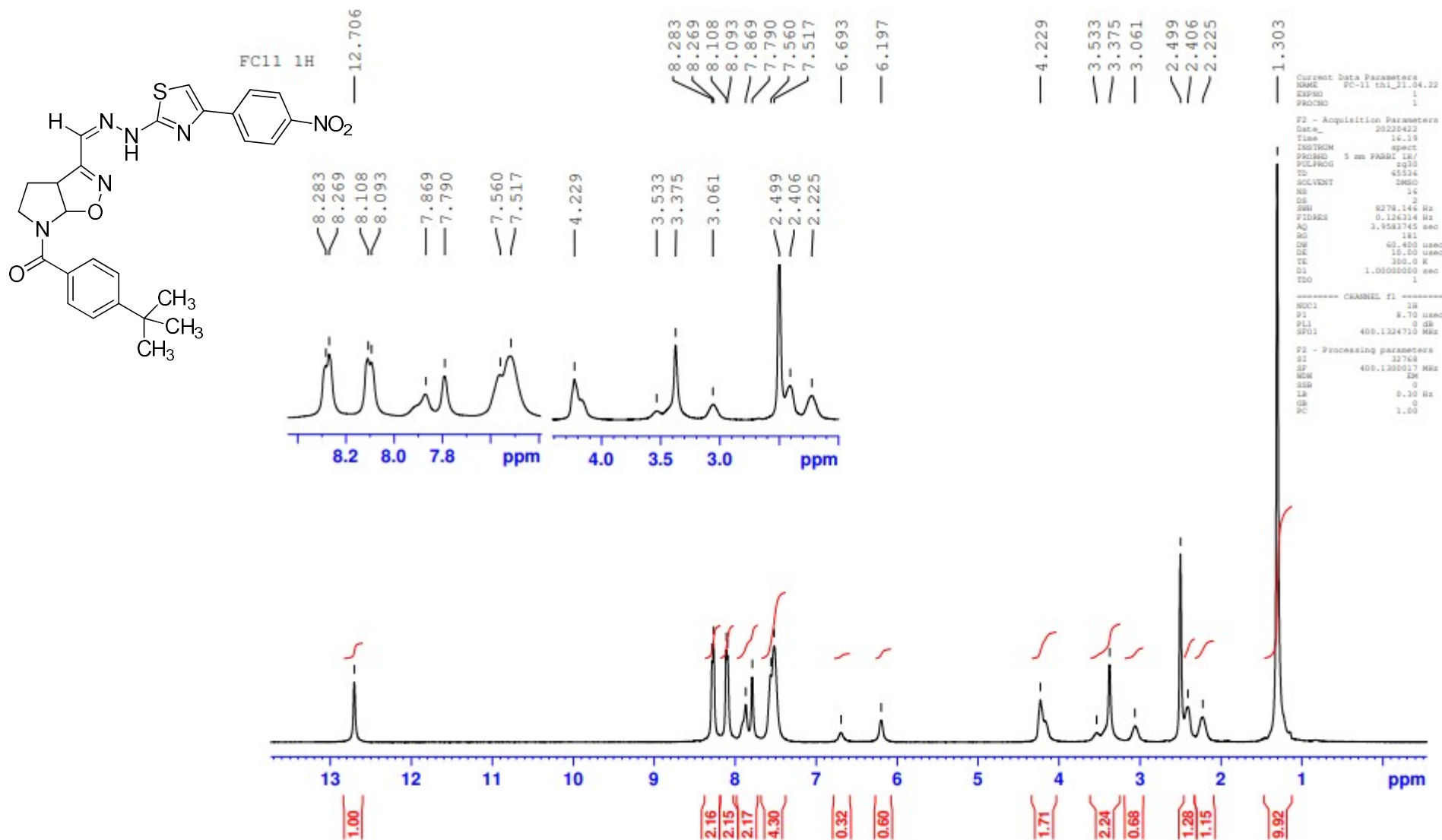
APÊNDICE AE – HÍBRIDO ISOXAZOLINA/TIAZOL **4i** – RMN  $^1\text{H}$  600 MHz

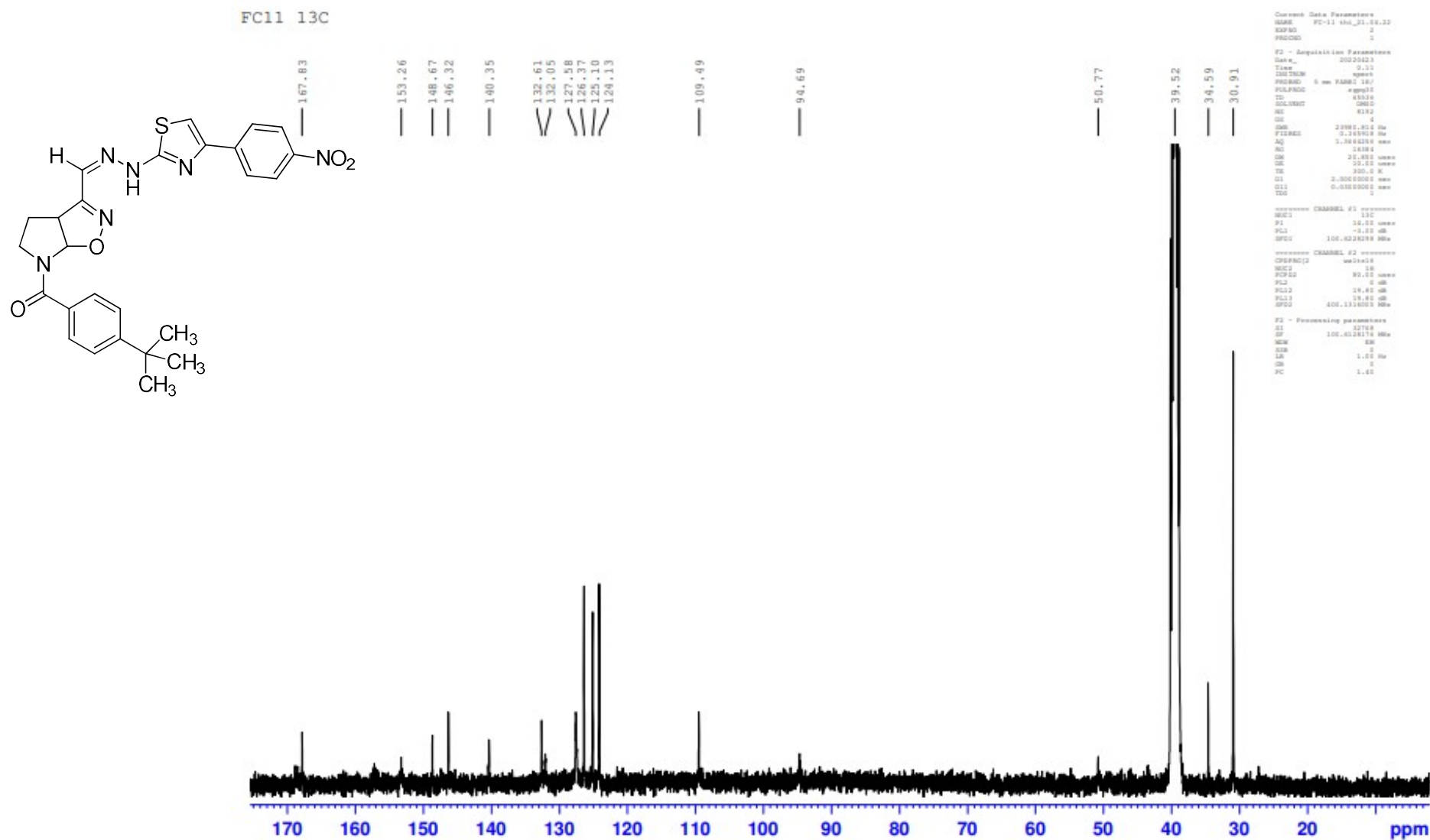


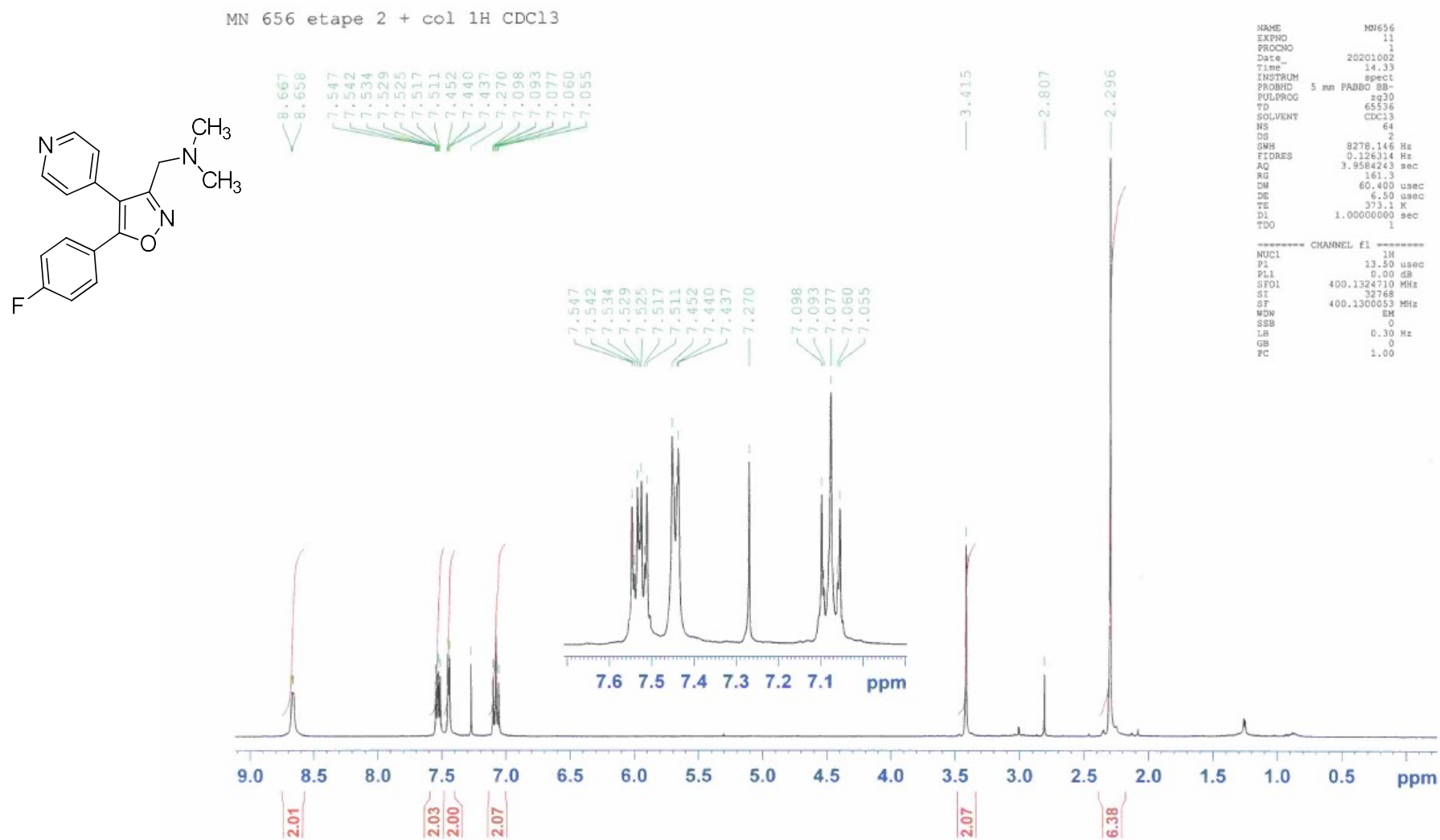
APÊNDICE AF – HÍBRIDO ISOXAZOLINA/TIAZOL **4j** – RMN  $^{13}\text{C}$  150 MHz

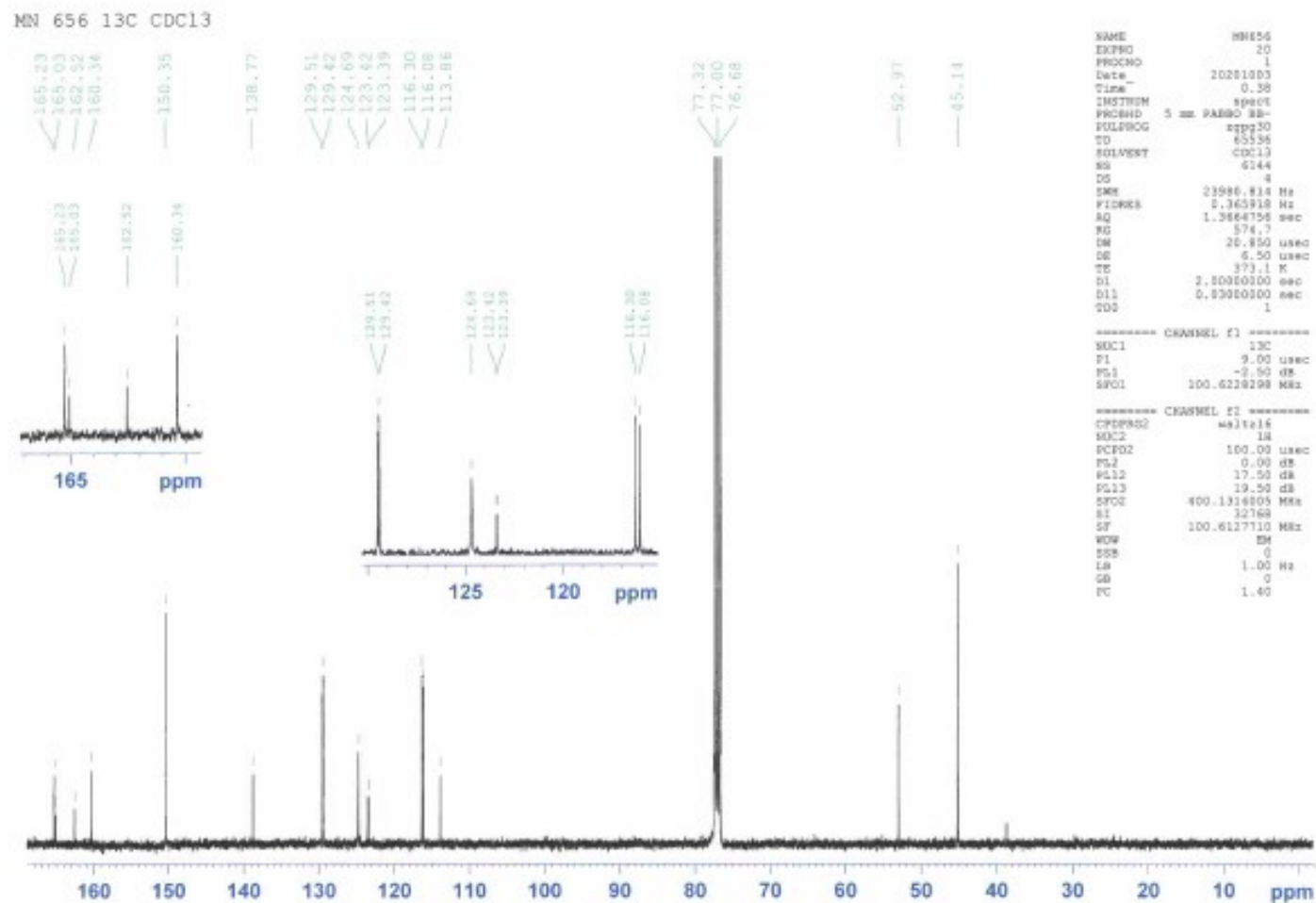
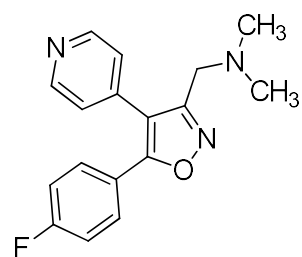


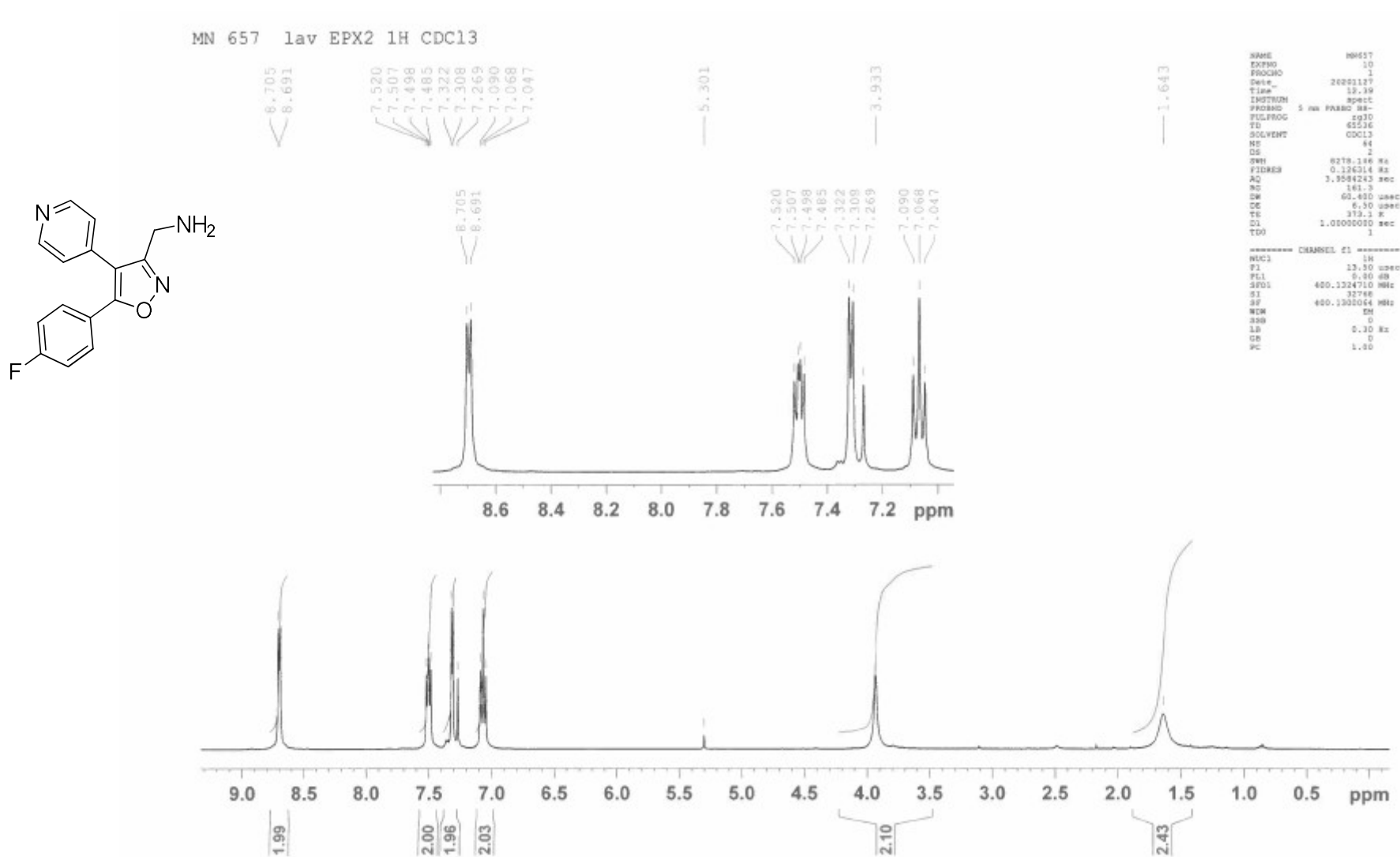
APÊNDICE AG – HÍBRIDO ISOXAZOLINA/TIAZOL **4k** – RMN  $^1\text{H}$  600 MHz

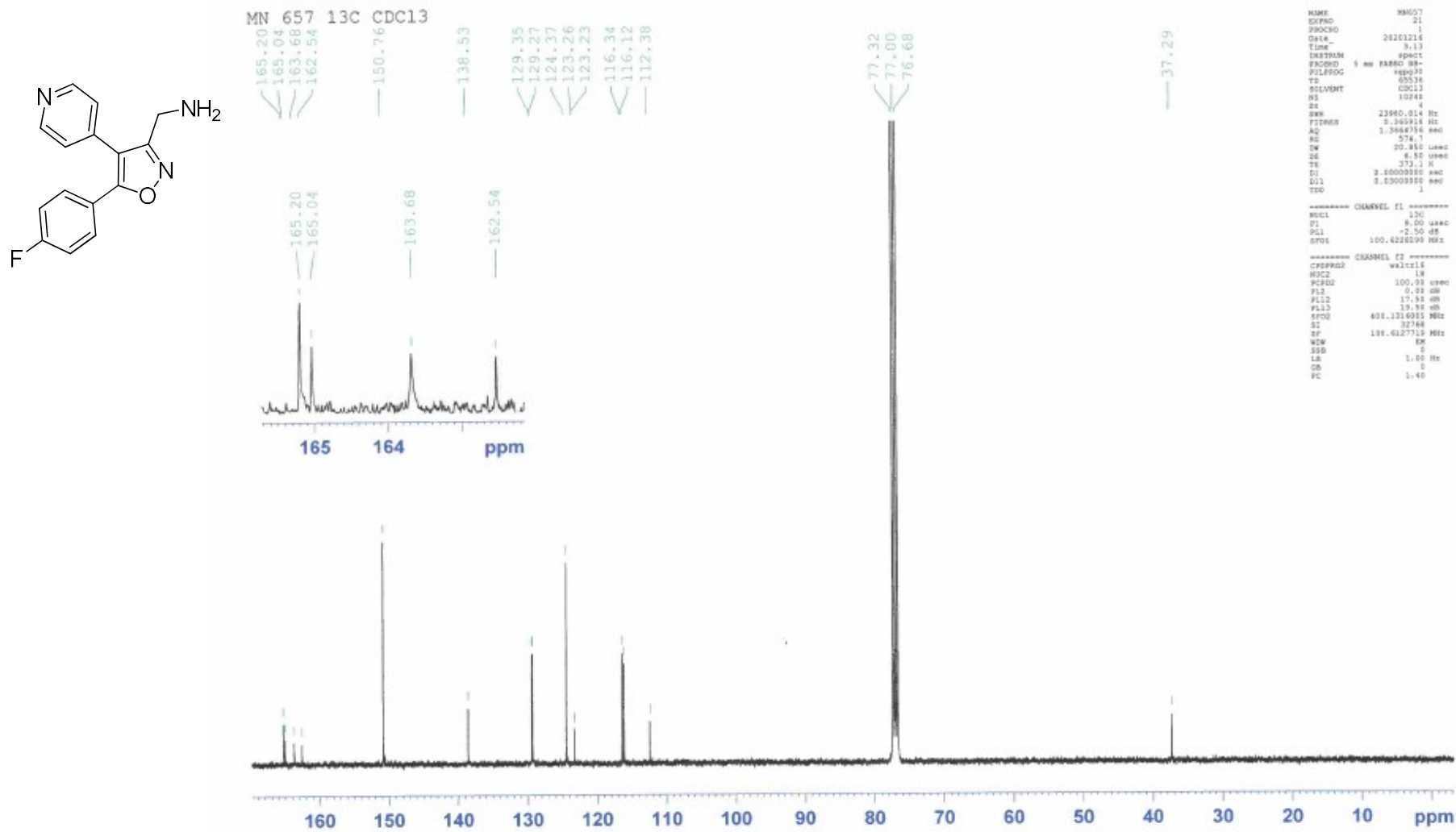


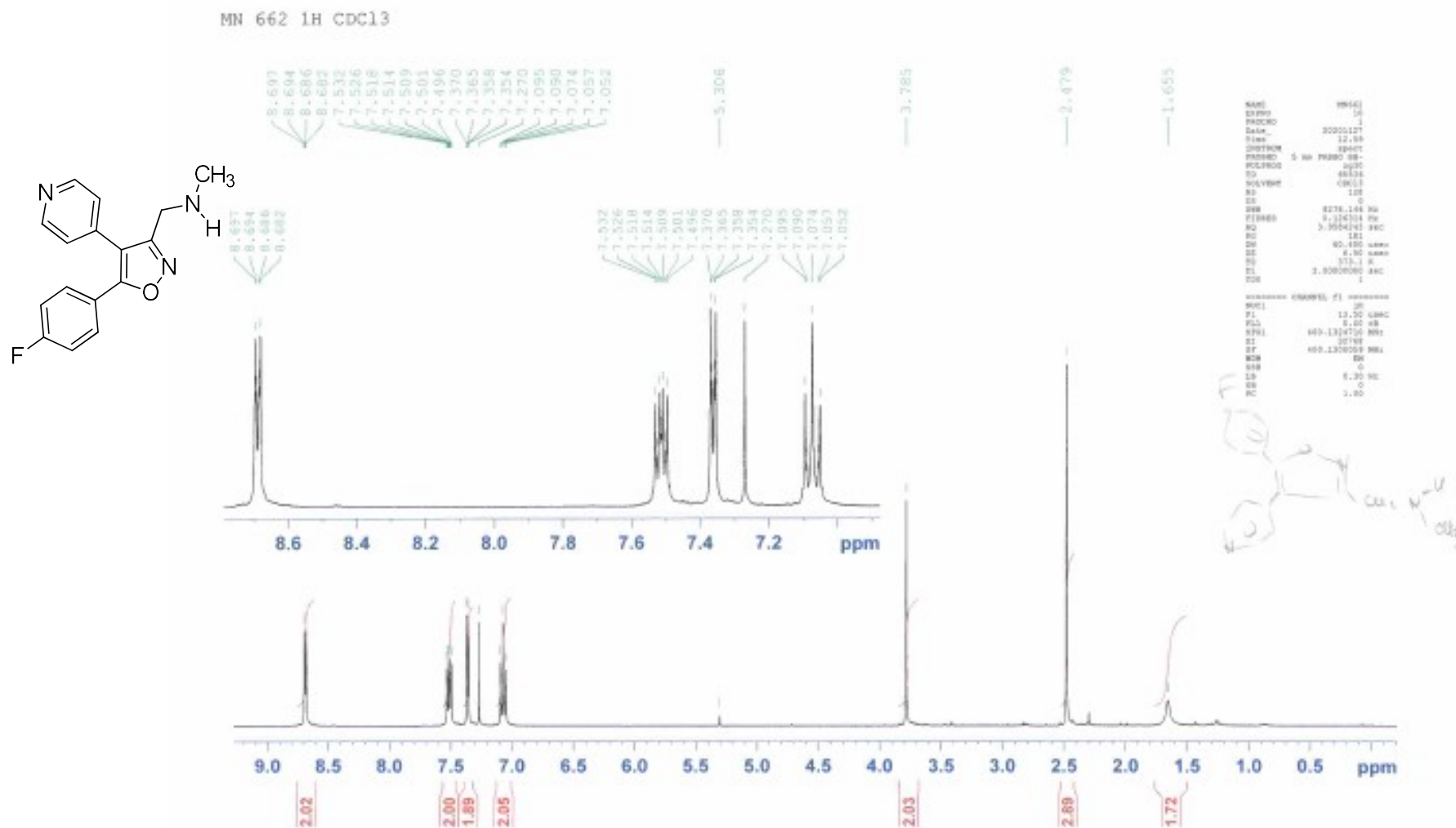
APÊNDICE AH – HÍBRIDO ISOXAZOLINA/TIAZOL **4k** – RMN  $^{13}\text{C}$  150 MHz


APÊNDICE AI – DIARIL-ISOXAZOL **105a** – RMN  $^1\text{H}$  400 MHz

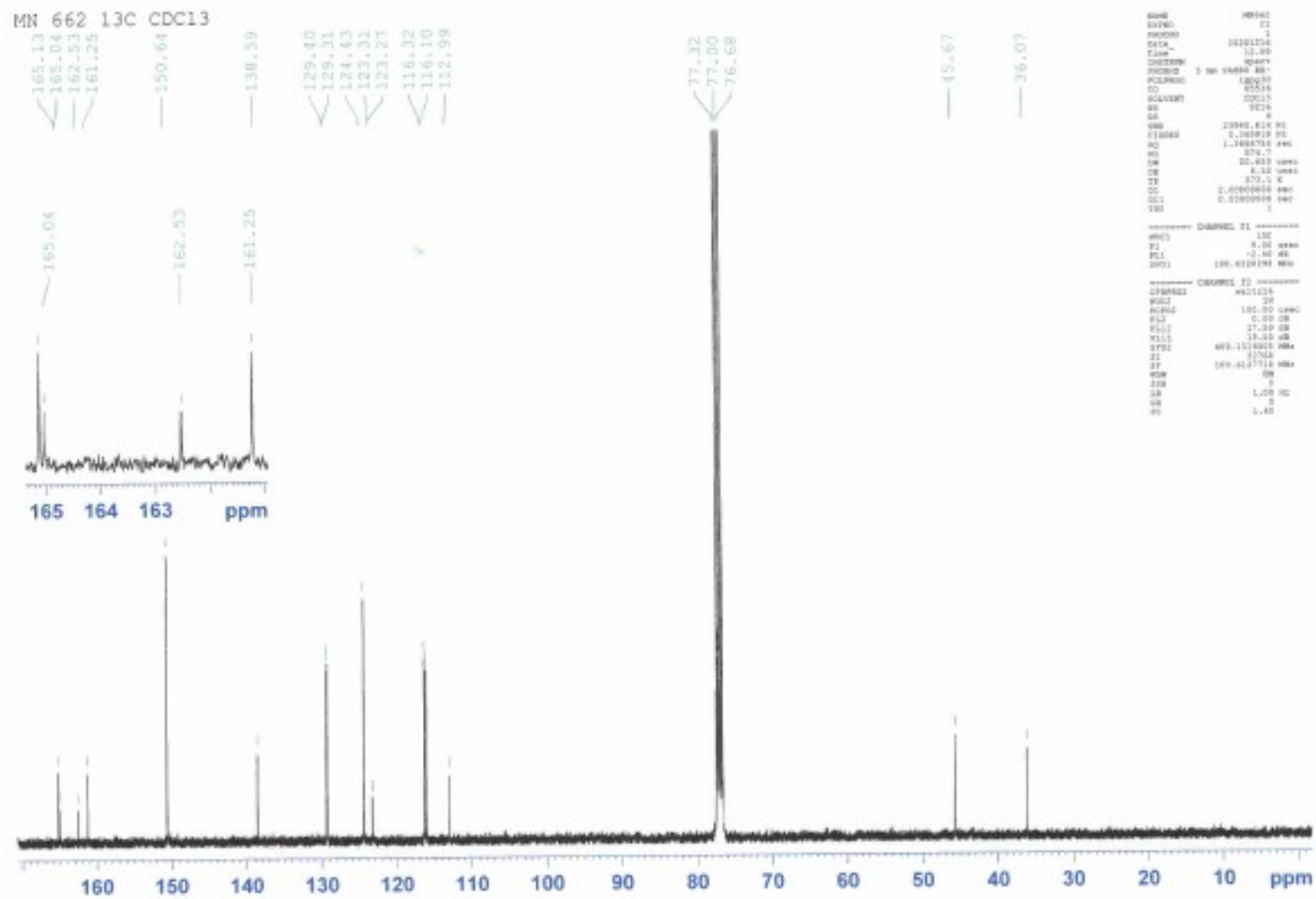
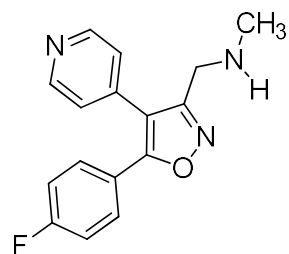
APÊNDICE AJ – DIARIL-ISOXAZOL **105a** – RMN  $^{13}\text{C}$  100 MHz

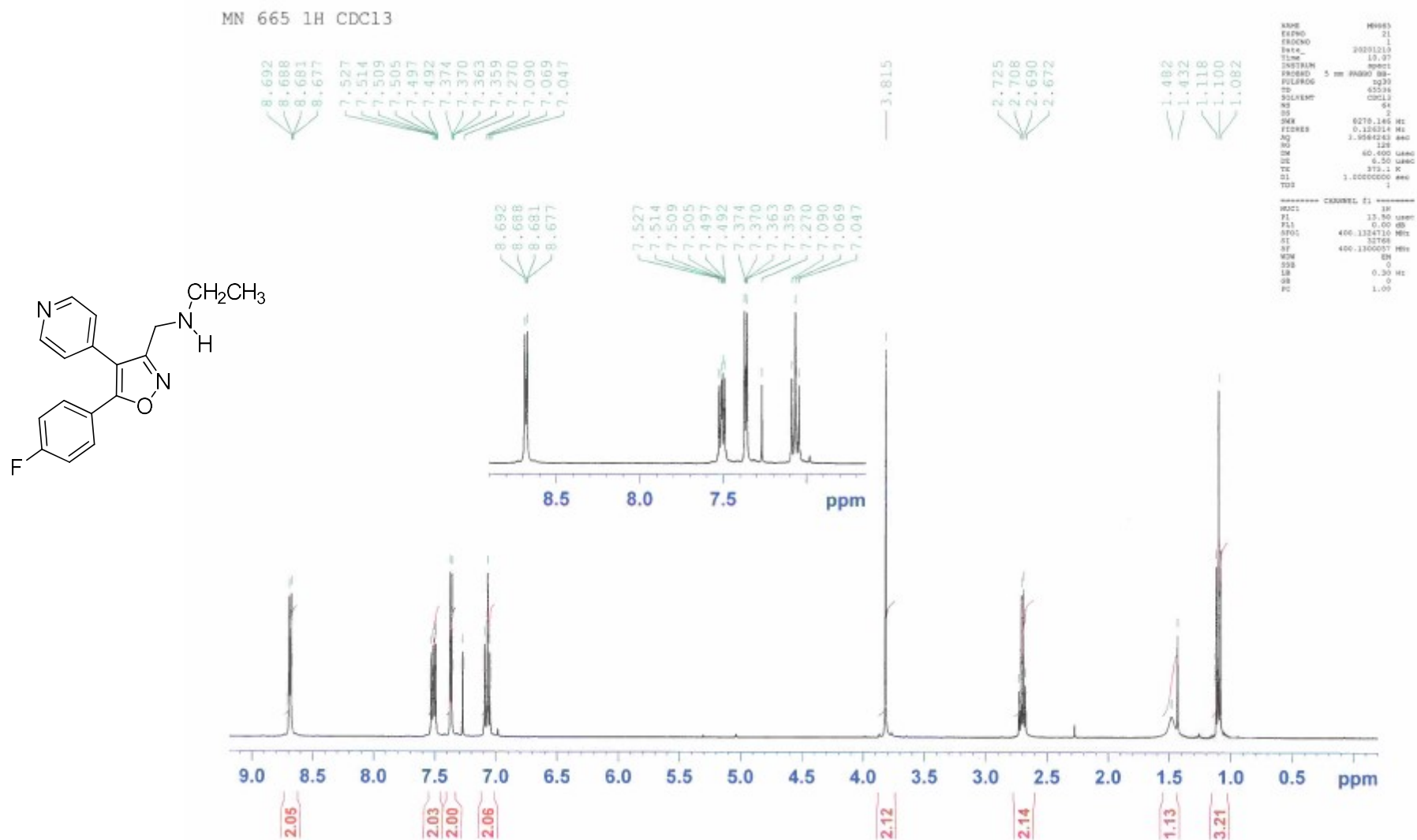
APÊNDICE AK – DIARIL-ISOXAZOL **105b** – RMN  $^1\text{H}$  400 MHz

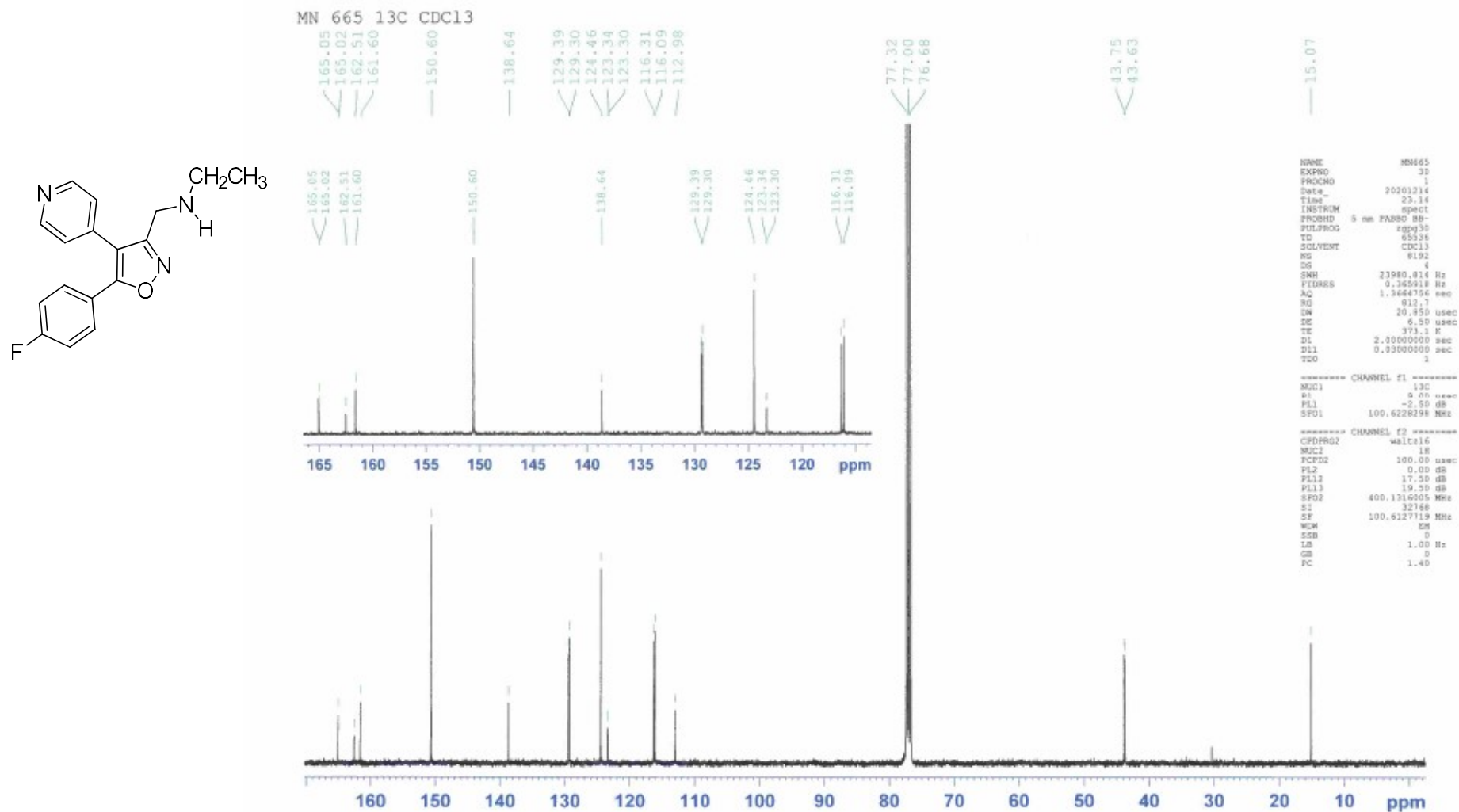
APÊNDICE AL – DIARIL-ISOXAZOL **105b** – RMN  $^{13}\text{C}$  100 MHz

APÊNDICE AM – DIARIL-ISOXAZOL **105c** – RMN  $^1\text{H}$  400 MHz

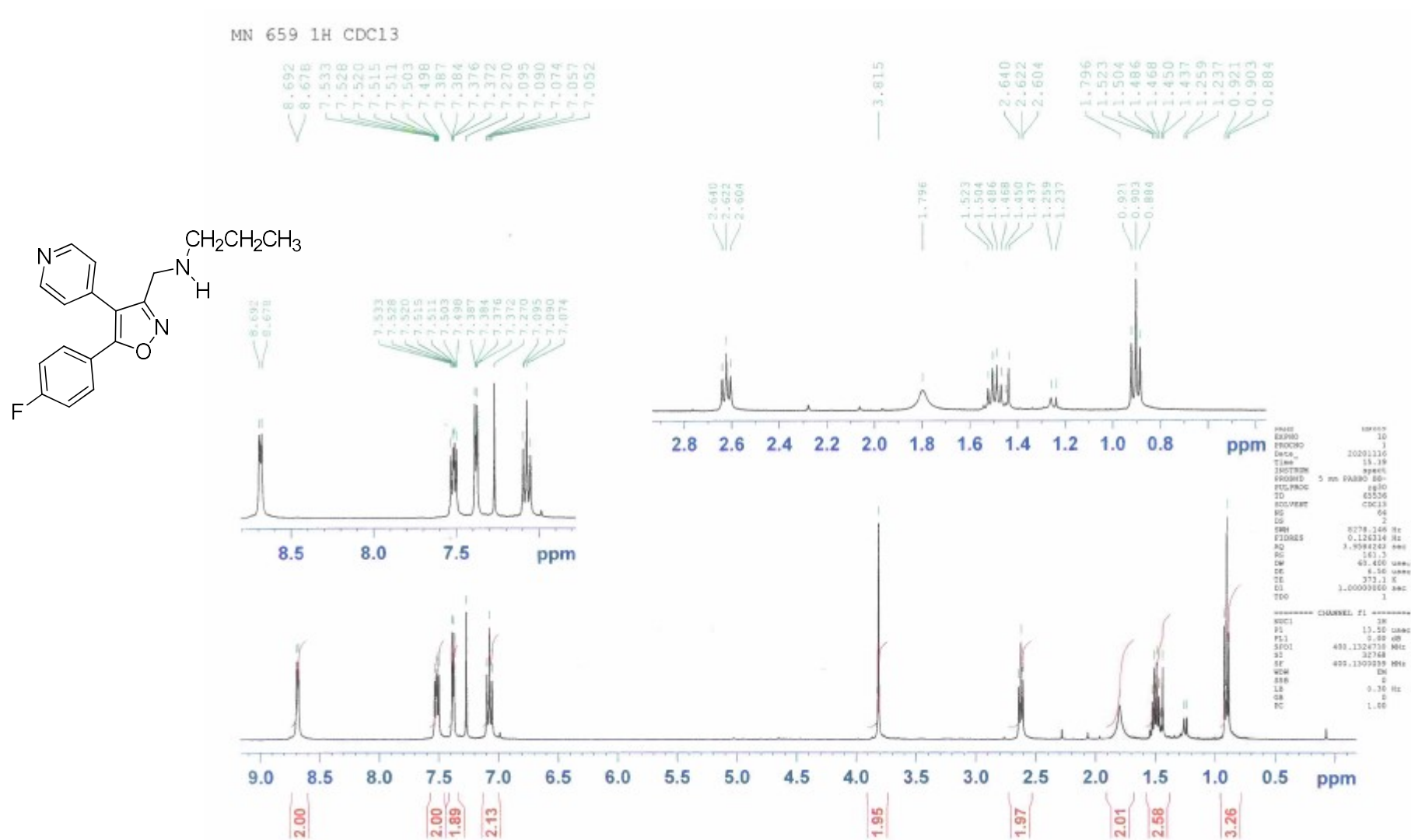
APÊNDICE AN – DIARIL-ISOXAZOL **105c** – RMN  $^{13}\text{C}$  100 MHz

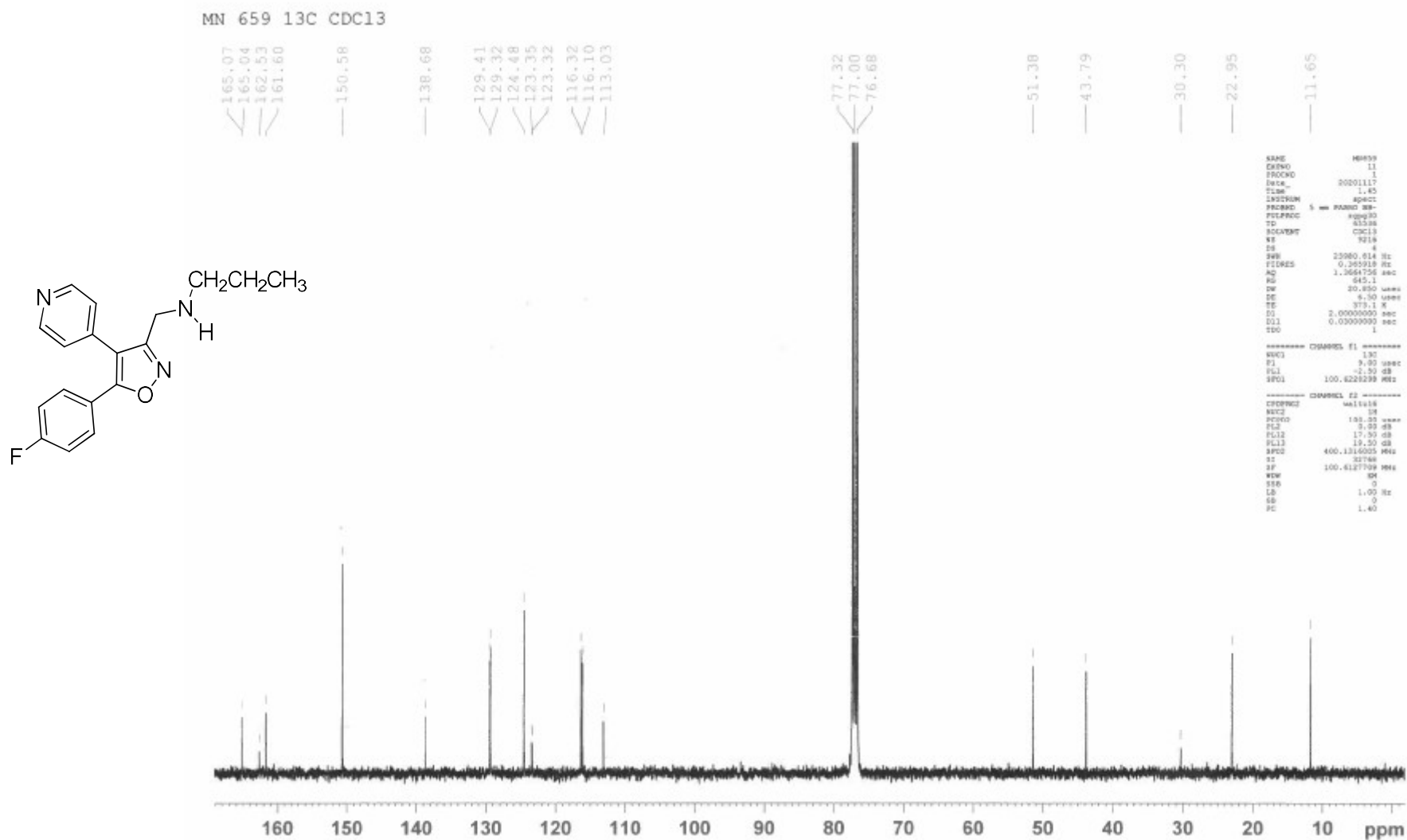


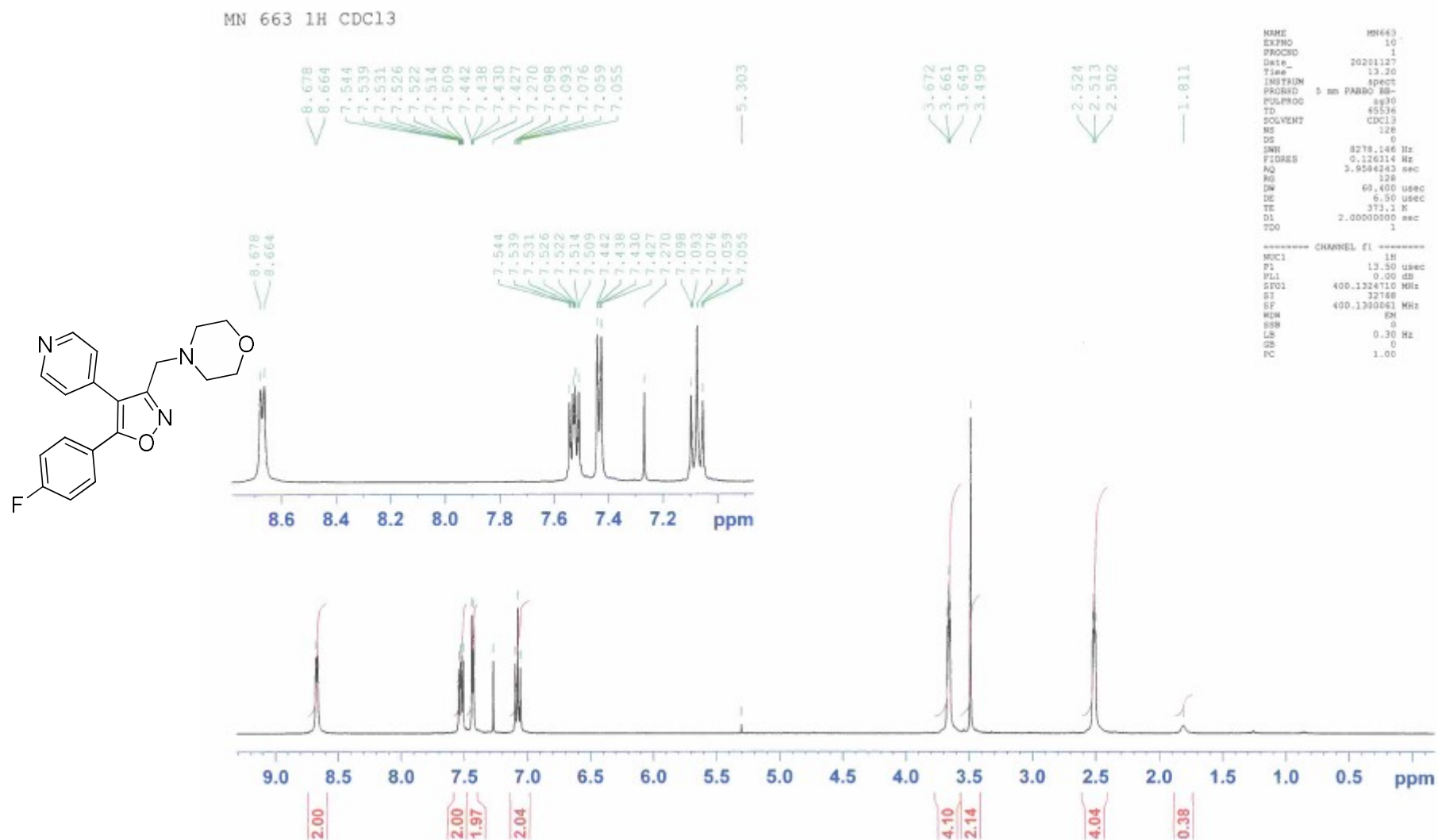
APÊNDICE AO – DIARIL-ISOXAZOL **105d** – RMN  $^1\text{H}$  400 MHz

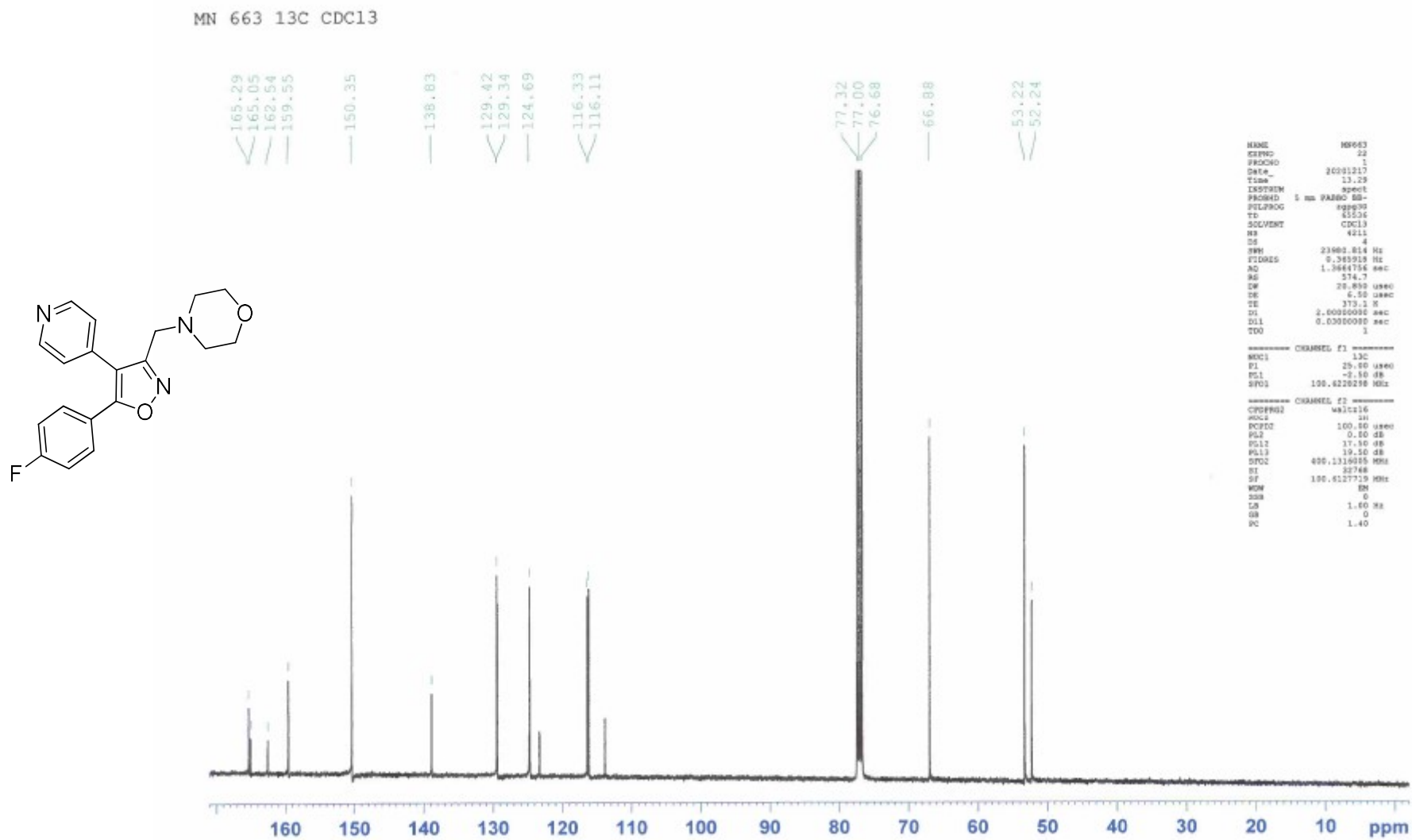
APÊNDICE AP – DIARIL-ISOXAZOL **105d** – RMN  $^{13}\text{C}$  100 MHz

APÊNDICE AQ – DIARIL-ISOXAZOL **105e** – RMN <sup>1</sup>H 400 MHz



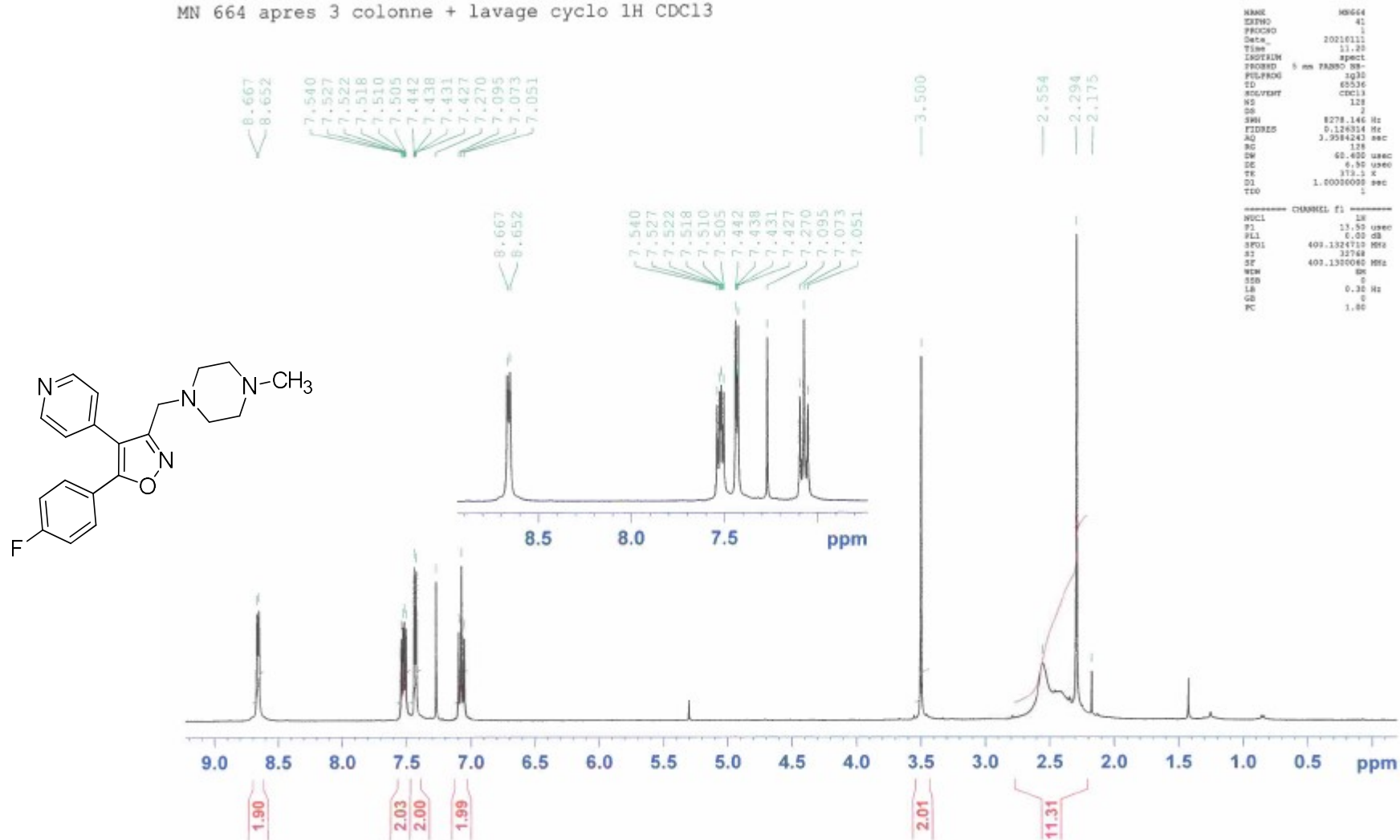
APÊNDICE AR – DIARIL-ISOXAZOL **105e** – RMN  $^{13}\text{C}$  100 MHz

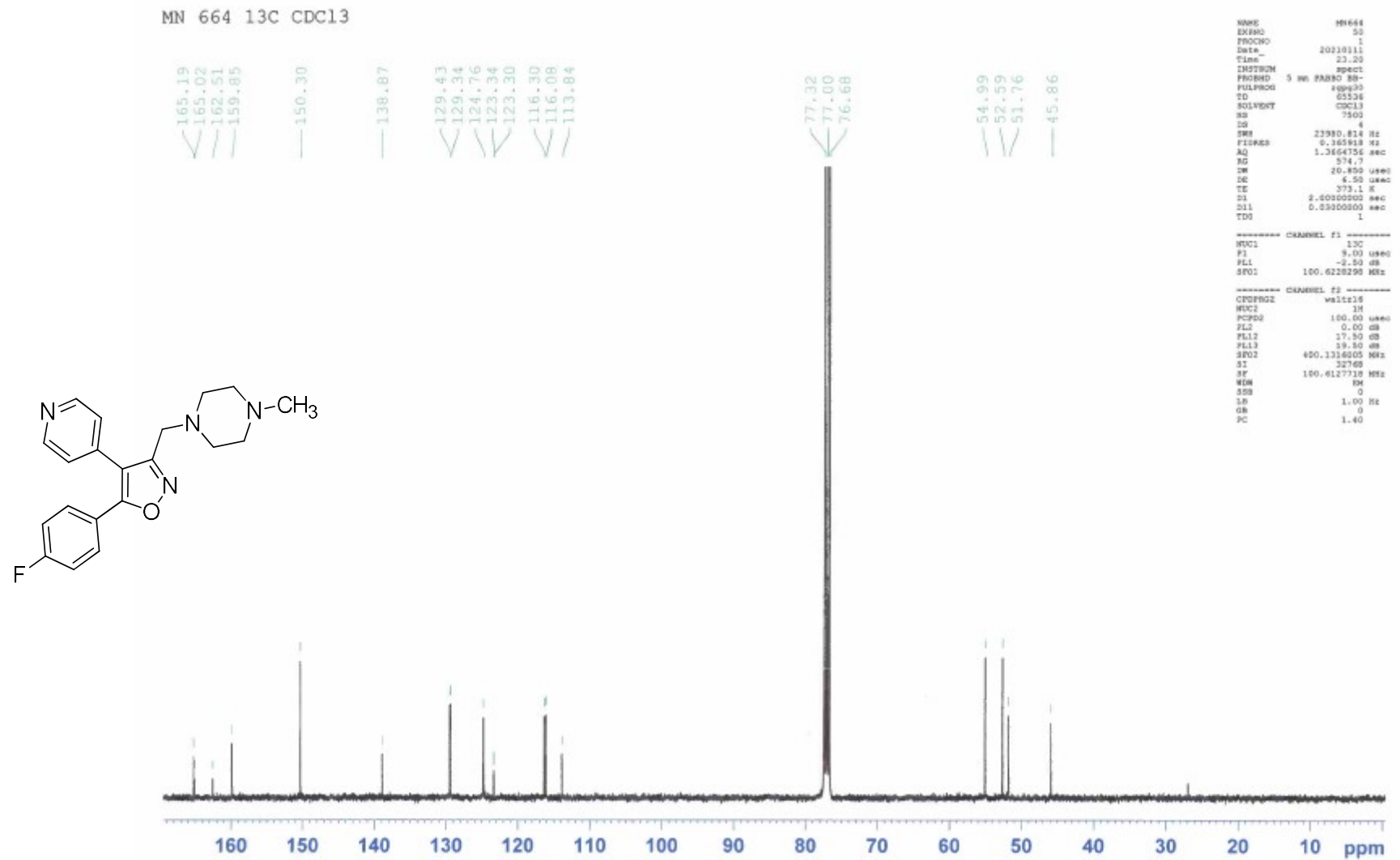
APÊNDICE AS – DIARIL-ISOXAZOL **105f** – RMN  $^1\text{H}$  400 MHz

APÊNDICE AT – DIARIL-ISOXAZOL **105f** – RMN  $^{13}\text{C}$  100 MHz

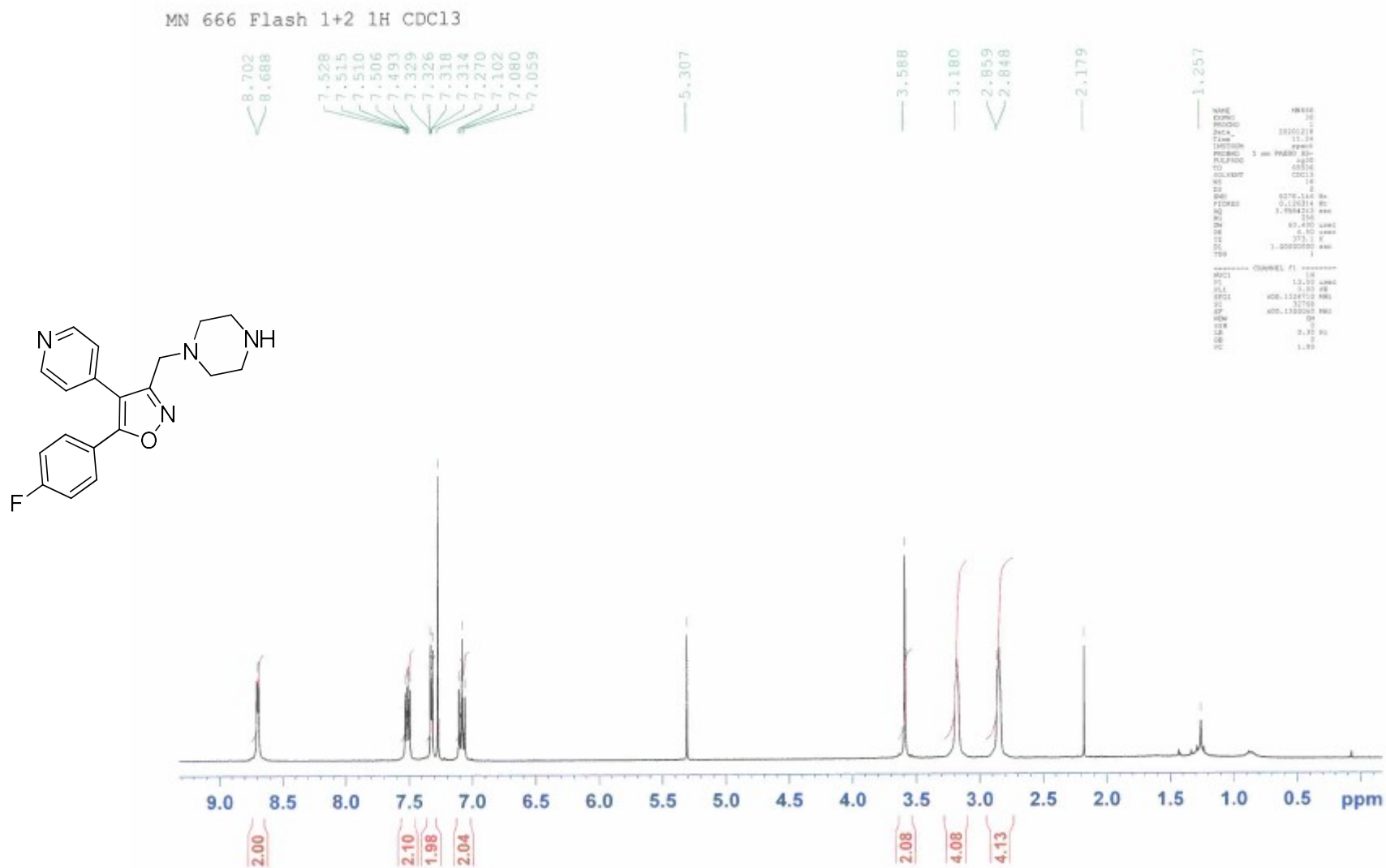
APÊNDICE AU – DIARIL-ISOXAZOL **105g** – RMN  $^1\text{H}$  400 MHz

MN 664 apres 3 colonne + lavage cyclo 1H CDC13



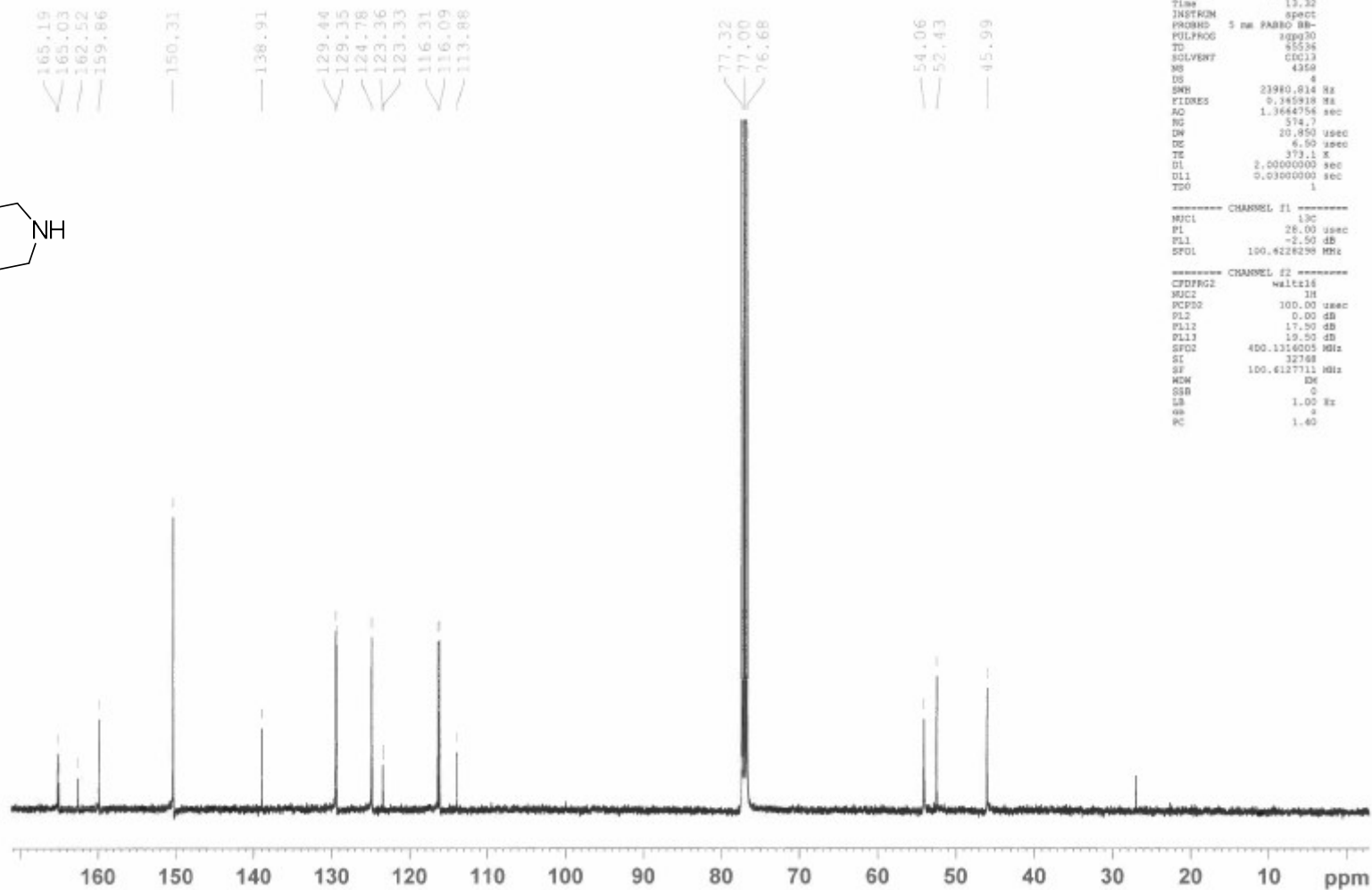
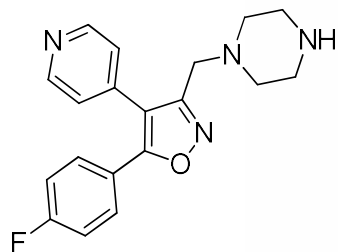
APÊNDICE AV – DIARIL-ISOXAZOL **105g** – RMN  $^{13}\text{C}$  100 MHz

APÊNDICE AW – DIARIL-ISOXAZOL **105h** – RMN <sup>1</sup>H 400 MHz



APÊNDICE AX – DIARIL-ISOXAZOL **105h** – RMN  $^{13}\text{C}$  100 MHz

MN 666 apres trituration EP 13C CDC13



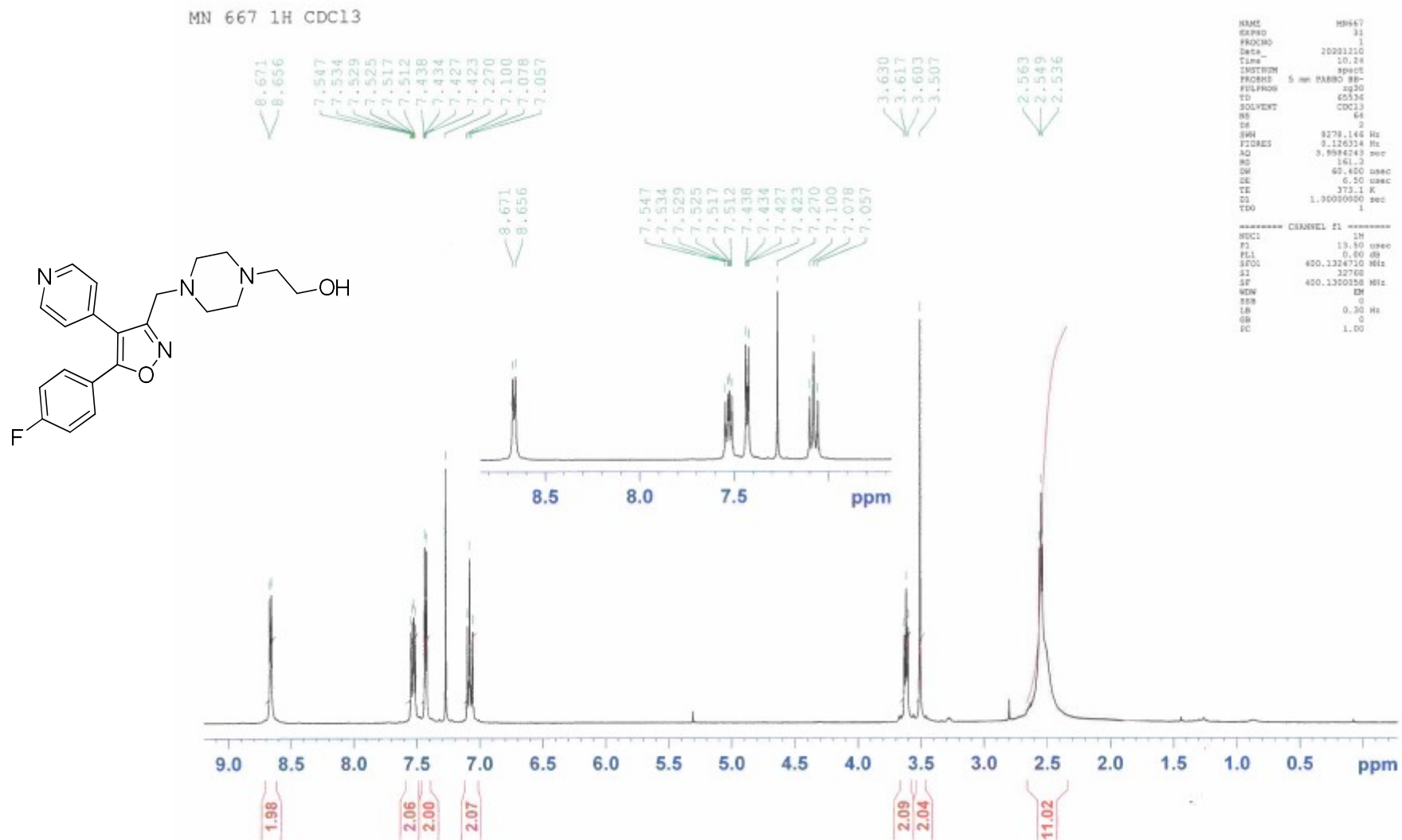
```

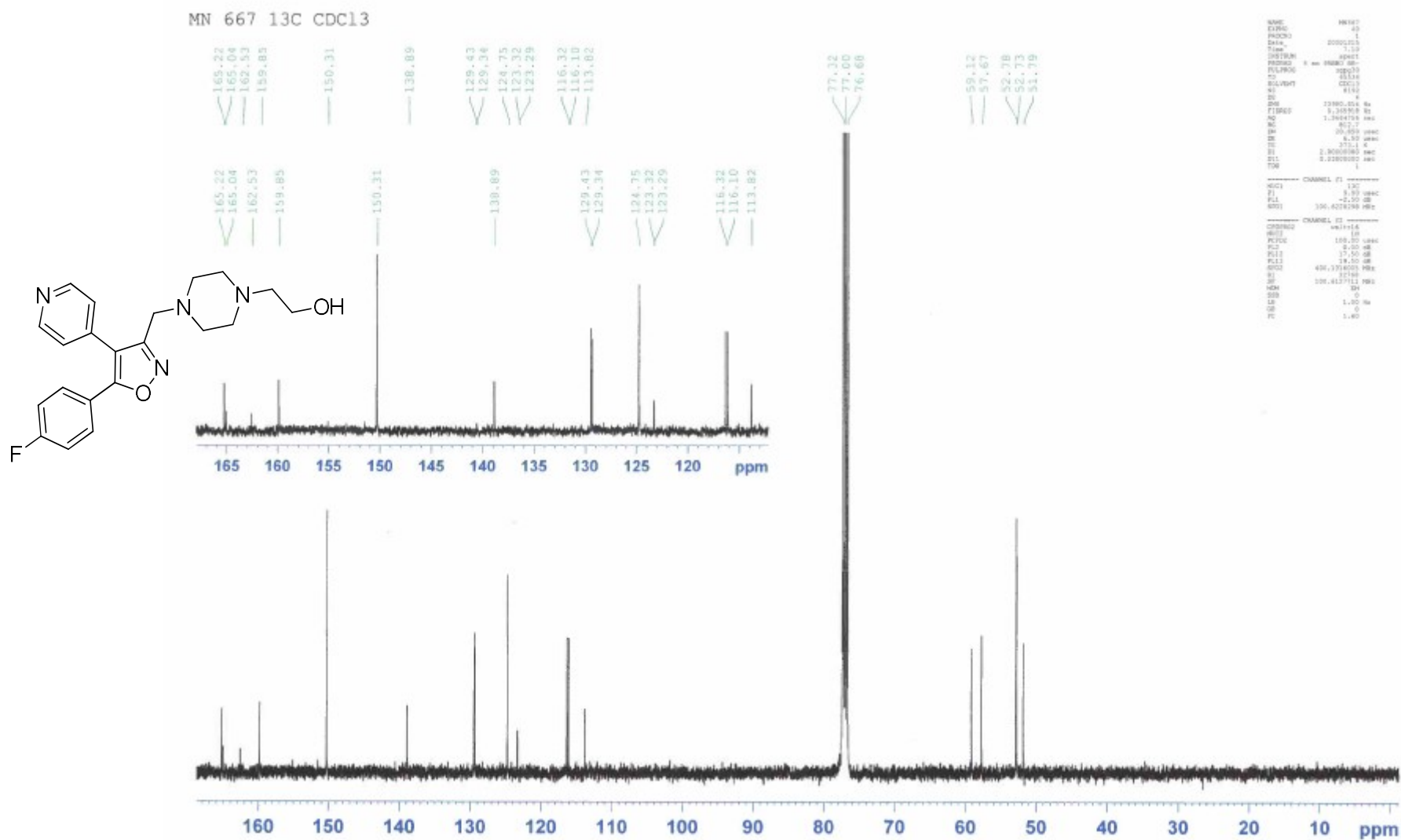
NAME      MN666
EXPNO     50
PROCNO    1
Date_     20210122
Time      13.32
INSTRUM    spect
PROBHD    5 mm PABBO BB-
PULPROG    zgpg30
TD         65536
SOLVENT    CDCl3
NS         4350
DS         4
SWH        21940.814 Hz
FIDRES     0.345918 Hz
AQ         1.3664756 sec
RG         514.7
DN         20.850 usec
DE         6.50 usec
TE         373.1 K
D1         2.00000000 sec
D11        0.03000000 sec
TD0        1

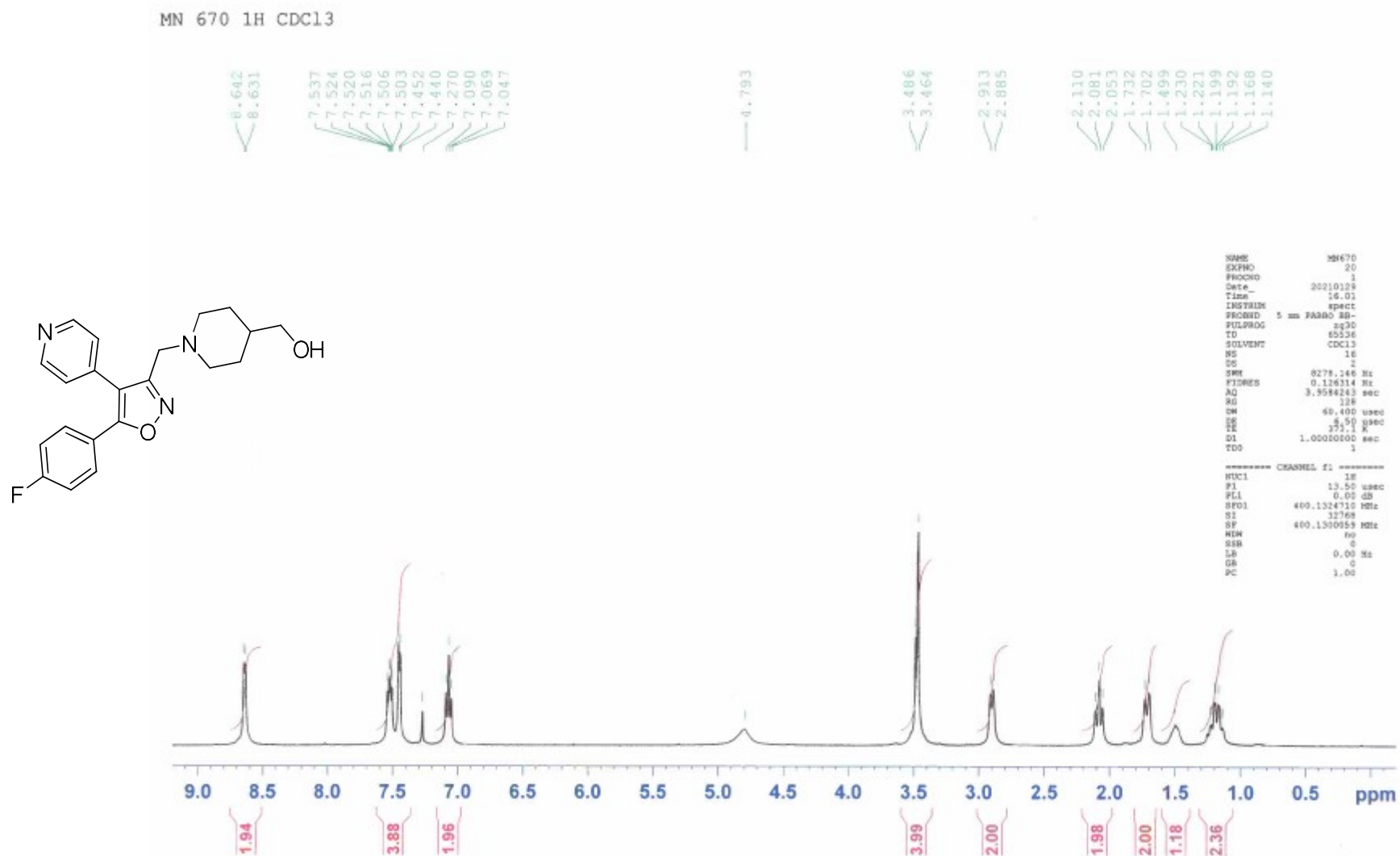
===== CHANNEL f1 =====
NUC1       13C
P1         28.00 usec
PL1        -2.50 dB
SFO1       100.6228250 MHz

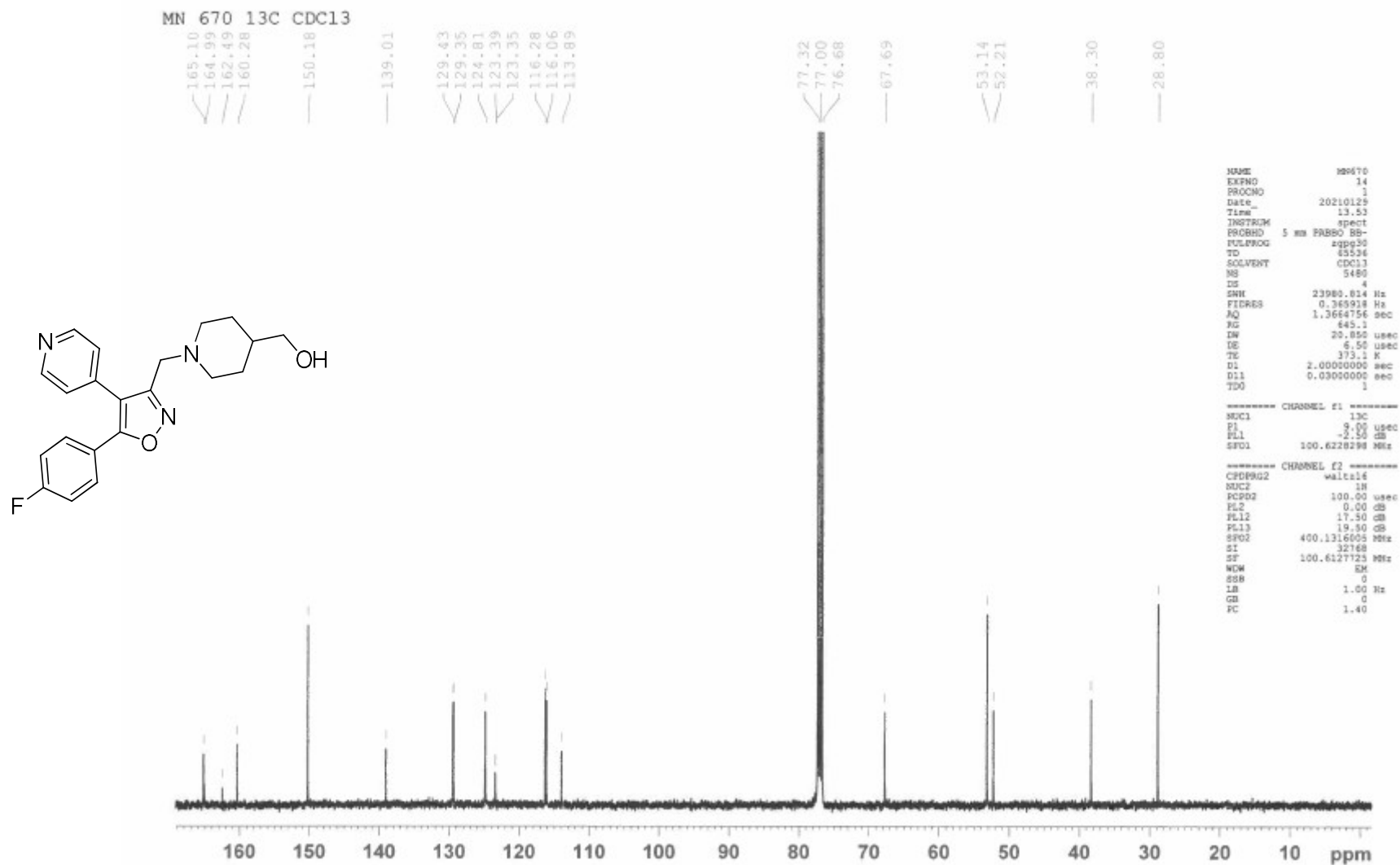
===== CHANNEL f2 =====
CPDPRG2    waltz16
NUC2       1H
PCPD2      100.00 usec
PL2         0.00 dB
PL12        17.50 dB
PL13        19.50 dB
SFO2       400.1314005 MHz
SI         32768
SF         100.6127711 MHz
WDW         EM
SSB         0
LB         1.00 Hz
GB          0
PC         1.60

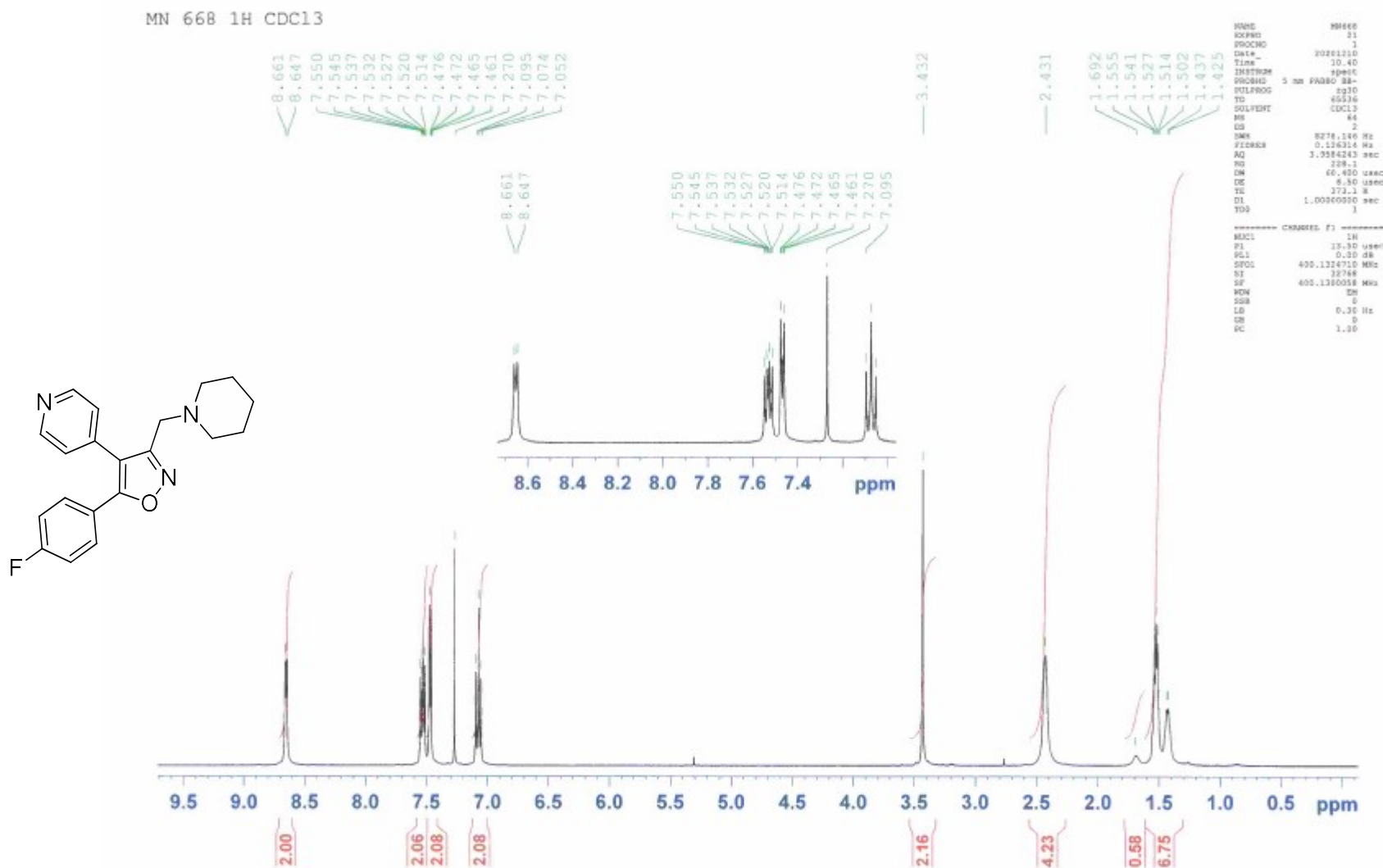
```

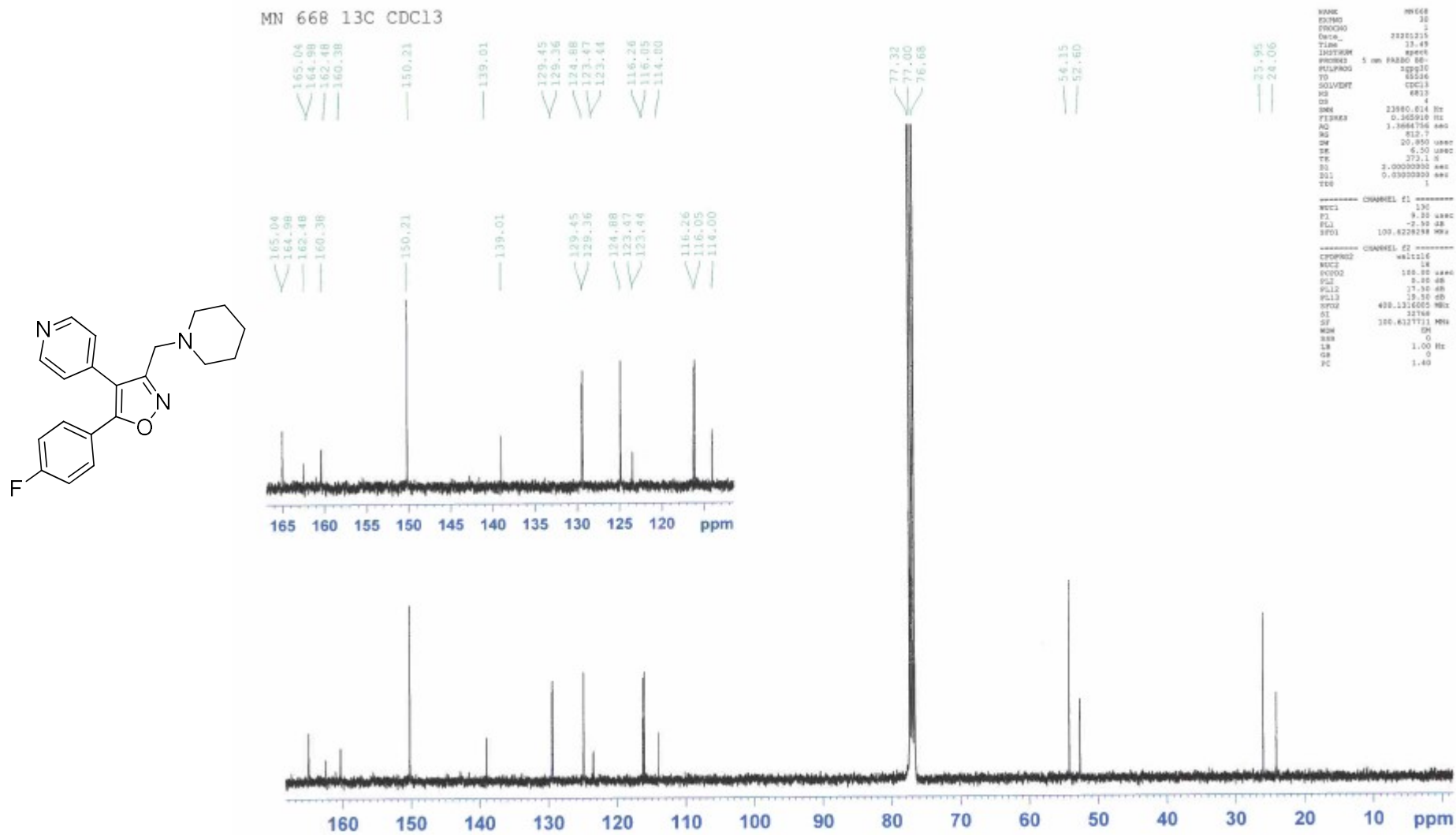
APÊNDICE AY – DIARIL-ISOXAZOL **105i** – RMN  $^1\text{H}$  400 MHz

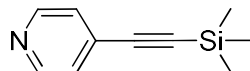
APÊNDICE AZ – DIARIL-ISOXAZOL **105i** – RMN <sup>13</sup>C 100 MHz

APÊNDICE BA – DIARIL-ISOXAZOL **105j** – RMN  $^1\text{H}$  400 MHz

APÊNDICE BB – DIARIL-ISOXAZOL **105j** – RMN  $^{13}\text{C}$  100 MHz

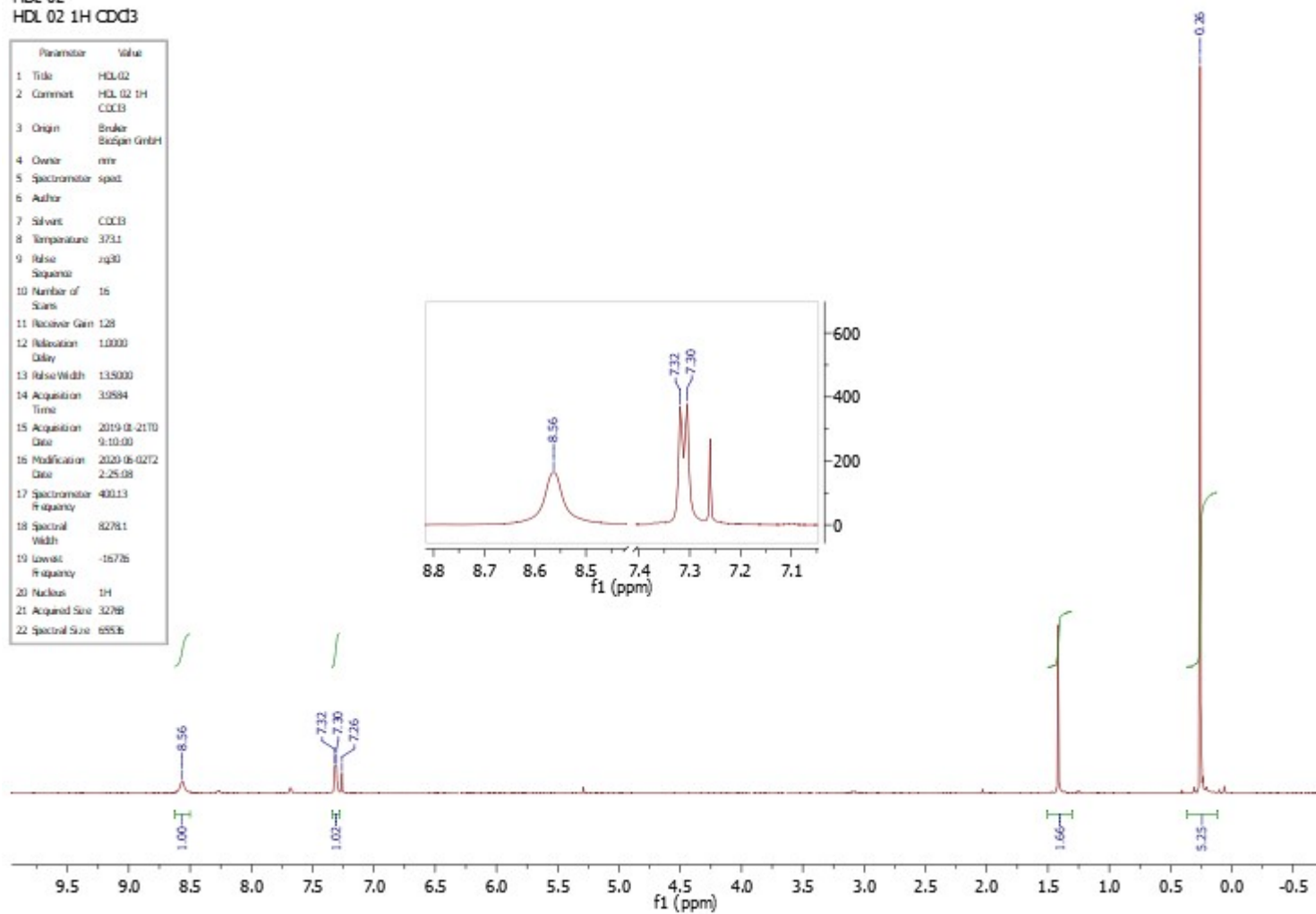
APÊNDICE BC – DIARIL-ISOXAZOL **105k** – RMN  $^1\text{H}$  400 MHz

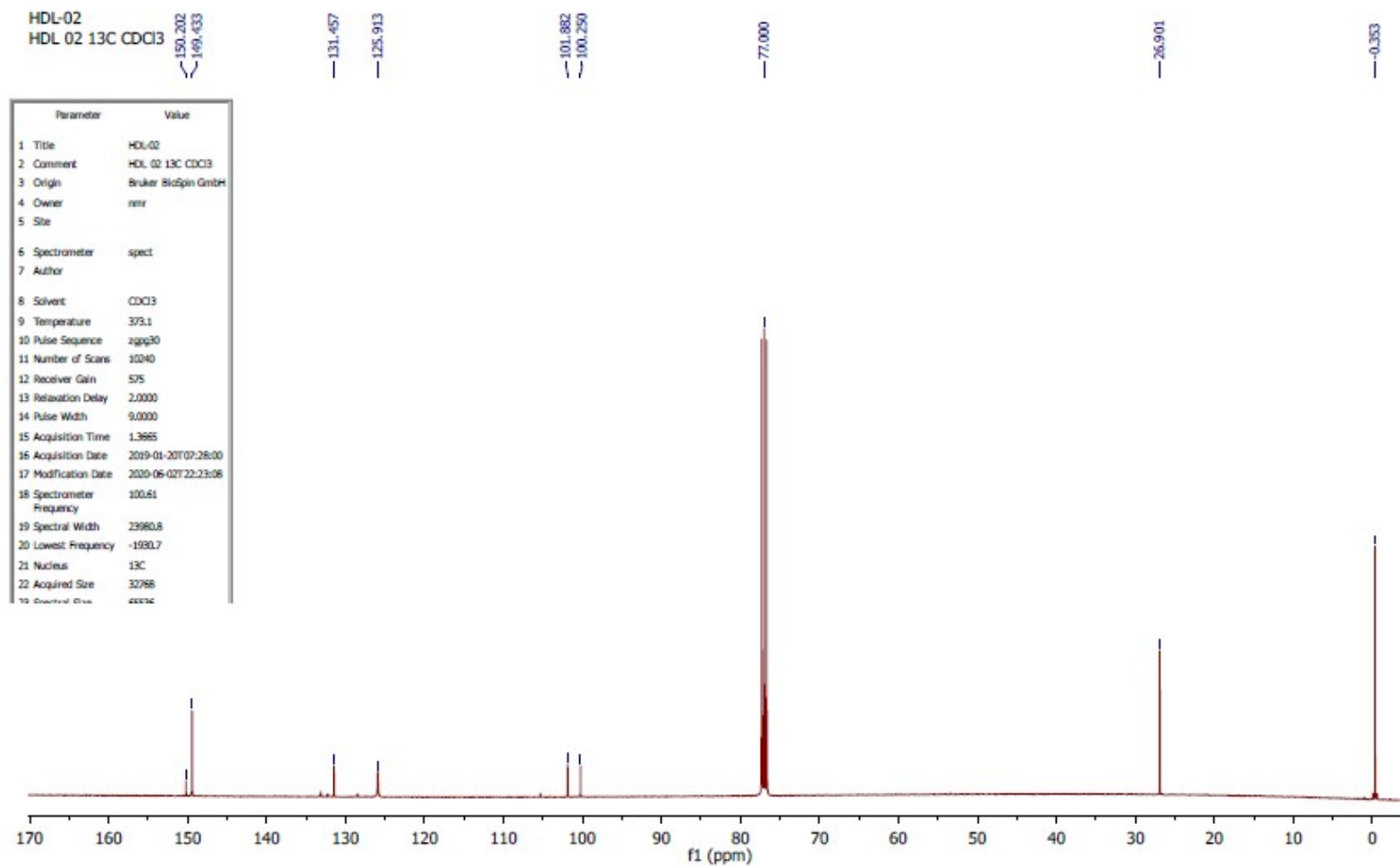
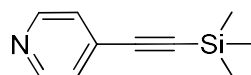
APÊNDICE BD – DIARIL-ISOXAZOL **105k** – RMN  $^{13}\text{C}$  100 MHz

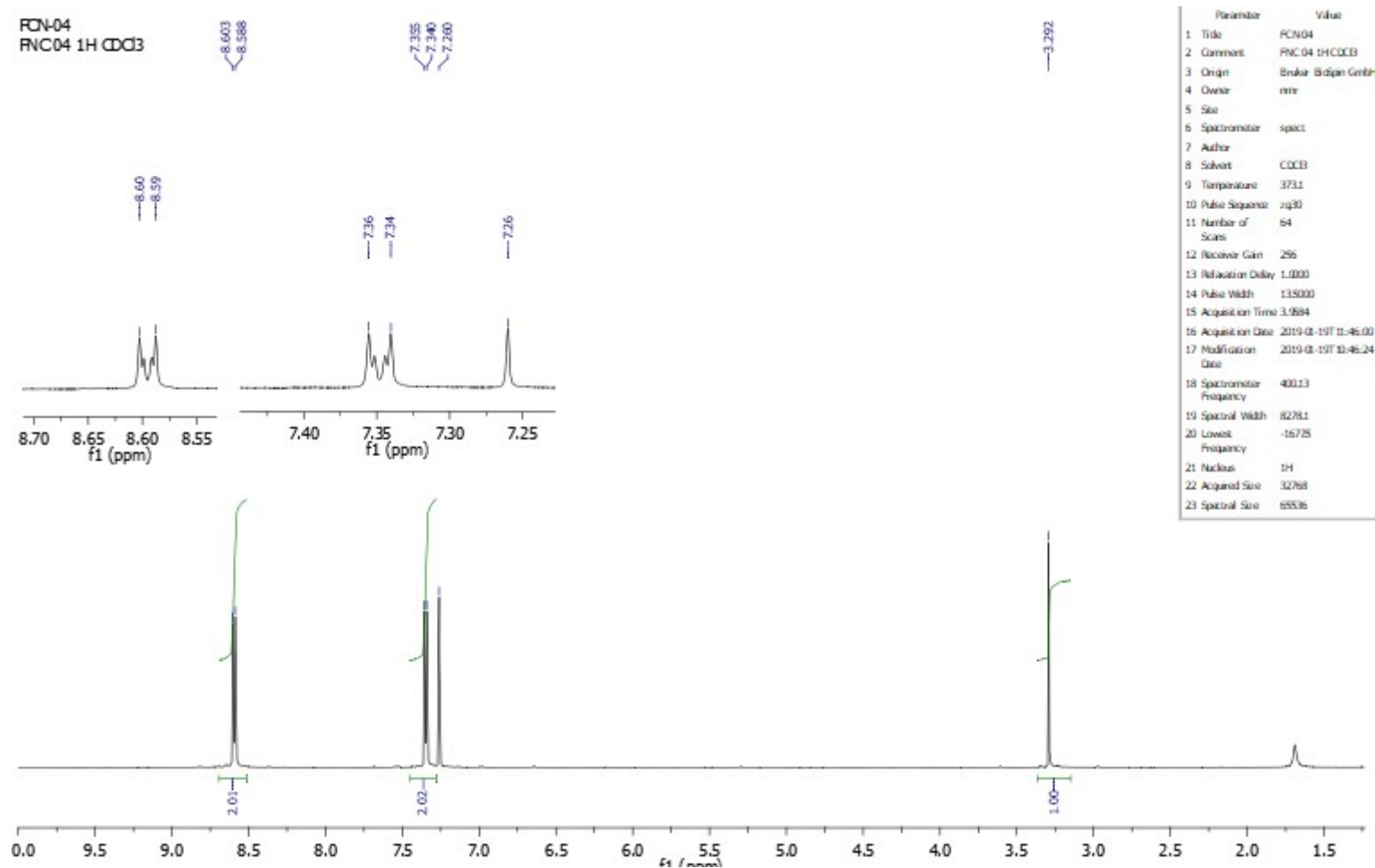
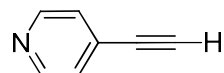
APÊNDICE BE – DIARIL-ISOXAZOL **93** – RMN  $^1\text{H}$  400 MHz

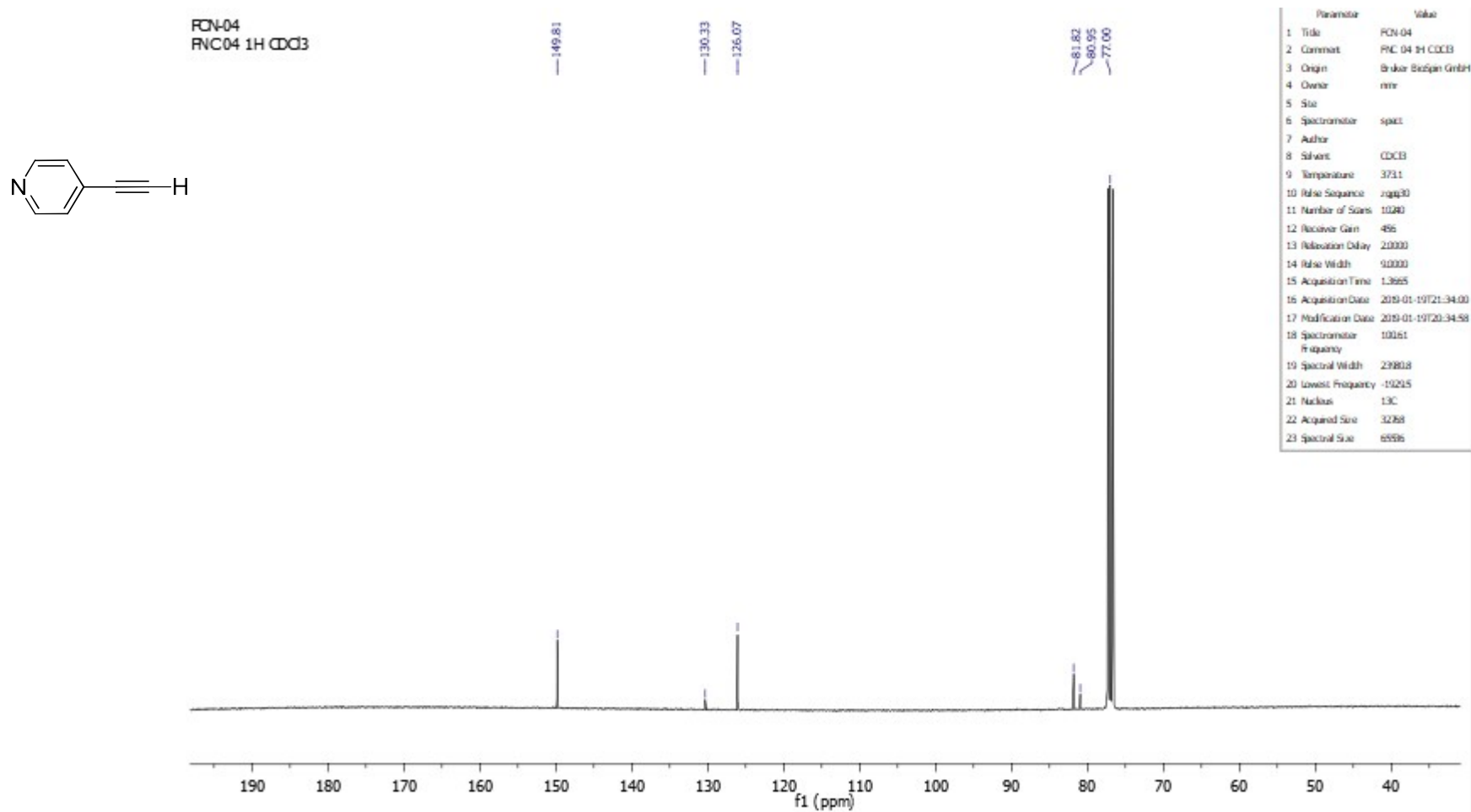
HDL-02  
HDL 02 1H CDD3

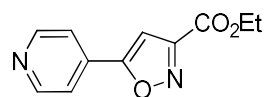
| Parameter                    | Value                 |
|------------------------------|-----------------------|
| 1 Title                      | HDL02                 |
| 2 Comment                    | HDL 02 1H<br>CDD3     |
| 3 Origin                     | Broker<br>Bruker GmbH |
| 4 Owner                      | nme                   |
| 5 Spectrometer               | spat                  |
| 6 Author                     |                       |
| 7 Solvent                    | CDCB                  |
| 8 Temperature                | 373.1                 |
| 9 Pulse                      | zg30                  |
| Sequence                     |                       |
| 10 Number of<br>Scans        | 16                    |
| 11 Receiver Gain             | 128                   |
| 12 Relaxation<br>Delay       | 1.0000                |
| 13 Pulse Width               | 13.5000               |
| 14 Acquisition<br>Time       | 3.0584                |
| 15 Acquisition<br>Date       | 2019-08-21 10         |
| 16 Modification<br>Date      | 2020-06-02 12         |
| 17 Spectrometer<br>Frequency | 400.13                |
| 18 Spectral<br>Width         | 8278.1                |
| 19 Lowest<br>Frequency       | -15726                |
| 20 Nucleus                   | 1H                    |
| 21 Acquired Size             | 32788                 |
| 22 Spectral Size             | 65536                 |



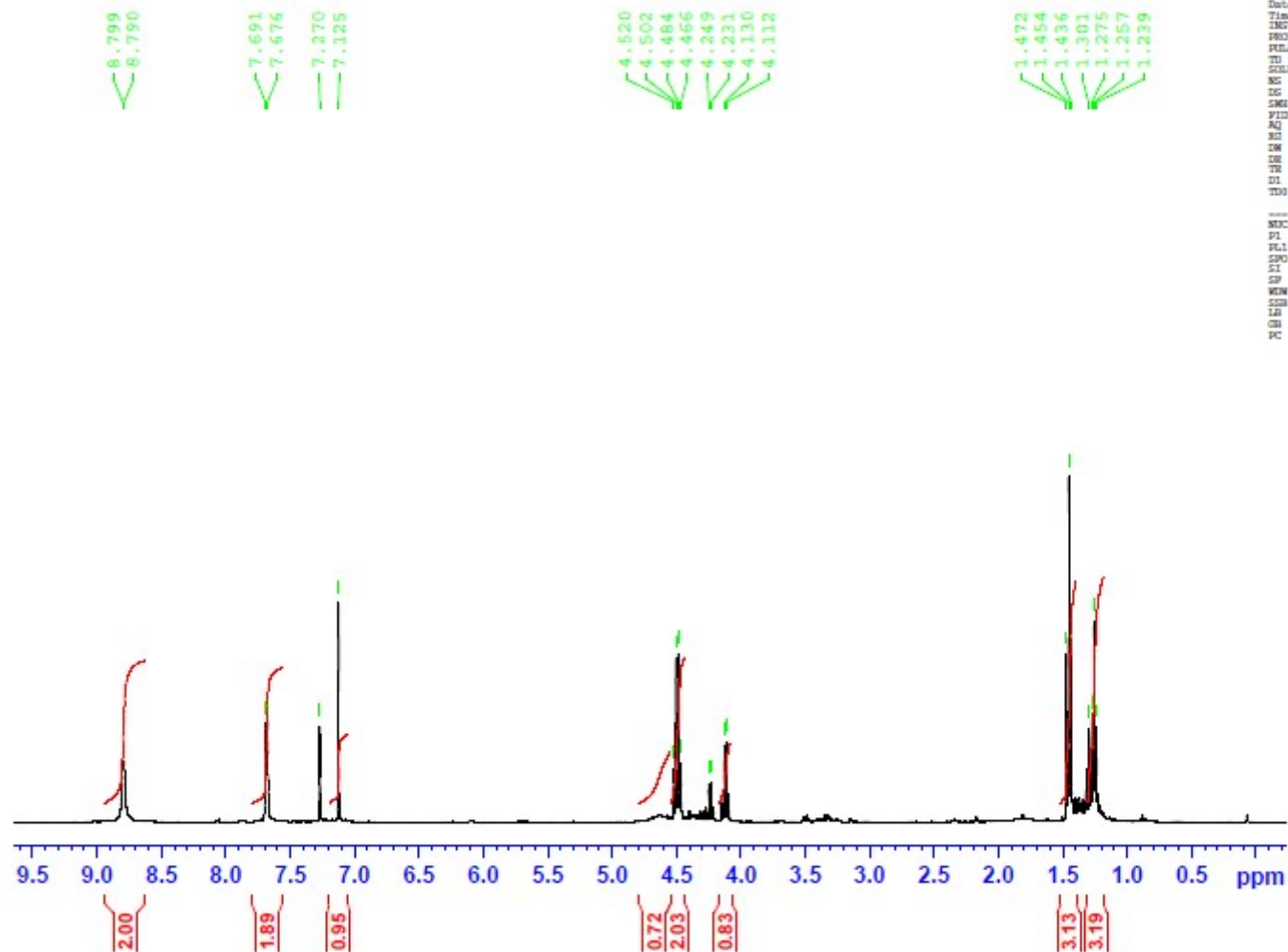
APÊNDICE BF – DIARIL-ISOXAZOL **88** – RMN  $^{13}\text{C}$  100 MHz

APÊNDICE BG – DIARIL-ISOXAZOL **89** – RMN  $^1\text{H}$  400 MHz

APÊNDICE BH – DIARIL-ISOXAZOL **89** – RMN  $^{13}\text{C}$  100 MHz

APÊNDICE BI – DIARIL-ISOXAZOL **91** – RMN  $^1\text{H}$  400 MHz

FCN-18BV.32 1H CDCl3



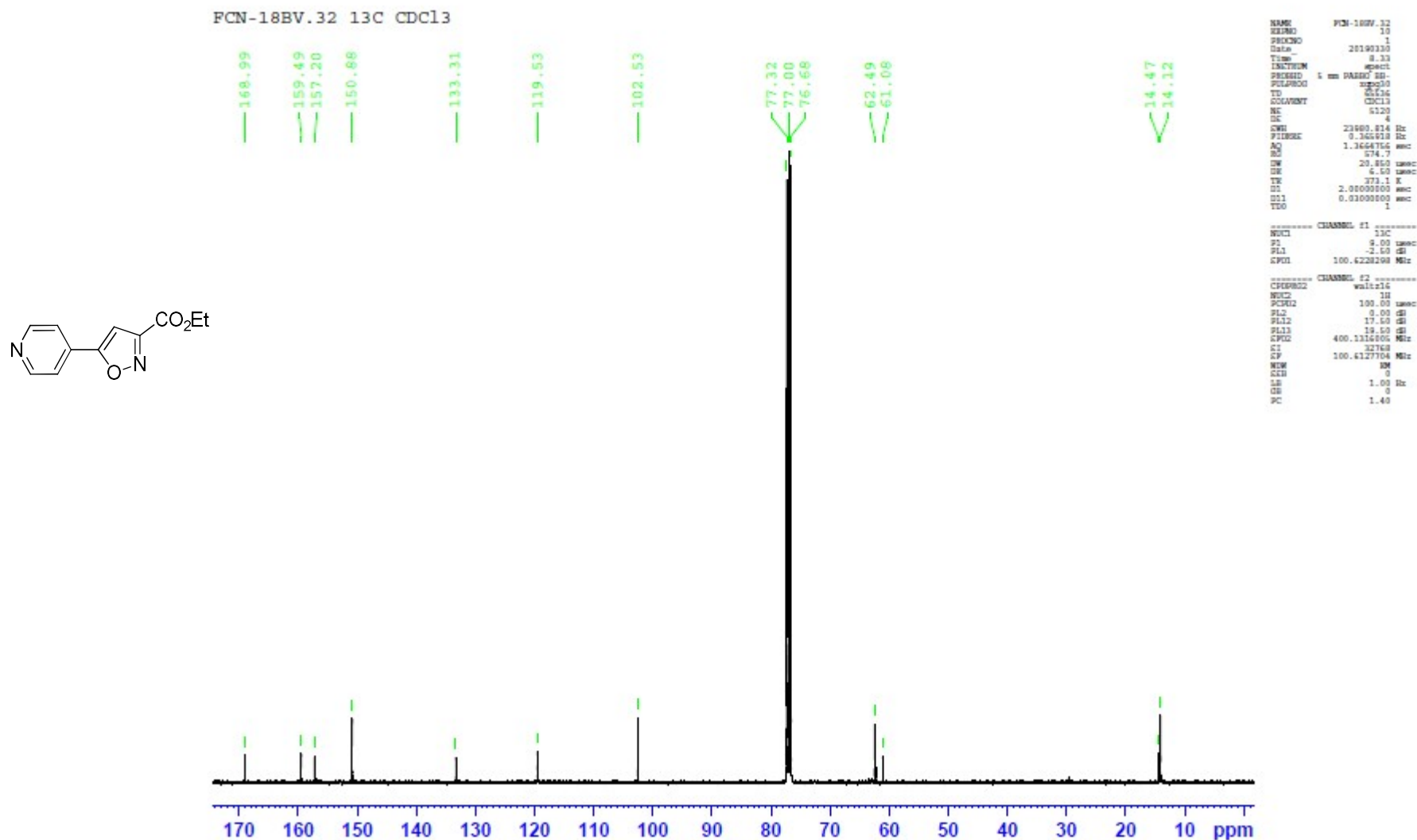
```

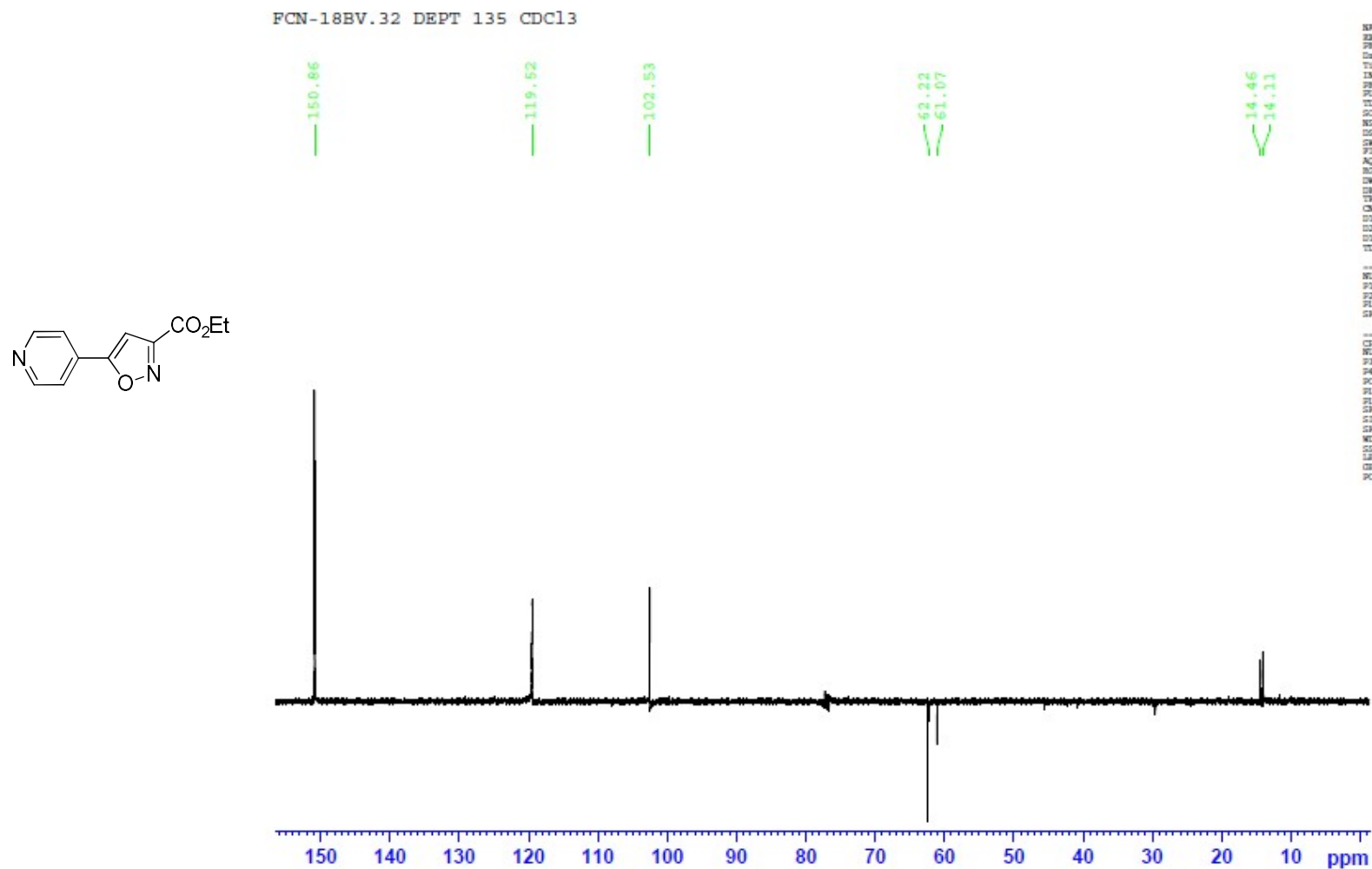
NAME      FCN-18BV.32
PROCNO    12
PROBHD    5 mm
Date_     20190310
Time      11.53
INSTRUM    spect
PROBHD    5 mm
PULPROG    zgpg30
TD         65536
SOLVENT    CDCl3
NS         12
DS         2
SHE        8278.146 Hz
FIDRES     0.126314 Hz
AQ         2.6584243 sec
RG         161.3
RW         60.400 usec
DS         6.50 usec
TE         373.1 K
D1         1.00000000 sec
TD0        1

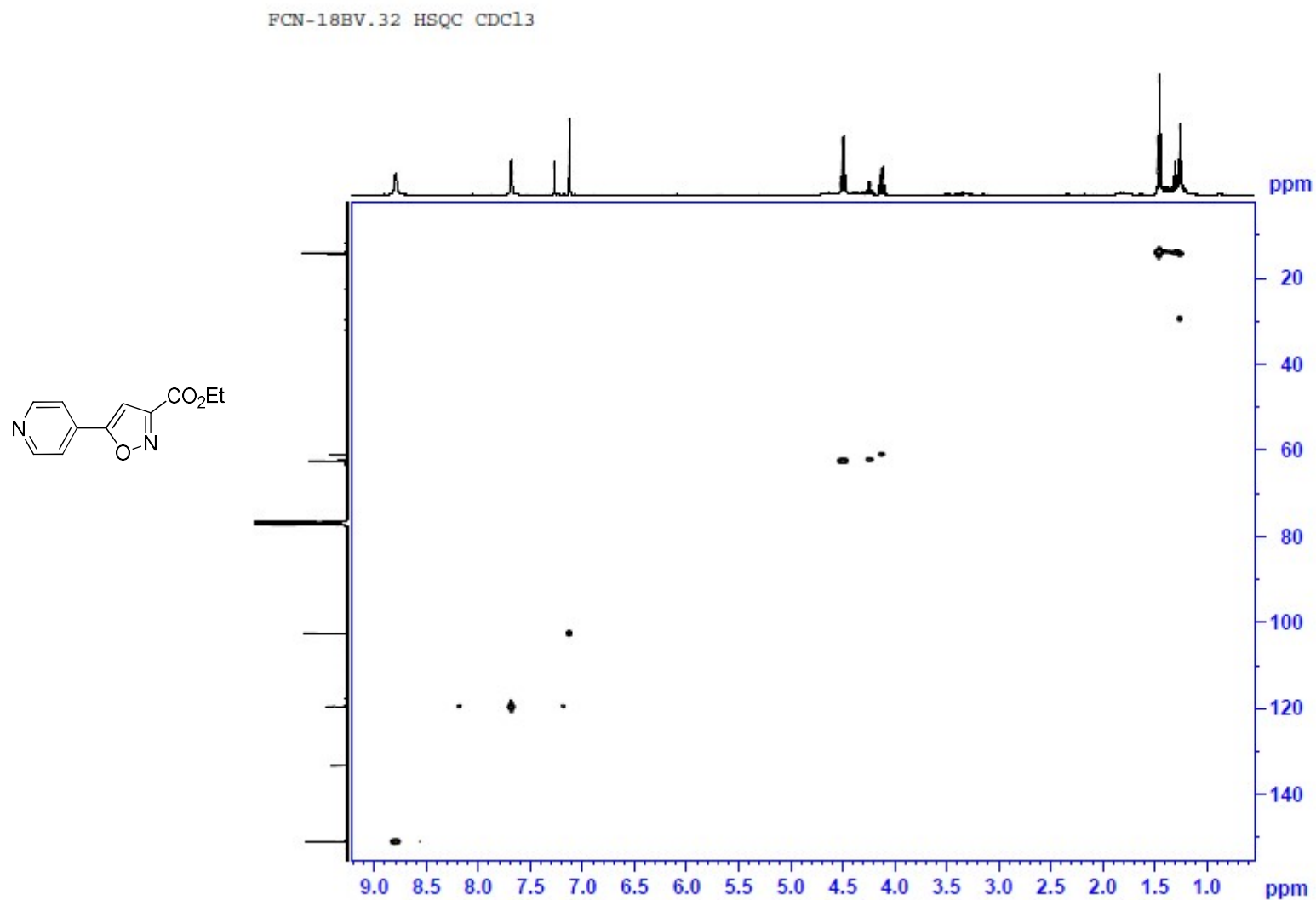
===== CHANNEL f1 =====
NUC1       1H
P1         13.50 usec
PL1        0.50 dB
SFO1       400.1324710 MHz
SI         32768
SF         400.1320055 MHz
WDW        RM
SSB        0
LA         0.70 Hz
GB         0
PC         1.00

```

APÊNDICE BJ – DIARIL-ISOXAZOL **91** – RMN  $^{13}\text{C}$  100 MHz

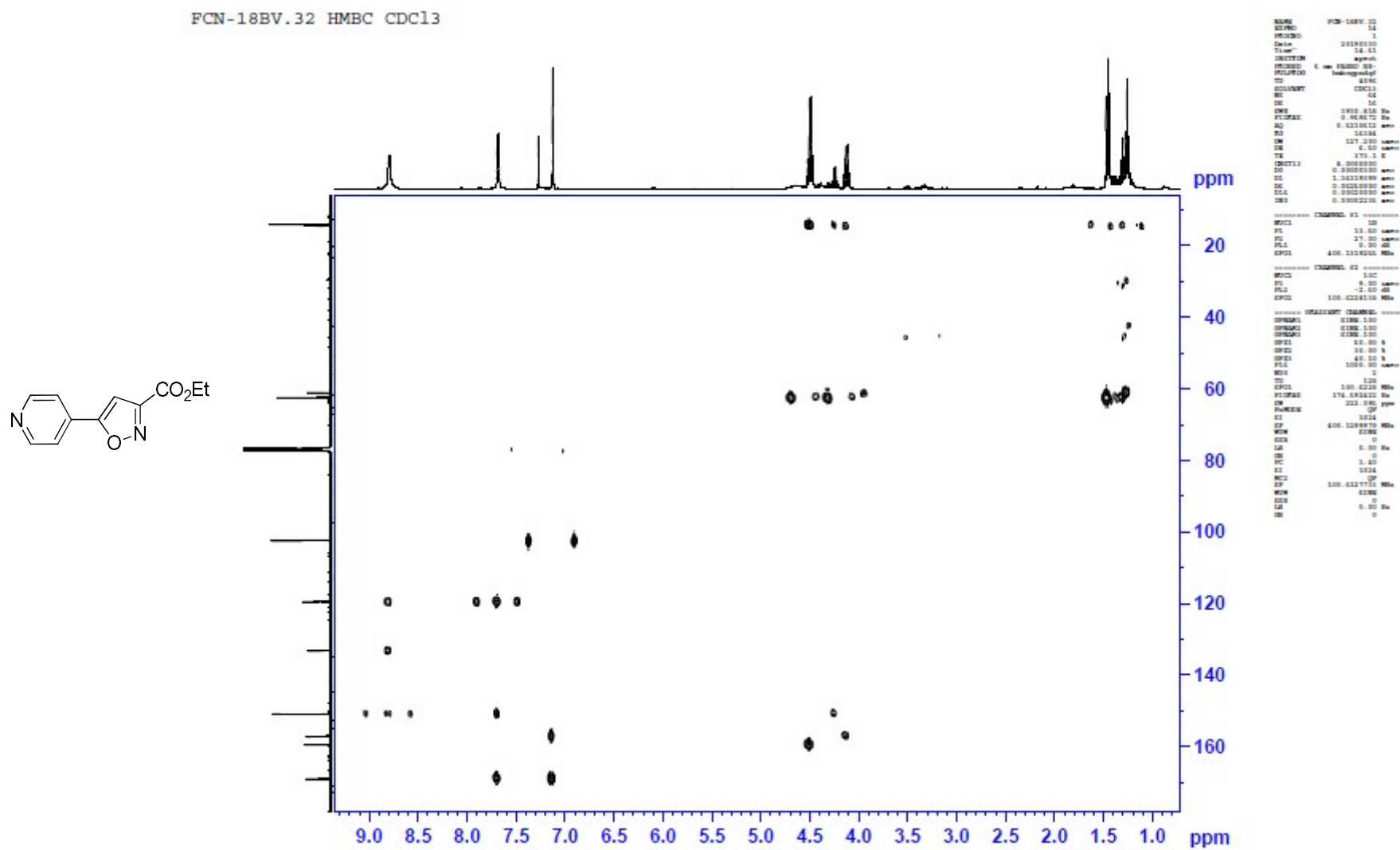


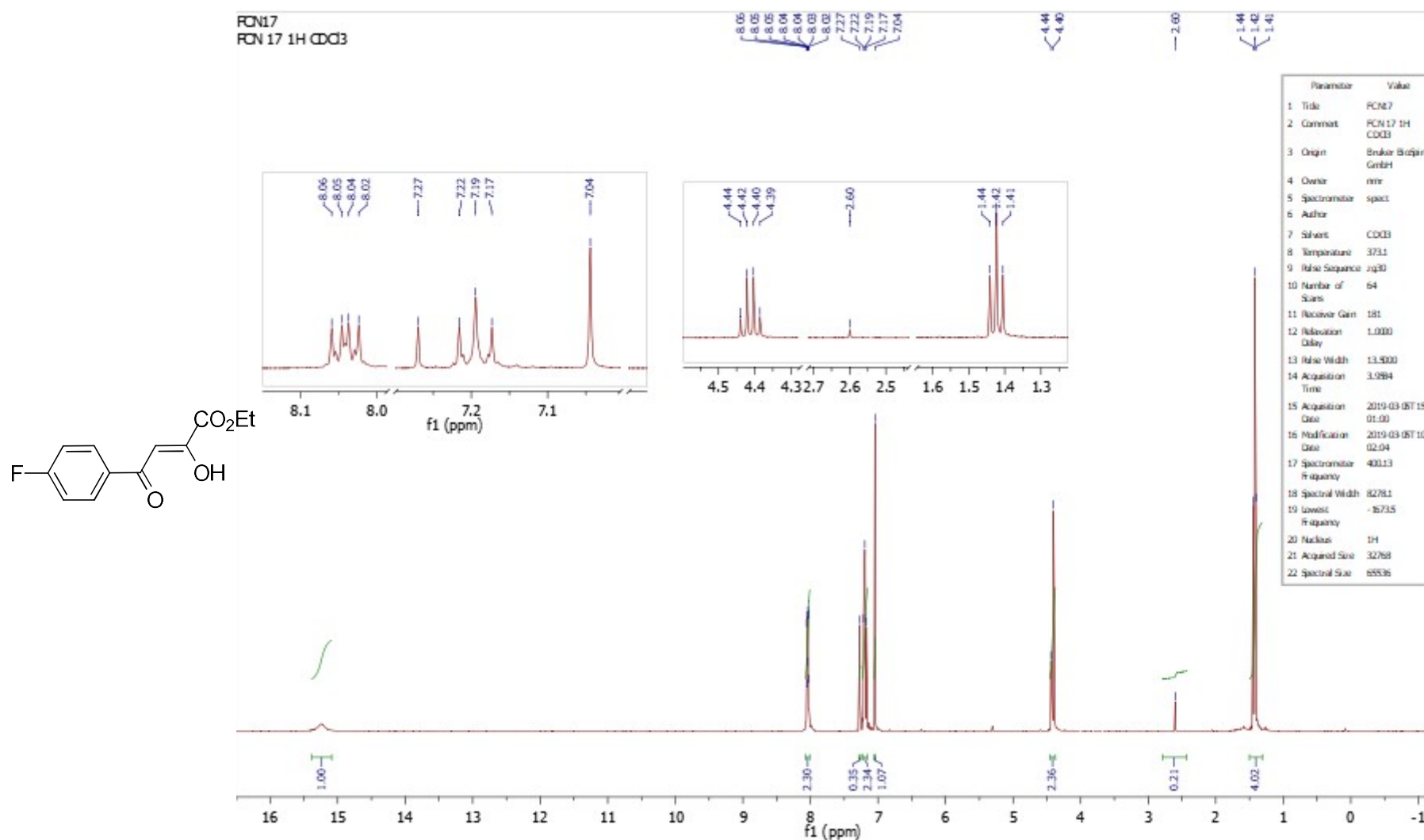
APÊNDICE BK – DIARIL-ISOXAZOL 91 – RMN DEPT

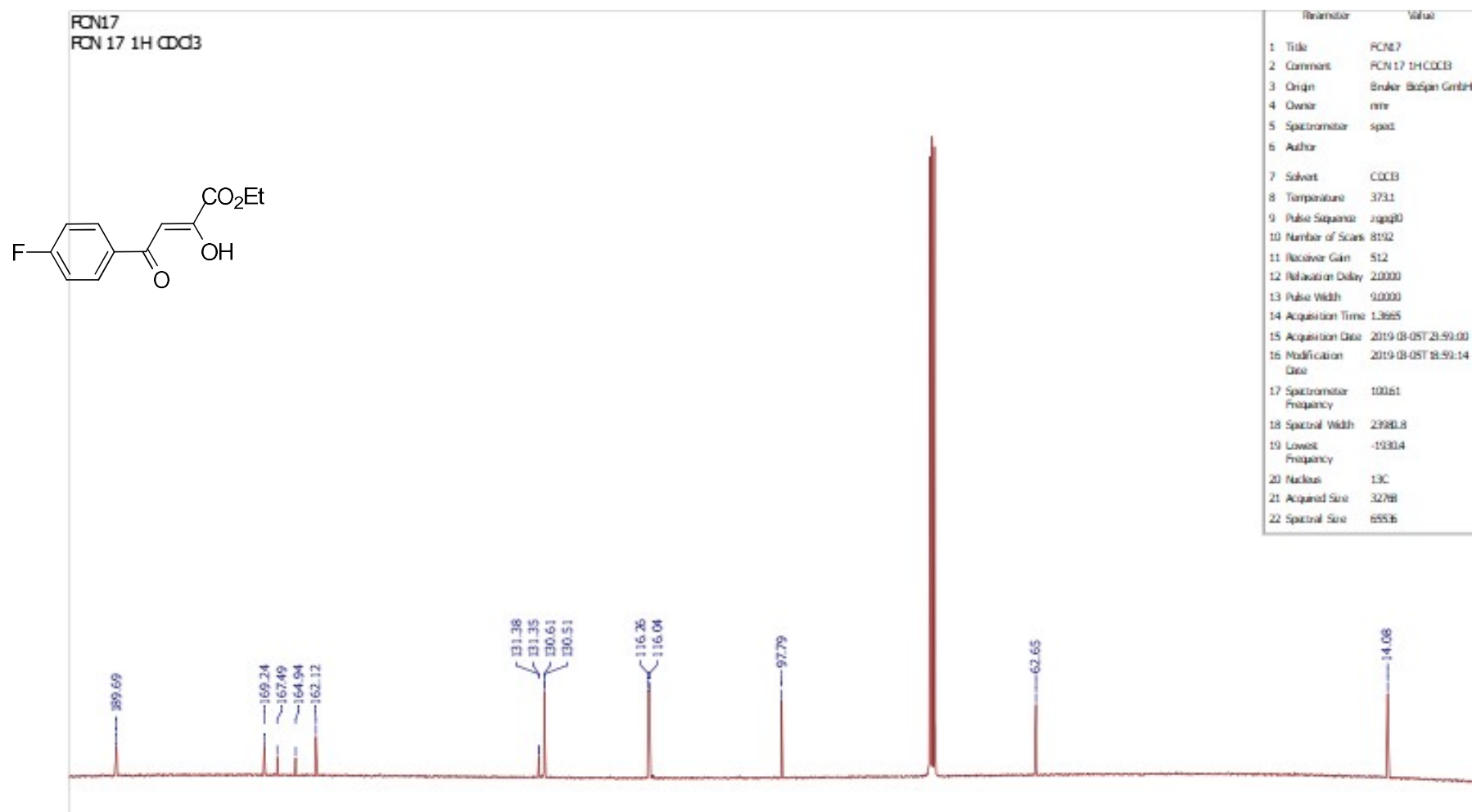
APÊNDICE BL – DIARIL-ISOXAZOL **91** – RMN HSQC

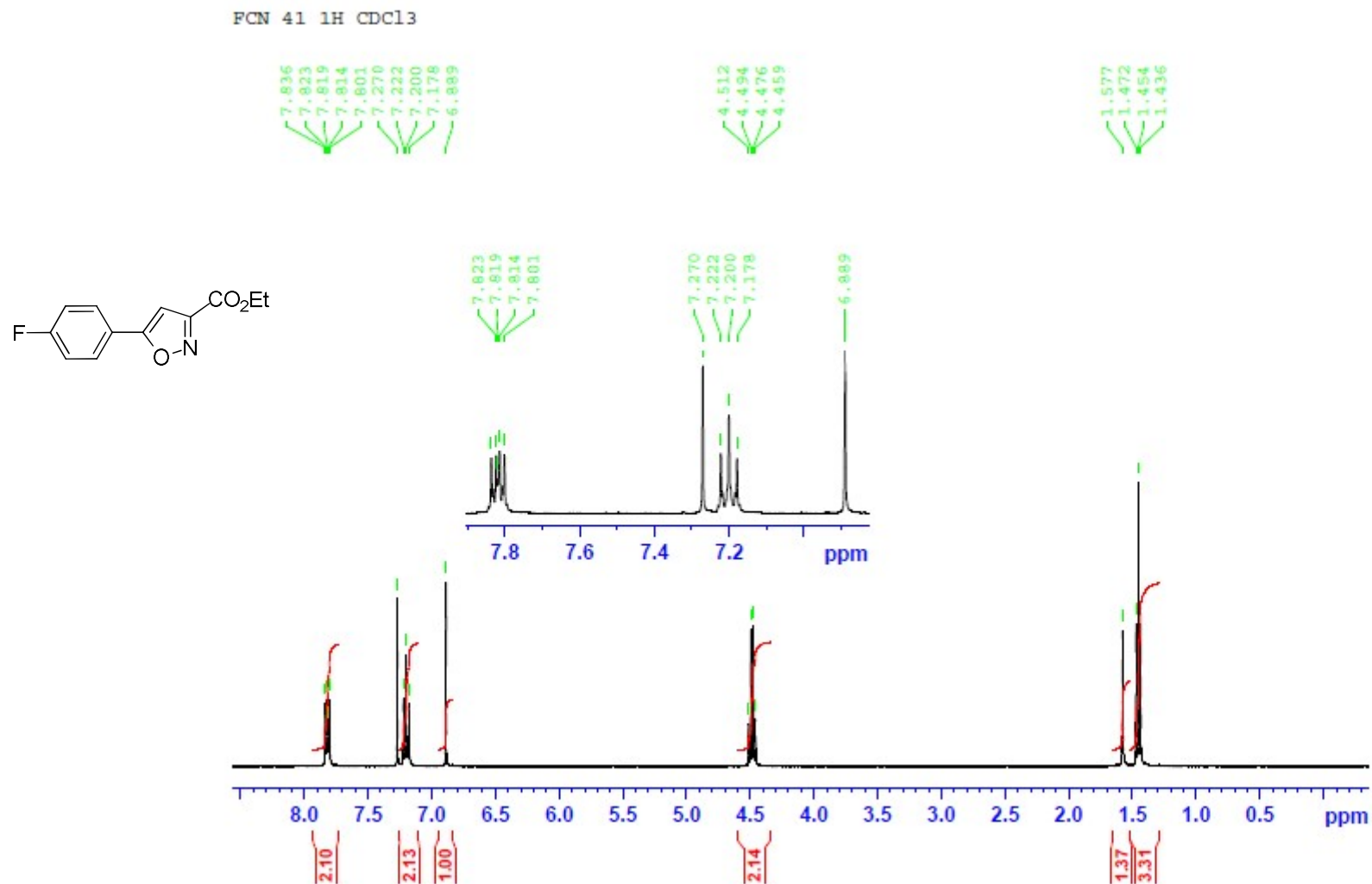
```

NAME      FCN-18BV.32
EXPNO     1
PROCNO    1
F2        300000000
TIME      11.07
INSTRUM   zgpg30
PROBHD    5 mm QNP1H
PULPROG   zgpg30
TD        65536
SOLVENT    CDCl3
NS         32
DS         4
SWH        1600.018 Hz
FIDRES     0.0000000 Hz
AQ         0.1180000 Hz
RG         327.000 Hz
IN         4.00 Hz
TE         300.2 K
CMT2      140.0000000
D0         0.0000000 Hz
D1         1.6017800 Hz
D4         0.0007814 Hz
D11        0.0000000 Hz
D13        0.0000000 Hz
D14        0.0000000 Hz
D16        0.0000000 Hz
D18        0.0000000 Hz
D19        0.0000000 Hz
===== CHANNEL f1 =====
NUC1       13C
P1         13.00 Hz
PC1        27.00 Hz
PL1        1.00 Hz
PL12       0.00 dB
PL13       0.00 dB
PL14       0.00 dB
===== CHANNEL f2 =====
CPDPRG2    gcp2
NUC2       1H
P2         4.00 Hz
PC2        9.00 Hz
PL2        18.00 Hz
PL22       0.00 dB
PL23       -2.00 dB
PL24       0.00 dB
===== CHANNEL f3 =====
CPDPRG3    gcp3
NUC3       13C
P3         13.00 Hz
PC3        27.00 Hz
PL3        1.00 Hz
PL32       0.00 dB
PL33       0.00 dB
PL34       0.00 dB
===== CHANNEL f4 =====
CPDPRG4    gcp4
NUC4       1H
P4         4.00 Hz
PC4        9.00 Hz
PL4        18.00 Hz
PL42       0.00 dB
PL43       -2.00 dB
PL44       0.00 dB
===== CHANNEL f5 =====
CPDPRG5    gcp5
NUC5       13C
P5         13.00 Hz
PC5        27.00 Hz
PL5        1.00 Hz
PL52       0.00 dB
PL53       0.00 dB
PL54       0.00 dB
===== CHANNEL f6 =====
CPDPRG6    gcp6
NUC6       1H
P6         4.00 Hz
PC6        9.00 Hz
PL6        18.00 Hz
PL62       0.00 dB
PL63       -2.00 dB
PL64       0.00 dB
===== CHANNEL f7 =====
CPDPRG7    gcp7
NUC7       13C
P7         13.00 Hz
PC7        27.00 Hz
PL7        1.00 Hz
PL72       0.00 dB
PL73       0.00 dB
PL74       0.00 dB
===== CHANNEL f8 =====
CPDPRG8    gcp8
NUC8       1H
P8         4.00 Hz
PC8        9.00 Hz
PL8        18.00 Hz
PL82       0.00 dB
PL83       -2.00 dB
PL84       0.00 dB
===== CHANNEL f9 =====
CPDPRG9    gcp9
NUC9       13C
P9         13.00 Hz
PC9        27.00 Hz
PL9        1.00 Hz
PL92       0.00 dB
PL93       0.00 dB
PL94       0.00 dB
===== CHANNEL f10 =====
CPDPRG10   gcp10
NUC10      1H
P10        4.00 Hz
PC10       9.00 Hz
PL10       18.00 Hz
PL102      0.00 dB
PL103      -2.00 dB
PL104      0.00 dB
===== CHANNEL f11 =====
CPDPRG11   gcp11
NUC11      13C
P11        13.00 Hz
PC11       27.00 Hz
PL11       1.00 Hz
PL112      0.00 dB
PL113      0.00 dB
PL114      0.00 dB
===== CHANNEL f12 =====
CPDPRG12   gcp12
NUC12      1H
P12        4.00 Hz
PC12       9.00 Hz
PL12       18.00 Hz
PL122      0.00 dB
PL123      -2.00 dB
PL124      0.00 dB
===== CHANNEL f13 =====
CPDPRG13   gcp13
NUC13      13C
P13        13.00 Hz
PC13       27.00 Hz
PL13       1.00 Hz
PL132      0.00 dB
PL133      0.00 dB
PL134      0.00 dB
===== CHANNEL f14 =====
CPDPRG14   gcp14
NUC14      1H
P14        4.00 Hz
PC14       9.00 Hz
PL14       18.00 Hz
PL142      0.00 dB
PL143      -2.00 dB
PL144      0.00 dB
===== CHANNEL f15 =====
CPDPRG15   gcp15
NUC15      13C
P15        13.00 Hz
PC15       27.00 Hz
PL15       1.00 Hz
PL152      0.00 dB
PL153      0.00 dB
PL154      0.00 dB
===== CHANNEL f16 =====
CPDPRG16   gcp16
NUC16      1H
P16        4.00 Hz
PC16       9.00 Hz
PL16       18.00 Hz
PL162      0.00 dB
PL163      -2.00 dB
PL164      0.00 dB
===== CHANNEL f17 =====
CPDPRG17   gcp17
NUC17      13C
P17        13.00 Hz
PC17       27.00 Hz
PL17       1.00 Hz
PL172      0.00 dB
PL173      0.00 dB
PL174      0.00 dB
===== CHANNEL f18 =====
CPDPRG18   gcp18
NUC18      1H
P18        4.00 Hz
PC18       9.00 Hz
PL18       18.00 Hz
PL182      0.00 dB
PL183      -2.00 dB
PL184      0.00 dB
===== CHANNEL f19 =====
CPDPRG19   gcp19
NUC19      13C
P19        13.00 Hz
PC19       27.00 Hz
PL19       1.00 Hz
PL192      0.00 dB
PL193      0.00 dB
PL194      0.00 dB
===== CHANNEL f20 =====
CPDPRG20   gcp20
NUC20      1H
P20        4.00 Hz
PC20       9.00 Hz
PL20       18.00 Hz
PL202      0.00 dB
PL203      -2.00 dB
PL204      0.00 dB
===== CHANNEL f21 =====
CPDPRG21   gcp21
NUC21      13C
P21        13.00 Hz
PC21       27.00 Hz
PL21       1.00 Hz
PL212      0.00 dB
PL213      0.00 dB
PL214      0.00 dB
===== CHANNEL f22 =====
CPDPRG22   gcp22
NUC22      1H
P22        4.00 Hz
PC22       9.00 Hz
PL22       18.00 Hz
PL222      0.00 dB
PL223      -2.00 dB
PL224      0.00 dB
===== CHANNEL f23 =====
CPDPRG23   gcp23
NUC23      13C
P23        13.00 Hz
PC23       27.00 Hz
PL23       1.00 Hz
PL232      0.00 dB
PL233      0.00 dB
PL234      0.00 dB
===== CHANNEL f24 =====
CPDPRG24   gcp24
NUC24      1H
P24        4.00 Hz
PC24       9.00 Hz
PL24       18.00 Hz
PL242      0.00 dB
PL243      -2.00 dB
PL244      0.00 dB
===== CHANNEL f25 =====
CPDPRG25   gcp25
NUC25      13C
P25        13.00 Hz
PC25       27.00 Hz
PL25       1.00 Hz
PL252      0.00 dB
PL253      0.00 dB
PL254      0.00 dB
===== CHANNEL f26 =====
CPDPRG26   gcp26
NUC26      1H
P26        4.00 Hz
PC26       9.00 Hz
PL26       18.00 Hz
PL262      0.00 dB
PL263      -2.00 dB
PL264      0.00 dB
===== CHANNEL f27 =====
CPDPRG27   gcp27
NUC27      13C
P27        13.00 Hz
PC27       27.00 Hz
PL27       1.00 Hz
PL272      0.00 dB
PL273      0.00 dB
PL274      0.00 dB
===== CHANNEL f28 =====
CPDPRG28   gcp28
NUC28      1H
P28        4.00 Hz
PC28       9.00 Hz
PL28       18.00 Hz
PL282      0.00 dB
PL283      -2.00 dB
PL284      0.00 dB
===== CHANNEL f29 =====
CPDPRG29   gcp29
NUC29      13C
P29        13.00 Hz
PC29       27.00 Hz
PL29       1.00 Hz
PL292      0.00 dB
PL293      0.00 dB
PL294      0.00 dB
===== CHANNEL f30 =====
CPDPRG30   gcp30
NUC30      1H
P30        4.00 Hz
PC30       9.00 Hz
PL30       18.00 Hz
PL302      0.00 dB
PL303      -2.00 dB
PL304      0.00 dB
===== CHANNEL f31 =====
CPDPRG31   gcp31
NUC31      13C
P31        13.00 Hz
PC31       27.00 Hz
PL31       1.00 Hz
PL312      0.00 dB
PL313      0.00 dB
PL314      0.00 dB
===== CHANNEL f32 =====
CPDPRG32   gcp32
NUC32      1H
P32        4.00 Hz
PC32       9.00 Hz
PL32       18.00 Hz
PL322      0.00 dB
PL323      -2.00 dB
PL324      0.00 dB
===== CHANNEL f33 =====
CPDPRG33   gcp33
NUC33      13C
P33        13.00 Hz
PC33       27.00 Hz
PL33       1.00 Hz
PL332      0.00 dB
PL333      0.00 dB
PL334      0.00 dB
===== CHANNEL f34 =====
CPDPRG34   gcp34
NUC34      1H
P34        4.00 Hz
PC34       9.00 Hz
PL34       18.00 Hz
PL342      0.00 dB
PL343      -2.00 dB
PL344      0.00 dB
===== CHANNEL f35 =====
CPDPRG35   gcp35
NUC35      13C
P35        13.00 Hz
PC35       27.00 Hz
PL35       1.00 Hz
PL352      0.00 dB
PL353      0.00 dB
PL354      0.00 dB
===== CHANNEL f36 =====
CPDPRG36   gcp36
NUC36      1H
P36        4.00 Hz
PC36       9.00 Hz
PL36       18.00 Hz
PL362      0.00 dB
PL363      -2.00 dB
PL364      0.00 dB
===== CHANNEL f37 =====
CPDPRG37   gcp37
NUC37      13C
P37        13.00 Hz
PC37       27.00 Hz
PL37       1.00 Hz
PL372      0.00 dB
PL373      0.00 dB
PL374      0.00 dB
===== CHANNEL f38 =====
CPDPRG38   gcp38
NUC38      1H
P38        4.00 Hz
PC38       9.00 Hz
PL38       18.00 Hz
PL382      0.00 dB
PL383      -2.00 dB
PL384      0.00 dB
===== CHANNEL f39 =====
CPDPRG39   gcp39
NUC39      13C
P39        13.00 Hz
PC39       27.00 Hz
PL39       1.00 Hz
PL392      0.00 dB
PL393      0.00 dB
PL394      0.00 dB
===== CHANNEL f40 =====
CPDPRG40   gcp40
NUC40      1H
P40        4.00 Hz
PC40       9.00 Hz
PL40       18.00 Hz
PL402      0.00 dB
PL403      -2.00 dB
PL404      0.00 dB
===== CHANNEL f41 =====
CPDPRG41   gcp41
NUC41      13C
P41        13.00 Hz
PC41       27.00 Hz
PL41       1.00 Hz
PL412      0.00 dB
PL413      0.00 dB
PL414      0.00 dB
===== CHANNEL f42 =====
CPDPRG42   gcp42
NUC42      1H
P42        4.00 Hz
PC42       9.00 Hz
PL42       18.00 Hz
PL422      0.00 dB
PL423      -2.00 dB
PL424      0.00 dB
===== CHANNEL f43 =====
CPDPRG43   gcp43
NUC43      13C
P43        13.00 Hz
PC43       27.00 Hz
PL43       1.00 Hz
PL432      0.00 dB
PL433      0.00 dB
PL434      0.00 dB
===== CHANNEL f44 =====
CPDPRG44   gcp44
NUC44      1H
P44        4.00 Hz
PC44       9.00 Hz
PL44       18.00 Hz
PL442      0.00 dB
PL443      -2.00 dB
PL444      0.00 dB
===== CHANNEL f45 =====
CPDPRG45   gcp45
NUC45      13C
P45        13.00 Hz
PC45       27.00 Hz
PL45       1.00 Hz
PL452      0.00 dB
PL453      0.00 dB
PL454      0.00 dB
===== CHANNEL f46 =====
CPDPRG46   gcp46
NUC46      1H
P46        4.00 Hz
PC46       9.00 Hz
PL46       18.00 Hz
PL462      0.00 dB
PL463      -2.00 dB
PL464      0.00 dB
===== CHANNEL f47 =====
CPDPRG47   gcp47
NUC47      13C
P47        13.00 Hz
PC47       27.00 Hz
PL47       1.00 Hz
PL472      0.00 dB
PL473      0.00 dB
PL474      0.00 dB
===== CHANNEL f48 =====
CPDPRG48   gcp48
NUC48      1H
P48        4.00 Hz
PC48       9.00 Hz
PL48       18.00 Hz
PL482      0.00 dB
PL483      -2.00 dB
PL484      0.00 dB
===== CHANNEL f49 =====
CPDPRG49   gcp49
NUC49      13C
P49        13.00 Hz
PC49       27.00 Hz
PL49       1.00 Hz
PL492      0.00 dB
PL493      0.00 dB
PL494      0.00 dB
===== CHANNEL f50 =====
CPDPRG50   gcp50
NUC50      1H
P50        4.00 Hz
PC50       9.00 Hz
PL50       18.00 Hz
PL502      0.00 dB
PL503      -2.00 dB
PL504      0.00 dB
===== CHANNEL f51 =====
CPDPRG51   gcp51
NUC51      13C
P51        13.00 Hz
PC51       27.00 Hz
PL51       1.00 Hz
PL512      0.00 dB
PL513      0.00 dB
PL514      0.00 dB
===== CHANNEL f52 =====
CPDPRG52   gcp52
NUC52      1H
P52        4.00 Hz
PC52       9.00 Hz
PL52       18.00 Hz
PL522      0.00 dB
PL523      -2.00 dB
PL524      0.00 dB
===== CHANNEL f53 =====
CPDPRG53   gcp53
NUC53      13C
P53        13.00 Hz
PC53       27.00 Hz
PL53       1.00 Hz
PL532      0.00 dB
PL533      0.00 dB
PL534      0.00 dB
===== CHANNEL f54 =====
CPDPRG54   gcp54
NUC54      1H
P54        4.00 Hz
PC54       9.00 Hz
PL54       18.00 Hz
PL542      0.00 dB
PL543      -2.00 dB
PL544      0.00 dB
===== CHANNEL f55 =====
CPDPRG55   gcp55
NUC55      13C
P55        13.00 Hz
PC55       27.00 Hz
PL55       1.00 Hz
PL552      0.00 dB
PL553      0.00 dB
PL554      0.00 dB
===== CHANNEL f56 =====
CPDPRG56   gcp56
NUC56      1H
P56        4.00 Hz
PC56       9.00 Hz
PL56       18.00 Hz
PL562      0.00 dB
PL563      -2.00 dB
PL564      0.00 dB
===== CHANNEL f57 =====
CPDPRG57   gcp57
NUC57      13C
P57        13.00 Hz
PC57       27.00 Hz
PL57       1.00 Hz
PL572      0.00 dB
PL573      0.00 dB
PL574      0.00 dB
===== CHANNEL f58 =====
CPDPRG58   gcp58
NUC58      1H
P58        4.00 Hz
PC58       9.00 Hz
PL58       18.00 Hz
PL582      0.00 dB
PL583      -2.00 dB
PL584      0.00 dB
===== CHANNEL f59 =====
CPDPRG59   gcp59
NUC59      13C
P59        13.00 Hz
PC59       27.00 Hz
PL59       1.00 Hz
PL592      0.00 dB
PL593      0.00 dB
PL594      0.00 dB
===== CHANNEL f60 =====
CPDPRG60   gcp60
NUC60      1H
P60        4.00 Hz
PC60       9.00 Hz
PL60       18.00 Hz
PL602      0.00 dB
PL603      -2.00 dB
PL604      0.00 dB
===== CHANNEL f61 =====
CPDPRG61   gcp61
NUC61      13C
P61        13.00 Hz
PC61       27.00 Hz
PL61       1.00 Hz
PL612      0.00 dB
PL613      0.00 dB
PL614      0.00 dB
===== CHANNEL f62 =====
CPDPRG62   gcp62
NUC62      1H
P62        4.00 Hz
PC62       9.00 Hz
PL62       18.00 Hz
PL622      0.00 dB
PL623      -2.00 dB
PL624      0.00 dB
===== CHANNEL f63 =====
CPDPRG63   gcp63
NUC63      13C
P63        13.00 Hz
PC63       27.00 Hz
PL63       1.00 Hz
PL632      0.00 dB
PL633      0.00 dB
PL634      0.00 dB
===== CHANNEL f64 =====
CPDPRG64   gcp64
NUC64      1H
P64        4.00 Hz
PC64       9.00 Hz
PL64       18.00 Hz
PL642      0.00 dB
PL643      -2.00 dB
PL644      0.00 dB
===== CHANNEL f65 =====
CPDPRG65   gcp65
NUC65      13C
P65        13.00 Hz
PC65       27.00 Hz
PL65       1.00 Hz
PL652      0.00 dB
PL653      0.00 dB
PL654      0.00 dB
===== CHANNEL f66 =====
CPDPRG66   gcp66
NUC66      1H
P66        4.00 Hz
PC66       9.00 Hz
PL66       18.00 Hz
PL662      0.00 dB
PL663      -2.00 dB
PL664      0.00 dB
===== CHANNEL f67 =====
CPDPRG67   gcp67
NUC67      13C
P67        13.00 Hz
PC67       27.00 Hz
PL67       1.00 Hz
PL672      0.00 dB
PL673      0.00 dB
PL674      0.00 dB
===== CHANNEL f68 =====
CPDPRG68   gcp68
NUC68      1H
P68        4.00 Hz
PC68       9.00 Hz
PL68       18.00 Hz
PL682      0.00 dB
PL683      -2.00 dB
PL684      0.00 dB
===== CHANNEL f69 =====
CPDPRG69   gcp69
NUC69      13C
P69        13.00 Hz
PC69       27.00 Hz
PL69       1.00 Hz
PL692      0.00 dB
PL693      0.00 dB
PL694      0.00 dB
===== CHANNEL f70 =====
CPDPRG70   gcp70
NUC70      1H
P70        4.00 Hz
PC70       9.00 Hz
PL70       18.00 Hz
PL702      0.00 dB
PL703      -2.00 dB
PL704      0.00 dB
===== CHANNEL f71 =====
CPDPRG71   gcp71
NUC71      13C
P71        13.00 Hz
PC71       27.00 Hz
PL71       1.00 Hz
PL712      0.00 dB
PL713      0.00 dB
PL714      0.00 dB
===== CHANNEL f72 =====
CPDPRG72   gcp72
NUC72      1H
P72        4.00 Hz
PC72       9.00 Hz
PL72       18.00 Hz
PL722      0.00 dB
PL723      -2.00 dB
PL724      0.00 dB
===== CHANNEL f73 =====
CPDPRG73   gcp73
NUC73      13C
P73        13.00 Hz
PC73       27.00 Hz
PL73       1.00 Hz
PL732      0.00 dB
PL733      0.00 dB
PL734      0.00 dB
===== CHANNEL f74 =====
CPDPRG74   gcp74
NUC74      1H
P74        4.00 Hz
PC74       9.00 Hz
PL74       18.00 Hz
PL742      0.00 dB
PL743      -2.00 dB
PL744      0.00 dB
===== CHANNEL f75 =====
CPDPRG75   gcp75
NUC75      13C
P75        13.00 Hz
PC75       27.00 Hz
PL75       1.00 Hz
PL752      0.00 dB
PL753      0.00 dB
PL754      0.00 dB
===== CHANNEL f76 =====
CPDPRG76   gcp76
NUC76      1H
P76        4.00 Hz
PC76       9.00 Hz
PL76       18.00 Hz
PL762      0.00 dB
PL763      -2.00 dB
PL764      0.00 dB
===== CHANNEL f77 =====
CPDPRG77   gcp77
NUC77      13C
P77        13.00 Hz
PC77       27.00 Hz
PL77       1.00 Hz
PL772      0.00 dB
PL773      0.00 dB
PL774      0.00 dB
===== CHANNEL f78 =====
CPDPRG78   gcp78
NUC78      1H
P78        4.00 Hz
PC78       9.00 Hz
PL78       18.00 Hz
PL782      0.00 dB
PL783      -2.00 dB
PL784      0.00 dB
===== CHANNEL f79 =====
CPDPRG79   gcp79
NUC79      13C
P79        13.00 Hz
PC79       27.00 Hz
PL79       1.00 Hz
PL792      0.00 dB
PL793      0.00 dB
PL794      0.00 dB
===== CHANNEL f80 =====
CPDPRG80   gcp80
NUC80      1H
P80        4.00 Hz
PC80       9.00 Hz
PL80       18.00 Hz
PL802      0.00 dB
PL803      -2.00 dB
PL804      0.00 dB
===== CHANNEL f81 =====
CPDPRG81   gcp81
NUC81      13C
P81        13.00 Hz
PC81       27.00 Hz
PL81       1.00 Hz
PL812      0.00 dB
PL813      0.00 dB
PL814      0.00 dB
===== CHANNEL f82 =====
CPDPRG82   gcp82
NUC82      1H
P82        4.00 Hz
PC82       9.00 Hz
PL82       18.00 Hz
PL822      0.00 dB
PL823      -2.00 dB
PL824      0.00 dB
===== CHANNEL f83 =====
CPDPRG83   gcp83
NUC83      13C
P83        13.00 Hz
PC83       27.00 Hz
PL83       1.00 Hz
PL832      0.00 dB
PL833      0.00 dB
PL834      0.00 dB
===== CHANNEL f84 =====
CPDPRG84   gcp84
NUC84      1H
P84        4.00 Hz
PC84       9.00 Hz
PL84       18.00 Hz
PL842      0.00 dB
PL843      -2.00 dB
PL844      0.00 dB
===== CHANNEL f85 =====
CPDPRG85   gcp85
NUC85      13C
P85        13.00 Hz
PC85       27.00 Hz
PL85       1.00 Hz
PL852      0.00 dB
PL853      0.00 dB
PL854      0.00 dB
===== CHANNEL f86 =====
CPDPRG86   gcp86
NUC86      1H
P86        4.00 Hz
PC86       9.00 Hz
PL86       18.00 Hz
PL862      0.00 dB
PL863      -2.00 dB
PL864      0.00 dB
===== CHANNEL f87 =====
CPDPRG87   gcp87
NUC87      13C
P87        13.00 Hz
PC87       27.00 Hz
PL87       1.00 Hz
PL872      0.00 dB
PL873      0.00 dB
PL874      0.00 dB
===== CHANNEL f88 =====
CPDPRG88   gcp88
NUC88      1H
P88        4.00 Hz
PC88       9.00 Hz
PL88       18.00 Hz
PL882      0.00 dB
PL883      -2.00 dB
PL884      0.00 dB
===== CHANNEL f89 =====
CPDPRG89   gcp89
NUC89      13C
P89        13.00 Hz
PC89       27.00 Hz
PL89       1.00 Hz
PL892      0.00 dB
PL893      0.00 dB
PL894      0.00 dB
===== CHANNEL f90 =====
CPDPRG90   gcp90
NUC90      1H
P90        4.00 Hz
PC90       9.00 Hz
PL90       18.00 Hz
PL902      0.00 dB
PL903      -2.00 dB
PL904      0.00 dB
===== CHANNEL f91 =====
CPDPRG91   gcp91
NUC91      13C
P91        13.00 Hz
PC91       27.00 Hz
PL91       1.00 Hz
PL912      0.00 dB
PL913      0.00 dB
PL914      0.00 dB
===== CHANNEL f92 =====
CPDPRG92   gcp92
NUC92      1H
P92        4.00 Hz
PC92       9.00 Hz
PL92       18.00 Hz
PL922      0.00 dB
PL923      -2.00 dB
PL924      0.00 dB
===== CHANNEL f93 =====
CPDPRG93   gcp93
NUC93      13C
P93        13.00 Hz
PC93       27.00 Hz
PL93       1.00 Hz
PL932      0.00 dB
PL933      0.00 dB
PL934      0.00 dB
===== CHANNEL f94 =====
CPDPRG94   gcp94
NUC94      1H
P94        4.00 Hz
PC94       9.00 Hz
PL94       18.00 Hz
PL942      0.00 dB
PL943      -2.00 dB
PL944      0.00 dB
===== CHANNEL f95 =====
CPDPRG95   gcp95
NUC95      13C
P95        13.00 Hz
PC95       27.00 Hz
PL95       1.00 Hz
PL952      0.00 dB
PL953      0.00 dB
PL954      0.00 dB
===== CHANNEL f96 =====
CPDPRG96   gcp96
NUC96      1H
P96        4.00 Hz
PC96       9.00 Hz
PL96       18.00 Hz
PL962      0.00 dB
PL963      -2.00 dB
PL964      0.00 dB
===== CHANNEL f97 =====
CPDPRG97   gcp97
NUC97      13C
P97        13.00 Hz
PC97       27.00 Hz
PL97       1.00 Hz
PL972      0.00 dB
PL973      0.00 dB
PL974      0.00 dB
===== CHANNEL f98 =====
CPDPRG98   gcp98
NUC98      1H
P98        4.00 Hz
PC98       9.00 Hz
PL98       18.00 Hz
PL982      0.00 dB
PL983      -2.00 dB
PL984      0.00 dB
===== CHANNEL f99 =====
CPDPRG99   gcp99
NUC99      13C
P99        13.00 Hz
PC99       27.00 Hz
PL99       1.00 Hz
PL992      0.00 dB
PL993      0.00 dB
PL994      0.00 dB
===== CHANNEL f100 =====
CPDPRG100  gcp100
NUC100     1H
P100       4.00 Hz
PC100      9.00 Hz
PL100      18.00 Hz
PL1002     0.00 dB
PL1003     -2.00 dB
PL1004     0.00 dB
===== CHANNEL f101 =====
CPDPRG101  gcp101
NUC101     13C
P101       13.00 Hz
PC101      27.00 Hz
PL101      1.00 Hz
PL1012     0.00 dB
PL1013     0.00 dB
PL1014     0.00 dB
===== CHANNEL f102 =====
CPDPRG102  gcp102
NUC102     1H
P102       4.00 Hz
PC102      9.00 Hz
PL102      18.00 Hz
PL1022     0.00 dB
PL1023     -2.00 dB
PL1024     0.00 dB
===== CHANNEL f103 =====
CPDPRG103  gcp103
NUC103     13C
P103       13.00 Hz
PC103      27.00 Hz
PL103      1.00 Hz
PL1032     0.00 dB
PL1033     0.00 dB
PL1034     0.00 dB
===== CHANNEL f104 =====
CPDPRG104  gcp104
NUC104     1H
P104       4.00 Hz
PC104      9.00 Hz
PL104      18.00 Hz
PL1042     0.00 dB
PL1043     -2.00 dB
PL1044     0.00 dB
===== CHANNEL f105 =====
CPDPRG105  gcp105
NUC105     13C
P105       13.00 Hz
PC105      27.00 Hz
PL105      1.00 Hz
PL1052     0.00 dB
PL1053     0.00 dB
PL1054     0.00 dB
===== CHANNEL f106 =====
CPDPRG106  gcp106
NUC106     1H
P106       4.00 Hz
PC106      9.00 Hz
PL106      18.00 Hz
PL1062     0.00 dB
PL1063     -2.00 dB
PL1064     0.00 dB
===== CHANNEL f107 =====
CPDPRG107  gcp107
NUC107     13C
P107       13.00 Hz
PC107      27.00 Hz
PL107      1.00 Hz
PL1072     0.00 dB
PL1073     0.00 dB
PL1074     0.00 dB
===== CHANNEL f108 =====
CPDPRG108  gcp108
NUC108     1H
P108       4.00 Hz
PC108      9.00 Hz
PL108      18.00 Hz
PL1082     0.00 dB
PL1083     -2.00 dB
PL1084     0.00 dB
===== CHANNEL f109 =====
CPDPRG109  gcp109
NUC109     13C
P109       13.00 Hz
PC109      27.00 Hz
PL109      1.00 Hz
PL1092     0.00 dB
PL1093     0.00 dB
PL1094     0.00 dB
===== CHANNEL f110 =====
CPDPRG110  gcp110
NUC110     1H
P110       4.00 Hz
PC110      9.00 Hz
PL110      18.00 Hz
PL1102     0.00 dB
PL1103     -2.00 dB
PL1104     0.00 dB
===== CHANNEL f111 =====
CPDPRG111  gcp111
NUC111     13C
P111       13.00 Hz
PC111      27.00 Hz
PL111      1.00 Hz
PL1112     0.00 dB
PL1113     0.00 dB
PL1114     0.00 dB
===== CHANNEL f112 =====
CPDPRG112  gcp112
NUC112     1H
P112       4.00 Hz
PC112      9.00 Hz
PL112      18.00 Hz
PL1122     0.00 dB
PL1123     -2.00 dB
PL1124     0.00 dB
===== CHANNEL f113 =====
CPDPRG113  gcp113
NUC113     13C
P113       13.00 Hz
PC113      27.00 Hz
PL113      1.00 Hz
PL1132     0.00 dB
PL1133     0.00 dB
PL1134     0.00 dB
===== CHANNEL f114 =====
CPDPRG114  gcp114
NUC114     1H
P114       4.00 Hz
PC114      9.00 Hz
PL114      18.00 Hz
PL1142     0.00 dB
PL1143     -2.00 dB
PL1144     0.00 dB
===== CHANNEL f115 =====
CPDPRG115  g
```

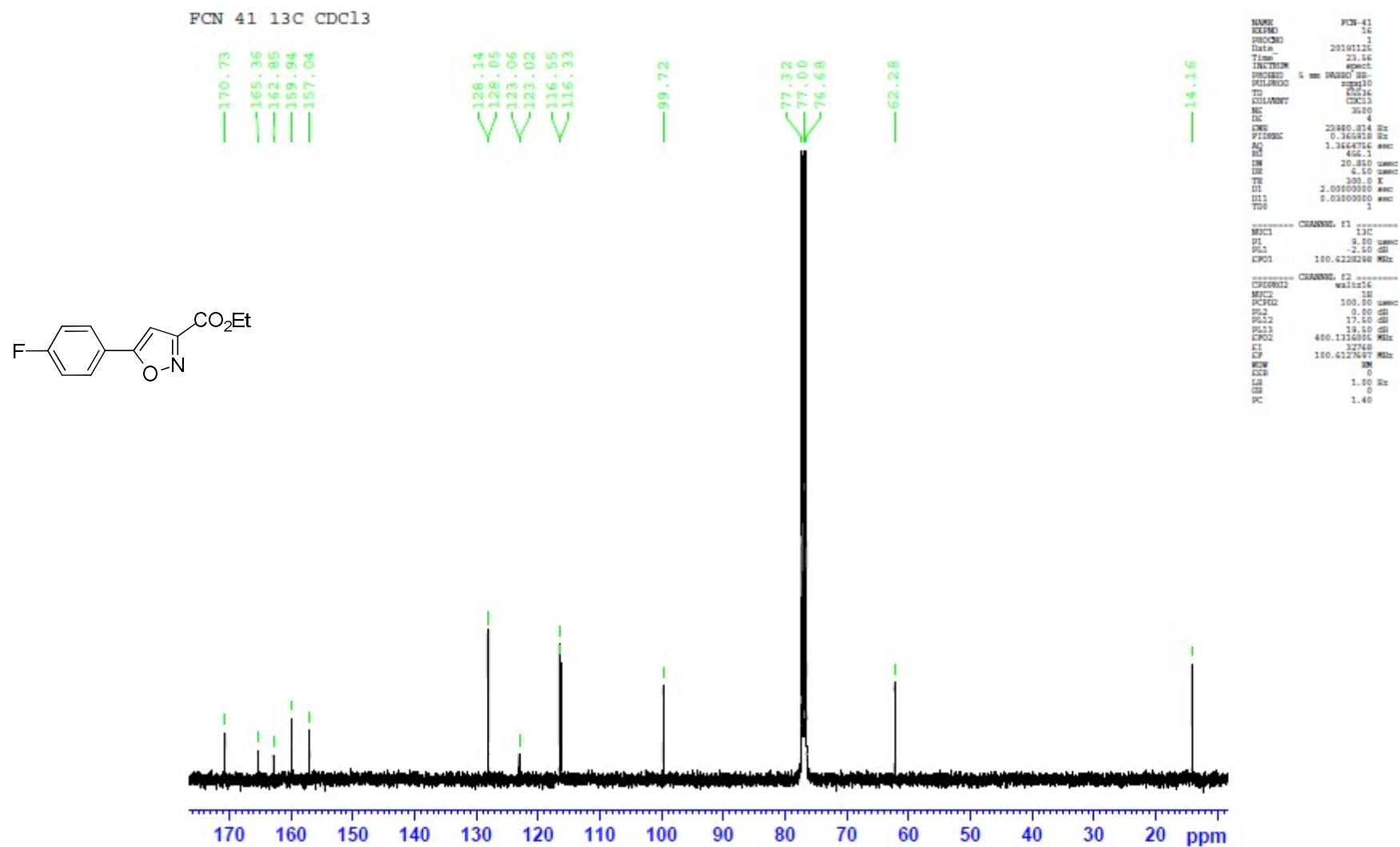
APÊNDICE BM – DIARIL-ISOXAZOL **91** – RMN HMBC

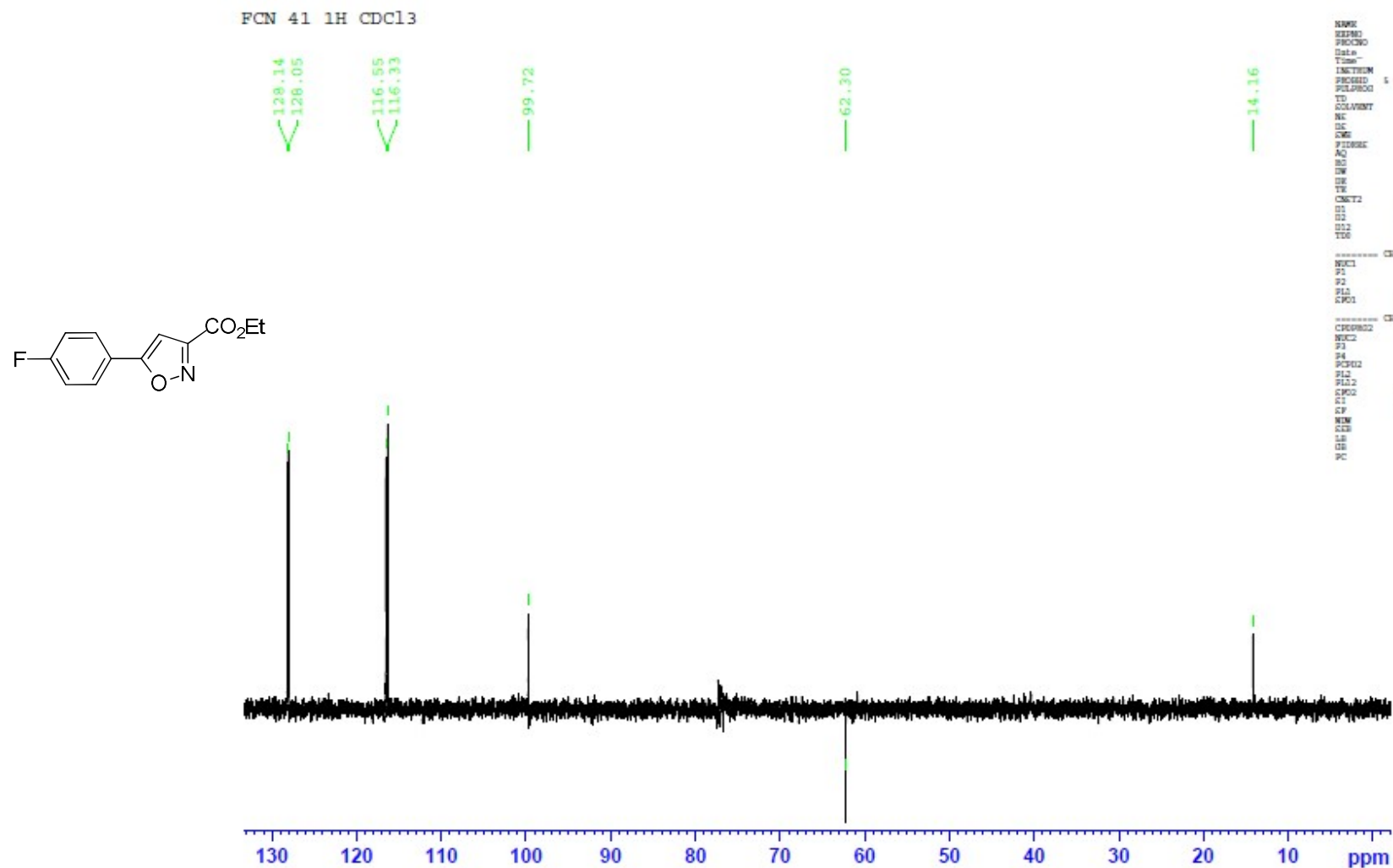
APÊNDICE BN – DIARIL-ISOXAZOL **100** – RMN  $^1\text{H}$  400 MHz

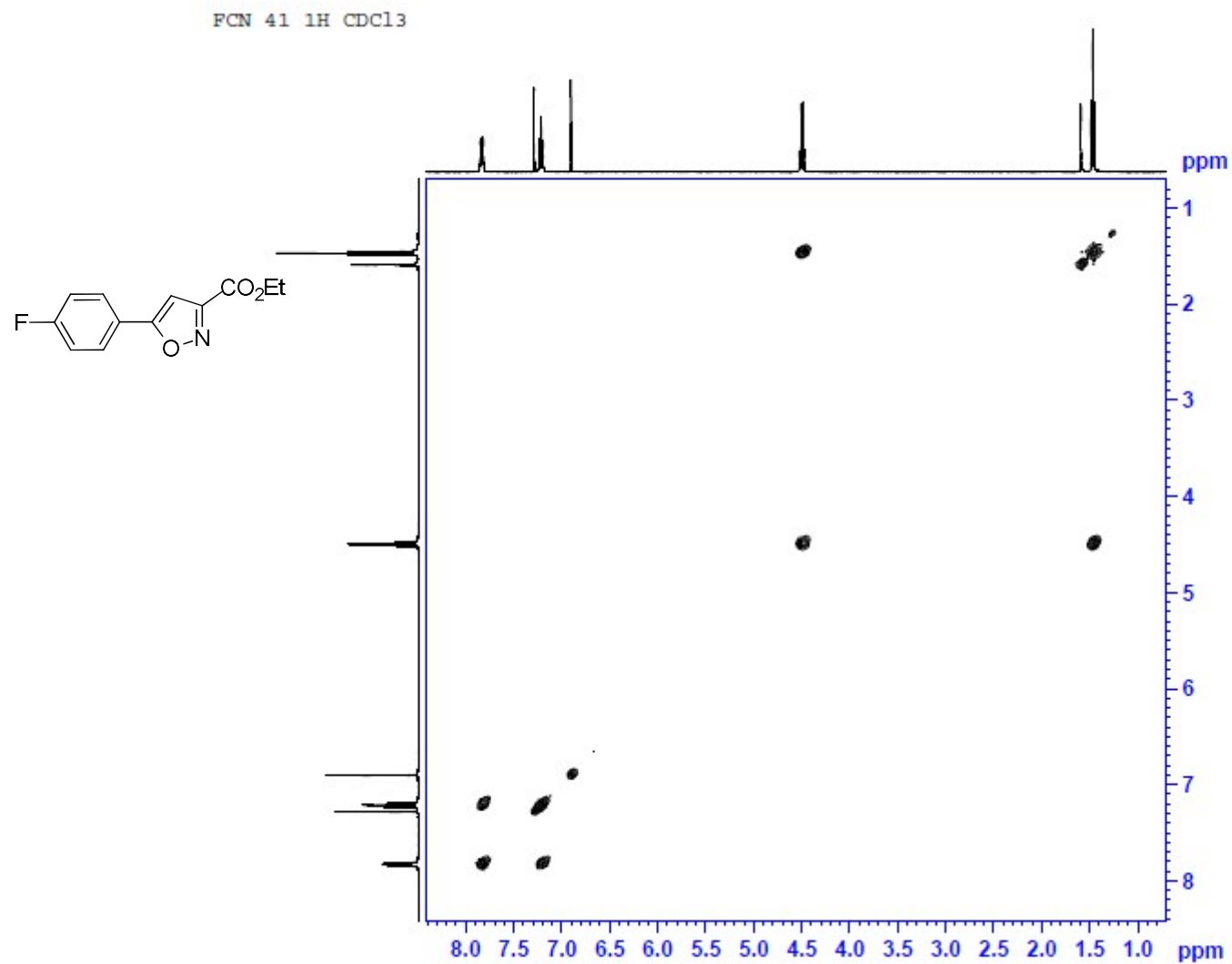
APÊNDICE BO – DIARIL-ISOXAZOL **100** – RMN  $^{13}\text{C}$  100 MHz

APÊNDICE BP – DIARIL-ISOXAZOL **101** – RMN  $^1\text{H}$  400 MHz

APÊNDICE BQ – DIARIL-ISOXAZOL **101** – RMN  $^{13}\text{C}$  100 MHz



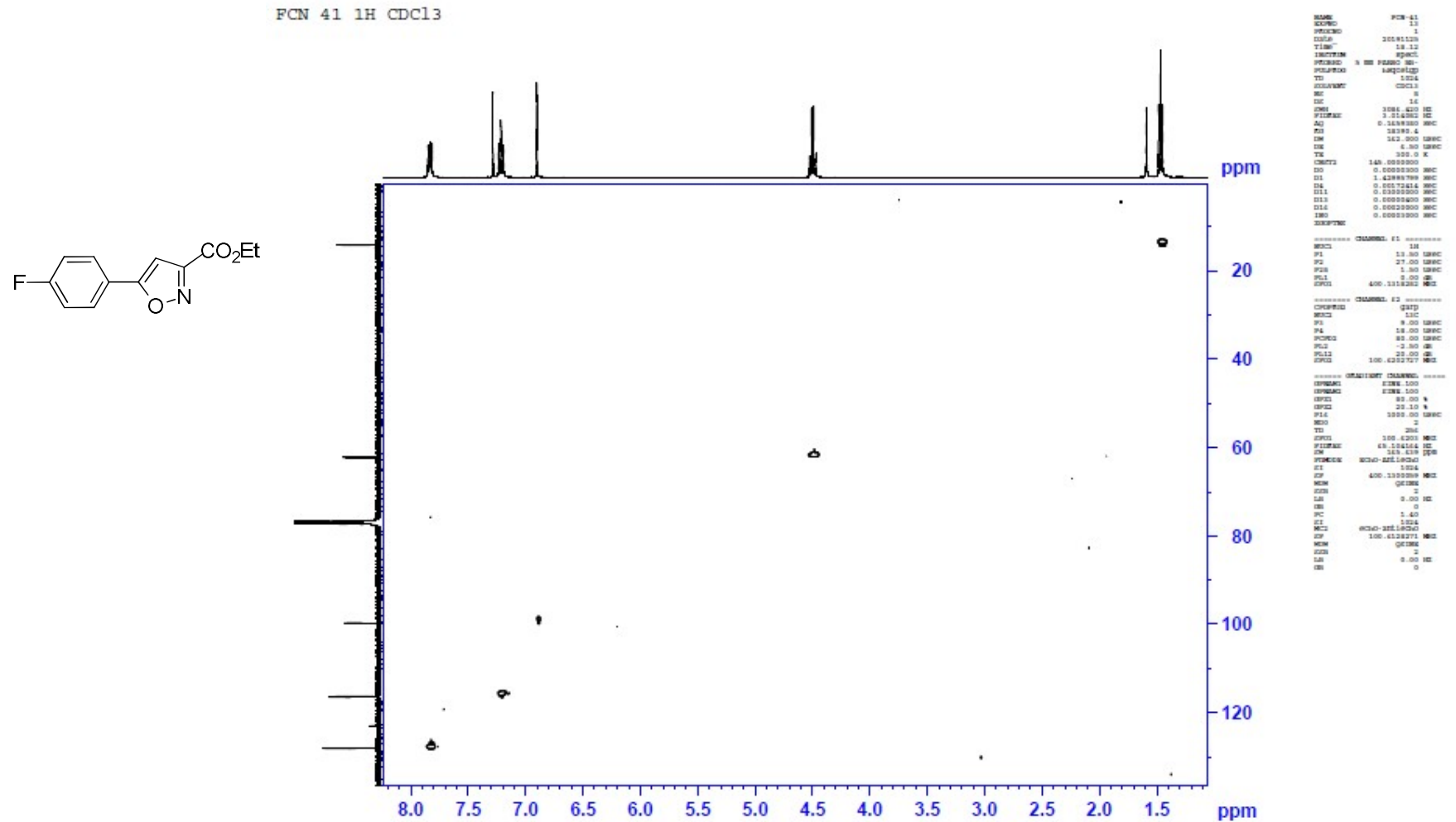
APÊNDICE BR – DIARIL-ISOXAZOL **101** – RMN DEPT

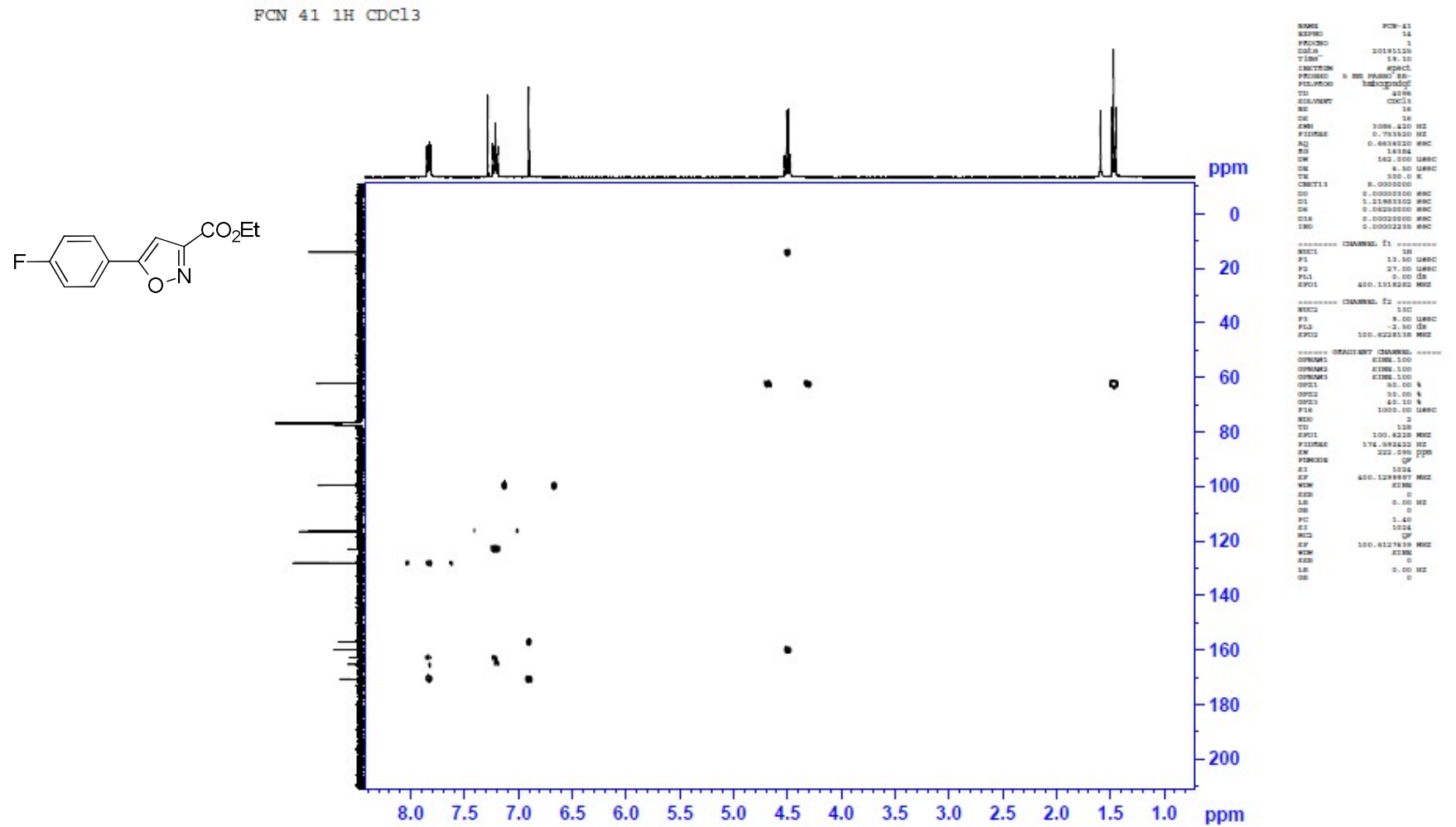
APÊNDICE BS – DIARIL-ISOXAZOL **101** – RMN COSY

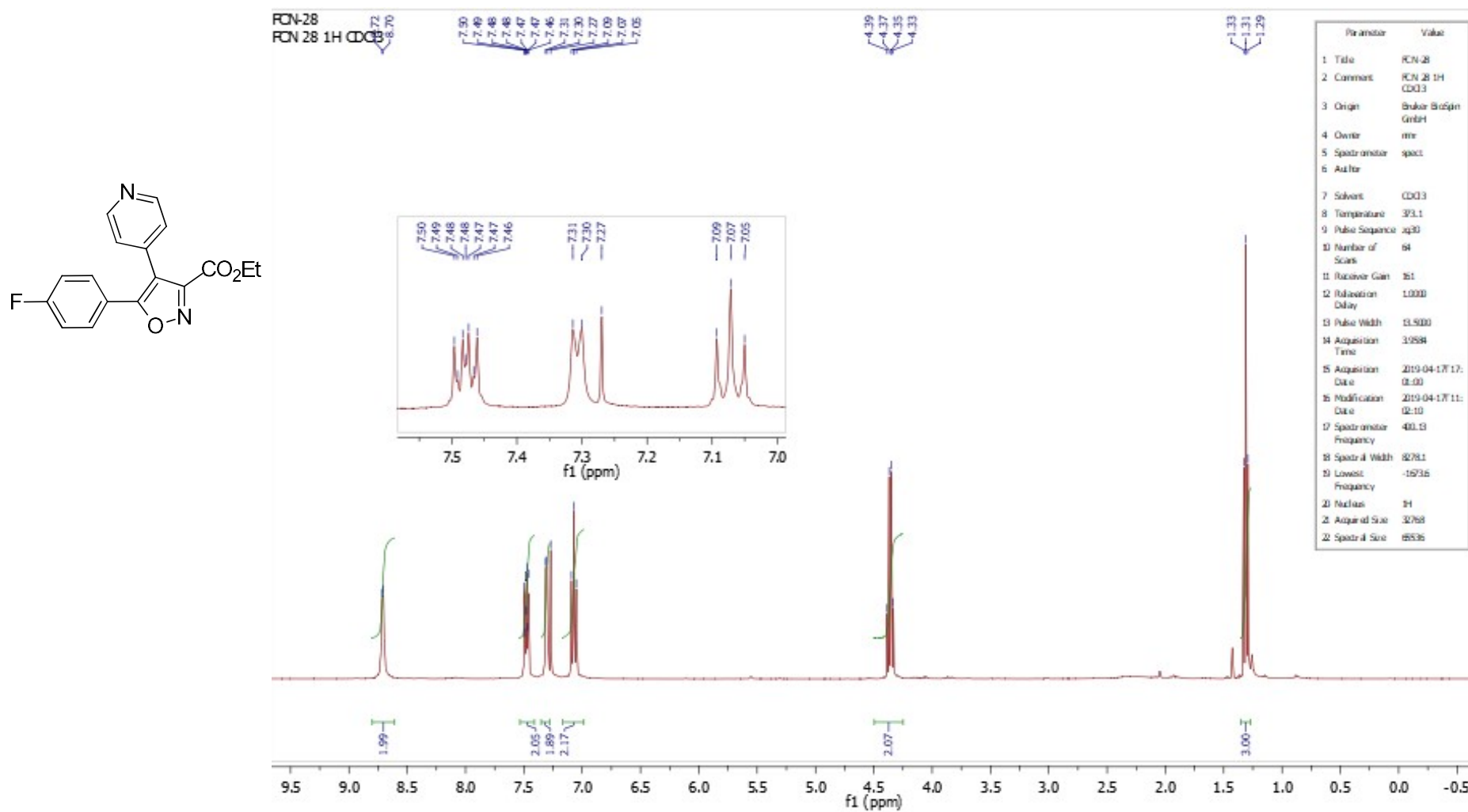
```

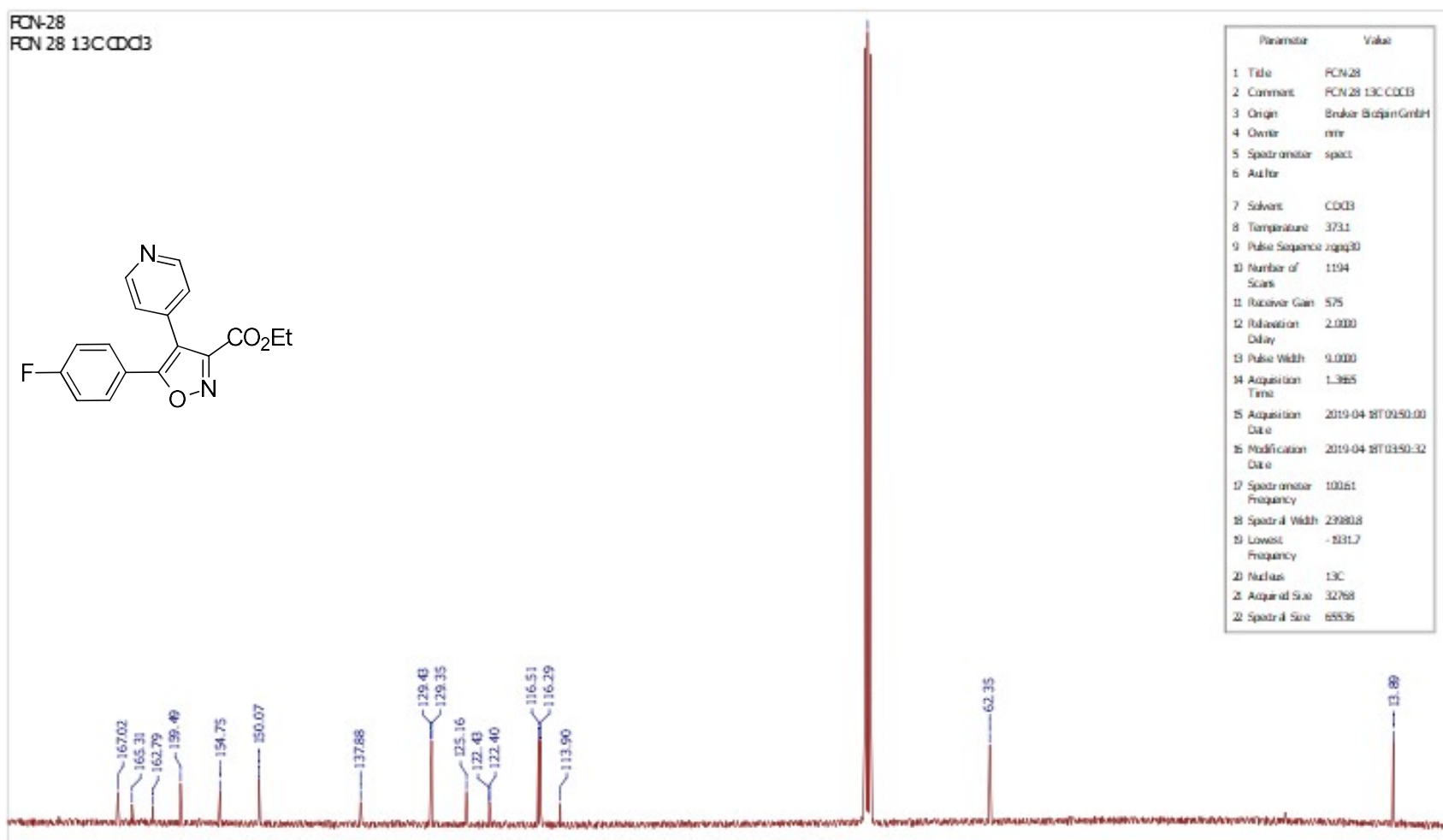
NAME      FCN-41
EXPNO     1
PROCNO    1
Date_     20190120
Time      20.18
INSTRUM   spect
PROBHD    5 mm PABBO 1H-
PULPROG   zgpg30
TD        65536
F2        214.8
SOLVENT   CDCl3
DE        0
DS        0
CONE      3081.421 Hz
F2RES      1.307041 Hz
AQ         0.1118261 s
RG         320
SWH        142.000 kHz
DSB         0.00
GB         0.00
PC         1.00
TE         300.2 K
DQ         0.0000000 s
CZ         1.3400000 s
DZ         0.0000000 s
DZ2        0.0000000 s
DZ3        0.0000000 s
===== CHANNEL f1 =====
NUC1       13
PC         11.00 s
PC2        11.00 s
PL1        0.00 dB
PL2        0.00 dB
XPR1       400.1318262 MHz
===== CHANNEL CHANNEL =====
INSTRUM    spect
PRG1        zgpg30
NUC1       13
PC1         10.00 s
PL1         1000.00 dB
RG1         320
CONE        3081.421 Hz
F2RES        1.307041 Hz
AQ1          0.1118261 s
RG1          320
SWH1         142.000 kHz
DSB1         0.00
GB1         0.00
PC1          1.00
TE1          300.2 K
DQ1          0.0000000 s
CZ1          1.3400000 s
DZ1          0.0000000 s
DZ2           0.0000000 s
DZ3           0.0000000 s

```

APÊNDICE BT – DIARIL-ISOXAZOL **101** – RMN HSQC

APÊNDICE BU – DIARIL-ISOXAZOL **101** – RMN HMBC

APÊNDICE BV – DIARIL-ISOXAZOL **11** – RMN  $^1\text{H}$  400 MHz

APÊNDICE BW – DIARIL-ISOXAZOL **11** – RMN  $^{13}\text{C}$  100 MHz

APÊNDICE BX – DIARIL-ISOXAZOL **103** – RMN  $^1\text{H}$  400 MHz