

**MINISTÉRIO DA DEFESA
EXÉRCITO BRASILEIRO
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA
INSTITUTO MILITAR DE ENGENHARIA
CURSO DE MESTRADO EM QUÍMICA**

GABRIELA DE ANDRADE DANIN BARBOSA

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO ANTIBACTERIANA DE
DERIVADOS DE 3-(2-FURIL)-4,5-DIIDRO-ISOXAZÓIS**

Rio de Janeiro

2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

INSTITUTO MILITAR DE ENGENHARIA

GABRIELA DE ANDRADE DANIN BARBOSA

SÍNTESE E AVALIAÇÃO ANTIBACTERIANA DE DERIVADOS DE 3-(2-FURIL)-4,5-DIIDRO-ISOXAZÓIS

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Mestrado em Química do Instituto Militar de Engenharia, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências em Química.

Orientador: Alcino Palermo de Aguiar, D.Sc.

Rio de Janeiro

2010

c2010

INSTITUTO MILITAR DE ENGENHARIA

Praça General Tibúrcio, 80 – Praia Vermelha

Rio de Janeiro - RJ CEP 22290-270

Este exemplar é de propriedade do Instituto Militar de Engenharia, que poderá incluí-lo em base de dados, armazenar em computador, microfilmar ou adotar qualquer forma de arquivamento.

É permitida a menção, reprodução parcial ou integral e a transmissão entre bibliotecas deste trabalho, sem modificação de seu texto, em qualquer meio que esteja ou venha a ser fixado, para pesquisa acadêmica, comentários e citações, desde que sem finalidade comercial e que seja feita a referência bibliográfica completa.

Os conceitos expressos neste trabalho são de responsabilidade do(s) autor(es) e do(s) orientador (es).

540

B 238 Barbosa, Gabriela de Andrade Danin

Síntese e avaliação antibacteriana de derivados de 3-(2-furil)-4,5-diidro-isoxazóis / Gabriela de Andrade Danin Barbosa – Rio de Janeiro: Instituto Militar de Engenharia, 2010.

128 p.: il

Dissertação (Mestrado) – Instituto Militar de Engenharia – Rio de Janeiro, 2010.

1. 4,5-diidro-isoxazol. 2. Furaldeído. 3. Heterociclo bioativo. I. Título. II. Instituto Militar de Engenharia.

CDD 540

INSTITUTO MILITAR DE ENGENHARIA

GABRIELA DE ANDRADE DANIN BARBOSA

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO ANTIBACTERIANA DE DERIVADOS DE
3-(2-FURIL)-4,5-DIIDRO-ISOXAZÓIS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao curso de Mestrado em Química do Instituto Militar de Engenharia, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências em Química.

Orientador: Alcino Palermo de Aguiar – D.Sc.

Aprovada em 30 de junho de 2010 pela seguinte banca examinadora:

Prof. Alcino Palermo de Aguiar – D.Sc.- IME – Presidente

Prof. José Daniel Figueroa-Villar – Ph.D. - IME

Prof. Marcio Contrucci Saraiva de Mattos – D.Sc. – UFRJ

Prof. Reinaldo Teixeira Delfino – D.Sc. - IME

Rio de Janeiro
2010

Aos meus pais, por toda dedicação e incentivo para realização dessa etapa.

Ao Tiago Paes, pelo carinho, compreensão e companheirismo.

AGRADECIMENTOS

A Deus, fonte de luz e amor, Pai bondoso que continua a guiar minha jornada mesmo diante de erros cometidos.

Aos meus pais, Lincon e Ediléa, e a toda minha família pela compreensão, incentivo e carinho. Por entender todos os momentos de ausência e por estarem sempre presentes nos momentos difíceis.

Ao meu orientador, professor Alcino Palermo de Aguiar, pela orientação, dedicação, paciência e, principalmente, pela oportunidade de realização deste trabalho, que sem dúvida alguma, me fez crescer cientificamente.

Aos meus amigos Rodrigo e Marcelle pela amizade, companheirismo, pela importante colaboração nos dias de trabalho no laboratório e nos estudos e pelo constante apoio e incentivo nos momentos difíceis.

Às minhas amigas Giseli e Jacqueline pela ajuda, paciência, apoio e por transmitir seus valiosos conhecimentos sempre que precisei esclarecer minhas dúvidas.

Aos amigos Vitor, Daniela, Elaine, Luana, Sirlene, Erica e Gilberto pela companhia, pelas inúmeras conversas científicas e não-científicas e pelos importantes momentos de descontração que tornaram a realização desta tarefa muito mais prazerosa.

Às minhas queridas amigas, Chaiana Wolff, Aline Rodrigues, Fernanda Silva e Carolina Morgado que compreenderam os momentos em que estive ausente, me apoiaram e torceram por mim.

Aos companheiros de laboratório cuja convivência foi fundamental para minha formação acadêmica e pessoal. Aos demais colegas de Pós-Graduação pelo carinho e incentivo.

À Alessandra França pela sua ajuda na realização dos inúmeros espectros de RMN.

Ao Professor Jose Daniel Figueroa Villar por ter sido sempre solícito e dedicado nos momentos em que precisei de sua ajuda.

À Cristiane da PUC, pela análise elementar realizada.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

“É melhor tentar e falhar do que preocupar-se e ver a vida passar. É melhor tentar, ainda que em vão, que sentar-se fazendo nada até o final.”

Martin Luther King

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	11
LISTA DE TABELAS.....	15
LISTA DE SIGLAS.....	17
1 INTRODUÇÃO	20
1.1 Reações de ciclo-adição 1,3-dipolar	22
1.2 Metodologia para obtenção de óxido de nitrila	25
1.2.1 Obtenção de óxido de nitrila a partir de nitrocompostos	25
1.2.2 Obtenção de óxido de nitrila a partir da oxidação de aldoxima.....	29
1.3 Síntese e bioatividade de derivados de 3-(5-nitro-2-furil)-4,5-diidro-isoxazóis....	34
1.4 Atividade biológica e toxicológica de nitrofuranos.....	37
1.4.1 Mecanismo de ação de nitrocompostos.....	39
1.5 Mecanismos de defesa bacteriana e resistência a antibióticos.....	41
1.6 Justificativa.....	43
1.7 Objetivo.....	44
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	45
2.1 Materiais.....	45
2.1.1 Equipamentos.....	45
2.1.2 Reagentes e Solventes.....	46
2.2 Metodologia Sintética	48
2.2.1 Purificação do furaldeído.....	49
2.2.2 Síntese do 5-nitro-2-furaldeído diacetato.....	49
2.2.3 Síntese do 5-nitro-2-furaldeído.....	50
2.2.4 Síntese dos derivados de 4,5-diidro-isoxazol.....	50
2.2.4.1 Síntese de 3-furil-5-carboxilamida-4,5-diidro-isoxazol.....	50

2.2.4.1.1	Síntese da aldoxima.....	51
2.2.4.1.2	Síntese do cloreto de imidoíla.....	51
2.2.4.1.3	Reação de ciclo-adição.....	51
2.2.4.2	Síntese de 3-furil-5-fenil-4,5-diidro-isoxazol.....	52
2.2.4.3	Síntese do 3-(5-cloro-2-furil)-5-etilcarboxilato-4,5-diidro-isoxazol.....	52
2.2.4.4	Síntese do 3-(5-nitro-2-furil)-5-carboxilamida-4,5-diidro-isoxazol.....	53
2.2.4.5	Síntese do 3-(5-nitro-2-furil)-5-etilcarboxilato-4,5-diidro-isoxazol.....	54
2.3	Ensaio microbiológico dos derivados de 4,5-diidro-isoxazóis.....	54
2.3.1	Materiais.....	55
2.3.1.1	Microrganismos.....	55
2.3.2	Metodologia dos ensaios microbiológicos.....	55
2.3.2.1	Preparo do meio de cultura.....	56
2.3.2.2	Preparo do inóculo.....	56
2.3.2.3	Preparo das soluções-mãe dos compostos a serem testados.....	57
2.3.2.4	Determinação da concentração inibitória mínima (CIM).....	58
3	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	59
3.1	Síntese do 5-nitro-2-furaldeído.....	59
3.2	Síntese dos derivados de 4,5-diidro-isoxazol-3,5-dissubstituídos.....	63
3.2.1	Síntese do óxido de nitrila.....	63
3.2.2	Reação de ciclo-adição.....	67
3.2.2.1	Síntese de 3-furil-5-carboxilamida-4,5-diidro-isoxazol.....	67
3.2.2.2	Síntese de 3-furil-5-fenil-4,5-diidro-isoxazol.....	71
3.2.2.3	Síntese do 3-(5-cloro-2-furil)-5-etilcarboxilato-4,5-diidro-isoxazol.....	74
3.2.2.4	Síntese do 3-(5-nitro-2-furil)-5-carboxilamida-4,5-diidro-isoxazol.....	78
3.2.2.5	Síntese do 3-(5-nitro-2-furil)-5-etilcarboxilato-4,5-diidro-isoxazol.....	81
3.3	Ensaio Microbiológico.....	84

3.3.1	Triagem dos derivados de 4,5-diidro-isoxazol.....	84
3.3.2	Determinação da CIM.....	87
4	CONCLUSÃO.....	90
5	PERSPECTIVA.....	91
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	92
7	APÊNDICE.....	98

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIG. 1.1	Fármacos com diferentes heterociclos em sua estrutura.	20
FIG. 1.2	Compostos isoxazolínicos com atividade farmacológica	21
FIG. 1.3	Compostos bifuncionalizados derivados da abertura do anel heterocíclico.....	21
FIG. 1.4	Heterociclos formados a partir de reações de ciclo-adição 1,3 dipolar.....	22
FIG. 1.5	Interações baseadas na teoria dos orbitais de fronteiras.....	23
FIG. 1.6	Diagrama de energia para formação da estrutura isoxazolílica.....	23
FIG. 1.7	Formas de dimerização do óxido de nitrila.....	24
FIG. 1.8	Formação de óxido de nitrila a partir de nitroalcanos empregando Et ₃ N.....	26
FIG. 1.9	Síntese do cloreto de imidoíla a partir de nitroalcanos.....	27
FIG. 1.10	Formação de isoxazóis a partir de nitroalcanos em presença de DMTMM	28
FIG. 1.11	Formação de aldoximas.....	29
FIG. 1.12	Obtenção de óxido de nitrila empregando NBS.....	30
FIG. 1.13	Metodologia de obtenção do cloreto de imidoíla a partir do cloro gasoso	31
FIG. 1.14	Formação do óxido de nitrila pelo tratamento de aldoximas com NCS em DMF.....	31
FIG. 1.15	Formação do óxido de nitrila empregando NaOCl	31
FIG. 1.16	Oxidação de aldoximas com Cloramina T.....	32
FIG. 1.17	Obtenção de 4,5-diidro-isoxazóis empregando o ácido tricloro-isocianúrico ...	32
FIG. 1.18	Formação de cloreto de imidoíla a partir de <i>N-terc</i> -butil- <i>N</i> -cloro-cianoamida .	33
FIG. 1.19	Obtenção de 4,5-diidro-isoxazóis através da reação de ciclo-adição.....	34
FIG. 1.20	Obtenção de derivados de isoxazóis utilizando enaminas como dipolarófilo....	35
FIG. 1.21	Derivados de 3-(5-nitro-2-furil)-4,5-diidro-isoxazóis bioativos.....	36
FIG. 1.22	Derivados de nitro-furil com atividade antibacteriana frente <i>M. tuberculosis</i> ...	36
FIG. 1.23	Fármacos com grupo nitro que apresentam atividades farmacológicas.....	37

FIG. 1.24	Possível mecanismo biorredutivo de nitrocompostos para rota anaeróbia	40
FIG. 1.25	Possível mecanismo biorredutivo de nitrocompostos para rota aeróbia.....	40
FIG. 1.26	Diferença morfológica entre as paredes celulares de bactéria Gram-positivas e Gram-negativas.....	41
FIG. 2.1	Estrutura do 5-nitro-2-furaldeído diacetato.....	49
FIG. 2.2	Estrutura do 5-nitro-2-furaldeído.....	50
FIG. 2.3	Estrutura do 3-furil-5-carboxilamida-4,5-diidro-isoxazol.....	50
FIG. 2.4	Estrutura do 3-furil-5-fenil-4,5-diidro-isoxazol.....	52
FIG. 2.5	Estrutura de 3-(5-cloro-2-furil)-5-etilcarboxilato-4,5-diidro-isoxazol	52
FIG. 2.6	Estrutura do 3-(5-nitro-2-furil)-5-carboxilamida-4,5-diidro-isoxazol	53
FIG. 2.7	Estrutura do 3-(5-nitro-2-furil)-5-etilcarboxilato-4,5-diidro-isoxazol	54
FIG. 2.8	Esquema ilustrativo da microplaca	56
FIG. 2.9	Procedimento para o preparo do inóculo	57
FIG. 3.1	Cromatograma do 5-nitro-2-furaldeído diacetato	59
FIG. 3.2	Cromatograma do 5-nitro-2-furaldeído.....	62
FIG. 3.3	Proposta de intermediários da reação de formação de aldoxima.....	64
FIG. 3.4	Cromatograma da furaldoxima.	64
FIG. 3.5	Cromatograma da 5-nitro-2-furaldoxima.....	65
FIG. 3.6	Possível aldoxima formada a partir do respectivo aldeído.....	66
FIG. 3.7	Proposta de intermediários da reação de formação do cloreto de imidoíla.....	66
FIG. 3.8	Possíveis regioisômeros formados pela reação de ciclo-adição 1,3-dipolar	68
FIG. 3.9	Formas de ressonância do composto 33.....	69
FIG. 3.10	Cromatograma da reação de ciclo-adição do composto 34.....	71
FIG. 3.11	Fragmentos sugeridos para o composto 34	74
FIG. 3.12	Cromatograma da reação de ciclo-adição do composto 35.....	75

FIG. 3.13	Formas de ressonância do cloreto de imidoíla substituído na posição 5.....	77
FIG. 3.14	Fragmentos de massas sugeridos para o composto 35.....	78
FIG. 3.15	Cromatograma da reação de ciclo-adição do composto 37.....	81
FIG. 3.16	Fragmentos sugeridos para o composto 37.....	83
FIG. 3.17	Resultado do teste de microdiluição do composto 37.....	87
FIG. 3.18	Resultado do teste de microdiluição do composto 36 frente a <i>E.coli</i> e <i>E.faecalis</i>	88
FIG. 3.19	Resultado do teste de microdiluição do composto 36 frente a <i>P.aeruginosa</i> e <i>S.aureus</i>	88
FIG. 7.1	Espectro de Infravermelho do composto 31.....	99
FIG. 7.2	Espectro de RMN ¹³ C do composto 31.....	100
FIG. 7.3	Espectro de RMN ¹ H do composto 31.....	101
FIG. 7.4	Espectro de infravermelho do composto 32.....	102
FIG. 7.5	Espectro de RMN ¹³ C do composto 32.....	103
FIG. 7.6	Espectro de RMN ¹ H do composto 32.....	104
FIG. 7.7	Espectro de infravermelho do composto 33.....	105
FIG. 7.8	Espectro de RMN ¹³ C do composto 33.....	106
FIG. 7.9	Espectro de RMN ¹³ C APT do composto 33.....	107
FIG. 7.10	Espectro de RMN ¹ H do composto 33.....	108
FIG. 7.11	Espectro de RMN ¹ H expandido do composto 33.....	109
FIG. 7.12	Espectro de infravermelho do composto 34.....	110
FIG. 7.13	Espectro de RMN ¹³ C do composto 34.....	111
FIG. 7.14	Espectro de RMN ¹ H do composto 34.....	112
FIG. 7.15	Espectro de RMN ¹ H expandido do composto 34.....	113
FIG. 7.16	Espectro de massas do composto 34.....	114
FIG. 7.17	Espectro de infravermelho do composto 35.....	115

FIG. 7.18	Espectro de RMN ^{13}C do composto 35	116
FIG. 7.19	Espectro de RMN ^1H do composto 35.....	117
FIG. 7.20	Espectro de RMN ^1H expandido do composto 35	118
FIG. 7.21	Espectro de massas do composto 35.....	119
FIG. 7.22	Espectro de infravermelho do composto 36.....	120
FIG. 7.23	Espectro de RMN ^{13}C do composto 36.....	121
FIG. 7.24	Espectro de RMN ^1H do composto 36.....	122
FIG. 7.25	Espectro de RMN ^1H expandido composto 36	123
FIG. 7.26	Espectro de infravermelho do composto 37.....	124
FIG. 7.27	Espectro de RMN ^{13}C do composto 37	125
FIG. 7.28	Espectro de RMN ^1H do composto 37	126
FIG. 7.29	Espectro de RMN ^1H expandido do composto 37	127
FIG. 7.30	Espectro de massas do composto 37	128

LISTA DE TABELAS

TAB. 1.1	Rendimentos dos 4,5-diidro-isoxazóis a partir de nitroalcanos.....	27
TAB. 1.2	Formação do cloreto de imidoíla a partir de nitroalcanos primários.....	28
TAB. 1.3	Rendimentos de isoxazóis obtidos a partir de nitrocompostos.....	29
TAB. 1.4	Diferentes metodologias de deidrologenação de aldoximas.....	30
TAB. 1.5	Formação de 4,5-diidro-isoxazóis a partir de ATCI.....	33
TAB. 1.6	Concentrações inibitórias mínimas para os derivados isoxazolínicos.....	35
TAB. 1.7	Atividade anti-tuberculose dos compostos isoxazolínicos com nitrofurano.....	37
TAB. 1.8	Classe de nitrocompostos e respectivo emprego na terapêutica.....	38
TAB. 2.1	Relação de equipamentos utilizados na síntese dos derivados isoxazolínicos.	45
TAB. 2.2	Relação de equipamentos utilizados no ensaio biológico	46
TAB. 2.3	Relação de reagentes e meio de cultura utilizado no ensaio biológico	46
TAB.2.4	Relação de reagentes e solventes utilizados na síntese dos derivados isoxazolínicos.....	47
TAB. 2.5	Relação de microrganismos utilizados no ensaio biológico.....	55
TAB. 3.1	Principais absorções na região do IV do composto 31	60
TAB. 3.2	Deslocamentos químicos (δ) dos carbonos do composto 31	60
TAB. 3.3	Deslocamentos químicos (δ) dos hidrogênios do composto 31	61
TAB. 3.4	Principais absorções na região do IV do composto 32.....	62
TAB. 3.5	Deslocamentos químicos (δ) dos carbonos do composto 32.....	63
TAB. 3.6	Deslocamentos químicos (δ) dos hidrogênios do composto 32	63
TAB. 3.7	Estimativa de conversão de aldoxima	65
TAB. 3.8	Principais absorções na região do IV do composto 33.....	67
TAB. 3.9	Deslocamentos químicos (δ) dos carbonos do composto 33.....	68

TAB. 3.10	Deslocamentos químicos (δ) dos hidrogênios do composto 33	70
TAB. 3.11	Análise elementar de CHN do composto 33	70
TAB. 3.12	Deslocamentos químicos (δ) dos carbonos do composto 34.....	72
TAB. 3.13	Deslocamentos químicos (δ) dos hidrogênios do composto 34	73
TAB. 3.14	Análise elementar de CHN do composto 34	73
TAB 3.15	Principais absorções na região do IV do composto 35.....	75
TAB. 3.16	Deslocamentos químicos (δ) dos carbonos do composto 35.....	76
TAB. 3.17	Deslocamentos químicos (δ) dos hidrogênios do composto 35	77
TAB. 3.18	Análise elementar de CHN do composto 35	78
TAB. 3.19	Principais absorções na região do IV do composto 36.....	79
TAB. 3.20	Deslocamentos químicos (δ) dos carbonos do composto 36.....	79
TAB. 3.21	Deslocamentos químicos (δ) dos hidrogênios do composto 36	80
TAB. 3.22	Análise elementar de CHN do composto 36	80
TAB. 3.23	Principais absorções na região do iv do composto 37	82
TAB. 3.24	Deslocamentos químicos (δ) dos carbonos do composto 37.....	82
TAB. 3.25	Deslocamentos químicos (δ) dos hidrogênios do composto 37	83
TAB. 3.26	Análise elementar de CHN do composto 37	84
TAB. 3.27	Resultado do teste preliminar para bactérias Gram-negativas.....	85
TAB. 3.28	Resultado do teste preliminar para bactérias Gram-positivas	85
TAB. 3. 29	Log P para os compostos estudados.....	86
TAB. 3.30	Valores da CIM para compostos 36, 37 e amoxicilina frente as cepas padrão.	89

LISTA DE SIGLAS

ADX	Aldoxima
ALD	Aldeído
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APT	<i>Attached proton test</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATCI	Ácido tricloro-isocianúrico
CG	Cromatografia em fase gasosa
CIM	Concentração inibitória mínima
DMTMM	4-[4,6-dimetóxi(1,3,5)triazina-2-il]-4-metil-morfolínio
DMAP	dimetil-amino-piridina
DMF	<i>N,N</i> -dimetil-formamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
EM	Espectrometria de massas
IV	Infravermelho
J	Constante de acoplamento
HOMO	<i>Highest Occupied Molecular Orbital</i>
LPS	Lipopolissacarídeo
LUMO	<i>Lowest Unoccupied Molecular Orbital</i>
NBS	<i>N</i> -bromo-succinimida
NCCLS	National committee for clinical laboratory standards
NCS	<i>N</i> -cloro-succinimida
OMF	Orbital Molecular de Fronteira
RMN	Ressonância magnética nuclear
SOD	Superóxido dismutase
TMS	Tetrametilsilano
UFC	Unidade formadora de colônia

RESUMO

Este trabalho descreve a síntese de 5 diferentes derivados de 4,5-diidro-isoxazóis, formados regioselectivamente através da reação de ciclo-adição 1,3-dipolar de óxido de nitrila, derivado do furaldeído e 5-nitro-2-furaldeído, a alquenos. Os óxidos de nitrila foram gerados *in situ* através da cloração de aldoximas utilizando o ácido tricloro-isocianúrico. Todos os compostos foram caracterizados por IV, RMN ^{13}C e ^1H , EM e análise elementar.

A atividade antibacteriana de todos os compostos foi avaliada frente a cepas padrão de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) utilizando testes de diluição em série. Os compostos com o grupo nitrofurano na posição 3 do heterociclo foram os que apresentaram melhores resultados frente a todas as cepas.

ABSTRACT

This work describes the production of different derivatives of 4,5-dihydroisoxazoles obtained by regioselective 1,3-dipolar cycloaddition reaction between alkenes and nitrile oxides (derivated from furaldehyde and 5-nitro-2-furaldehyde). The nitrile oxides were generated *in situ* using chlorination of the aldoxime with trichloroisocyanuric acid. All compounds were characterized by FTIR, ¹H and ¹³C NMR, CG/MS and elemental analysis.

The synthesized compounds were evaluated against standard strains of *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Escherichia coli* (ATCC 25922) and *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) using serial dilution tests. Only the compounds containing nitrofurane group indicated promising results against all bacteria.

1 INTRODUÇÃO

A crescente procura por substâncias bioativas vem demonstrando que heterociclos são de grande importância na síntese de compostos de interesse biológico. Tendo em vista que na natureza mais da metade dos compostos apresentam anéis heterocíclicos em suas estruturas, esta classe de compostos possui destacada importância na pesquisa, bem como no desenvolvimento de novos produtos, os quais podem apresentar propriedades farmacológicas conforme apresentado na FIG. 1.1 (DALLANOCE, 2006; PATRICK, 2001).

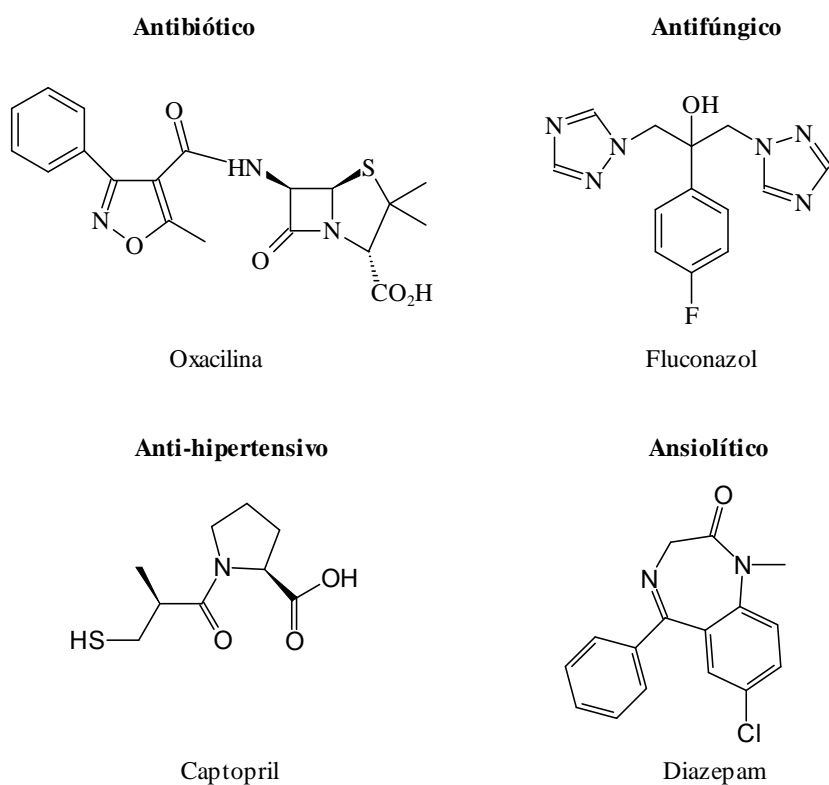


FIG. 1.1 Fármacos com diferentes heterociclos em sua estrutura.

Os 4,5 diidro-isoxazóis, também chamado de isoxazolinas, fazem parte de uma classe de heterociclos amplamente descrita na literatura, os quais podem ser precursores de diferentes compostos bioativos (PLENKIEWICZ & ZAGOZDA, 2007; BASAPPA, 2003;

SORO, 2006). Os derivados isoxazolínicos são conhecidos por apresentarem uma interessante atividade biológica: antibiótica, antineoplásica, antiviral e antifúngica, conforme a FIG. 1.2 (LEE, 2007; BASAPPA, 2003; PIRRUNG, 2002).

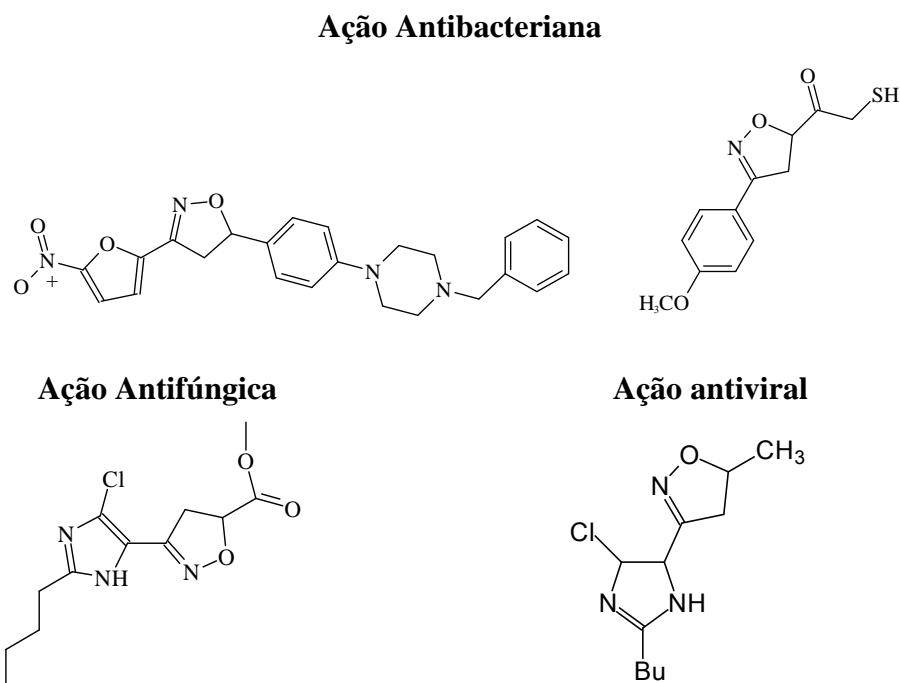


FIG. 1.2 Compostos isoxazolínicos com atividade farmacológica.

Além disso, os 4,5-diidro-isoxazóis podem ser precursores de compostos bifuncionalizados (FIG. 1.3) como os hidroxi-nitrilas, amino-álcoois e hidroxi-cetonas (KOVER & MATTOS, 1994; LEE, 2006).

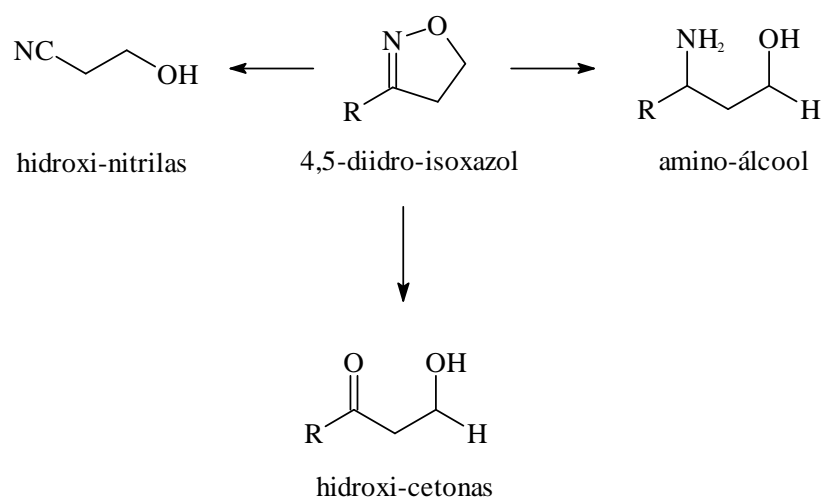


FIG. 1.3 Compostos bifuncionalizados derivados da abertura do anel heterocíclico.

A produção de 4,5-diidro-isoxazóis a partir da reação de ciclo-adição 1,3 dipolar de óxido de nitrilas e alquenos tornou-se um rota muito utilizada na síntese de produtos naturais e novas moléculas biologicamente ativas (BASRA *et al.*, 2000).

1.1 REAÇÕES DE CICLO-ADIÇÃO 1,3 DIPOLAR

As reações de ciclo-adição são um dos processos mais importantes para a síntese de heterociclos de 5 membros, podendo fornecer diferentes heterociclos (FIG.1.4), tais como: 4,5-diidro-isoxazóis (1), isoxazóis (2), oxadiazóis (3) ou triazóis (4) (RODRIGUES & AGUIAR, 2001; DONNICI *et al.*, 2006).

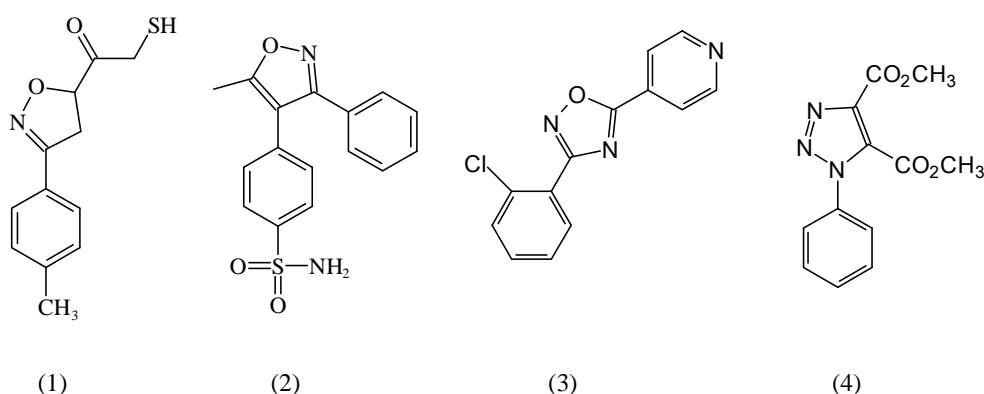


FIG. 1.4 Heterociclos formados a partir de reações de ciclo-adição 1,3 dipolar.

O conceito geral da reação de ciclo-adição 1,3 dipolar foi introduzido por HUISGEN nos anos 60, seu trabalho indicava a base para a compreensão do mecanismo das reações de ciclo-adição (HUISGEN, 1968). Ao mesmo tempo, surgiu um novo conceito de conservação da simetria de orbitais, desenvolvido por WOODWARD e HOFFMANN (1965). Este trabalho foi um marco importante para a compreensão do mecanismo concertado das reações de ciclo-adição e contribuiu para o entendimento da reatividade e regioseletividade deste tipo de reação (DOMINGO *et al.*, 2006; GOTHELF & JORGENSEN, 1998). WOODWARD e HOFFMANN descreveram um novo conceito sobre a teoria dos orbitais de fronteira (OMF), onde foi evidenciado que o entrosamento mais favorável dos orbitais ocorria entre o HOMO (*Highest Occupied Molecular Orbital*) e

o LUMO (*Lowest Unoccupied Molecular Orbital*) com mesma simetria e dimensões próximas (WOODWARD & HOFFMANN, 1965). O $LUMO_{\text{dipolo}}$ pode interagir com o $HOMO_{\text{alqueno}}$ e o $HOMO_{\text{dipolo}}$ como o $LUMO_{\text{alqueno}}$ (GOTHELF & JORGENSEN, 1998), sendo preferencial o que tiver a menor diferença de energia (ΔE) entre os orbitais, neste caso, a interação forneceu, preferencialmente, o regioisômero 5, conforme a FIG. 1.5 (WOODWARD & HOFFMANN, 1965; NAIR *et al.*, 2000).

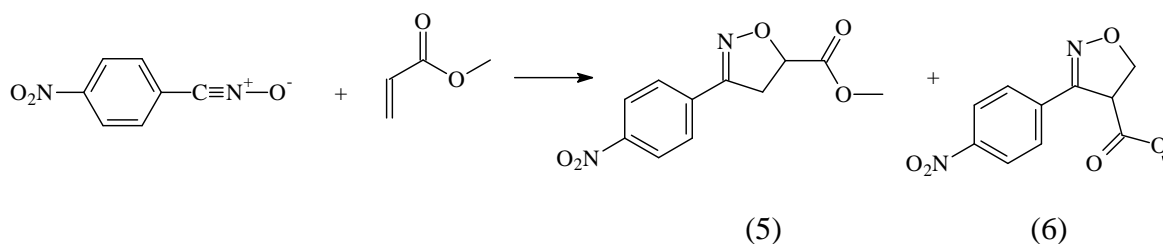


FIG. 1.5 Interações baseadas na Teoria dos Orbitais de fronteiras

Na FIG. 1.6 pode-se observar que o $LUMO$ do dipolo interagiu com o $HOMO$ do dipolarófilo com um $\Delta E = 0,391$ eV, enquanto que o caso contrário apresentaria $\Delta E = 0,478$ eV (KURTH *et al.*, 2007).

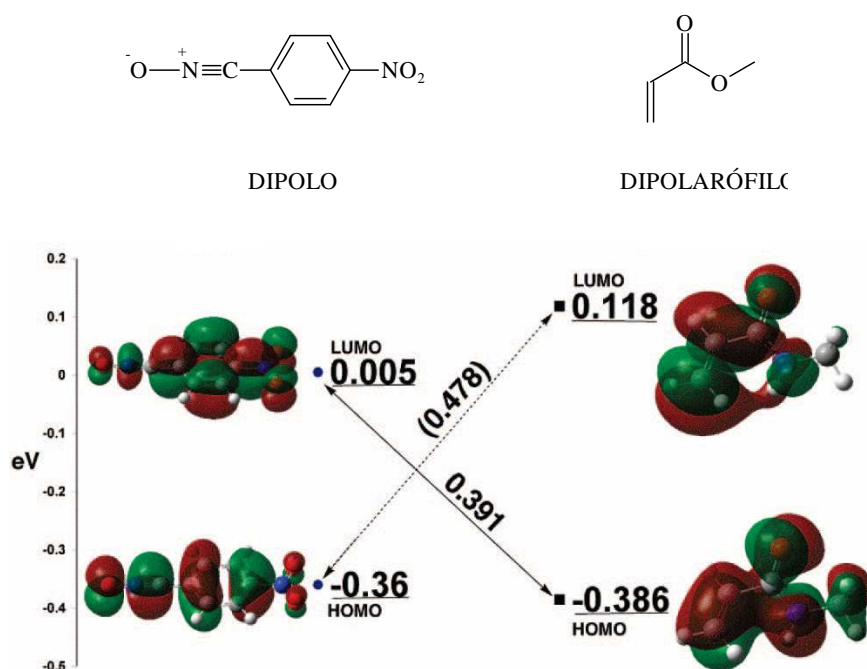


FIG. 1.6 Diagrama de energia para formação da estrutura isoxazolínica.

Dentre os diferentes tipos de reagentes 1,3 dipolares, tais como nitronas, azidas e óxidos de nitrila, este último reage facilmente com alquenos e alquinos, fornecendo, de maneira regiosseletiva, como produto final isoxazóis ou 4,5-diidro-isoxazóis (NAIR & SUJA, 2007; WEIDNER-WELLS *et al.*, 1998). Porém, devem ser preparados *in situ*, visto que dimerizam facilmente gerando alguns subprodutos (FIG. 1.7), majoritariamente furoxanos (RODRIGUES, 2008).

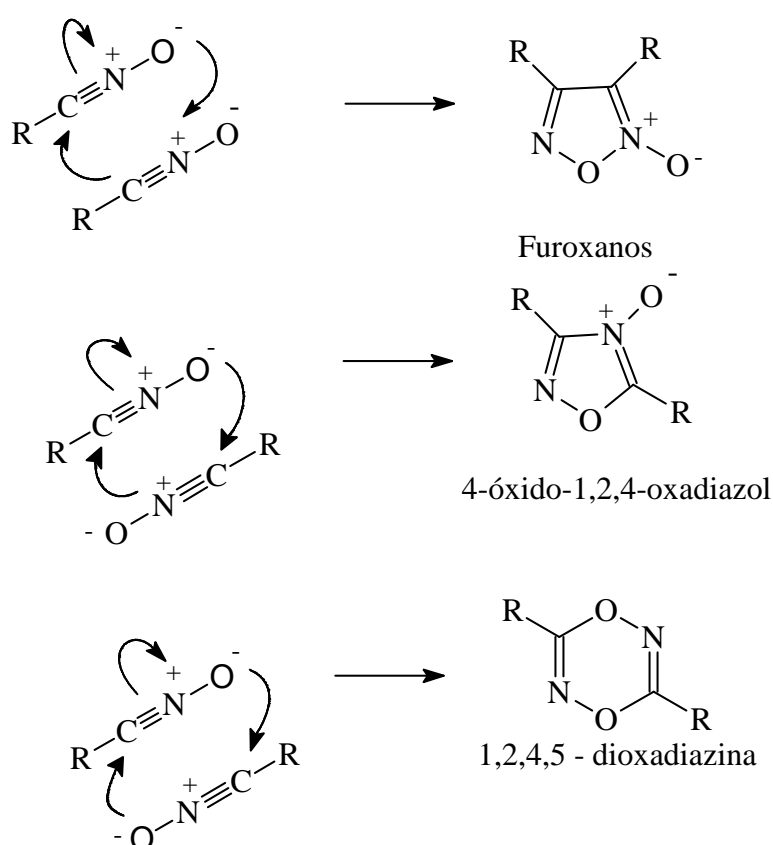


FIG. 1.7 Formas de dimerização do óxido de nitrila.

1.2 METODOLOGIA PARA OBTENÇÃO DE ÓXIDOS DE NITRILA

Existem na literatura várias metodologias para a preparação de óxidos de nitrila *in situ*, sendo que essas metodologias podem ser divididas, basicamente, em duas: a partir de reações de desidrogenação de nitrocompostos e pela desidroalogenação de aldoximas.

1.2.1 OBTENÇÃO DE ÓXIDO DE NITRILA A PARTIR DE NITROCOMPOSTOS

A preparação de óxido de nitrila a partir da desidrogenação de nitroalcanos primários é bastante conhecida. A seguir, abordaremos resumidamente os principais reagentes reportados na literatura empregados na formação desses intermediários.

Em 1960, MUKAIYAMA e HOSHINO reportaram pela primeira vez a obtenção de óxidos de nitrila a partir do tratamento de nitroalcanos primários com fenil-isocianato. Essas reações eram realizadas rapidamente na presença de uma quantidade catalítica de alquil-aminas terciárias como trietilamina ou tri-*n*-butilamina (MUKAIYAMA & HOSHINO, 1960).

No tratamento de nitroalcanos (7), o efeito catalisador da amina terciária (8) promove primeiramente a formação do íon nitronato (9) que irá reagir com o fenil-isocianato (10). Ou seja, um dos oxigênios do íon nitronato combina-se com o carbono parcialmente positivo do fenil-isocianato e, por transferência de próton, o intermediário 11 irá se decompor em óxido de nitrila (13) e ácido carbônico (12). A dimerização de óxidos de nitrila leva a formação de furoxanos (15) e o ácido formado se decompõe levando a formação de dióxido de carbono e amina (14), esta reagindo com o fenil-isocianato gera a uréia (16). O óxido de nitrila formado reagindo com um dipolarófilo fornece o produto de adição (17) conforme a FIG. 1.8 (MUKAIYAMA & HOSHINO, 1960).

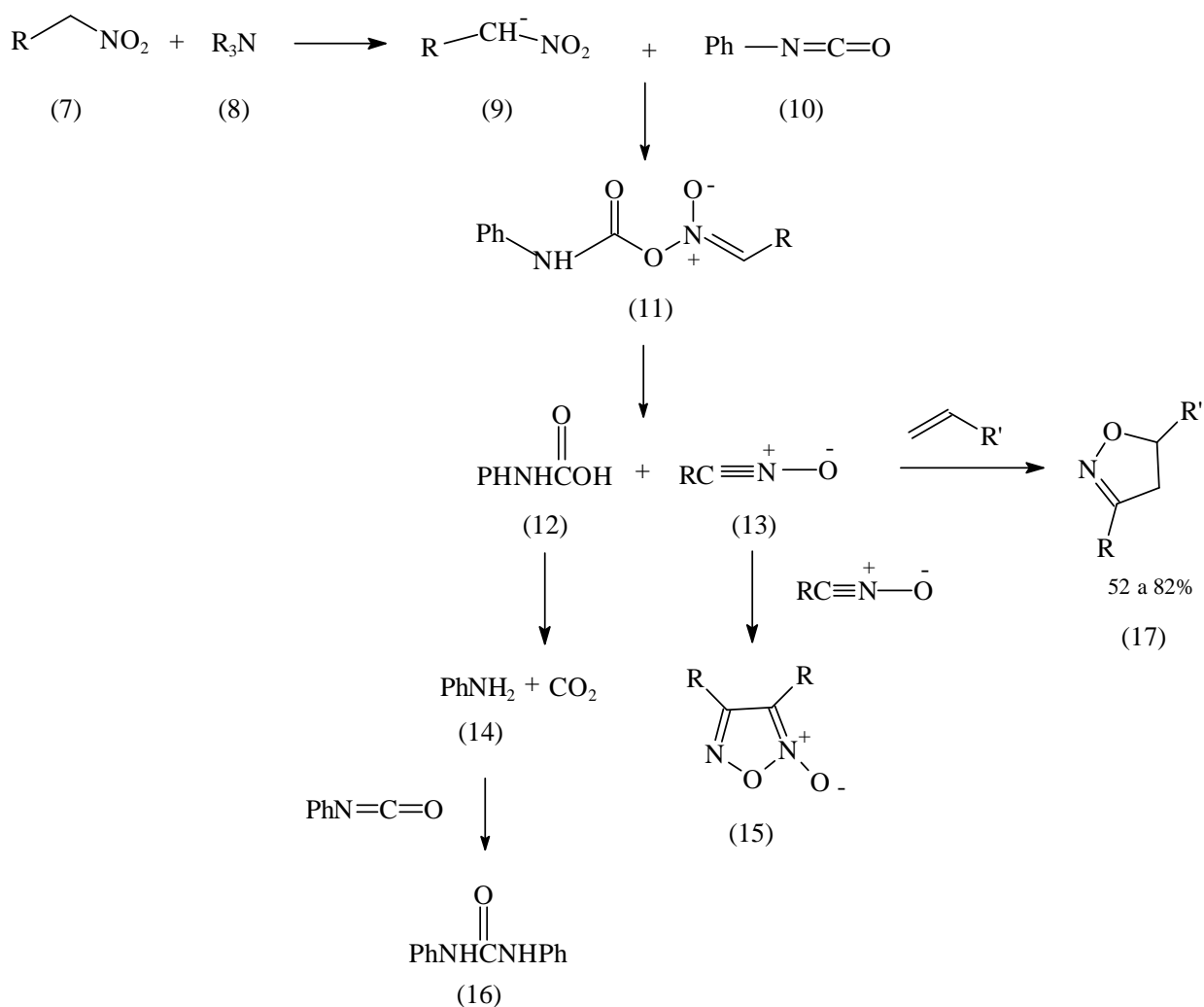
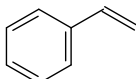
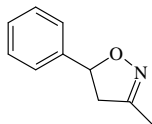
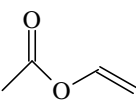
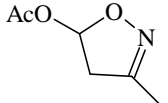
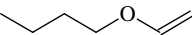
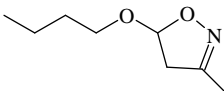


FIG. 1.8 Formação de óxido de nitrila a partir de nitroalcanos empregando Et₃N.

Empregando essa metodologia, MUKAIYAMA & HOSHINO (1960) obtiveram rendimentos satisfatórios, onde estes variam de acordo com os substituintes (TAB. 1.1).

Entretanto, ainda que seja um método eficiente para o preparo de uma variedade de heterociclos, essa metodologia apresenta como fatores limitantes a pouca disponibilidade de nitrocompostos, bem como a possibilidade de formação de diferentes produtos (SHIMIZU *et al.*, 1986).

TAB. 1.1 Rendimentos dos 4,5-diidro-isoxazóis a partir de nitroalcanos.

ÓXIDO DE NITRILA	DIPOLARÓFILO	PRODUTO	RENDIMENTO (%)
$\text{H}_3\text{C}-\overset{+}{\text{C}}\equiv\text{N}-\text{O}^-$			79
			53
			82

MUKAIYAMA & HOSHINO, 1960

Posteriormente, outras metodologias foram desenvolvidas visando facilitar a formação do íon nitronato. SHIMIZU e colaboradores utilizaram cloreto de sulfonila e cloroformato de etila na presença de trietilamina visando catalisar a reação em questão com bons rendimentos (SHIMIZU *et al.*, 1986).

Posteriormente, KUMARAN (1996) reportou o tratamento de nitroalcanos primários com uma base, metóxido de sódio ou hidreto de sódio, e a reação subsequente com tetracloreto de titânio (TiCl_4) fornecendo o precursor do óxido de nitrila (FIG. 1.9), cloreto de imidoíla, em bons rendimentos como mostrado na TAB. 1.2 (KUMARAN, 1996).

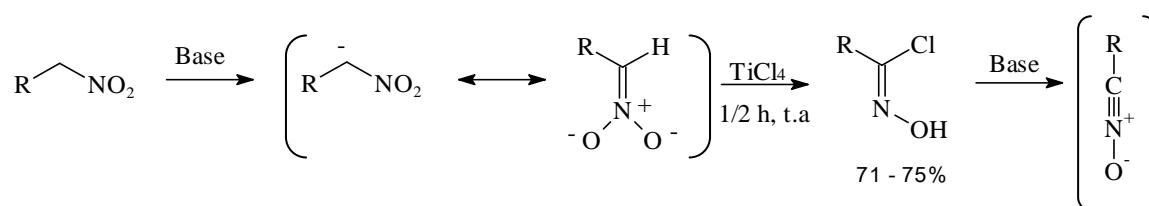
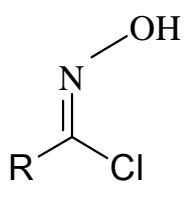


FIG. 1.9 Síntese do cloreto de imidoíla a partir de nitroalcanos.

A presença de ácido de Lewis propicia uma interação com o nitrocomposto, favorecendo um aumento da eletrofilicidade do carbono e facilitando o ataque do cloreto (KUMARAN, 1996).

TAB. 1.2 Formação do cloreto de imidoíla a partir de nitroalcanos primários

Cloreto de imidoíla	Substituinte	Solvente	Base	Rendimentos (%)
	benzil	CH ₂ Cl ₂	NaOMe	75
	<i>p</i> -metil-benzil	CH ₂ Cl ₂	NaOaMe	71
	benzil	benzeno	NaH	75
	<i>p</i> -metil-benzil	benzeno	NaH	72

KUMARAN, 1996

Em 2003, GIACOMELLI *et al.* reportaram, em um método mais atual, a reação de nitroalcanos com 4-[4,6-dimetóxi(1,3,5)triazina-2-il]-4-metil-morfolínio (DMTMM) em presença de uma pequena quantidade de dimetil-aminopiridina (DMAP) (FIG.1.10).

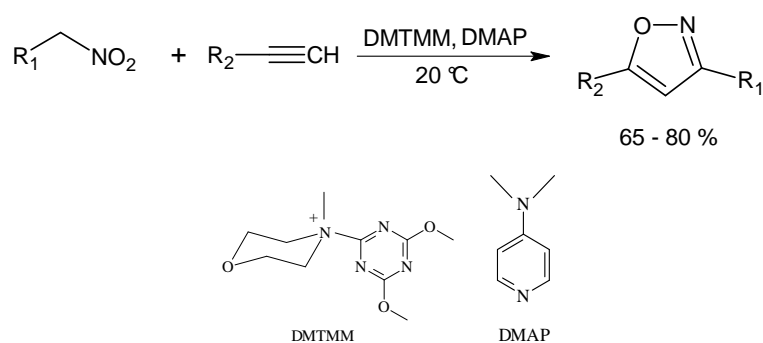
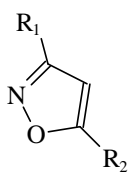


FIG. 1.10 Formação de isoxazóis a partir de nitroalcanos em presença de DMTMM.

O DMAP foi utilizado como catalisador na conversão de nitroalcanos a óxido de nitrila e conseqüentemente com a adição do dipolarófilo pôde ser utilizado na formação de isoxazóis, em condições brandas e obtendo os bons rendimentos mostrados na TAB. 1.3 (GIACOMELLI *et al.*, 2003).

TAB. 1.3 Rendimentos de isoxazóis obtidos a partir de nitrocompostos.

ISOXAZÓIS	SUBSTITUINTES		RENDIMENTOS
	R ₁	R ₂	%
	Me	Ph	75
	COOMe	Ph	84
	CH ₂ COOEt	Ph	68

GIACOMELLI *et al.*, 2003

1.2.2 OBTENÇÃO DE ÓXIDO DE NITRILA A PARTIR DA OXIDAÇÃO DE ALDOXIMAS

As aldoximas podem ser obtidas por uma metodologia clássica, que consiste no tratamento de aldeídos com hidroxilamina em meio ácido, fornecendo as respectivas aldoximas conforme a FIG. 1.11 (SOLOMONS & FRYHLE, 2006).

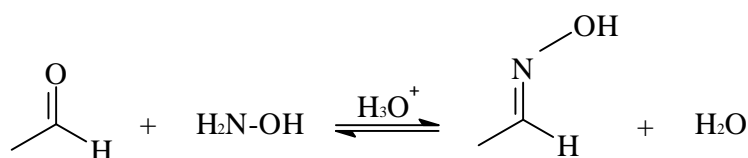


FIG. 1.11 Formação de aldoximas.

GRUNDMANN & RITCHER (1967) reportaram pela primeira vez a halogenação de aldoximas utilizando hipobromito de sódio (NaOBr) em solução alcalina, com posterior desidroalogenação dos respectivos haletos de imidoíla.

No ano seguinte, GRUNDMANN & RITCHER (1968) demonstraram a formação de óxidos de nitrila a partir do tratamento de aldoximas com *N*-bromo-succinimida (NBS) em uma solução de *N,N*-dimetil-formamida (DMF) na presença de uma base, etóxido de sódio ou trietilamina, a baixa temperatura (FIG. 1.12) e com melhores rendimentos de acordo com a TAB 1.4 (GRUNDMANN & RITCHER, 1968).

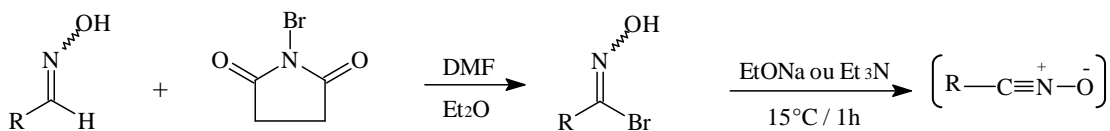


FIG. 1.12 Obtenção de óxido de nitrila empregando NBS.

Uma vantagem desse método é a possibilidade de separação dos compostos formados, pois ao término da reação, adicionando água à mistura o óxido de nitrila precipita e o subproduto formado (succinimida) fica em solução (GRUNDMANN & RITCHER, 1968).

TAB. 1.4 Diferentes metodologias de deidroalogenação de aldoximas.

SUBSTÂNCIA	RENDIMENTO (%)		
	NaOBr/NaOH H ₂ O	NBS/NaOCH ₃ DMF	NBS/ Et ₃ N DMF
	82	81	90
	30	60	81

GRUNDMANN & RITCHER, 1968

Um dos primeiros métodos de cloração de aldoximas foi estudado por CHIANG em 1971. Seu estudo se baseou na cloração, através do cloro gasoso (Cl₂), de benzoaldoximas com diferentes substituintes, utilizando como solvente o clorofórmio ou o diclorometano. CHIANG concluiu que a formação do cloreto de imidoíla dependia tanto do solvente utilizado quanto da característica do grupo substituinte (elétron-doador ou elétron-receptor) contido no anel aromático (FIG. 1.13).

Uma limitação bastante significativa para essa metodologia é a grande possibilidade de cloração do anel aromático quando a benzoaldoxima contém substituinte elétron-doador (CHIANG, 1971).

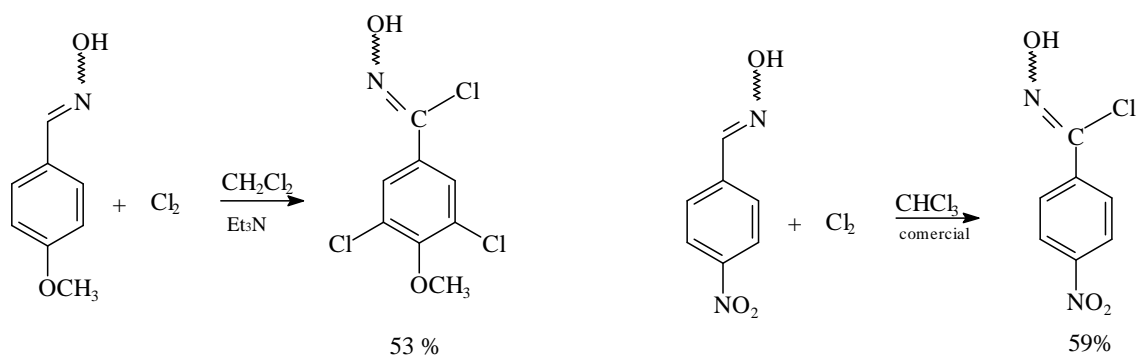


FIG. 1.13 Metodologia de obtenção do cloreto de imidoíla a partir do cloro gasoso.

Alguns anos depois, LIU e colaboradores propuseram a obtenção de cloreto de imidoíla a partir do tratamento de aldoximas com *N*-cloro-succinimida (NCS) em *N,N*-dimetil-formamida (DMF) (FIG. 1.14). Essa metodologia substitui a desidroaloxidação oxidativa de aldoximas utilizando Cl_2 , pois a cloração do anel aromático só ocorreria na presença de um grupo fortemente ativador (LIU *et al.*, 1980).

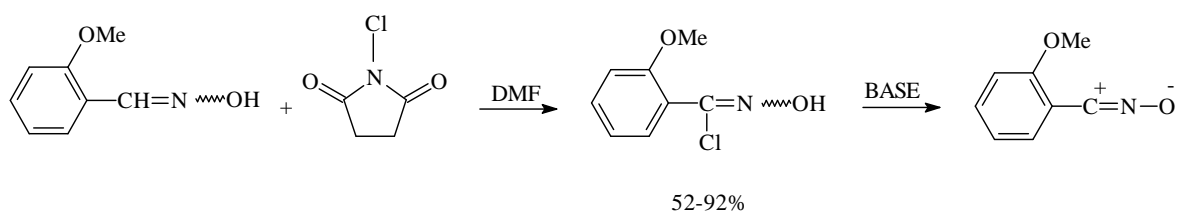


FIG. 1.14 Formação do óxido de nitrila pelo tratamento de aldoximas com NCS em DMF.

Em 1982, LEE descreveu uma metodologia para halogenação de oximas, que consiste no tratamento de aldoximas com hipoclorito de sódio (NaOCl), obtendo os respectivos cloretos de imidoíla (FIG. 1.15). Esse método ainda é bem empregado por utilizar um reagente de baixo custo, porém a reação necessita de monitoramento já que o NaOCl é termo e fotossensível. Os rendimentos da formação de anéis heterocíclicos desta reação variaram de 19 a 95% (LEE, 1982).

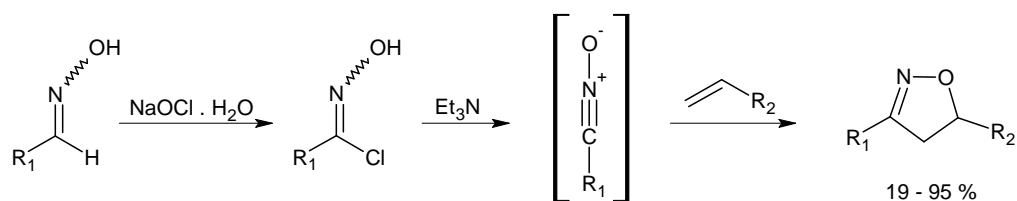


FIG. 1.15 Formação do óxido de nitrila empregando NaOCl .

HASSNER e RAI (1989) reportaram o uso de *N*-cloro-*N*-sódio-4-metil-benzo-sulfonamida (Cloramina T) na conversão de aldoximas em óxidos de nitrila *in situ*. A reação utilizando cloramina-T converte toda aldoxima em seu respectivo cloreto de imidoíla sem que haja cloração do anel aromático e acontece tanto com aldoximas aromáticas quanto com aldoximas alifáticas em bons rendimentos (FIG. 1.16).

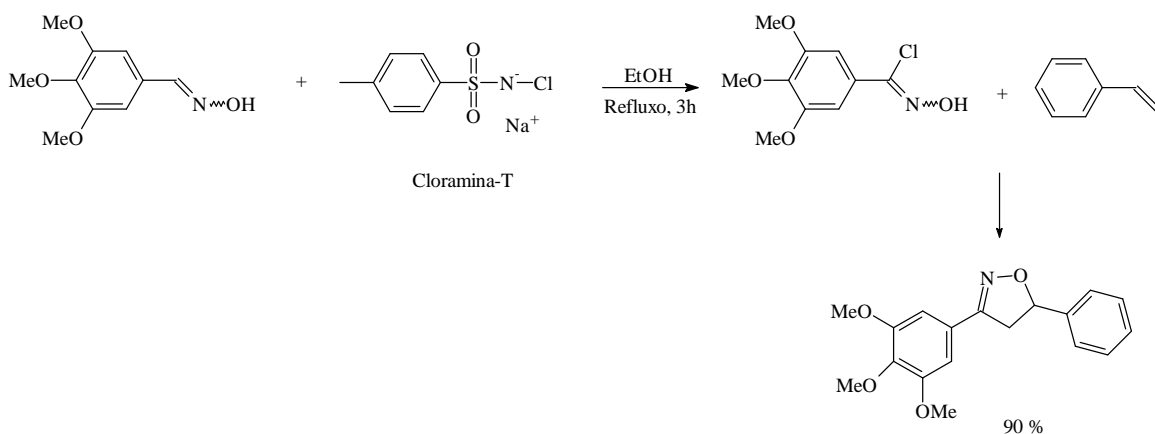


FIG. 1.16 Oxidação de aldoximas com Cloramina T.

Em 2001, RODRIGUES e AGUIAR descreveram uma metodologia de formação de óxido de nitrila, utilizando o ácido tricloro-isocianúrico (ATCI) como principal reagente (FIG. 1.17). O ATCI é um forte agente oxidante que converte aldoximas em cloretos de imidoíla de maneira eficiente, além de apresentar baixo custo e disponibilidade (RODRIGUES & AGUIAR, 2001).

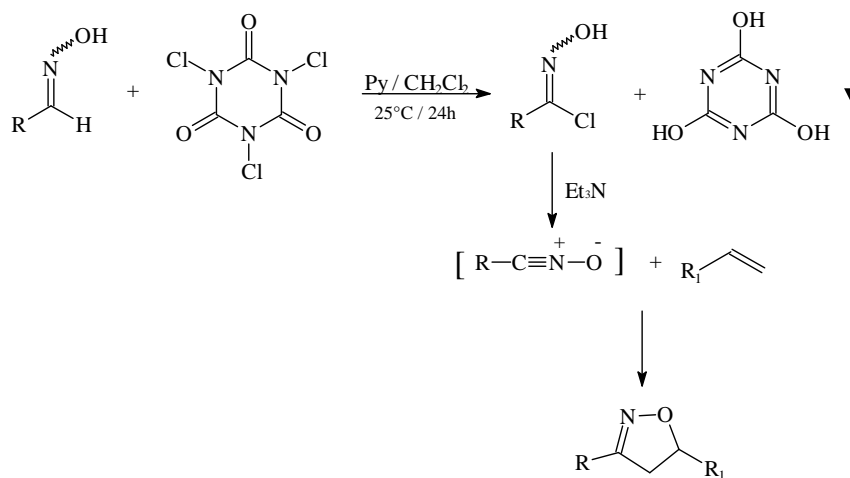

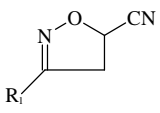

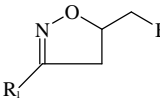

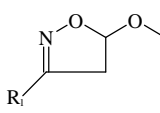

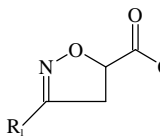


FIG 1.17 Obtenção de 4,5-diidro-isoxazóis empregando o ácido tricloro-isocianúrico.

Esta metodologia demonstrou que além das vantagens mencionadas anteriormente obteve produtos de ciclo-adição com bons rendimentos segundo a TAB.1.5 (RODRIGUES & AGUIAR, 2001).

TAB. 1.5 Formação de 4,5-diidro-isoxazóis a partir de ATCI

DIPOLARÓFILOS	COMPOSTOS	RENDIMENTOS
		31
		51
		52
		60

RODRIGUES & AGUIAR, 2001

Em 2006, KAUSHIK e KUMAR reportaram que o uso *N-terc*-butil-*N*-cloro-cianoamida foi eficiente na conversão de aldoximas em cloreto de imidoíla. O tratamento de aldoximas com *N-terc*-butil-*N*-cloro-cianoamida em diclorometano a temperatura ambiente gerou os cloretos de imidoíla correspondentes (FIG. 1.18). Estes, em presença de quantidades catalíticas de base, deram origem ao óxido de nitrila que com a adição dos dipolarófilos geraram os heterociclos com rendimentos satisfatórios (KAUSHIK, 2006).

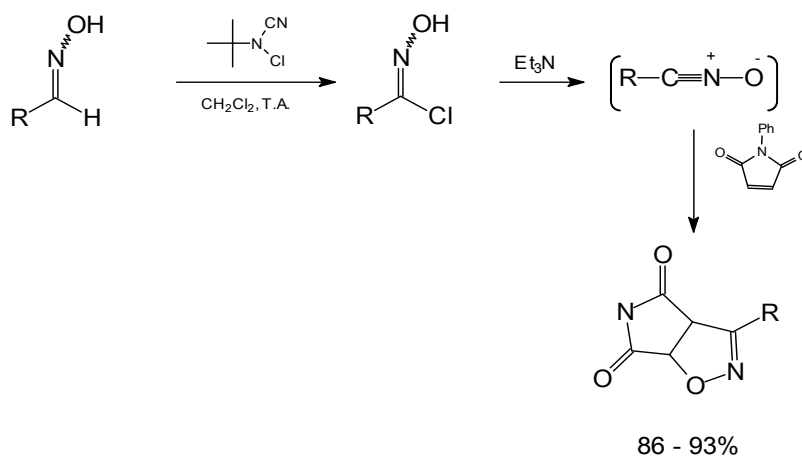


FIG. 1.18 Formação de cloreto de imidoíla a partir de *N-terc*-butil-*N*-cloro-cianoamida

1.3 SÍNTESE E BIOATIVIDADE DE DERIVADOS DE 3-(5-NITRO-2-FURIL) - 4,5-DIIDRO-ISOXAZÓIS

Estudos de modificação de compostos-protótipos têm demonstrado que heterociclos como isoxazóis e 4,5-diidro-isoxazóis podem apresentar um conjunto bastante diversificado de atividade farmacológica (WEIDNER-WELLS *et al.*, 2004; PLENKIEWICZ & ZAGOZDA, 2007).

Neste âmbito, a inserção de um radical nitrofuril na posição 3 do heterociclo 4,5-diidro-isoxazol tem levado a um aumento da bioatividade. Os nitrocompostos, a partir da década de 40, receberam uma maior atenção devido a sua utilização terapêutica (TAVARES *et al.*, 2009), destacando-se os nitrofuranos que são um importante grupamento capaz de auxiliar a atividade antibacteriana, antifúngica e anti-protozoários (HABER & SCHOENBERGER, 1968; HOYLE & HOWARTH, 1973; LEE *et al.*, 2007).

Em 1967, SASAKI & YOSHIOKA sintetizaram, a partir de reação de ciclo-adição, derivados de 3-(5-nitro-2-furil)-4,5-diidro-isoxazóis (FIG. 1.19). Foram utilizados dois métodos distintos; no primeiro método o óxido de nitrila foi preparado *in situ* a partir do cloreto de imidofla e trietilamina em éter; já no segundo, ao cloreto de imidofla foi adicionado o dipolarófilo utilizando tolueno como solvente, e o sistema foi mantido em refluxo a 160°C por 18 horas (SASAKI & YOSHIOKA, 1967).

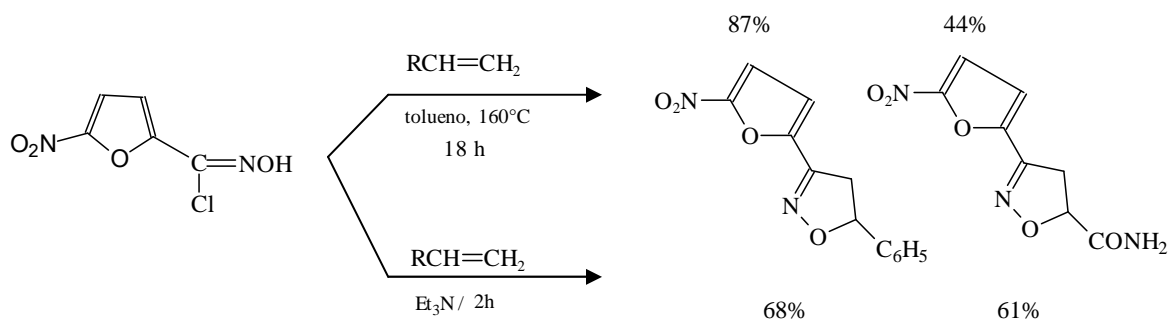


FIG. 1.19 Obtenção de 4,5-diidro-isoxazóis através da reação de ciclo-adição.

No ano seguinte, SASAKI & YOSHIOKA reportaram a síntese de 3-(5-nitro-2-furil)-4,5-diidro-isoxazóis a partir de cloretos de imidofla utilizando enaminas como

dipolarófilos (FIG. 1.20) e, posteriormente, através de hidrólise ácida foram obtidos derivados de isoxazóis (SASAKI & YOSHIOKA, 1968).

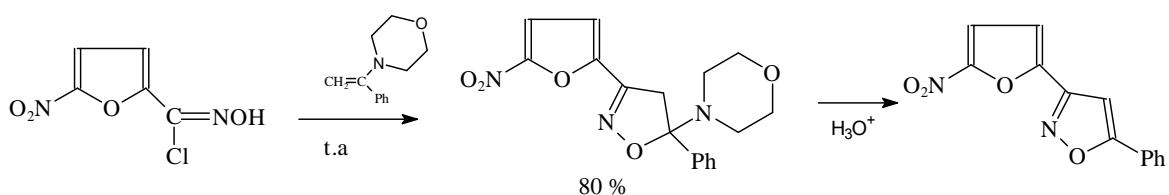
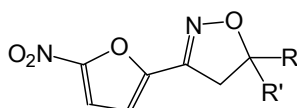


FIG. 1.20 Obtenção de derivados de isoxazóis utilizando enaminas como dipolarófilos.

Em 1971, MINAMI e colaboradores reportaram a síntese e a avaliação biológica de diferentes derivados isoxazolínicos a partir do 5-nitro-2-furaldeído (MINAMI *et al.*, 1971). Os compostos apresentaram atividade biológica frente às bactérias *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* e *Mycobacterium tuberculosis*, entre outras (TAB. 1.6)

TAB. 1.6 Concentrações inibitórias mínimas para os derivados isoxazolínicos.

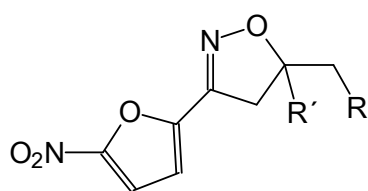


COMPOSTO	R	R'	CIM ($\mu\text{g/mL}$)			
			<i>S. aureus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
18	Fenil	Piperidina	0.3	1	>100	10
19	COCH ₃	H	10	-	3	3
20	3-Py	H	10	10	1	-
21	CH ₂ CN	H	3	-	1	3

MINAMI *et al.*, 1971

Em 1973, HOYLE e HOWARTH avaliaram a atividade biológica de diferentes derivados de 3-(5-nitro-2-furil)-4,5-diidro-isoxazóis (FIG. 1.21). Os derivados isoxazolínicos com o nitrofurano na posição 3 do anel apresentaram propriedades farmacológicas, tais como propriedades antifúngicas, antivirais e, em particular, atividade

antibacteriana, principalmente, aquelas relacionadas ao trato urinário (HOYLE & HOWARTH, 1973).



R	R'
Cl	CH ₃
HNCOCH ₂ CN	H
HNCOCH ₃	H
HNCOCH ₂ OCH ₃	H
HNCOCH ₂ Cl	H

FIG 1.21 Derivados de 3-(5-nitro-2-furil)-4,5-diidro-isoxazóis bioativos

Os antibióticos derivados de nitroaromáticos são uns dos poucos que têm demonstrado atividade contra *Mycobacterium tuberculosis*. Recentemente, LEE e colaboradores (2007) desenvolveram uma série de nitrofuril-amidas com excelente atividade *in vitro* contra *Mycobacterium tuberculosis*. No entanto, esta série de compostos não apresentou um bom desempenho durante estudos *in vivo*, devido a uma curta meia-vida biológica e a rápida eliminação. Segundo os autores, a principal razão para a instabilidade metabólica é resultante do grupamento amida. Com isso, Lee e colaboradores avaliaram a substituição da amida por uma isoxazolina (FIG. 1.22), pois o anel isoxazolinico representa um sistema bioisóstere estável que se encontra entre muitas drogas e moléculas bioativas (LEE *et al.*, 2007).

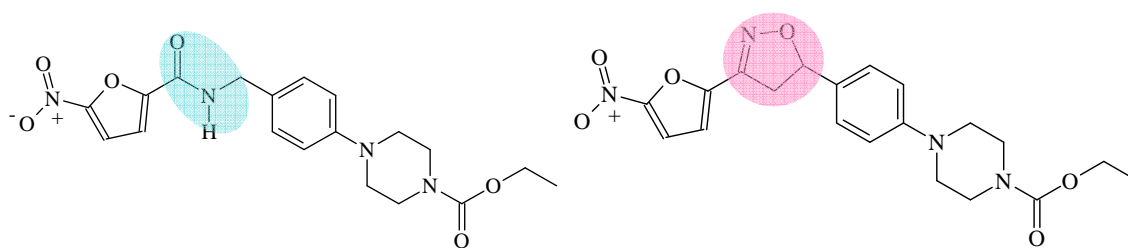
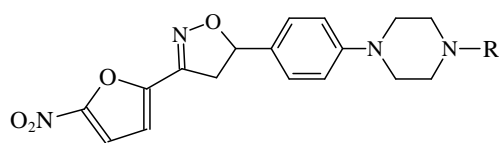


FIG 1.22 Derivados de nitro-furil com atividade antibacteriana frente *M. tuberculosis*.

Os resultados mostraram que todos os compostos sintetizados apresentaram uma melhor atividade anti-tuberculose *in vitro* (TAB. 1.7) e melhoraram o tempo de meia-vida correspondente aos compostos da série anterior, demonstrando que a estratégia de substituição foi bem sucedida (LEE *et al.*, 2007).

TAB. 1.7 Atividade anti-tuberculose dos compostos isoxazolínicos com nitrofurano.



Composto	R	CIM ($\mu\text{g/mL}$) $\times 10^{-3}$
22	$\text{COOC}(\text{CH}_3)_3$	0,1
23	CH_2Ph	0,05
24	$\text{COOCH}_2\text{CH}_3$	0,1
25	$\text{CONHCH}(\text{CH}_3)_2$	0,2

LEE *et al.*, 2007

1.4 ATIVIDADE BIOLÓGICA E TOXICOLÓGICA DE NITROFURANOS

O planejamento de novas substâncias bioativas envolve a determinação de diferentes parâmetros físico-químicos e eletrônicos da molécula. Dentre os diferentes tipos de substituintes, o grupo nitro faz-se presente em diferentes moléculas bioativas, as quais apresentam diferentes bioatividades, e atualmente possuem diversas atuações clínicas (FIG. 1.23), tais como: antiinflamatório (nimesulida), antibacteriano (cloranfenicol, nitrofural) e antiparasitário (nifurtimox; benznidazol) (BOSQUESI *et al.*, 2008; TAVARES *et al.*, 2009).

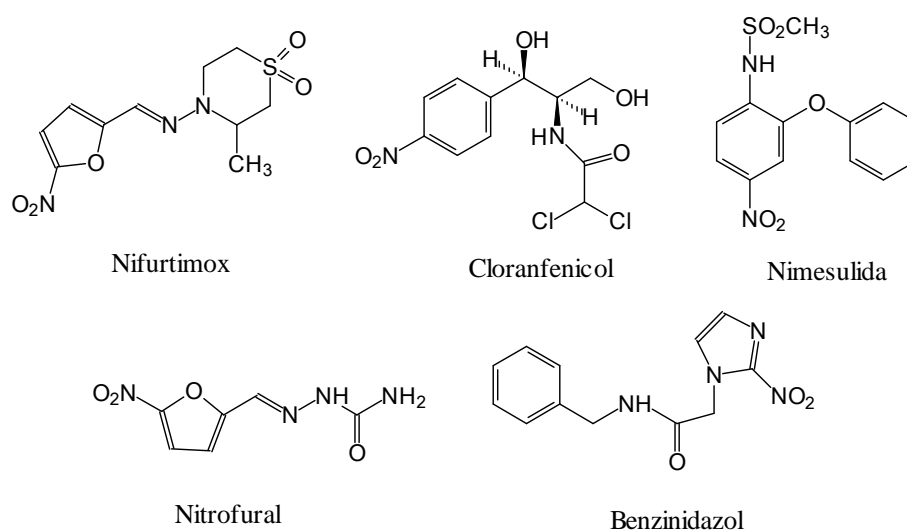
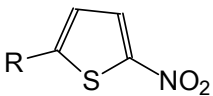
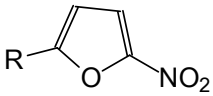
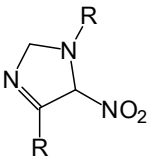


FIG. 1.23 Fármacos com grupo nitro que apresentam atividades farmacológicas.

A atividade biológica desta classe de compostos é dependente da presença do grupo nitro ligado à molécula e resulta, basicamente, de mudanças na estabilidade do mesmo, intermediada por interações entre o nitrocomposto e o seu alvo. Em nível molecular estas mudanças ocorrem devido à facilidade de redução do grupo nitro, característica resultante do seu caráter fortemente aceptor de elétrons (TAVARES *et al.*, 2009). A maioria dos compostos nitrados com ação farmacológica apresentam o mecanismo de biorredução enzimática, o que resulta na formação de radicais livres, como provável mecanismo de ação (BOSQUESI *et al.*, 2008; TAVARES *et al.*, 2009). Entre as diversas classes de nitrocompostos que apresentam interesses biológicos, algumas de maior relevância estão representadas na TAB 1.8 (TAVARES *et al.*, 2009).

TAB. 1.8 Classe de nitrocompostos e respectivo emprego na terapêutica

Classe	Agente etiológico
Nitrotiofênicos 	<i>Entamoeba histolitica</i> , <i>Leishmania</i> sp, <i>Trichomonas</i> sp, <i>Trypanosoma cruzi</i> , <i>Entamoeba histolítica</i> , <i>Plasmodium falciparum</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Micobacterium</i> sp.
Nitrofurânicos 	<i>Trypanosoma cruzi</i> , <i>Leishmania</i> sp, <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Camphylobacter crescentus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Micobacterium tuberculosis</i> , <i>Entamoeba histolitica</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Clostridium perfringes</i> , <i>Bacterioides</i> sp.
Nitroimidazóis 	<i>Micobacterium tuberculosis</i> , <i>Trypanosoma cruzi</i> , <i>Giardia muris</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Clostridium perfringes</i> , <i>Bacterioides</i> sp

TAVARES *et al.*, 2009; MICETICH, 1971; LEE, 2007

No entanto, a possibilidade da atividade biológica ser dependente da ligação dos intermediários de nitrorredução ao DNA promove questionamentos sobre o caráter mutagênico dos nitrocompostos. Porém, estudos realizados nos últimos anos demonstraram que a provável ação mutagênica, assim como a toxicidade dos nitrocompostos, é dependente de fatores como a estrutura química, tempo de exposição e dose utilizada, o que demonstra a possibilidade, sob condições controladas, do emprego terapêutico de alguns nitrocompostos (TAVARES *et al.*, 2009).

1.4.1 MECANISMO DE AÇÃO DE NITROCOMPOSTOS

De acordo com os dados da literatura, é consenso que o mecanismo de ação desta classe de compostos está ligado ao processo de redução *in vivo* do grupo nitro e à subsequente interação dos produtos formados com biomoléculas essenciais de bactérias, fungos e parasitas (TAVARES *et al.*, 2009). Em bactérias, o requisito básico para a ação mutagênica de compostos nitrofurânicos é a redução promovida por, no mínimo, três nitrorredutases. Estas reduções resultam de reações em cadeia que levam à formação de espécies eletrofílicas que podem reagir com o DNA (BOSQUESI *et al.*, 2008)

A passagem transmembrana destas moléculas ocorre por difusão passiva e aumenta à medida que os radicais livres provenientes do processo de biorredução desestabilizam a membrana celular. Assim, devido ao aumento da concentração intracelular de nitrocompostos, maior quantidade de radicais livres é gerada e, conseqüentemente, maior é o dano causado pelo estresse oxidativo. Essa formação excessiva de radicais livres pode resultar em peroxidação de membranas biológicas e proteínas, inibição de enzimas e danos ao DNA (TAVARES *et al.*, 2009).

Em meio anaeróbio, o nitro radical aniônico e a hidroxilamina formados são os principais intermediários ou metabólitos do processo de redução enzimática do grupo nitro até amino (TAVARES *et al.*, 2009). O alvo destes compostos é o DNA, a redução dos mesmos causa quebra e desestabilização da hélice (FIG. 1.24). O grau do dano é relacionado com a composição da fita e é aumentado com a presença de Adenina-Timina no DNA (TOCHER, 1997). Todavia, existem suspeitas de que outros intermediários também apresentem atividade biológica, entre as quais, a toxicidade ao DNA supostamente

causada pelo radical $\text{Ar-NO}_2\text{H}^\cdot$ e a inativação enzimática causada pelo derivado nitroso (Ar-NO), agindo como receptor de elétrons de grupo tióis de enzimas detoxificantes (TAVARES *et al.*, 2009).

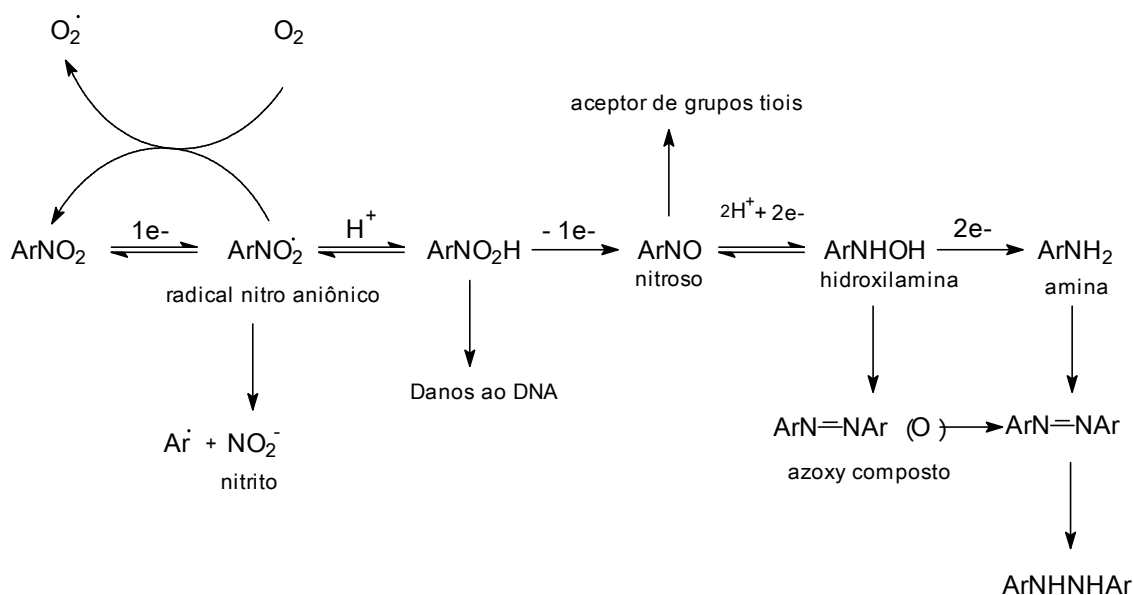


FIG. 1.24 Possível mecanismo biorredutivo de nitrocompostos para rota anaeróbica.

Em meio aeróbico, o nitro radical aniônico gerado no processo de redução enzimática interage com o oxigênio presente no meio, formando o radical O_2^\cdot (FIG. 1.25). Este radical sofre ação de enzimas como o superóxido dismutase (S.OD.), formando o peróxido de hidrogênio que pode desestruturar membranas biológicas e também reagir com enzimas ferredoxinas, liberando espécies reativas (OH^\cdot) que são tóxicas para as células (TOCHER, 1997; TAVARES *et al.*, 2009).

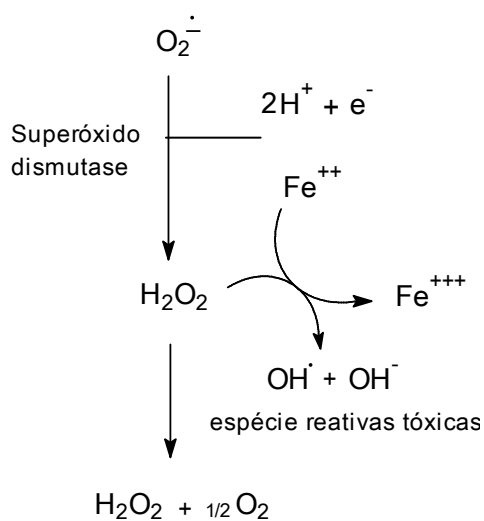


FIG. 1.25 Possível mecanismo biorredutivo de nitrocompostos para rota aeróbica.

No entanto, a ausência de compostos eficazes frente a doenças órfãs, como algumas doenças infecto-contagiosas e alguns tipos de câncer evidenciam as deficiências da terapêutica atual. Estes fatos demonstram a necessidade premente de desenvolvimento de novos agentes bioativos. Neste sentido, o emprego de ferramentas de modulação da estrutura dos nitrocompostos, como o bioisoterismo, que possibilitam o planejamento de moléculas com melhor perfil farmacológico se apresenta extremamente promissor (TAVARES *et al.*, 2009; MAYA *et al.*, 2007).

1.5 MECANISMOS DE DEFESA BACTERIANA E RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS

As bactérias são organismos unicelulares, identificados pela primeira vez por Van Leeuwenhoek por volta dos anos 1670, após a invenção do microscópio. Para melhor diferenciação das bactérias ao microscópio foram adotados métodos de coloração, como a coloração de Gram. Esse método permitiu a divisão das bactérias em dois grandes grupos: Gram-positiva e Gram-negativa (FIG. 1.26) Essa distinção é possível através da diferença entre a morfologia das paredes celulares que proporciona a absorção do corante de forma diferente (PUPO *et al.*, 2010; TORTORA *et al.*, 2005).

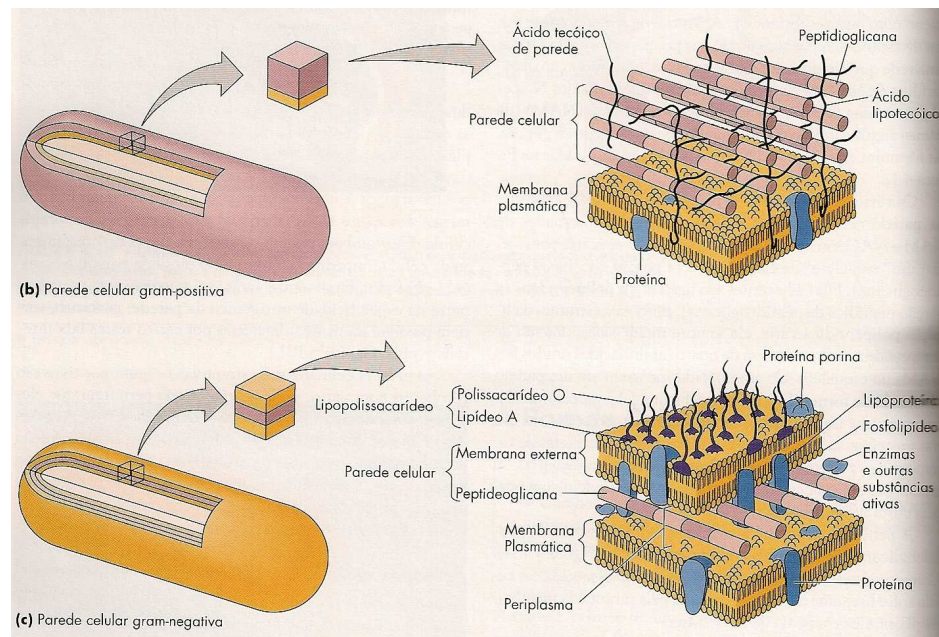


FIG. 1.26 Diferença morfológica entre as paredes celulares de bactéria Gram-positivas e Gram-negativas.

As bactérias Gram-positivas são caracterizadas por possuírem uma espessa e rígida camada de peptidoglicano e pela presença de ácidos teicóico e lipoteicóico. Já as Gram-negativas apresentam uma fina camada de peptidoglicanos entre a membrana celular interna e externa e na membrana externa há a presença de lipopolissacarídeo (LPS), lipoproteínas e fosfolípídeos. O LPS fornece duas características importantes das Gram-negativas: a porção polissacarídica, denominada polissacarídeo O, atua como antígeno e é útil para diferenciar as espécies; e a porção lipídica, denominada lipídeo A, é referida como endotoxina, sendo tóxica quando presente na corrente sanguínea do hospedeiro ou no trato gastrointestinal (TORTORA *et al.*, 2005).

As bactérias multiplicam-se rapidamente, sofrem mutação e podem trocar material genético a todo o momento entre linhagens de mesma espécie ou de espécies diferentes. São consideradas microrganismos de alta capacidade de adaptação a diversos fatores, como a exposição a agentes químicos potentes (PUPO *et al.*, 2010).

No decorrer das últimas décadas, o desenvolvimento de fármacos eficientes no combate a infecções bacterianas revolucionou o tratamento médico, ocasionando a redução drástica da mortalidade causada por doenças microbianas. Por outro lado, a disseminação do uso de antibióticos fez com que as bactérias também desenvolvessem defesas relativas aos agentes antibacterianos, com o consequente aparecimento de resistência (SÁ *et al.*, 2006).

Apesar do mecanismo de resistência variar de patógeno para patógeno, a resistência é causada por alguns fatores básicos: degradação ou modificação do antibiótico – enzimas catalisam a degradação do antibiótico ou modificam grupos funcionais farmacologicamente importantes; efluxo contínuo do antibiótico – genes superexpressam proteínas transportadoras responsáveis pela entrada e saída de substância no meio citoplasmático, fazendo com que a retirada do antibiótico para o meio extracelular seja mais rápida que a difusão pela membrana bacteriana; reprogramação e modificação da estrutura-alvo – alvos macromoleculares do antibiótico, como ribossomos, proteínas e constituintes da parede celular, são estruturalmente modificados a partir de genes que os expressam, afetando o reconhecimento do fármaco pelo alvo (SÁ *et al.*, 2006; PUPO *et al.*, 2010).

1.6 JUSTIFICATIVA

Nas décadas de 1940 e 1950, a maioria das infecções hospitalares era causada por micróbios Gram-positivos. Em um dado momento, a bactéria *Staphylococcus aureus* era a principal causa das infecções hospitalares. Já na década de 1970, bastonetes Gram-negativos, como *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, passaram a ser as grandes vilãs das infecções nosocomiais. Durante a década de 1980, a bactéria Gram-positiva *S. aureus* multirresistente, os estafilococos coagulase-negativos e o *Enterococcus* sp. surgiram como os principais patógenos hospitalares. E a partir da década de 1990 até os últimos anos, essas bactérias Gram-positivas passaram a ser responsáveis por 34% das infecções hospitalares, e as Gram-negativas por 32% (TORTORA *et al.*, 2005).

A resistência bacteriana a inúmeros fármacos e a crescente detecção de infecções hospitalares causadas por cepas multirresistentes são consideradas um problema de saúde pública que compromete o tratamento de doenças infecciosas, estimulando a procura por novas substâncias bioativas.

Inseridos neste contexto, encontram-se os 4,5-diidro-isoxazóis que apresentam diferentes atividades farmacológicas, dentre elas a antibacteriana, como já relatada na literatura. Além disso, os 4,5-diidro-isoxazóis possuem uma versatilidade sintética permitindo a incorporação de uma grande variedade de substituintes nas posições 3 e 5 do anel, podendo gerar um extensa variedade de estruturas químicas atuantes em diversas áreas, como por exemplo, a biológica.

Os 4,5-diidro-isoxazóis podem ser sintetizados a partir da reação de ciclo-adição 1,3-dipolar. Dentre as metodologias de ciclo-adição 1,3-dipolar, a metodologia utilizando ácido tricloro-isocianúrico torna-se mais viável tendo em vista que o reagente é de fácil obtenção, baixo custo e reage em condições brandas convertendo aldoximas em seus respectivos cloretos de imidoíla.

1.7 OBJETIVO

Em continuidade ao projeto de síntese e avaliação biológica de derivados de 4,5-diidro-isoxazóis desenvolvido por este grupo de pesquisa, este trabalho tem como objetivo:

- Sintetizar derivados de 4,5-diidro-isoxazóis empregando como dipolo óxido de nitrilas derivados do furaldeído e do 5-nitro-furaldeído e diferentes compostos insaturados (acrilamida, estireno e acrilato de etila) como dipolarófilo.
- Caracterizar os produtos obtidos através de diferentes técnicas, tais como, espectrofotometria na região de infravermelho (IV), espectroscopia de ressonância magnética nuclear de carbono (RMN ^{13}C) e hidrogênio (RMN ^1H), espectroscopia de massas (EM) e análise elementar (CHN).
- Avaliar a atividade antibacteriana dos compostos obtidos frente às cepas padrão de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853).

2 MATERIAIS E MÉTODOS

A seguir estão relacionados os materiais e métodos utilizados para a obtenção dos compostos estudados, bem como os procedimentos adotados na avaliação da atividade antibacteriana.

2.1 MATERIAIS

2.1.1 EQUIPAMENTOS

TAB. 2.1 Relação de equipamentos utilizados na síntese dos derivados isoxazolínicos.

EQUIPAMENTO	MODELO	MARCA
Aparelho de Análise Elementar CHN	2400 Serie II	Perkin-Elmer
Aparelho de ponto de fusão	PF 100	Gehaka
Balança analítica digital	A 2005	Sartorius
Banho Maria	550	Fisaton
Bomba de vácuo	ES 50	Edwards
Cromatógrafo gasoso	6820 GC	Agilent Technologies
Espectrômetro de massas	QP-2010 Plus	Shimadzu
Espectrômetro de infravermelho	Prestige 21	Shimadzu
Evaporador Rotatório	MO35	Janke & Kunkle
Placa de aquecimento e agitação magnética	752 A	Fisaton
Ressonância Magnética Nuclear	Unity 300	Varian

TAB. 2.2 Relação de equipamentos utilizados no ensaio biológico

EQUIPAMENTO	MODELO	MARCA
Autoclave vertical	-	Phoenix
Balança analítica digital	A 205	Sartorius Analytic
Câmara de segurança biológica classe II	-	Veco
Estufa de cultura	502 A	FANEM
Geladeira	-	Bosch
Pipeta automática multicanal	20 – 200 µL	HTL
Pipeta automática	0,5 – 10 µL	Thermo Electro
Pipeta automática	20 – 200 µL	Thermo Electro
Pipeta automática	100–1000 µL	Thermo Electro

2.1.2 REAGENTES E SOLVENTES

Os solventes e reagentes utilizados tiveram seu grau de pureza determinado pelo fabricante.

TAB. 2.3 Relação de reagentes e meio de cultura utilizado no ensaio biológico

REAGENTE/MEIO DE CULTURA	GRAU DE PUREZA	PROCEDÊNCIA
Caldo Mueller-Hinton	Puro	Merck
Amoxicilina	95%	Pharma Nostra
Cloreto de sódio	P.A	Vetec
Dimetilsulfóxido	P.A	Vetec
Violeta <i>p</i> -iodonitrotetrazólio	95%	Sigma-aldrich

TAB. 2.4 Relação de reagentes e solventes utilizados na síntese dos derivados isoxazolínicos

MATÉRIA-PRIMA	GRAU DE PUREZA	PROCEDÊNCIA
Acetona	P.A	Vetec
Acetato de etila	P.A	Vetec
Ácido nítrico	95%	Vetec
Ácido sulfúrico	P.A	Vetec
Ácido tricloroisocianúrico	100%	Hidro All
Acrilamida	99%	Vetec
Acrilato de etila	99,5%	Acros Organics
Álcool etílico	P.A	Vetec
Anidrido acético	P.A	Merck
Carbonato de sódio anidro	P.A	Vetec
Cloridrato de hidroxilamina	99%	Vetec
Cloreto de metileno	P.A	Vetec
Clorofórmio d	99,6%	Cambridge Isotope
Dimetilsulfóxido d	99,5%	Cambridge Isotope
Estireno	Comercial	Petroflex
Furaldeído	95%	Merck
Hexano	P.A	Vetec
Hidróxido de sódio	P.A	Vetec
5-nitro-2-furaldeído	99%	Sigma-aldrich
Sílica Gel 230-400 mesh	100%	Merck
Sílica Gel 35-70 mesh	100%	Merck
Sílica Gel 70-325 mesh	100%	Merck
Sílica Gel p/ ccf PF ₂₅₄₋₃₆₆	100%	Merck
Sulfato de sódio anidro	P.A	Merck
Trietilamina	P.A	Vetec

2.2 METODOLOGIA SINTÉTICA

Todas as etapas da rota sintética utilizada para a obtenção dos derivados isoxazolínicos foram acompanhadas por Cromatografia Gasosa (CG). A metodologia utilizada para a confirmação da estrutura química dos compostos sintetizados consistiu na determinação do ponto de fusão, na análise espectrométrica de Infravermelho (IV), Ressonância Magnética Nuclear de Carbono (RMN ^{13}C), Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H), Análise Elementar e Espectroscopia de Massas (EM).

As análises por cromatografia gasosa foram realizadas no aparelho da Agilent Technologies CG 6829 empregando uma coluna HP-5MS 5% fenil-metil-silicone com diâmetro de 320 μm , espessura de 25 μm e comprimento de 30 m. A temperatura inicial da coluna foi de 70 $^{\circ}\text{C}$, com uma taxa de aquecimento de 15 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ até atingir 280 $^{\circ}\text{C}$ sendo mantida por 6 minutos. A temperatura do injetor foi de 250 $^{\circ}\text{C}$ e a temperatura do detector de 295 $^{\circ}\text{C}$.

A separação dos compostos foi realizada por cromatografia flash em coluna, utilizando com fase estacionária a sílica gel de 230-400 mesh (Merck) e como fase móvel uma mistura adequada de solventes (hexano:acetato de etila).

Os pontos de fusão dos compostos foram determinados em capilares utilizando o equipamento de marca Gehaka, modelo PF 1000 não calibrado.

Os espectros de infravermelho foram obtidos pelo espectrômetro Shimadzu modelo Prestige 21. As amostras foram preparadas em pastilhas de brometo de potássio (KBr).

Os espectros de ressonância magnética nuclear de carbono e hidrogênio foram obtidos pelo espectrômetro VARIAN, modelo Unity-300 registrado a 75 e 300 MHz, respectivamente. Os solventes utilizados foram clorofórmio deuterado (CDCl_3) e dimetilsulfóxido deuterado ($\text{DMSO-}d_6$), contendo tetrametilsilano (TMS) como referência interna. As escalas dos espectros foram corrigidas a partir do deslocamento químico do solvente.

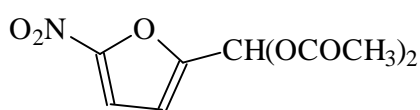
As espectrometrias de massas foram realizadas no espectrômetro Shimadzu modelo QP-2010 Plus, que operou em condições similares às empregadas na cromatografia gasosa.

A análise elementar de C, H e N foi realizada no Laboratório de Caracterização de Petróleo, Derivados e Biocombustíveis (LCPB), do Departamento de Química da PUC-Rio.

2.2.1 PURIFICAÇÃO DO FURALDEÍDO

A purificação do furaldeído foi conduzida por destilação fracionada a pressão reduzida (aproximadamente 4 mmHg) com 7% de carbonato de sódio. A temperatura do banho de aquecimento foi mantida em torno de 90°C. (ARMAREGO & PERRIN, 2000).

2.2.2 SÍNTESE DO 5-NITRO-2-FURALDEÍDO DIACETATO



(31)

FIG. 2.1 Estrutura do 5-nitro-2-furaldeído diacetato

Em um bécher em banho de gelo foram adicionados 32 mmol (1,32 mL) de ácido nítrico fumegante e 1 mmol (0,05 mL) de ácido sulfúrico.

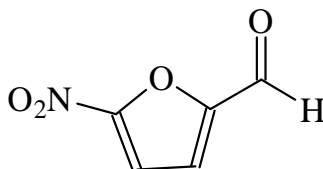
Em um balão de fundo redondo de 250 mL foram adicionados 100 mmol (9,44 mL) de anidrido acético e mantido em banho de gelo até a temperatura interna alcançar aproximadamente 5°C. Em seguida, ainda em banho de gelo e agitação constante, foi adicionada bem lentamente, com o auxílio de uma pipeta Pasteur, a mistura sulfonítrica. Posteriormente, foram gotejados 25 mmol (2,07 mL) de furaldeído previamente purificado sob as mesmas condições. O sistema foi mantido por 40 minutos em banho de gelo e agitação constante. É importante frisar que para evitar desprendimento de gás NO₂, a adição deve ser bem lenta e a temperatura interna do balão não deve ultrapassar 10°C.

Após, foram adicionados 15g de gelo picado e mantido em agitação constante por 30 minutos. Em seguida, foram acrescentados 3,5 mL de uma solução de NaOH com o objetivo de manter o pH próximo de 4, o sistema foi mantido em agitação por 10 minutos.

Decorridos os 10 minutos, o balão foi aquecido a 50°C – 55°C por 1 hora. Posteriormente, este foi resfriado em banho de gelo e agitação por 3 horas. O precipitado foi lavado com água destilada gelada, filtrado e seco em temperatura ambiente. O produto foi purificado através da recristalização com etanol. Na recristalização foi utilizada 1g do

produto formado e 14 mL de etanol P.A, a mistura foi levemente aquecida e resfriada em temperatura ambiente (GILLER et al., 1977; TEHRANI *et al.*, 2003).

2.2.3 SÍNTESE DO 5-NITRO-2-FURALDEÍDO



(32)

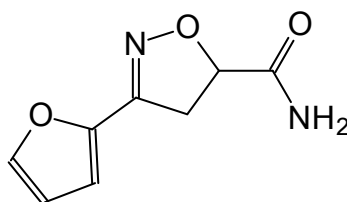
FIG. 2.2 Estrutura do 5-nitro-2-furaldeído

Em um balão de fundo redondo de 50 mL foram adicionados 0,8 mmol (200 mg) de 5-nitro-2-furaldeído diacetato, 8 mL de água destilada, 1 mL de ácido sulfúrico concentrado e 6 mL de etanol PA. O sistema foi mantido em refluxo a uma temperatura de aproximadamente 80°C por duas horas e meia (MILIC *et al.*, 1989).

Em seguida, foi realizada a extração do respectivo aldeído, pela adição de 10 mL de cloreto de metileno e 5 mL de água destilada em um funil de separação. Este procedimento foi repetido por três vezes. Posteriormente, a fase orgânica foi seca com sulfato de sódio, filtrada e o solvente evaporado no rotaevaporador.

2.2.4 SÍNTESE DOS DERIVADOS DE 4,5-DIIDRO-ISOXAZOL

2.2.4.1 SÍNTESE DE 3-FURIL-5-CARBOXILAMIDA-4,5-DIIDRO-ISOXAZOL



(33)

FIG 2.3 Estrutura do 3-furil-5-carboxilamida-4,5-diidro-isoxazol

2.2.4.1.1 SÍNTESE DA ALDOXIMA

Em um balão de fundo redondo de 100 mL foram dissolvidos 60 mmol de cloridrato de hidroxilamina ($\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$) em 4 mL de água destilada. Após, foram adicionados 20 mmol de furaldeído, previamente solubilizado em 40 mL de etanol. O sistema foi mantido sob agitação constante e temperatura de aproximadamente 27°C por 2 horas.

Em seguida, foi realizada a extração da fase orgânica com 20 mL de diclorometano e 10 mL de água destilada. O procedimento foi realizado três vezes. Logo após, a secagem da fase orgânica foi realizada com sulfato de sódio.

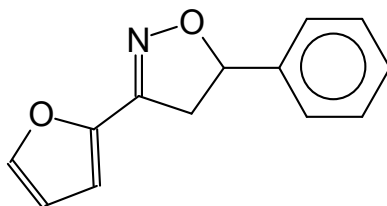
2.2.4.1.2 SÍNTESE DO CLORETO DE IMIDOÍLA

A aldoxima obtida foi resfriada a 15°C em banho de gelo. Após, foram adicionados 20 mmol de trietilamina (Et_3N) solubilizada em 10 mL de diclorometano e 10 mmol (2,32g) de ácido tricloro-isocianúrico (ATCI). O sistema ficou em banho de gelo por 15 minutos, após a remoção do banho de gelo, o meio foi mantido sob agitação e temperatura de 27°C por 1 hora. O ácido isocianúrico formado foi removido por filtração simples (RODRIGUES & AGUIAR, 2001).

2.2.4.1.3 REAÇÃO DE CICLO-ADIÇÃO

Em um balão de fundo redondo de 250 mL foram adicionados 30 mmol (2,13g) de acrilamida em 10 mL de diclorometano. Posteriormente, sob agitação, foram acrescentados 30 mmol de Et_3N em 10 mL de diclorometano e sob gotejamento 20 mmol do cloreto de imidoíla obtido. A reação foi mantida por 24 horas sob 27°C e agitação constante. O precipitado formado foi removido por filtração à vácuo e seco em temperatura ambiente.

2.2.4.2 SÍNTESE DO 3-FURIL-5-FENIL-4,5-DIIDRO-ISOXAZOL



(34)

FIG 2.4 Estrutura do 3-furil-5-fenil-4,5-diidro-isoxazol

A síntese da furaldoxima foi realizada utilizando 15 mmol (1,44g) de furaldeído e 45 mmol (4,17g) de $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$, os quais foram deixados por 2 horas em agitação a 27°C . A aldoxima formada foi tratada com 5 mmol (1,16g) de ATCI e 15 mmol (1,52g) de Et_3N por 3 horas sob agitação constante a temperatura ambiente.

Posteriormente, em um balão de fundo redondo de 250 mL foram adicionados 30 mmol (3,12g) de estireno com 10 mL de diclorometano. Sob agitação, foram acrescentados 30 mmol (3,04g) de trietilamina em 10 mL de diclorometano e sob gotejamento 20 mmol do cloreto de imidoíla obtido. A reação foi mantida por 44 horas sob agitação constante a 27°C .

Após esse tempo, o meio reacional foi lavado por três vezes utilizando, no total, 60 mL de água destilada a fim de se extrair a fase orgânica que foi seca com sulfato de sódio anidro. Obteve-se o indício de formação do heterociclo desejado através da análise por cromatografia em fase gasosa com o aparecimento de um pico em 16 minutos. O composto foi isolado através de cromatografia em coluna utilizando gradiente de concentração com os solventes hexano e acetato de etila.

2.2.4.3 SÍNTESE DO 3-(5-CLORO-2-FURIL)-5-ETILCARBOXILATO-4,5-DIIDRO-ISOXAZOL

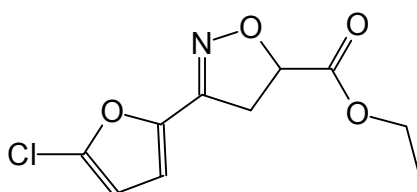
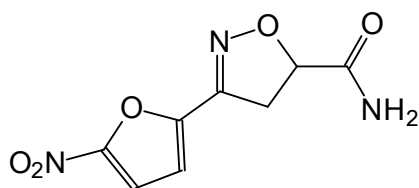


FIG. 2.5 Estrutura de 3-(5-cloro-2-furil)-5-etilcarboxilato-4,5-diidro-isoxazol (35)

Na síntese da furaldoxima foram utilizados 15 mmol (1,44g) de furaldeído e 45 mmol (3,12g) de $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$. Após 2 horas de reação, a aldoxima formada foi tratada com 15 mmol (1,52g) de Et_3N e 10 mmol (2,32g) de ATCI por 2 horas, sob agitação constante e temperatura ambiente. O cloreto de imidoíla formado foi gotejado a uma mistura de 20 mmol (2g) de acrilato de etila e 20 mmol (2,02g) de Et_3N solubilizados em 15 mL de diclorometano. A reação, monitorada por CG, permaneceu em agitação constante a temperatura ambiente por 48 horas. O produto formado foi isolado por cromatografia em coluna, em que se utilizou na fase móvel hexano e acetato de etila por gradiente de concentração.

2.2.4.4 SÍNTESE DO 3-(5-NITRO-2-FURIL)-5-CARBOXILAMIDA-4,5-DIIDRO-ISOXAZOL

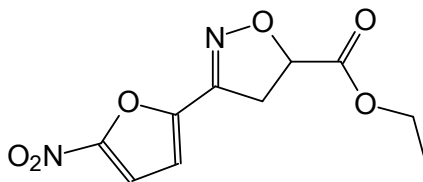


(36)

FIG 2.6 Estrutura do 3-(5-nitro-2-furil)-5-carboxilamida-4,5-diidro-isoxazol

Foram utilizados 20 mmol (2,82g) de 5-nitro-2-furaldeído e 60 mmol (4,17g) de $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ para a síntese da aldoxima, os quais foram deixados sob agitação e temperatura ambiente por 5 horas. Foram adicionados 20 mmol (2,02g) de Et_3N e 10 mmol (2,32g) de ATCI à aldoxima formada. A reação permaneceu sob agitação e temperatura ambiente por 2 horas. O cloreto de imidoíla formado foi gotejado a uma mistura de 30 mmol (2,13g) de acrilamida e 30 mmol (3,03g) de Et_3N solubilizados em 20 mL de diclorometano. A reação durou 24 horas a temperatura ambiente e sob agitação. Após, o precipitado formado foi filtrado a vácuo e seco em temperatura ambiente.

2.2.4.5 SÍNTESE DO 3-(5-NITRO-2-FURIL)-5-ETILCARBOXILATO-4,5-DIIDRO-ISOXAZOL



(37)

FIG 2.7 Estrutura do 3-(5-nitro-2-furil)-5-etilcarboxilato-4,5-diidro-isoxazol

A 5-nitro-2-furaldoxima foi sintetizada a partir de 15 mmol (2,12g) de 5-nitro-2-furaldeído e 45 mmol (3,12g) de $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$, os quais foram deixados em temperatura ambiente e agitação constante por 5 horas. A aldoxima formada reagiu com 15 mmol (1,52g) de Et_3N e 10 mmol (2,32g) de ATCI por 2 horas sob agitação constante e temperatura ambiente. Após, o cloreto de imidoíla formado foi gotejado a uma mistura de 20 mmol (2,0g) de acrilato de etila e 20 mmol (2,02g) de Et_3N solubilizado em 15 mL de diclorometano. A reação permaneceu em agitação constante a temperatura ambiente por 42 horas. A reação foi acompanhada por CG, sendo constatado o aparecimento de um novo pico, próximo de 17,14 minutos, sugerindo ser o pico do composto formado. O produto formado foi isolado por cromatografia em coluna, em que se utilizou na fase móvel hexano e acetato de etila por gradiente de concentração.

2.3 ENSAIO MICROBIOLÓGICO DOS DERIVADOS DE 4,5-DIIDRO-ISOXAZÓIS

Os ensaios microbiológicos foram realizados por microdiluição em caldo frente as cepas padrão de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e *Escherichia coli* (ATCC 25922), de acordo com a Norma M7-A6 Vol.23 N° 2 2003 desenvolvida pelo NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS).

2.3.1 MATERIAIS

2.3.1.1 MICRORGANISMOS

TAB. 2.5 Relação de microrganismos utilizados no ensaio biológico

MICRORGANISMOS	GRAM	CEPA
<i>Escherichia coli</i>	-	ATCC 25922
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	ATCC 27853
<i>Enterococcus faecalis</i>	+	ATCC 29212
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	ATCC 25923

2.3.2 METODOLOGIA DOS ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS

Foram realizadas três repetições dos testes biológicos para garantir a confiabilidade dos resultados. Em cada teste, os compostos foram testados em duplicata e foram empregados 3 métodos diferente de controle de qualidade:

- **Controle positivo:** adotado a fim de se averiguar a viabilidade dos microrganismos testados.
- **Controle negativo:** foi utilizado um antibiótico comercial, amoxicilina, de ação conhecida e amplo espectro.
- **Controle de esterilidade:** adotado para verificar a esterilidade do meio de cultura.

Apresenta-se na figura abaixo (FIG. 2.8) o procedimento geral utilizado nos ensaios microbiológicos.

	µg/mL	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	256												
B	128												
C	64												
D	32												
E	16												
F	8												
G	4												
H	2												

- 1 ao 8 → meio de cultura (100 µL) + amostra + inóculo (5µL)
 09 → meio de cultura (100 µL) + sol. de DMSO 10% + inóculo (5µL)
 10 → controle negativo – meio de cultura (100µL) + antibiótico + inóculo (5 µL)
 11 → controle positivo – meio de cultura (100 µL) + inóculo (5µL)
 12 → controle de esterilidade – meio de cultura (100 µL)

FIG. 2.8 Esquema ilustrativo da microplaca

2.3.2.1 PREPARO DO MEIO DE CULTURA

O caldo Müller-Hinton, utilizado como meio de cultura para o crescimento dos microrganismos, foi preparado segundo as especificações do fabricante. Utilizaram-se 21g do meio para 1000 mL de água destilada. Após, este e os demais materiais foram submetidos à esterilização por calor úmido. Utilizou-se autoclave, operando a 121°C por 20 minutos.

2.3.2.2 PREPARO DO INÓCULO

Inicialmente, uma alíquota da bactéria preservada em glicerol foi retirada, com o auxílio da alça de inoculação, e transferida para um tubo de ensaio contendo 5 mL de meio

de cultura previamente esterilizado (tubo I). Posteriormente, incubou-se a cultura à 37°C por 20 horas. Decorrido o tempo, inoculou-se 100 µL da suspensão bacteriana em 10 mL de meio esterilizado (tubo II) e incubou-se por 4 horas a 37°C.

Após, transferiu-se 1 mL do meio com a bactéria crescida para um tubo de ensaio e acrescentou-se 1 mL de formol 10% para realizar a medição da absorbância no espectrofotômetro (625 nm). Em seguida, ajustou-se a concentração inicial da suspensão bacteriana (tubo II) até a concentração ideal 10^7 UFC/mL (FIG. 2.9).

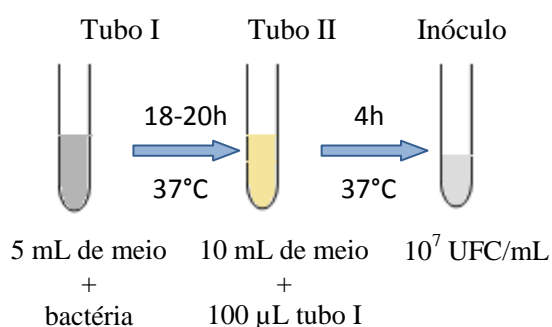


FIG. 2.9 Procedimento para o preparo do inóculo

2.3.2.3 PREPARO DAS SOLUÇÕES-MÃE DOS COMPOSTOS A SEREM TESTADOS

Para cada derivado de 4,5-diidro-isoxazol, preparam-se 5 mL de uma solução com concentração equivalente a 512 µg/mL. Adicionaram-se 2,5 mg do composto, 0,5 mL de DMSO e 4,5 mL de água salina previamente esterilizada. O mesmo foi feito para a amoxicilina, utilizada como antibiótico padrão. Na solução de DMSO 10%, utilizaram-se 0,5 mL de DMSO para 4,5 mL de água salina.

2.3.2.4 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

Inicialmente foram realizados testes de microdiluição com todos os compostos sintetizados em diluição seriada com concentração máxima de 256 µg/mL e mínima de 2 µg/mL, conforme a FIG. 2.7 mostrada na seção 2.3.2, a fim de investigar o seu comportamento frente a uma suspensão bacteriana de 5×10^4 UFC/poço. Após o preenchimento das microplacas, estas foram colocadas na estufa a 37°C *overnight*. Depois do tempo de incubação, foi realizada a leitura das placas no espectrofotômetro a 625 nm. Os compostos que apresentaram resposta a uma concentração menor ou igual a 128 µg/mL foram selecionados para um teste de microdiluição com concentrações inseridas no “ponto de corte” do teste preliminar. Considera-se como “ponto de corte” o intervalo entre a maior concentração em que foi observado crescimento bacteriano e a menor concentração em que não houve crescimento bacteriano.

Os testes de determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foram conduzidos a partir dos derivados isoxazolínicos que apresentaram resposta nos teste de triagem. A CIM foi determinada utilizando o procedimento supramencionado, entretanto em concentrações diferentes para cada composto.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho foi investigada a formação de óxidos de nitrila derivados do furaldeído e do 5-nitro-2-furaldeído. Os derivados isoxazolínicos propostos foram sintetizados a partir da metodologia desenvolvida por RODRIGUES (2001). Todos os compostos sintetizados tiveram sua bioatividade investigada frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

3.1 SÍNTESE DO 5-NITRO-2-FURALDEÍDO

O 5-nitro-2-furaldeído (32) foi sintetizado a partir do furaldeído previamente purificado. Este tratado com uma mistura sulfonítrica em presença de anidrido acético originou o intermediário 5-nitro-2-furaldeído diacetato (31) que foi purificado através de uma recristalização com etanol, obtendo 25% de rendimento (GILLER *et al.*, 1977; TEHRANI *et al.*, 2003).

Após a purificação do composto foi realizada cromatografia em fase gasosa a fim de verificar o tempo de retenção do composto para posterior comparação com o produto final (FIG. 3.1).

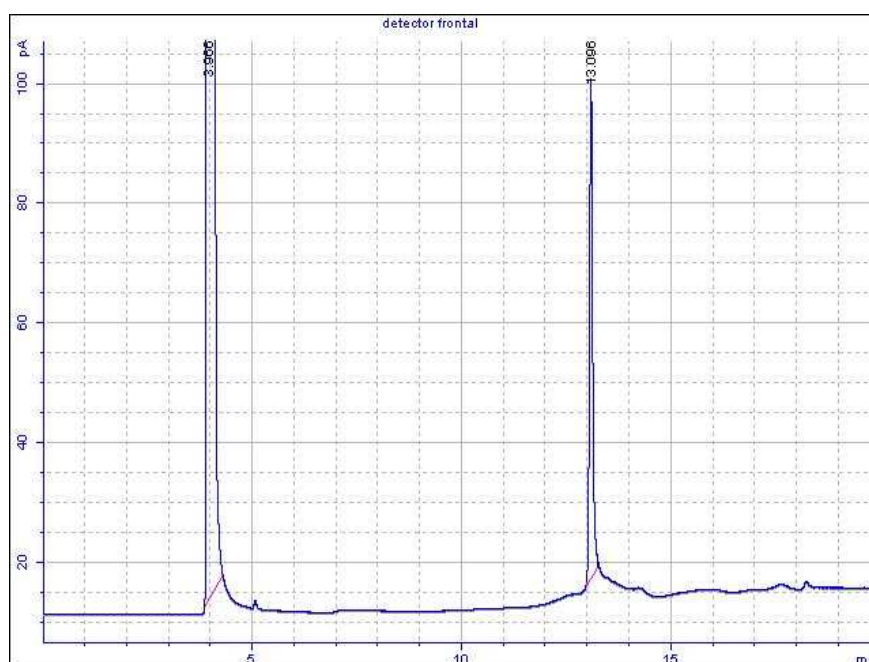


FIG. 3.1 Cromatograma do 5-nitro-2-furaldeído diacetato

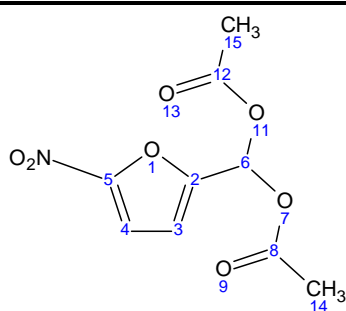
Para a caracterização do composto, inicialmente, foi realizado o ponto de fusão, que apresentou valor semelhante ao da literatura, correspondente a $pf = 90 - 92\text{ }^{\circ}\text{C}$ (TEHRANI *et al.*, 2003). Posteriormente, foi empregada a técnica de IV com a finalidade de caracterizar os principais grupos funcionais (TAB. 3.1; APÊNDICE, FIG. 7.1, página 99). A absorção observada em 1759 cm^{-1} foi atribuída a ligação C=O referente ao grupo éster e em 1541 e 1357 cm^{-1} referente a grupamento NO_2 indicando, possivelmente, a formação do diacetato e a nitração do anel furânico.

TAB. 3.1 Principais absorções na região do IV do composto 31

ABSORÇÃO (cm^{-1})	ATRIBUIÇÃO
1759	Deformação axial de C=O
1541 e 1357	Deformação axial de NO_2

Em seguida, foi realizada a análise por RMN ^{13}C . Os deslocamentos químicos em 152,3; 82,5 e 168,1 ppm foram atribuídos aos carbonos C-5, C-6 e C-8/C-12, que caracterizam a nitração do anel furânico e a formação do diacetato (TAB. 3.2; APÊNDICE, FIG. 7.2, página 100).

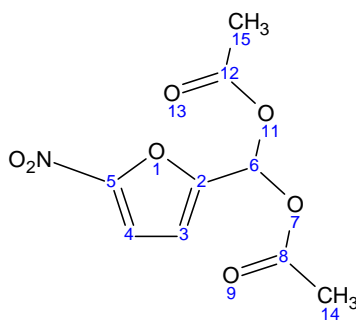
TAB. 3.2 Deslocamentos Químicos (δ) dos carbonos do composto 31



CARBONO	δ	MULTIPLICIDADE
C-2	150,4	C
C-3	111,5	CH
C-4	112,3	CH
C-5	152,3	C
C-6	82,5	CH
C-8; C-12	168,1	C
C-14; C-15	20,6	CH_3

Na análise do RMN de ^1H (TAB. 3.3; APÊNDICE, FIG.7.3, página 101) foi possível observar a presença de um simpleto em δ 2,17 referente aos hidrogênios H-14/H-15 e dupletos referentes ao H-3 e H-4 com deslocamentos químicos δ 6,73 e 7,28, respectivamente (TEHRANI *et al.*, 2003).

TAB. 3.3 Deslocamentos químicos (δ) dos hidrogênios do composto 31



H	MULTIPLICIDADE	δ	INTEGRAÇÃO	J (Hz)
H-3	d	6,73	1H	$^3J_{\text{H3-H4}} = 3,8$
H-4	d	7,28	1H	$^3J_{\text{H4-H3}} = 3,8$
H-6	s	7,70	1H	-
H-14/H-15	s	2,17	6H	-

d = duplete; s = simpleto

Com a obtenção do intermediário foi realizada uma hidrólise ácida formando o 5-nitro-2-furaldeído com 64% de rendimento (MILIC *et al.*, 1989). A reação foi monitorada por cromatografia gasosa, observando o aparecimento de um pico com tempo de retenção de 8,7 minutos e o desaparecimento do pico correspondente ao material de partida (FIG. 3.2).

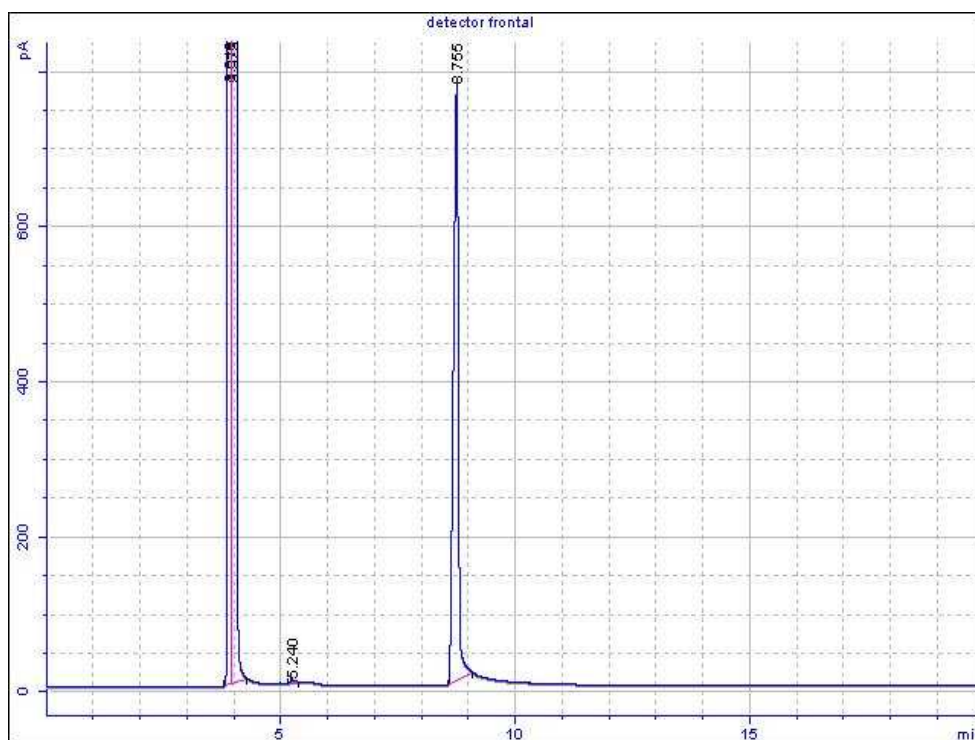


FIG. 3.2 Cromatograma do 5-nitro-2-furaldeído

O aldeído formado foi caracterizado por IV (APÊNDICE, FIG. 7.4, página 102). Na TAB. 3.4 são reportadas as principais bandas onde se destaca a absorção em 1689 cm^{-1} atribuída à deformação axial C=O do aldeído formado (SILVERSTEIN *et al.*, 2007).

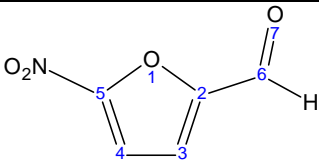
TAB. 3.4 Principais absorções na região do IV do composto 32

ABSORÇÃO (cm^{-1})	ATRIBUIÇÃO
1689	Deformação axial de C=O
1579 e 1348	Deformação axial NO ₂
2873 e 2843	Deformação axial CH

Na caracterização por RMN ^{13}C os deslocamentos δ 178,3 e 150,9 foram atribuídos aos carbonos C-6 e C-5, respectivamente (TAB. 3.5; APÊNDICE, FIG. 7.5, página 103). Tais deslocamentos mostram a formação do grupamento aldeído e a nitração do anel.

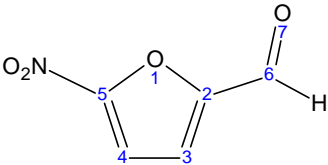
O espectro de RMN ^1H (APÊNDICE, FIG. 7.6, página 104) para o composto 32 apresentou o simpleto em δ 9,83 referente ao hidrogênio H-6. O valor observado caracteriza a formação do aldeído (SILVERSTEIN *et al.*, 2007).

TAB. 3.5 Deslocamentos Químicos (δ) dos carbonos do composto 32



CARBONO	δ	MULTIPLICIDADE
C-2	118,7	C
C-3;C-4	111,7	CH
C-5	150,9	C
C-6	178,3	C

TAB. 3.6 Deslocamentos químicos (δ) dos hidrogênios do composto 32



H	MULTIPLICIDADE	δ	INTEGRAÇÃO	J (Hz)
H-3	d	7,36	1H	$^3J_{H3-H4} = 3,8$
H-4	d	7,42	1H	$^3J_{H4-H3} = 3,8$
H-6	s	9,83	1H	-

d = duplete; s = simpleto

3.2 SÍNTESE DOS DERIVADOS DE 4,5-DIIDRO-ISOXAZOL-3,5-DISSUBSTITUIDOS

3.2.1 SÍNTESE DO ÓXIDO DE NITRILA

A síntese do dipolo foi iniciada com a obtenção da aldoxima a partir do respectivo aldeído tratado com uma solução de cloridrato de hidroxilamina. O mecanismo da reação encontra-se na figura abaixo (FIG. 3.3).

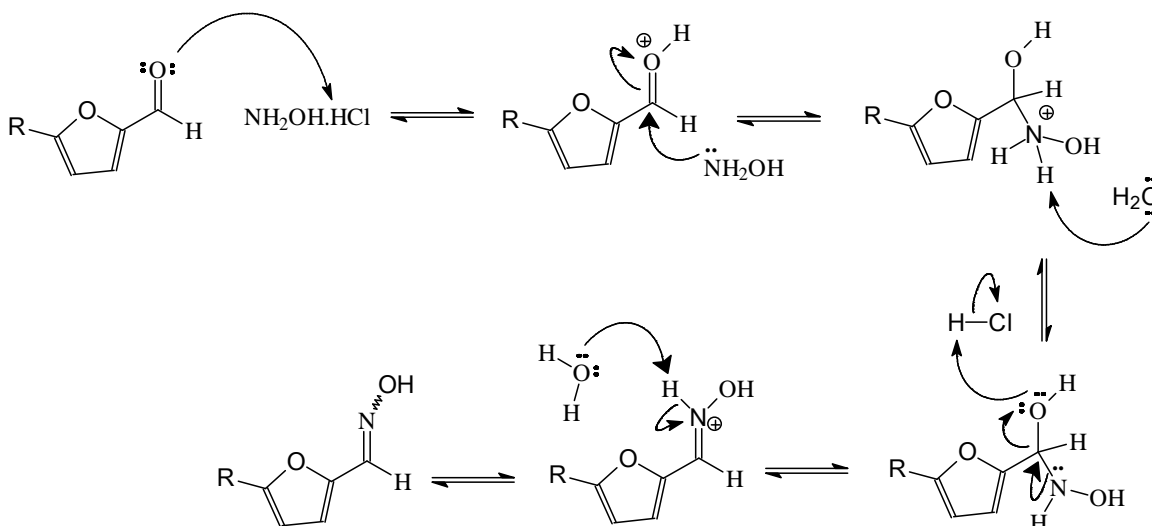


FIG. 3.3 Proposta de intermediários da reação de formação da aldoxima

As primeiras reações empregaram como material de partida o furaldeído. A reação foi monitorada por cromatografia em fase gasosa (CG). O desaparecimento do aldeído de partida em sua quase totalidade ocorreu por volta de 2 horas de reação (FIG. 3.4).

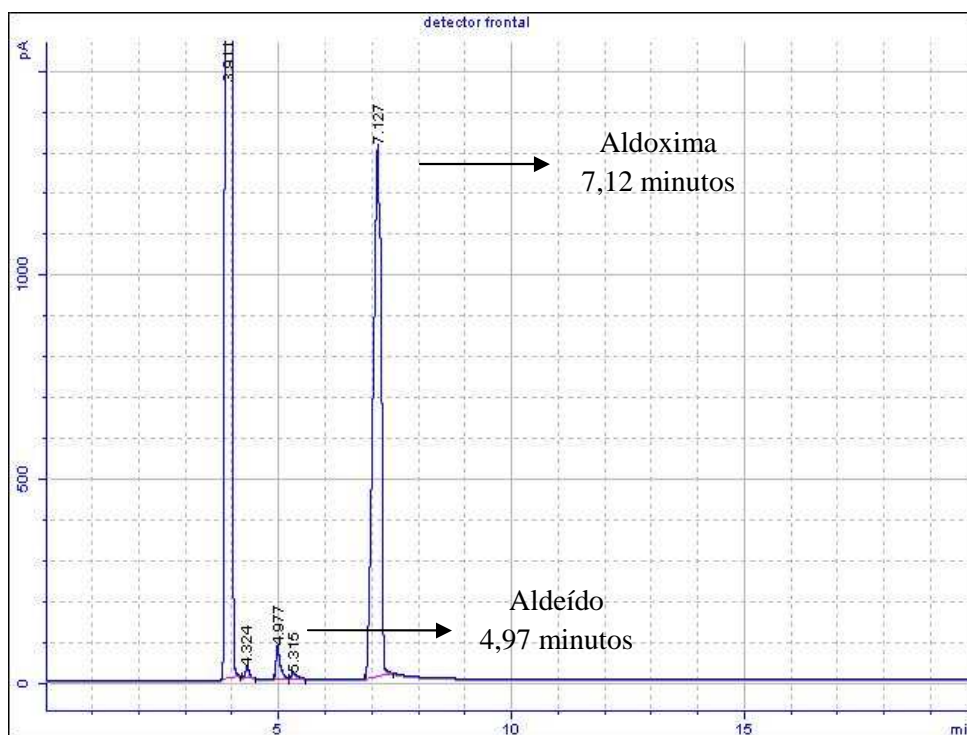


FIG. 3.4 Cromatograma da furaldoxima

Já o monitoramento das reações utilizando o 5-nitro-2-furaldeído como material de partida mostrou a necessidade de um maior tempo reacional, aproximadamente 5 horas (FIG. 3.5).

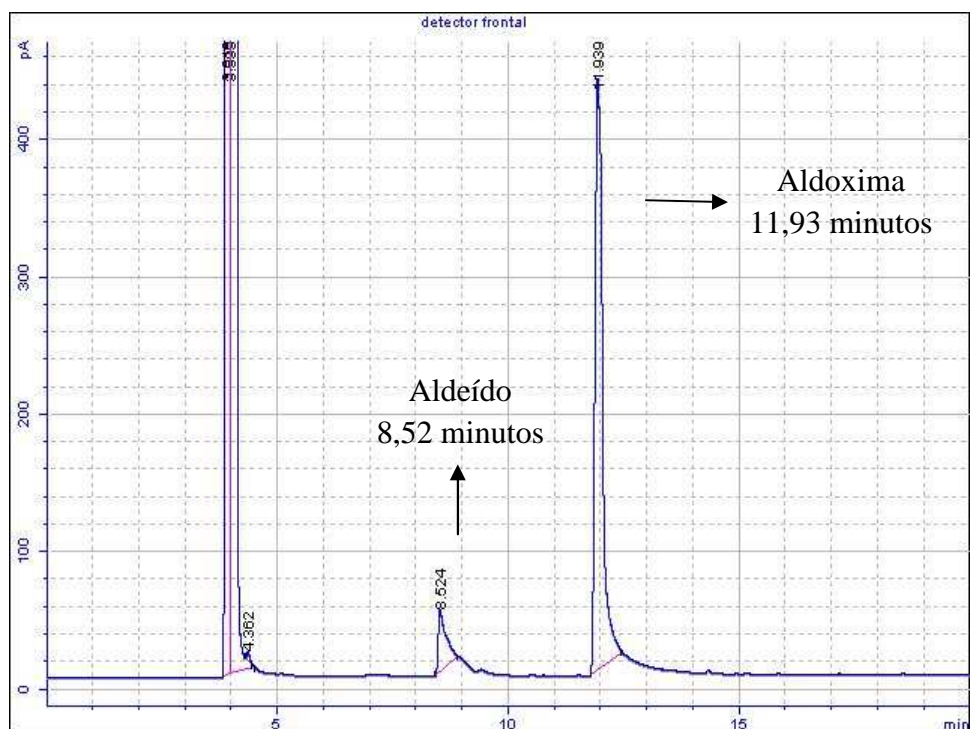
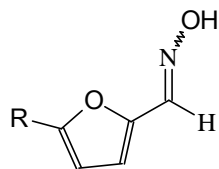


FIG. 3.5 Cromatograma da 5-nitro-2-furaldoxima

A tabela a seguir mostra os resultados estimados por CG, através da razão entre as áreas da aldoxima (ADX) / aldeído (ALD), empregando os diferentes aldeídos (TAB. 3.7).

TAB. 3.7 Estimativa de conversão de aldoxima



R	ÁREA ADX/ALD (%)
NO ₂	9,65
H	29,38

Com a análise do CG pode-se observar a formação de apenas um produto, o que mostra a alta seletividade da reação. Possivelmente, a formação desse único produto se deve ao fato da aldoxima formar um anel estável de 6 membros devido a ligações de hidrogênio intramoleculares, formando uma estrutura bastante estável (FIG. 3.6).

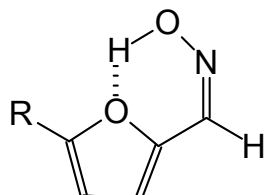


FIG. 3.6 Possível aldoxima formada a partir do respectivo aldeído

Posteriormente, a aldoxima foi halogenada empregando-se o ácido tricloroisocianúrico (ATCI) em presença de trietilamina (RODRIGUES & AGUIAR, 2001). Através do monitoramento por CG foi possível evidenciar a diminuição do pico com tempo de retenção referente ao material de partida em um período de 1 hora (furaldeído) e 2 horas (5-nitro-2-furaldeído). O mecanismo de reação para a formação deste produto encontra-se na FIG. 3.7.

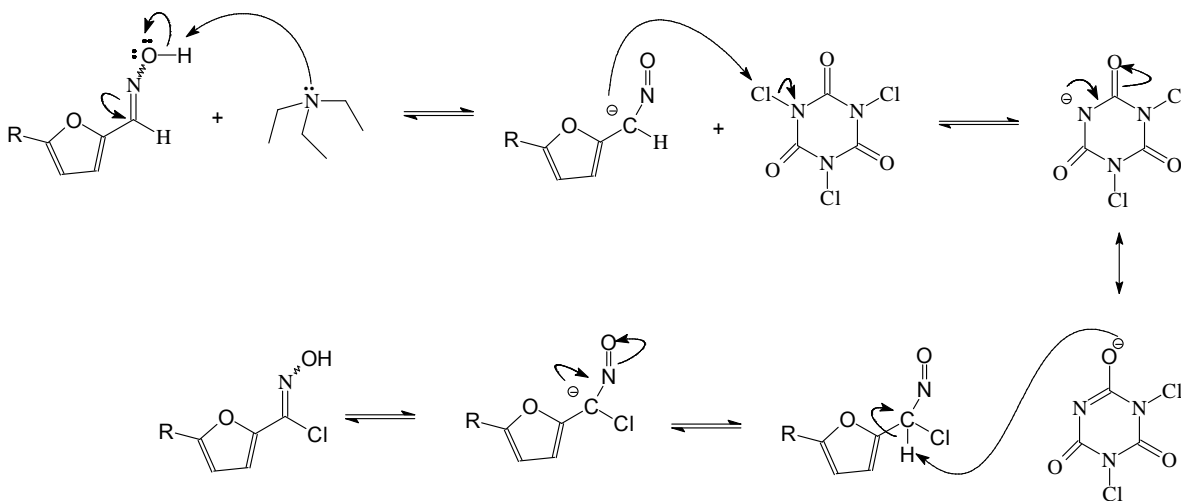


FIG. 3.7 Proposta de intermediários da reação de formação do cloreto de imidoíla.

O óxido de nitrila foi gerado *in situ* a partir da desidroalogenação do cloreto de imidoíla em presença de trietilamina. Com a finalidade de diminuir a possibilidade de

dimerização do óxido de nitrila (FIG. 1.7), ele foi gerado na presença do dipolarófilo em excesso.

3.2.2 REAÇÃO DE CICLO-ADIÇÃO

3.2.2.1 SÍNTESE DE 3-FURIL-5-CARBOXILAMIDA-4,5-DIIDRO-ISOXAZOL

A reação de ciclo-adição entre o óxido de nitrila e a acrilamida foi conduzida por um período de 24 horas. A separação foi conduzida por filtração a vácuo, uma vez que o produto formado apresentou-se insolúvel no meio reacional. Foram obtidos 1,09g (30%) de produto sólido amarelo-escuro com ponto de fusão entre 195 – 198 °C.

A caracterização foi inicialmente conduzida pela análise de IV (APÊNDICE, FIG. 7.7, página 105), na TAB 3.8 estão expostas as principais bandas encontradas no produto formado. A absorção de pouca intensidade observada em 1602 cm^{-1} foi atribuída à deformação axial de ligação C=N indicando, possivelmente, a formação do anel isoxazolínico (RODRIGUES & AGUIAR, 2001).

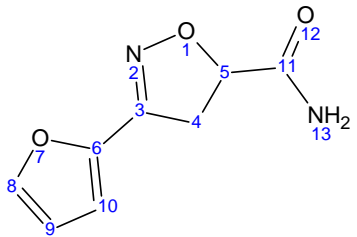
TAB. 3.8 Principais absorções na região do IV do composto 33

ABSORÇÃO (cm^{-1})	ATRIBUIÇÃO
1653	Deformação axial de C=O
1602	Deformação axial de C=N
3421 e 3280	Deformação axial N-H

Através da análise de RMN ^{13}C (APÊNDICE, FIG. 7.8, página 106) foram obtidos os deslocamentos químicos dos carbonos apresentados na TAB. 3.9.

A caracterização do heterociclo foi feita a partir dos seguintes deslocamentos químicos 148,2, 38,4 e 78,3 ppm associados a C-3, C-4 e C-5, respectivamente (RODRIGUES & AGUIAR, 2001; PIRRUNG, 2002).

TAB. 3.9 Deslocamentos Químicos (δ) dos carbonos do composto 33



CARBONO	δ	MULTIPLICIDADE
C-3	148,2	C
C-4	38,4	CH ₂
C-5	78,3	CH
C-6	143,6	C
C-8	145,5	CH
C-9	111,9	CH
C-10	113,8	CH
C-11	171,7	C

A reação de ciclo-adição 1,3-dipolar envolve um processo concertado e regioselectivo governado por uma relação entre os diferentes orbitais HOMO e LUMO (GOTHELF & JORGENSEN, 1998; NAIR & SUJA, 2007). De modo a estabelecer a regioquímica pertinente ao produto sintetizado, foi empregada a técnica APT (*Attached Proton test*), visto que o produto de ciclo-adição poderia assumir duas regioquímicas distintas (A e B), com apresentado na FIG. 3.8.

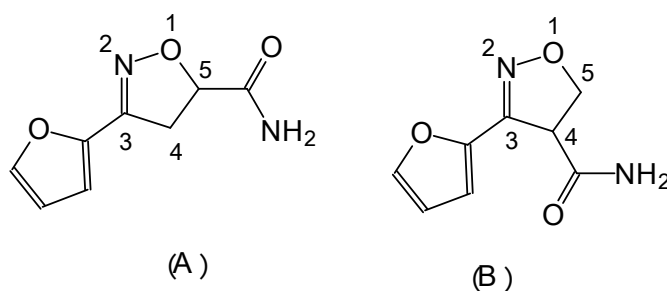


FIG 3.8 Possíveis regioisômeros formados pela reação de ciclo-adição 1,3-dipolar

Analisando as estruturas A e B, pode-se verificar que a multiplicidade dos carbonos C-4 e C-5 são diferentes, ou seja, na estrutura A o carbono C-4 trata-se de um metileno e C-5 de um metino, já a estrutura B apresenta o inverso.

Analisando os dados da TAB. 3.9 foram observados os deslocamentos químicos em δ 38,4 e 78,3 com multiplicidade de um metileno e um metino, respectivamente. O sinal δ 78,3 foi atribuído ao carbono C-5 da estrutura A por ser o mais desblindado que o C-4, sugerindo uma ligação com um átomo mais eletronegativo, no caso o oxigênio. O δ 148,2 foi atribuído ao carbono quaternário C-3, por ser um carbono sp^2 ligado a um elemento eletronegativo, o nitrogênio. Com base nos resultados conclui-se que a regioquímica do composto 33 era análoga a estrutura A da FIG. 3.8. O sinal mais desblindado δ 171,7 foi atribuído ao carbono quaternário C-11, referente à carbonila do grupamento amida.

Os metinos relacionados ao sistema aromático foram assinalados de acordo com os resultados reportados na TAB. 3.9. O δ 145,5 foi associado ao C-8, uma vez que este se encontra ligado a o átomo de oxigênio do anel furânico. Os assinalamentos dos metinos pertinentes aos carbonos C-9 e C-10 do sistema aromático podem ser justificados através das formas de ressonância do anel. O sinal δ 113,8 foi atribuído ao C-10, pois este se encontra na região de deficiência eletrônica (FIG. 3.9).

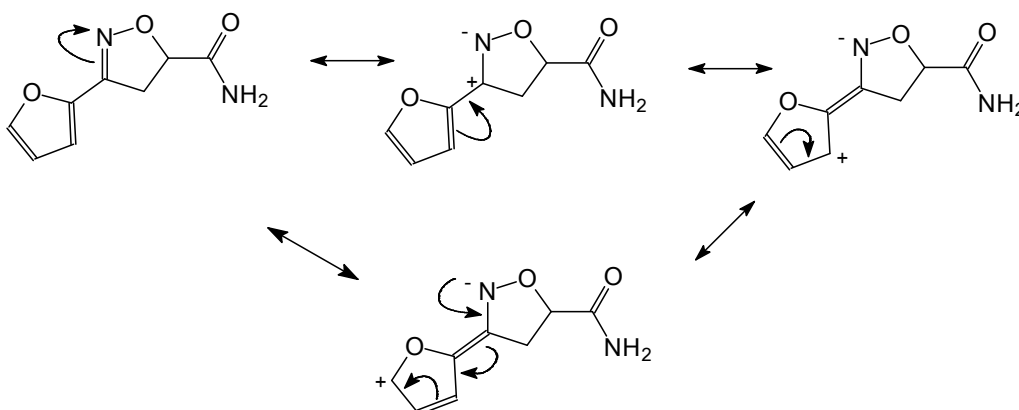


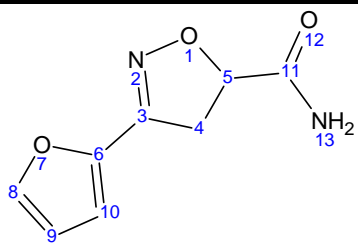
FIG 3.9 Formas de ressonância do composto 33

Em continuidade ao processo de caracterização, foi realizada a análise por RMN 1H que objetivou o assinalamento de todos os hidrogênios presentes (TAB 3.10).

Os duplos-dupletos (dd) relativos aos hidrogênios H-4a, H-4b e H-5 são característicos do anel heterocíclico (TAB 3.10). O H-4a, com deslocamento químico de δ 3,43, apresentou uma constante de acoplamento (J) de 17,0 Hz e 11,4 Hz. O primeiro valor corresponde ao acoplamento com o próton geminal H-4b e o segundo se refere ao

acoplamento com H-5. Já H-4b com deslocamento de δ 3,57, apresentou uma constante de acoplamento de 17,0 Hz e 6,4 Hz. Isso mostra que o H-4b também acopla com o H-5 e que o ângulo desses dois prótons era diferente do caso anterior (H-4a – H-5), logo os prótons H-4a e H-4b ocupam ambientes diferentes (SILVERSTEIN *et al.*, 2007) .

TAB. 3.10 Deslocamentos químicos (δ) dos hidrogênios do composto 33



H	MULTIPLICIDADE	δ	INTEGRAÇÃO	J (Hz)
H-4a	dd	3,57	1H	${}^2J_{\text{H4a-H4b}}=17,0$; ${}^3J_{\text{H4a-H5}}=11,4$
H-4b	dd	3,43	1H	${}^2J_{\text{H4b-H4a}}=17,0$; ${}^3J_{\text{H4b-H5}}=6,4$
H-5	dd	5,00	1H	${}^3J_{\text{H5-H4a}}=11,4$; ${}^3J_{\text{H5-H4b}}=6,4$
H-8	d	7,86	1H	${}^3J_{\text{H8-H9}}=1,8$
H-9	dd	6,65	1H	${}^3J_{\text{H9-H10}}=3,4$; ${}^3J_{\text{H9-H8}}=1,8$
H-10	d	6,96	1H	${}^3J_{\text{H10-H9}}=3,4$
H-13a	s	7,41	1H	-
H-13b	s	7,62	1H	-

dd = duplo-duplete; d = duplete; s = simpleto

Finalizando a caracterização do composto 33 foi realizada a análise elementar de C, H e N, no qual o resultado experimental foi obtido a partir da média da triplicata realizada (TAB 3.11). Porém, não foi possível realizar a EM devido a difícil solubilização da substância em solvente apropriado.

TAB. 3.11 Análise elementar de CHN do composto 33

Valor	C (% m/m)	H (% m/m)	N (% m/m)
Experimental	52,4($\pm 0,1$)	4,4	15,5
Calculado	53,3	4,4	15,5
Δ^a	0,9	0,0	0,0

^a Variação entre o valor calculado e o experimental

3.2.2.2 SÍNTESE DE 3-FURIL-5-FENIL-4,5-DIIDRO-ISOXAZOL

A formação do composto 34 foi observada através da análise por CG, através da formação de um pico comum tempo de retenção de 16 minutos (FIG. 3.10). O composto obtido foi isolado empregando a cromatografia em coluna, sendo utilizados como eluentes hexano e acetato de etila na proporção de 5:1, respectivamente. Ao final, obteve-se 0,560g (2,6 mmol) de um sólido marrom-escuro, com o ponto de fusão entre 75-79 °C, correspondente a um rendimento de 17%.

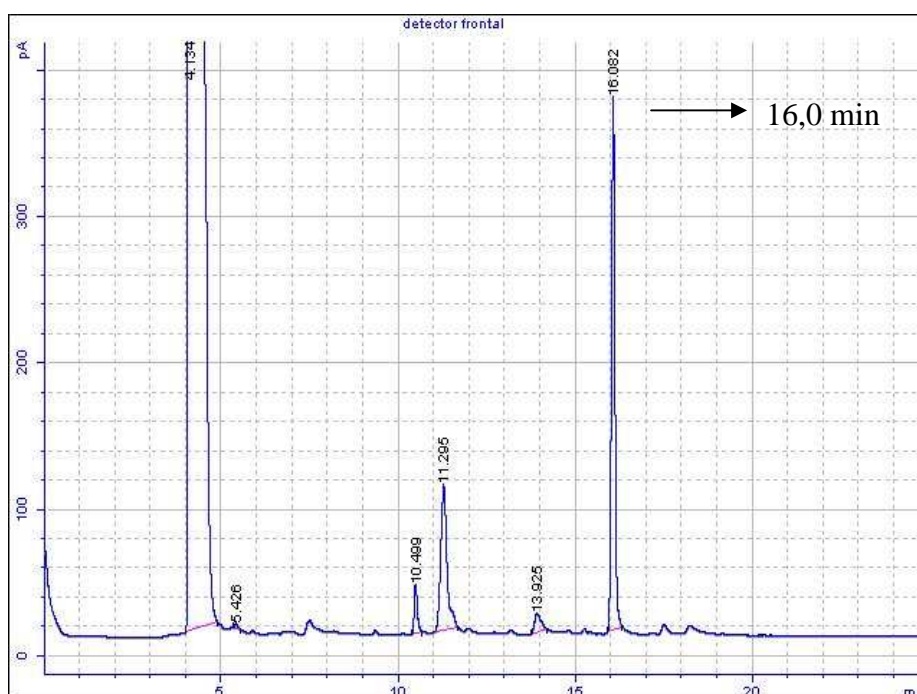


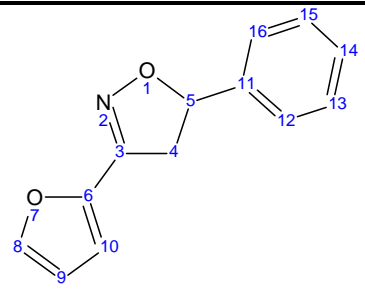
FIG. 3.10 Cromatograma da reação de ciclo-adição do composto 34

A caracterização do composto foi realizada, inicialmente, por IV (APÊNDICE, FIG. 7.12, página 110). Observou-se em 1483 cm^{-1} uma absorção atribuída à deformação axial da ligação C=N, evidenciando a formação do anel isoxazolínico, e em 763 e 700 cm^{-1} absorções atribuídas à deformação fora do plano de aromáticos monossustituídos.

Em continuidade ao processo de caracterização do produto obtido, foram conduzidas as análises de RMN ^{13}C e RMN ^1H .

A caracterização do heterociclo foi feita a partir dos carbonos característicos do anel, C-3, C-4 e C-5 em δ 148,4, 42,9 e 82,3, respectivamente. A TAB. 3.12 apresenta todos os assinalamentos observados.

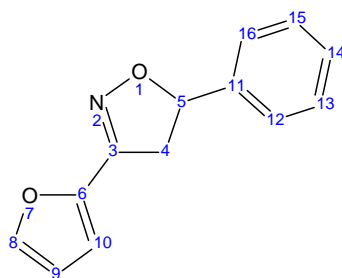
TAB 3.12 Deslocamentos Químicos (δ) dos carbonos do composto 34



CARBONO	δ	MULTIPLICIDADE
C-3	148,4	C
C-4	42,9	CH ₂
C-5	82,3	CH
C-6	144,8	C
C-8	144,9	CH
C-9	111,7	CH
C-10	111,9	CH
C-11	140,4	C
C-12/C-16	128,8	CH
C-13/C-15	128,3	CH
C-14	125,9	CH

Através da análise de RMN ¹H foi possível constatar dois duplos dupletos em δ 3,29 (²J_{H4a - H4b} = 16,7; ³J_{H4a - H5} = 10,9) e 3,73 (²J_{H4b - H4a} = 16,7; ³J_{H4b - H5} = 8,2) e um duplete em δ 5,69 (³J_{H5 - H4a} = 10,9; ³J_{H5 - H4b} = 8,2) referentes aos hidrogênios isoxazolínicos H-4a, H-4b e H-5, respectivamente (TAB. 3.13. APÊNDICE, FIG. 7.14. página 112).

TAB 3.13 Deslocamentos químicos (δ) dos hidrogênios do composto 34



H	MULTIPLICIDADE	δ	INTEGRAÇÃO	J (Hz)
H-4a	dd	3,29	1H	${}^2J_{H4a-H4b}=16,7$; ${}^3J_{H4a-H5}=10,9$
H-4b	dd	3,73	1H	${}^2J_{H4b-H4a}=16,7$; ${}^3J_{H4b-H5}=8,2$
H-5	dd	5,69	1H	${}^3J_{H5-H4a}=10,9$; ${}^3J_{H5-H4b}=8,2$
H-8	d	7,51	1H	${}^3J_{H8-H9}=1,8$
H-9	dd	6,48	1H	${}^3J_{H9-H10}=3,4$; ${}^3J_{H9-H8}=1,8$
H-10	d	6,72	1H	${}^3J_{H10-H9}=3,4$

dd = duplo-dupletto; d = dupletto; s = simpleto

A análise elementar foi obtida a fim de se verificar o grau de pureza do material obtido, sendo o valor experimental obtido pela média das duplicatas realizadas (TAB. 3.14).

TAB. 3.14 Análise elementar de CHN do composto 34

Valor	C (% m/m)	H (% m/m)	N (% m/m)
Experimental	72,3(\pm 0,2)	5,2	7,2
Calculado	73,2	5,2	6,6
Δ^a	0,9	0,0	0,6

^a Variação entre o valor calculado e o experimental

Concluindo a caracterização do composto 34, foi realizada a EM (APÊNDICE, FIG.7.16, página 114), onde foi detectado um íon molecular (M^+) igual a 213 que foi compatível com o valor esperado. O pico base apresentou m/z igual a 104 que se refere ao fragmento apresentado na FIG. 3.11.

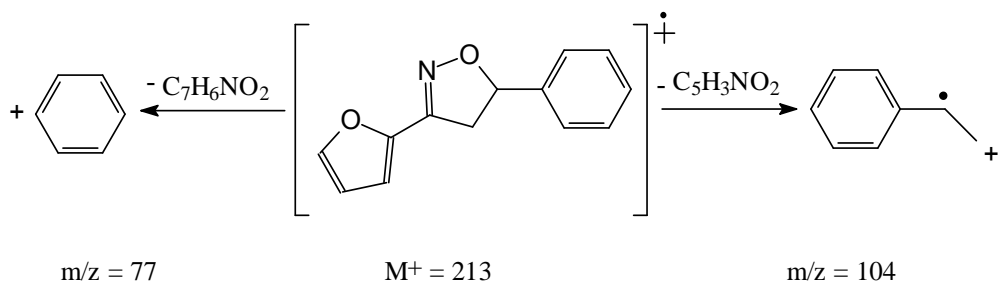


FIG.3.11 Fragmentos sugeridos para o composto 34

O composto (34) foi sintetizado tendo como objetivo comparar sua bioatividade frente a cepa de *Staphylococcus aureus* com o resultado observado por VICENTINO (2008), a qual utilizou um heterociclo análogo contendo o radical 4-piridila em substituição a fenila na posição C-5 (VICENTINO, 2008).

3.2.2.3 SÍNTESE DO 3-(5-CLORO-2-FURIL)-5-ETILCARBOXILATO-4,5-DIIDRO-ISOXAZOL

A etapa de ciclo-adição para a síntese foi conduzida por 48 horas a temperatura ambiente. De acordo com o cromatograma da FIG. 3.12, verificou-se o aparecimento de um novo pico em 14,7 min. O composto foi isolado por cromatografia em coluna, utilizando como eluentes hexano e acetato de etila em gradiente de polaridade. Por fim, obteve-se um sólido branco com 15 % de rendimento, com ponto de fusão entre 69-71 °C.

Após, a purificação do produto foram realizadas as caracterizações de IV, RMN ^{13}C e ^1H , CG-MS e CHN. Os resultados obtidos mostraram que o composto formado sofreu uma cloração no anel furânico, substituinte da posição 3 do heterociclo.

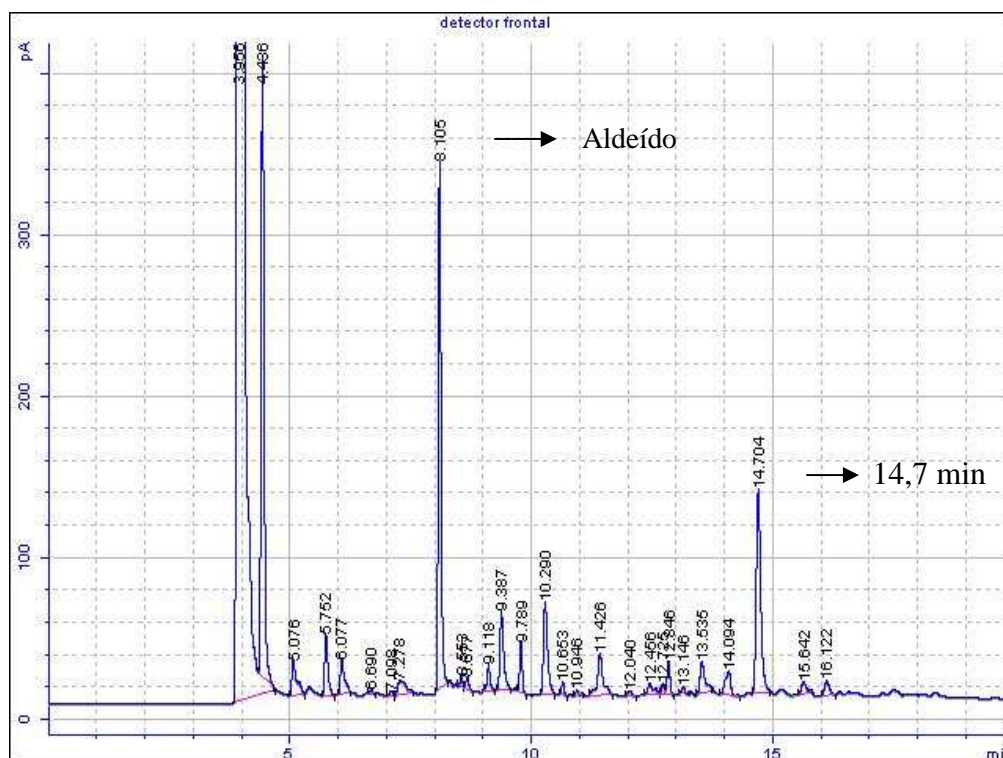


FIG. 3.12 Cromatograma da reação de ciclo-adição do composto 35

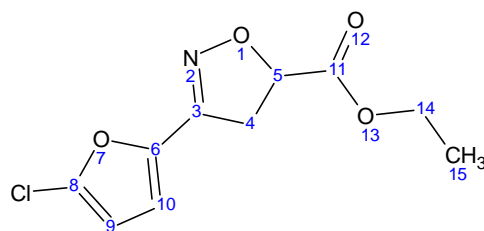
Na caracterização por IV (APÊNDICE, FIG. 7.17, página 115), observou-se a absorção referente à ligação C=N do anel heterociclo em 1612 cm^{-1} , em 1745 cm^{-1} a deformação axial de C=O referente a banda de éster e uma absorção em 1016 cm^{-1} que foi atribuída a deformação axial de C-Cl. As demais absorções características do composto estão expostas TAB. 3.15.

TAB 3.15 Principais absorções na região do IV do composto 35

ABSORÇÃO (cm^{-1})	ATRIBUIÇÃO
1745	Deformação axial de C=O
1612	C=N
1207	Deformação axial C-O
1016	Deformação axial C-Cl

Na análise de RMN ^{13}C (APÊNDICE, FIG.7.18, página 116) foram observados os deslocamentos químicos em δ 143,4; 38,4 e 78,1 referentes aos carbonos C-3, C-4 e C-5 do anel isoxazolínico. Os demais deslocamentos estão apresentados na TAB. 3.16 (RODRIGUES & AGUIAR, 2001; PIRRUNG, 2002).

TAB 3.16 Deslocamentos Químicos (δ) dos carbonos do composto 35



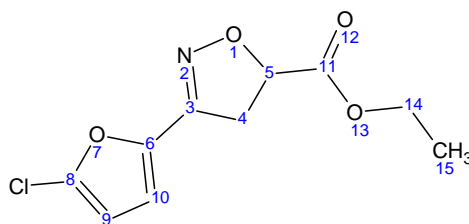
CARBONO	δ	MULTIPLICIDADE
C-3	143,4	C
C-4	38,4	CH ₂
C-5	78,1	CH
C-6	147,5	C
C-8	139,3	C
C-9	108,7	CH
C-10	114,1	CH
C-11	169,6	C
C-14	62,1	CH ₂
C-15	14,1	CH ₃

A potencial substituição no furano pelo halogênio foi considerada tendo em vista tanto o número de hidrogênios presentes no espectro de RMN ¹H, assim como a multiplicidade dos sinais obtidos.

O furano, sem substituintes apresenta dois dupletos e um duplo-duplete conforme reportado anteriormente. Porém, o espectro do composto 35 apresentou apenas dois dupletos em δ 6,29 e 6,77, que foram atribuídos aos H-9 e H-10 presentes no heterociclo em questão.

A formação do 4,5-diidro-isoxazol foi constatada pelo multiplete de sistema AB de segunda ordem em torno de δ 3,57 e um duplo duplete em δ 5,13 ($^3J_{H5-H4a}=10,8$; $^3J_{H5-H4b}=7,5$) correspondentes aos hidrogênios H-4 e H-5, responsáveis pela caracterização do heterociclo (TAB. 3.17, APÊNDICE, FIG. 7.19, página 117). O quarteto em δ 4,27 e o triplete em δ 1,32 foram atribuídos ao H-14 e H-15, referente a etila.

TAB 3.17 Deslocamentos químicos (δ) dos hidrogênios do composto 35



H	MULTIPLICIDADE	δ	INTEGRAÇÃO	J (Hz)
H-4	m	3,57	2H	-
H-5	dd	5,13	1H	${}^3J_{H5-H4a} = 10,8$; ${}^3J_{H5-H4b} = 7,4$
H-9	d	6,29	1H	${}^3J_{H9-H10} = 3,5$
H-10	d	6,77	1H	${}^3J_{H10-H9} = 3,5$
H-14	q	4,27	2H	-
H-15	t	1,32	3H	-

dd = duplo-duplete; d = duplete; m = multiplete; t = tripleto; q = quarteto

A posição da substituição do anel furânico pode ser justificada pela análise das constantes de acoplamento dos hidrogênios do anel. A substituição na posição 3 do furano apresenta as constantes de acoplamento (J) dos hidrogênios do C-8 e C-9 entre 1,3 e 2, enquanto que a substituição na posição 5 apresenta o acoplamento dos hidrogênios do C-9 e C-10 entre 3,1 e 3,8 (SILVERSTEIN *et al.*, 2007). A cloração do anel no C-8 também pode ser justificada pelas formas de ressonância do cloreto de imidoíla. A cloração na posição 5 forneceria um maior número de formas de ressonância, logo mais estabilizada seria a molécula, pois haveria uma maior dissipação de cargas (FIG. 3.13).

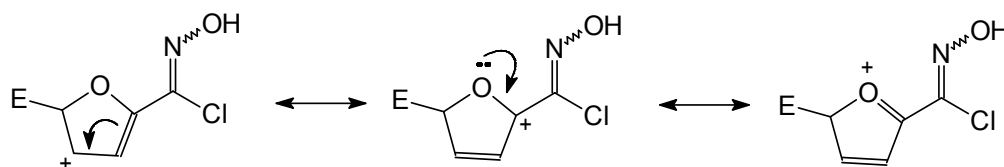


FIG. 3.13 Formas de ressonância do cloreto de imidoíla substituído na posição 5.

A caracterização do composto 35 foi concluída com a EM (APÊNDICE, FIG.7.21, página 119), onde foi possível detectar um íon molecular (M^+) igual a 243, o qual é convergente com o valor teórico. O fragmento do pico base com m/z igual a 73 está apresentado na FIG. 3.14.

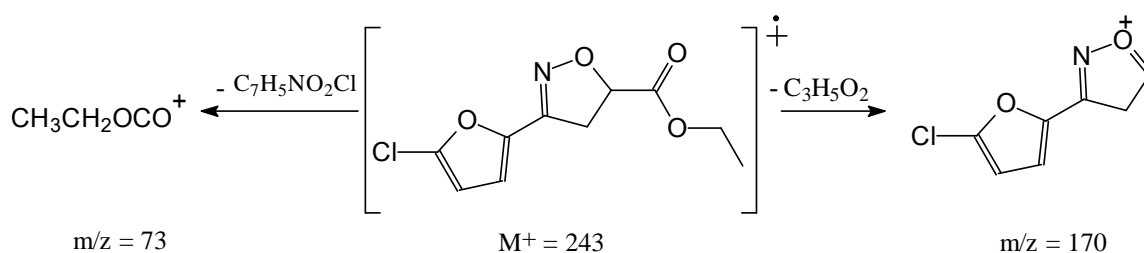


FIG.3.14 Fragmentos de massas sugeridos para o composto 35

A formação do cloro derivado pode ser justificada pela possibilidade do ácido tricloroisocianúrico, utilizado na síntese do cloreto de imidoíla, ter clorado o anel durante a reação.

Os valores obtidos na análise elementar de C, H e N do composto 35 foram reportados na TAB. 3.18.

TAB. 3.18 Análise elementar de CHN do composto 35

Valor	C (% m/m)	H (% m/m)	N (% m/m)
Experimental	48,6(±0,3)	4,1(±0,1)	6,4(±0,1)
Calculado	49,3	4,1	5,8
Δ^a	0,7	0,0	0,6

^a Variação entre o valor calculado e o experimental

3.2.2.4 SÍNTESE DO 3-(5-NITRO-2-FURIL)-5-CARBOXILAMIDA-4,5-DIIDRO-ISOXAZOL

A reação de ciclo-adição para obtenção do composto 36 durou 24 horas sob agitação magnética e a temperatura ambiente. A separação foi conduzida por filtração a vácuo, uma vez que o produto formado apresentou-se insolúvel no meio reacional. Foram obtidos 0,96 g (21%) de produto sólido amarelo-claro com ponto de fusão entre 230 –234°C.

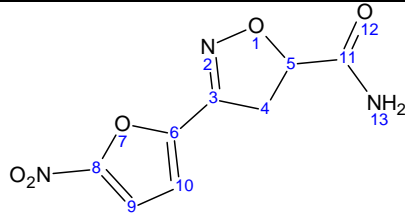
Na caracterização do produto por IV, observou-se a absorção referente a ligação C=N do anel heterocíclico em 1602 cm⁻¹. As demais absorções características do composto estão expostas TAB. 3.19.

TAB 3.19 Principais absorções na região do IV do composto 36

ABSORÇÃO (cm ⁻¹)	ATRIBUIÇÃO
1683	Deformação axial de C=O
1602	C=N
1566 e 1354	Deformação axial NO ₂
3456 e 3290	Deformação axial N-H

Na análise por RMN ¹³C foram observados os deslocamentos em δ 148,7; 38,1 e 80,3 referentes aos carbonos C-3, C-4 e C-5, respectivamente. Os demais deslocamentos estão apresentados na TAB. 3.20 (RODRIGUES & AGUIAR, 2001; PIRRUNG, 2002)

TAB 3.20 Deslocamentos Químicos (δ) dos carbonos do composto 36

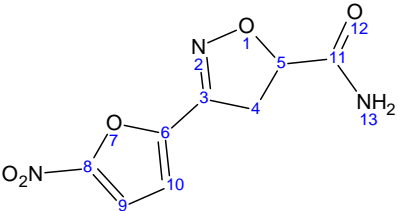


CARBONO	δ	MULTIPLICIDADE
C-3	148,7	C
C-4	38,1	CH ₂
C-5	80,3	CH
C-6	146,4	C
C-8	152,8	C
C-9	114,7	CH
C-10	116,6	CH
C-11	171,8	C

Pela RMN ¹H (TAB. 3.21) foi constatada a presença dos duplos-dupletos (dd) em δ 3,57 (²J_{H4a - H4b} = 17,2; ³J_{H4a - H5} = 11,4), 3,65 (²J_{H4b - H4a} = 17,2; ³J_{H4b - H5} = 7,0) e 5,16 (³J_{H5 - H4a} = 11,4; ³J_{H5 - H4b} = 7,0) correspondentes aos hidrogênios H-4a, H-4b e H-5, responsáveis pela

caracterização do heterociclo. Os hidrogênios ligados ao nitrogênio da amida apresentaram simplesos em δ 7,48 e 7,73.

TAB 3.21 Deslocamentos químicos (δ) dos hidrogênios do composto 36



H	MULTIPLICIDADE	δ	INTEGRAÇÃO	J (Hz)
H-4a	dd	3,57	1H	${}^2J_{\text{H4a} - \text{H4b}} = 17,2$; ${}^3J_{\text{H4a} - \text{H5}} = 11,4$
H-4b	dd	3,65	1H	${}^2J_{\text{H4b} - \text{H4a}} = 17,2$; ${}^3J_{\text{H4b} - \text{H5}} = 7,0$
H-5	dd	5,16	1H	${}^3J_{\text{H5} - \text{H4a}} = 11,4$; ${}^3J_{\text{H5} - \text{H4b}} = 7,0$
H-9	d	7,32	1H	${}^3J_{\text{H9} - \text{H10}} = 3,9$
H-10	d	7,81	1H	${}^3J_{\text{H10} - \text{H9}} = 3,9$
H-13a	s	7,48	1H	-
H-13b	s	7,73	1H	-

dd = duplo-dupletos; d = dupletos; s = simpleso

Objetivando determinar a pureza do composto 36, foi realizada a análise elementar que de acordo com a TAB. 3.22, apresentou um bom grau de pureza para o material obtido.

TAB. 3.22 Análise elementar de CHN do composto 36

Valor	C (% m/m)	H (% m/m)	N (% m/m)
Experimental	42,7($\pm 0,1$)	3,1	18,7($\pm 0,2$)
Calculado	42,7	3,1	18,7
Δ^a	0,0	0,0	0,0

^a Variação entre o valor calculado e o experimental

3.2.2.5 SÍNTESE DO 3-(5-NITRO-2-FURIL)-5-ETILCARBOXILATO-4,5-DIIDRO-ISOXAZOL

A reação de ciclo-adição para obtenção do composto 37 foi realizada em 24 horas sob agitação magnética e a temperatura ambiente. A reação foi monitorada por cromatografia gasosa, na qual se detectou o surgimento de um novo pico com tempo de retenção em 17,1 minutos (FIG. 3.15). O composto formado foi purificado através de cromatografia em coluna utilizando um gradiente de polaridade com hexano e acetato de etila. Deste modo, foram obtidos 0,94 g, que corresponde a 25% de rendimento, de um sólido amarelo com um ponto de fusão entre 92 – 94°C.

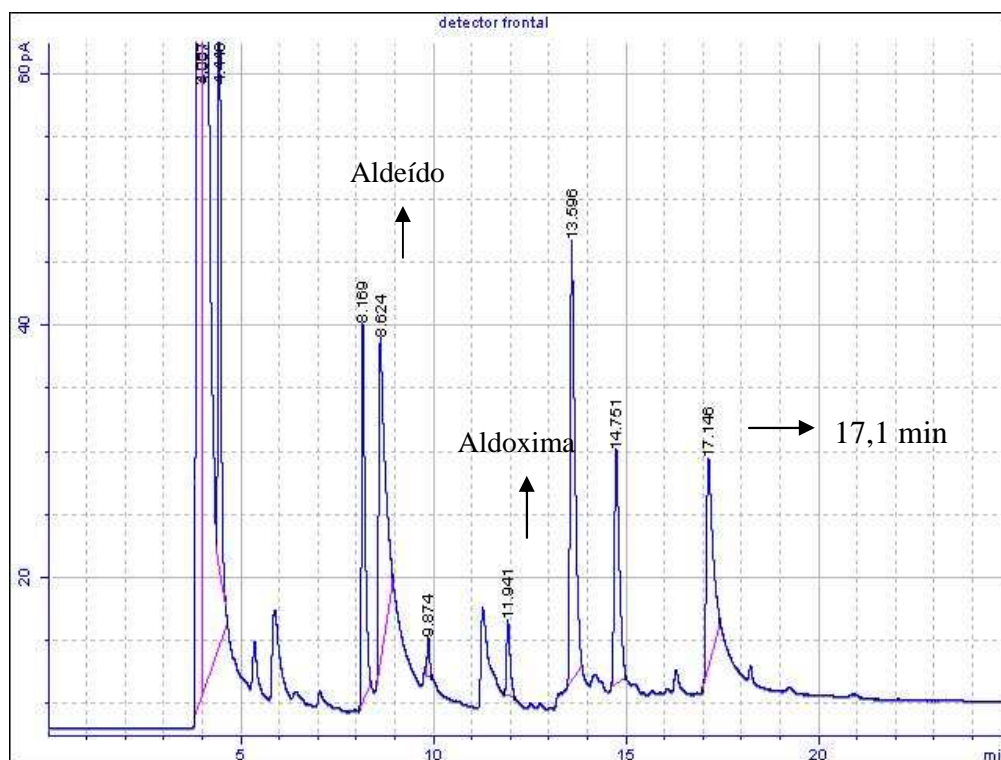


FIG. 3.15 Cromatograma da reação de ciclo-adição do composto 37

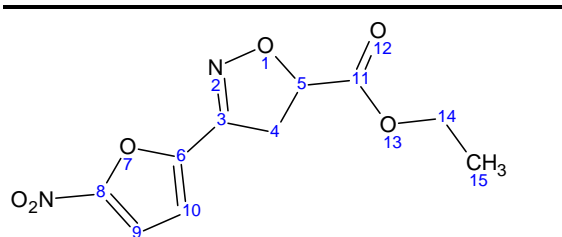
A análise por IV do composto isolado detectou uma absorção em 1610 cm^{-1} referente à deformação axial da ligação C=N presente no anel 4,5-diidro-isoxazol. Na TAB. 3.23 estão apresentadas as demais absorções observadas no espectro de IV.

TAB. 3.23 Principais absorções na região do IV do composto 37

ABSORÇÃO (cm ⁻¹)	ATRIBUIÇÃO
1730	Deformação axial de C=O
1610	C=N
1566 e 1354	Deformação axial NO ₂
1224	Deformação axial C-O

A formação do composto sintetizado pôde ser confirmada pela análise de RMN ¹³C e ¹H. Na RMN ¹³C foram observados os deslocamentos químicos em δ 147,6; 37,7 e 78,9 referentes aos carbonos C-3, C-4 e C-5 do anel isoxazolinico (TAB.3.24).

TAB. 3.24 Deslocamentos Químicos (δ) dos carbonos do composto 37

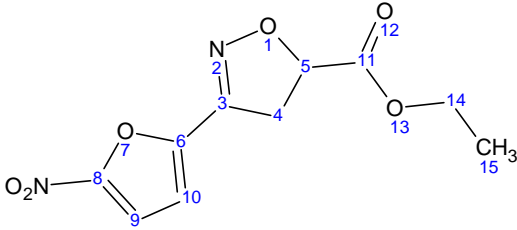


CARBONO	δ	MULTIPLICIDADE
C-3	147,6	C
C-4	37,7	CH ₂
C-5	78,9	CH
C-6	146,2	C
C-8	152,2	C
C-9	112,9	CH
C-10	113,2	CH
C-11	168,9	C
C-14	62,4	CH ₂
C-15	14,1	CH ₃

Na análise de RMN ¹H foi possível observar os hidrogênios isoxazolinicos H-4 como um multipeto de segunda ordem em δ 3,68 e H-5 como um duplo-dupeto em δ 5,24 (³J_{H5} -

$H_{4a} = 11,1$; ${}^3J_{H5 - H4b} = 7,5$). Os demais sinais relacionados ao composto 37 encontram-se na TAB. 3.25.

TAB. 3.25 Deslocamentos químicos (δ) dos hidrogênios do composto 37



H	MULTIPLICIDADE	δ	INTEGRAÇÃO	J (Hz)
H-4	m	3,68	2H	-
H-5	dd	5,24	1H	${}^3J_{H5 - H4a} = 11,1$; ${}^3J_{H5 - H4b} = 7,5$
H-9	d	7,06	1H	${}^3J_{H9-H10} = 3,8$
H-10	d	7,39	1H	${}^3J_{H10-H9} = 3,8$
H-14	q	4,27	2H	${}^3J_{H14-H15} = 7,1$
H-15	t	1,33	3H	${}^3J_{H15-H14} = 7,1$

dd = duplo-dupletto; d = dupletto; m = multipletto; t = tripletto; q = quartetto

Em prosseguimento a caracterização do composto obtido, foi realizada a EM que revelou o íon molecular de m/z igual a 254, análogo ao valor esperado (FIG. 3.16).

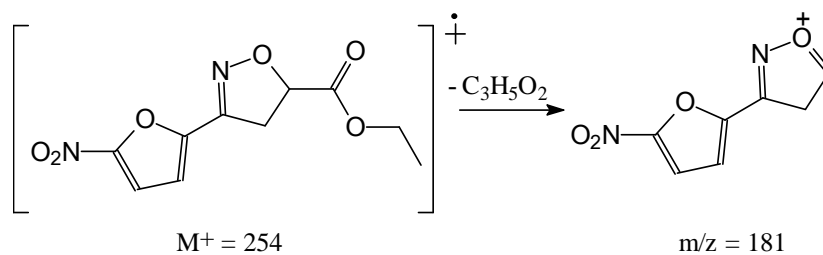


FIG. 3.16 Fragmentos sugeridos para o composto 37

A avaliação do grau de pureza do composto 37 foi realizada por análise elementar, o resultado obtido encontra-se na TAB. 3.26.

TAB. 3.26 Análise elementar de CHN do composto 37

Valor	C (% m/m)	H (% m/m)	N (% m/m)
Experimental	47,4 ($\pm 0,1$)	4,0	11,3($\pm 0,2$)
Calculado	47,2	3,9	11,0
Δ^a	0,2	0,1	0,3

^aVariação entre o valor calculado e o experimental

3.3 ENSAIO MICROBIOLÓGICO

Os ensaios biológicos foram realizados através da metodologia de microdiluição sucessiva em placa de 96 poços. Tal metodologia permite analisar quantitativamente a atividade *in vitro* de um possível agente antimicrobiano contra um determinado isolado bacteriano.

Os cinco derivados de 4,5-diidro-isoxazóis sintetizados foram testados frente as cepas padrão de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). Este ensaio foi dividido em duas etapas principais: análise preliminar da atividade antibacteriana dos compostos sintetizados e determinação da concentração inibitória mínima (CIM).

3.3.1 TRIAGEM DOS DERIVADOS DE 4,5-DIIDRO-ISOXAZOL

A análise preliminar foi realizada utilizando o método de microdiluição sucessiva com concentrações que variaram de 256 $\mu\text{g/mL}$ a 2 $\mu\text{g/mL}$, o resultado foi revelado através da utilização de indicador biológico (violeta *p*-iodonitrotetrazólio). Os compostos que apresentaram atividade biológica menor ou igual a 128 $\mu\text{g/mL}$, a máxima sugerida pela Norma M7-A6 do NCCLS, foram conduzidos para a segunda etapa, a determinação da concentração inibitória mínima (CIM). A CIM é registrada como a menor concentração do agente antimicrobiano que inibe completamente o crescimento, descartando qualquer

colônia única ou turvação leve causada pelo inóculo (NCCLS, 2003). A revelação do resultado da CIM foi realizada com o auxílio de um espectrofotômetro; através da densidade óptica foi possível observar se houve ou não crescimento bacteriano.

Vale ressaltar que todos os testes foram conduzidos em duplicata e foram realizados os controles positivo, negativo (foi utilizado amoxicilina com antibiótico de referência) e de esterilidade, com a finalidade de comprovar a viabilidade dos microrganismos, a esterilidade das soluções utilizadas e a não interferência do DMSO (10%), adicionado para facilitar a solubilização do composto, no crescimento bacteriano. Porém, a concentração de DMSO no poço da placa de teste não excedeu a 5%.

Os resultados dos testes microbiológicos preliminares mostraram que apenas os compostos 36 e 37 apresentaram atividade antibacteriana promissora. A TAB.3.27 apresenta os resultados do teste de microdiluição seriada com os compostos inicialmente testados.

TAB. 3.27 Resultado do teste preliminar para bactérias Gram-negativas

Conc. µg/mL	33		34		35		36		37	
	<i>E.coli</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>E.coli</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>E.coli</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>E.coli</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>E.coli</i>	<i>Pseudomonas</i>
256	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
128	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
64	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
32	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
16	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

*crescimento bacteriano (+); ausência de crescimento bacteriano (-).

TAB.3.28 Resultado do teste preliminar para bactérias Gram-positivas

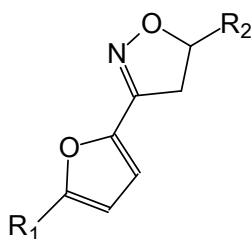
Conc. µg/mL	33		34		35		36		37	
	<i>E.faecalis</i>	<i>S.aureus</i>	<i>E.faecalis</i>	<i>S.aureus</i>	<i>E.faecalis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E.faecalis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E.faecalis</i>	<i>S. aureus</i>
256	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
128	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
64	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
32	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
16	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

*crescimento bacteriano (+); ausência de crescimento bacteriano (-).

De acordo com os dados apresentados nas tabelas é possível observar que apenas os compostos 36 e 37 apresentaram uma concentração inibitória menor ou igual a 128 µg/mL em todos os microrganismos testados.

Analisando os dados podemos constatar que, embora, o caráter hidrofóbico de uma substância seja fundamental para determinar a facilidade desta atravessar as membranas celulares, neste caso, a lipofilicidade dos compostos não interferiu de maneira muito relevante na atividade antibacteriana. Isso pode ser observado com os valores calculados de log P dos derivados sintetizados pelo programa ACD labs (TAB.3.29). O log P é um dos parâmetros utilizados frequentemente como medida quantitativa da lipofilicidade de compostos bioativos, sendo diretamente proporcional ao caráter hidrofóbico de um composto (PATRICK, 2001).

TAB. 3.29 Log P para os compostos estudados



COMPOSTO	R ₁	R ₂	log P
33	H	CONH ₂	-1,14
34	H	Ph	1,98
35	Cl	COOEt	1,74
36	NO ₂	CONH ₂	-1,56
37	NO ₂	COOEt	0,38

Erro = ±0,55

Os valores de log P mostraram que apesar dos compostos 34 e 35 apresentarem um maior caráter hidrofóbico, não apresentaram uma boa atividade antibacteriana frente as cepas testadas. Em contra partida, os compostos 36 e 37 com valores menores de log P apresentaram atividade mais promissoras frente aos microrganismos testados.

Nota-se, também, que os compostos que possuem o grupamento NO₂ no anel furânico apresentaram uma maior atividade biológica. Tais resultados podem estar relacionados com o mecanismo de redução enzimática do grupamento nitro, já discutido anteriormente (seção 1.4.1).

3.3.2 DETERMINAÇÃO DA CIM

Com os resultados do teste preliminar foi inicialmente determinado o “ponto de corte” de cada composto para as cepas utilizadas. Para o composto 36, como foi detectada a inibição do crescimento bacteriano até a concentração 32 $\mu\text{g/mL}$ para as bactérias *Escherichia coli* e *Enterococcus faecalis*, o ponto de corte foi entre 32 – 16 $\mu\text{g/mL}$, e para as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* como a inibição do crescimento bacteriano foi até 16 $\mu\text{g/mL}$, o ponto de corte estipulado foi entre 16 - 8 $\mu\text{g/mL}$. Já para o composto 37 o ponto de corte foi entre 128 – 64 $\mu\text{g/mL}$ para todas as bactérias utilizadas.

O método utilizado para a realização da CIM foi o mesmo realizado no teste preliminar, porém o resultado foi analisado através dos dados fornecidos pelo espectrofotômetro. Já as concentrações utilizadas variaram de acordo com o composto. Para o composto 36 foram utilizadas concentrações entre 40 $\mu\text{g/mL}$ e 12 $\mu\text{g/mL}$, com intervalos de 4 unidades, e 20 $\mu\text{g/mL}$ e 6 $\mu\text{g/mL}$ com intervalos de 2 unidades. Para o composto 37 foram utilizadas concentrações entre 130 $\mu\text{g/mL}$ e 64 $\mu\text{g/mL}$ com intervalos de 6 unidades.

Com os resultados obtidos observou-se que para o composto 37 a CIM, considerando as concentrações testadas, foi de 88 $\mu\text{g/mL}$ para as cepas de *E.coli*, *E.faecalis* e *P.aeruginosa* e de 94 $\mu\text{g/mL}$ para a cepa de *S.aureus* (FIG 3.17).

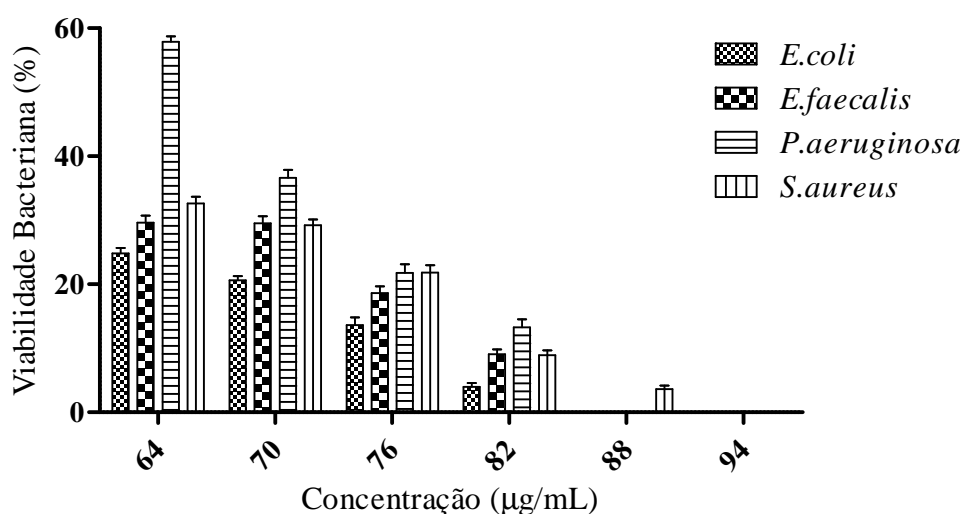


FIG 3.17 Resultado do teste de microdiluição do composto 37

Para o composto 36 as CIMs apresentadas mostraram que este composto expressa maior atividade antibacteriana em relação ao composto 37 tanto para bactérias Gram-positivas quanto para Gram-negativas. Na FIG 3.18 podemos observar que a CIM para as bactérias *E.coli* e *E.faecalis* foi de 28 $\mu\text{g/mL}$.

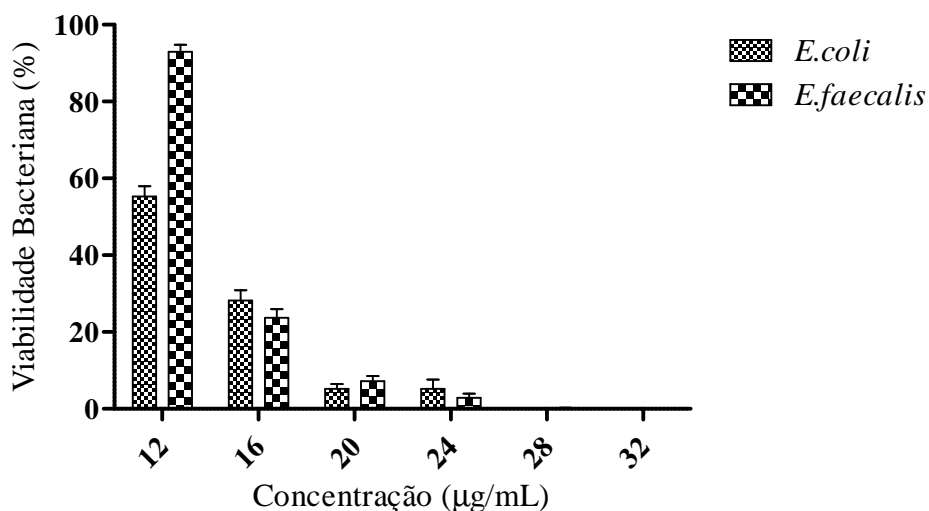


FIG 3.18 Resultado do teste de microdiluição do composto 36 frente a *E.coli* e *E.faecalis*.

Já para as bactérias *P.aeruginosa* e *S.aureus* o composto 36 apresentou CIM de 14 $\mu\text{g/mL}$ e 16 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (FIG 3.19).

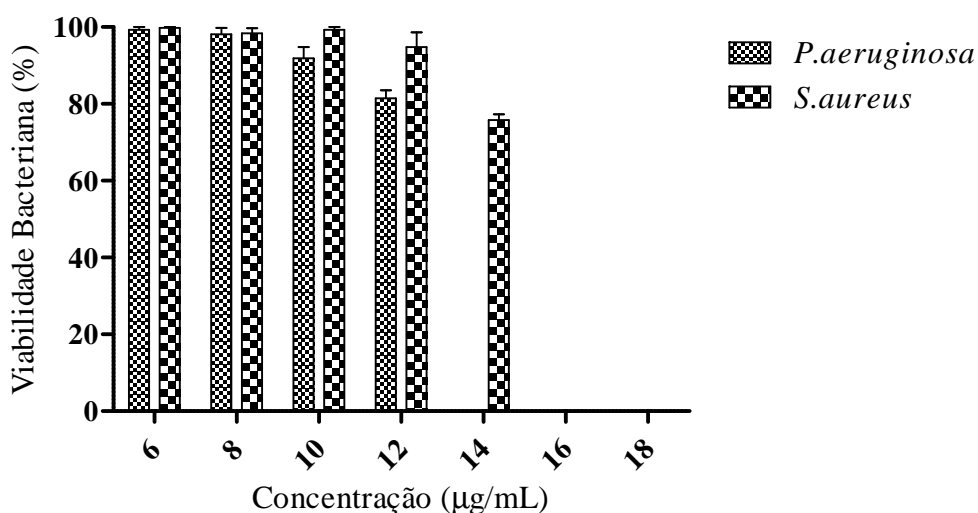
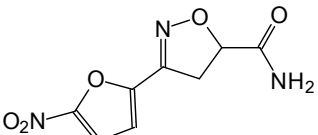
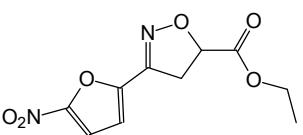


FIG 3.19 Resultados do teste de microdiluição do composto 36 frente a *P.aeruginosa* e *S.aureus*.

O antibiótico de referência utilizado como padrão nesses testes foi a amoxicilina, que apresentou uma CIM igual a 4 µg/mL frente a cepa de *E.coli*, 1 µg/mL para as cepas de *S. aureus* e *E. faecalis* e 128 µg/mL para *P. aeruginosa*, indo ao encontro da literatura (ANDREWS, 2001).

TAB. 3.30 Valores da CIM para os compostos 36, 37 e amoxicilina frente as cepas padrão

Bactérias	CIM (ug/mL)		
			Amoxicilina
<i>S.aureus</i>	16	94	1
<i>E.faecalis</i>	32	88	1
<i>E.coli</i>	28	88	4
<i>P.aeruginosa</i>	14	88	128

Os dados obtidos com os ensaios biológicos mostraram um resultado bastante promissor frente a bactéria *Pseudomonas aeruginosa*, visto que tal bactéria apresenta uma resistência intrínseca a muito antimicrobianos sendo, assim, de difícil tratamento (ARRUDA, 1998). Em hospitais e em outros locais em que agentes farmacêuticos são preparados, a habilidade das pseudomonas de se desenvolverem em meios com poucos nutrientes e locais úmidos, como resíduos de sabão, soro fisiológico ou equipamentos de diálise, tem sido um problema inesperado, além da capacidade de crescerem em alguns anti-sépticos, como compostos quaternários de amônio. Sua resistência à maioria dos antibióticos tem sido uma fonte de preocupação médica. Esta resistência está provavelmente relacionada a características das porinas da parede celular, responsáveis por controlar a entrada de moléculas, e a capacidade de seu genoma codificar diversos sistemas de bombeamento de efluxo. As pseudomonas são responsáveis por uma em cada dez infecções nosocomiais (infecções hospitalares), especialmente infecções em pacientes nas unidades de queimados (TORTORA *et al.*, 2005).

Cabe ressaltar que os valores de CIM encontrados para os compostos 36 e 37 são relativamente altos quando comparados com os antibióticos disponíveis no mercado, exceto frente à bactéria *Pseudomonas aeruginosa*. Os principais antibióticos disponíveis no mercado apresentam CIM consideravelmente altos para essa bactéria. A CIM da

cefalexina (beta-lactâmico) contra *Pseudomonas aeruginosa*, ATCC 27853, é > 128 µg/mL, da tetraciclina (inibição na síntese de proteínas) é igual a 32 µg/mL, da amoxicilina (beta-lactâmico) é > 128 µg/mL e da norflaxacina (inibição na síntese de DNA) é 1µg/mL (ANDREWS, 2001).

4 CONCLUSÃO

Neste trabalho foram sintetizados, identificados e avaliados frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas cinco derivados de 4,5-diidro-isoxazóis os quais apresentaram rendimentos variados de 15% a 30%.

Todos os derivados apresentaram a mesma regioseletividade, sendo esta determinada pela multiplicidade / deslocamento químico do C-5 através da técnica APT.

Dentre os compostos sintetizados, três apresentaram a sua estrutura química inédita (33, 35 e 37), visto que não foram encontrados na literatura pesquisada. Os outros dois compostos (34 e 36) não apresentaram na literatura pesquisas sobre uma possível atividade antibacteriana.

O ensaio microbiológico para todos os compostos obtidos mostrou que os compostos 36 e 37 apresentaram os melhores resultados frente a todas as cepas utilizadas, sendo o composto 36 o mais ativo.

5 PERSPECTIVAS

Os derivados de 4,5-diidro-isoxazóis contendo o nitrofurano na posição 3 do heterociclo mostraram-se eficientes contra as bactérias utilizadas, principalmente, frente a cepa de *Pseudomonas aeruginosa*, portanto, a síntese de novos análogos a este composto pode ser um potencial alvo de investigação.

Modificações no substituinte da posição 5 do anel, como a inserção de uma amida secundária, podem aumentar a lipofilicidade da molécula, contribuindo para uma melhor permeabilidade nas membranas celulares. A modificação do grupamento éster pelo ácido hidroxâmico poderia aumentar a atividade da molécula frente a cepa de *Escherichia coli*, pois compostos já sintetizados no nosso grupo de pesquisa (RODRIGUES, 2008) mostraram que moléculas com o ácido hidroxâmico na posição 5 do anel apresentaram atividade expressiva contra a bactéria em questão.

Os resultados obtidos indicaram que o grupamento NO₂ foi muito importante para o efeito observado. O processo de formação de radicais livres *in vivo* deste grupamento pode ser um fator importante para o tratamento da Doença de Chagas, já que a produção de radicais livres é o principal mecanismo de ação dos fármacos existentes (nifurtimox e benznidazol) contra *Trypanosoma cruzi*.

6 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- ARMAREGO, W.L.F., PERRIN, D.D. **Purification of Laboratory Chemicals**. 4 ed. São Paulo: Oxford University press.
- BASAPPA, M., SADASHIVA, M. P., MANTELINGU K., SWAMY S. N., RANGAPPA, K. S. Solution-phase synthesis of novel 2-isoxazoline libraries via 1,3-dipolar cycloaddition and their antifungal properties. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 11, p. 4539-4544, 2003.
- BASRA, S.K., DREW, M.G., MANN, J., KANE, P.D. A novel approach to bis-isoxazolines using a latent form of cyclopentadienone. **Journal of the Chemistry Society – Perkin Transactions 1**, 2000.
- BOQUESI, P. L., ALMEIDA, A. E., BLAU, L., MENEGON, R. F., SANTOS, J. L., CHUNG, M. C., Toxicidade de fármacos nitrofurânicos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, 29 (3), p. 231-238, 2008.
- CHIANG, Y. H. Chlorination of Oximes. I. Reaction and mechanism of the chlorination of oximes in commercial chloroform and methylene chloride. **Journal Organic Chemistry**, 36 (15), p. 2146-2155, 1971.
- DALLANOCE, C., MERONI, G., DE AMICI, M., HOFFMANN, C., KLOTZ, K., DE MICHELI, C. Synthesis of enantiopure Δ^2 -isoxazoline derivatives and evaluation of their affinity and efficacy profiles at human β -adrenergic receptor subtypes. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 14, p. 4393-4401, 2006.
- DOMINGO, L. R. 1,3-Dipolar Cycloadditions of Electrophilically Activated Benzonitrile N-Oxides. Polar Cycloaddition versus Oxime Formation. **Journal Organic Chemistry**, 71 (25), p. 9319-9330, 2006.
- DONNICI, C. L., MELO, J. O. F., AUGUSTI, R., FERREIRA, V. F., SOUZA, M. C.B.V., FERREIRA, M. L. G., CUNHA, A. C. Heterociclos 1,2,3-triazólicos: Histórico, métodos de preparação, aplicações e atividades farmacológicas. **Química Nova**, 29 (3), 2006.
- GIACOMELLI, G., DE LUCA, L., PORCHEDDU, A. A method for generating nitrile oxides from nitroalkanes: a microwave assisted route for isoxazoles. **Tetrahedron**, 59, p. 5437-5440, 2003.
- GILLER, S., *et. al.* United States Patent 4052419 (Oct. 4, 1977).
- GOTHELF, K.V., JORGENSEN, K.A. Asymmetric 1,3 dipolar cycloaddition reactions. **Chemical Reviews**, 98 (2), p. 863-909, 1998.

- GRUNDMANN, C., RICHTER, R. Nitrile oxide. Basic, Substituted, Stable Nitrile Oxide. **The Journal of Organic Chemistry**, 32, p.2308-2312, 1967.
- GRUNDMANN, C., RICHTER, R. Nitrile oxide. An improved method for the preparation of nitrile oxides from the aldoximes. **The Journal of Organic Chemistry**, 33, p.476-478, 1968.
- HABER, R.G., SCHOENBERGER, E. Nitrofuryl Pyrazoles and nitrofuryl isoxazoles. **Israel Journal of Chemistry**, 6, p. 631-639, 1968.
- HASSNER, A., RAI, K.M.L. A new method for the generation of nitrile oxides and its application of the synthesis of 2-isoxazolines. **Synthesis Communications**, 1, p. 57-59, 1989.
- HOYLE, W., HOWARTH, A. United States Patent 3769295 (Oct. 30, 1973).
- HUISGEN, R. On the Mechanism of 1,3 – dipolar Cycloadditions. **The Journal of Organic Chemistry**, 33 (6), 1968.
- KAUSHIK, M. P., KUMAR, V. A novel one pot synthesis of hidroximoyl chlorides and 2-isoxazolines using N-terc-butyl-N-chlorocyanamide. **Tetrahedron Letters**, 47, p. 1457-1460, 2006.
- KOVER, W.B., DE MATTOS, M. C. S. Ciclo-adição de óxidos de nitrila ao limoneno: Síntese quimio e regioespecífica de 2-isoxazolinas 3-substituídas. **Química Nova**, 17 (2), p. 119-123, 1994.
- KUMARAN, G. A novel one pot conversion of primary nitroalkanes to hydroximoyl chlorides. **Tetrahedron Letters**, 37 (35), p. 6407-6408, 1996.
- KURTH, M. J., JEDDELOH, M. R., HOLDEN, J. B., NOURI, D. H. A Library of 3-aryl-4,5-dihydroisoxazole-5-carboxamides. **Journal of Combinatorial Chemistry**, 9 (6), p. 1041-1045, 2007.
- LEE, G.A. A Simplified synthesis of unsaturated nitrogen-heterocycles using nitrile betaines. **Synthesis Communications**, 6, p. 508-509, 1982.
- LEE, C.K. Y., HERLT, A. J., SIMPSON, G. W., WILLIS, A. C., EASTON, C. J. 4-Alkoxy carbonyl - and Aminocarbonyl-Substituted Isoxazoles as Masked Acrylates and Acrylamides in the Asymmetric Synthesis of 2-Isoxazolines. **Journal of Organic Chemistry**, 71, p. 3221-3231, 2006.
- LEE, R. E., TANGALLAPALLY, R. P., SUN, D., RAKESH; BUDHA, N., LEE, R. E. B., LENAERTS, A. J. M., MEIBOHM B. Discovery of novel isoxazolines as anti-tuberculosis agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 17, p.6638-6642, 2007.
- LIU, K.J., SHELTON, B.R., HOWE, R.K. A particularly convenient preparation of benzohydroximinoyl chlorides: nitrile oxide precursors. **Journal of Organic Chemistry**, 45, p. 3916-3919, 1980.

- MAYA, J. D., CASSELS, B. K., FERREIRA, J., FAÚNDEZ, M., GALANTI, N., FERREIRA, A., MORELLO, A. Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. **Comparative Biochemistry and Physiology**, PART A 146, 601–620, 2007.
- MINAMI, S., *et. al.* United States Patent 3631169 (Dec. 28, 1971).
- MILIC, B. L., VLAOVIC, D., MACKENZIE, K. Modified producer for the preparation of 5-nitro-2-furylmethylene diacetate and its use in the synthesis of some novel (5-nitro-2-furyl) azomethines via 5-nitro-2-furaldehyde. **Journal of Chemical Research (S)**, 156-157, 1989.
- MUKAIYAMA, T., HOSHINO, T. The reactions of primary nitroparaffins with isocyanates. **Journal of the American Chemical Society**, 82 (2), p. 5339-5342, 1960.
- NAIR, V., NANDAKUMAR, M.V., MALIAKAL, D., MATHEN, J.S., RATH, N.P. 1,3-Dipolar Cycloaddition Reaction of Nitrile *N*-Oxide to 6-(2-Phenylethenyl)fulvene. **Tetrahedron**, 56, 8001-8005, 2000.
- NAIR, V., SUJA, T. O. Intramolecular 1,3-Dipolar Cycloaddition Reactions in Target Synthesis. **Tetrahedron**, 63, 11247-11275, 2007.
- NCCLS - National committee for clinical laboratory standards. M7-A6, 2003.
- PATRICK. **An introduction of medicinal chemistry**. São Paulo: Oxford University press, 2001. p. 397.
- PIRRUNG, M. C., TUMEY, N., RAETZ, C. R. H., JACKMAN J. E., SNEHALATHA, K., MCCLERREN, A. L., FIERKE, C. A., GANTT, S. L., RUSCHE, K. Inhibition of the antibacterial target UDP-(3-*O*-acyl)-*N*-acetylglucosamine Deacetylase (LpxC): Isoxazoline Zinc Amidase Inhibitors bearing diverse metal binding groups. **Journal of Medicinal Chemistry**, 45(19), p. 4359-4370, 2002.
- PLENKIEWICZ, J., ZAGOZDA, M. Optically active nitrile oxides: synthesis and 1,3 dipolar cycloaddition reactions. **Tetrahedron: Asymmetry**, 18, p.1457-1464, 2007.
- PUPO, M. T., MOMESSO, L. S., GUIMARÃES, D. O. Antibióticos: Importância terapêutica e perspectiva para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, 33 (3), 667-679, 2010.
- RODRIGUES, R.C., DE AGUIAR, A.P. A simple and efficient method for the synthesis of nitrile oxide from aldoxime using trichloroisocyanuric acid. **Synthetic Communications**, 31 (20), p. 3075-3080, 2001.
- RODRIGUES, G.C. **Síntese e avaliação antibacteriana de derivados de 3-aril-4,5-diidro-isoxazóis**. Dissertação (Mestrado em Ciências em Química) – Instituto Militar de Engenharia, 2008.

- SÁ, M. M., SILVEIRA, G. P., NOME, F., GESSER, J. C. Estratégias Utilizadas no combate a resistência bacteriana. **Química Nova**, 29 (4), 844-855, 2006.
- SASAKI, T., YOSHIOKA, T. Studies on Heteroaromaticity. IV. The thermal 1,3-dipolar cycloaddition of fur- and 5-nitro-2-furhydroxamoyl chlorides with olefinic and acetylenic compounds. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, 40 (11), p. 2604-2607, 1967.
- SASAKI, T., YOSHIOKA, T. Studies on Heteroaromaticity. XIX. Direct 1,3-dipolar cycloaddition of hydroxamoyl chlorides with enamines. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, 41 (9), p. 2212-2215, 1968.
- SHIMIZU, T., HAYASHI, Y., SHIBAFUCHHI H., TERAMURA, K. A convenient preparative method of nitrile oxides by the dehydration of primary nitro compounds with ethyl chloroformate or benzenesulfonyl chloride in presence of triethylamine. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, 59, p. 2827-2831, 1986.
- SILVERSTEIN, R. M., WEBSTER, F. X., KIEMLE, D. J. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 7 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2007.
- SOLOMONS, T. W. G., FRYHLE, C. B. **Química Orgânica**. v.2. 8 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2006.
- SORO Y., BAMBA F., SIAKA S., COUSTARD, J-M. One-step synthesis of diazadihydroacenaphthylene derivatives with an isoxazoline ring, starting from 1-benzylamino-1-methylsulfanyl-2-nitroethenes. **Tetrahedron letters**, 47, p. 3315-3319, 2006.
- SRIVASTAVA, B. K., JAIN, M. R., SOLANKI, M., SONI, R., VALANI, D., GUPTA, S., MISHRA, B., TAKALE, V., KAPADNIS, P., PATEL, H., PANDYA, P., PATEL, J. Z., PATEL, P. R. Synthesis and in vitro antibacterial activities of novel oxazolidinones. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 43, 683-693, 2008.
- TAVARES, L. C., SERRANO, S. H. P., PAULA, F. R., Aspectos mecanísticos da bioatividade e toxicidade de nitrocompostos. **Química Nova**, 32 (4), p. 1013-1020, 2009.
- TEHRANI, M. H. H., ZARGHI, A., FATHALI, S. A Modified Method for the Synthesis of Nitrofurazone. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, 2, 67-69, 2003.
- TOCHER, J. H. Reductive Activation of Nitroheterocyclic Compounds. **Gen. Pharmac.**, 28 (4), 485-487, 1997.
- TORTORA, G. J., FUNKE, B. R., CASE, C. L. **Microbiologia**. 8 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.
- VICENTINO, A.R.R. **Síntese e avaliação da atividade antibacteriana de novos derivados de 5-(piridila)-4,5-diidro-isoxazóis**. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências em Química) – Instituto Militar de Engenharia, 2008.

- WEIDNER-WELLS, M.A., FREGA-SPANNA, S. A., TURCHI, I.J. Unusual regioselectivity of dipolar cycloaddition reactions of nitrile oxides and tertiary cinnamides and crotonamides. **Journal of Organic Chemistry**, 68, 6319-6328, 1998.
- WEIDNER-WELLS, M., WERBLOOD, H., GOLDSCHMIDT, R., BUSH, K.; FOLENO, B. D., HILLIARD, J. J., MELTON, J., WIRA, E., MACIELAG, M. J. The synthesis and antimicrobial evaluation of a new series of isoxazolinyloxazolidinones. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 14, 3069-3072, 2004.
- WOODWARD, R. B., HOOFMANN, R. Stereochemistry of Electrocyclic Reactions. **Journal of the American Chemical Society**, 87 (2), 395-397, 1965.

7 APÉNDICE

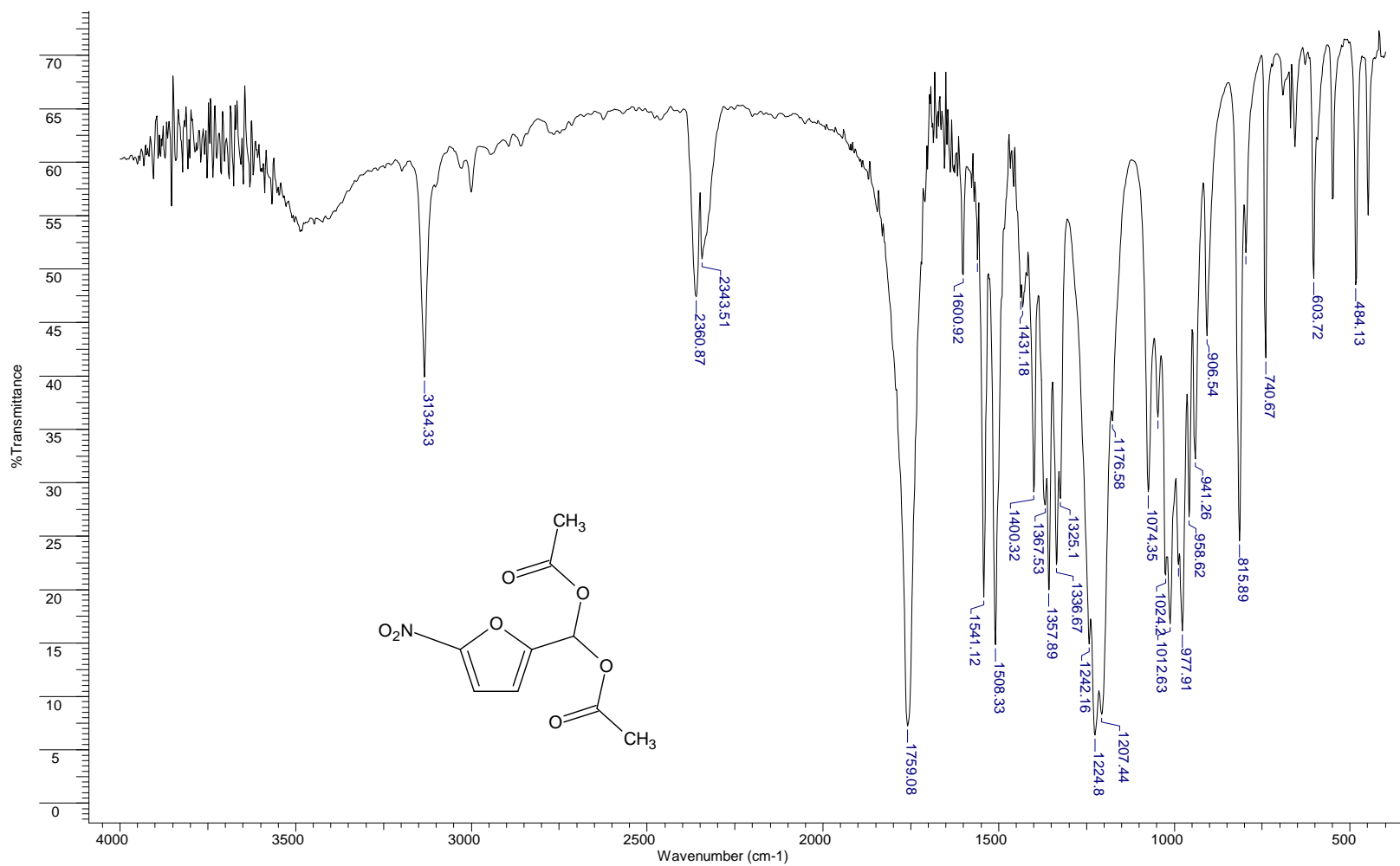


FIG. 7.1 Espectro de Infravermelho do composto 31

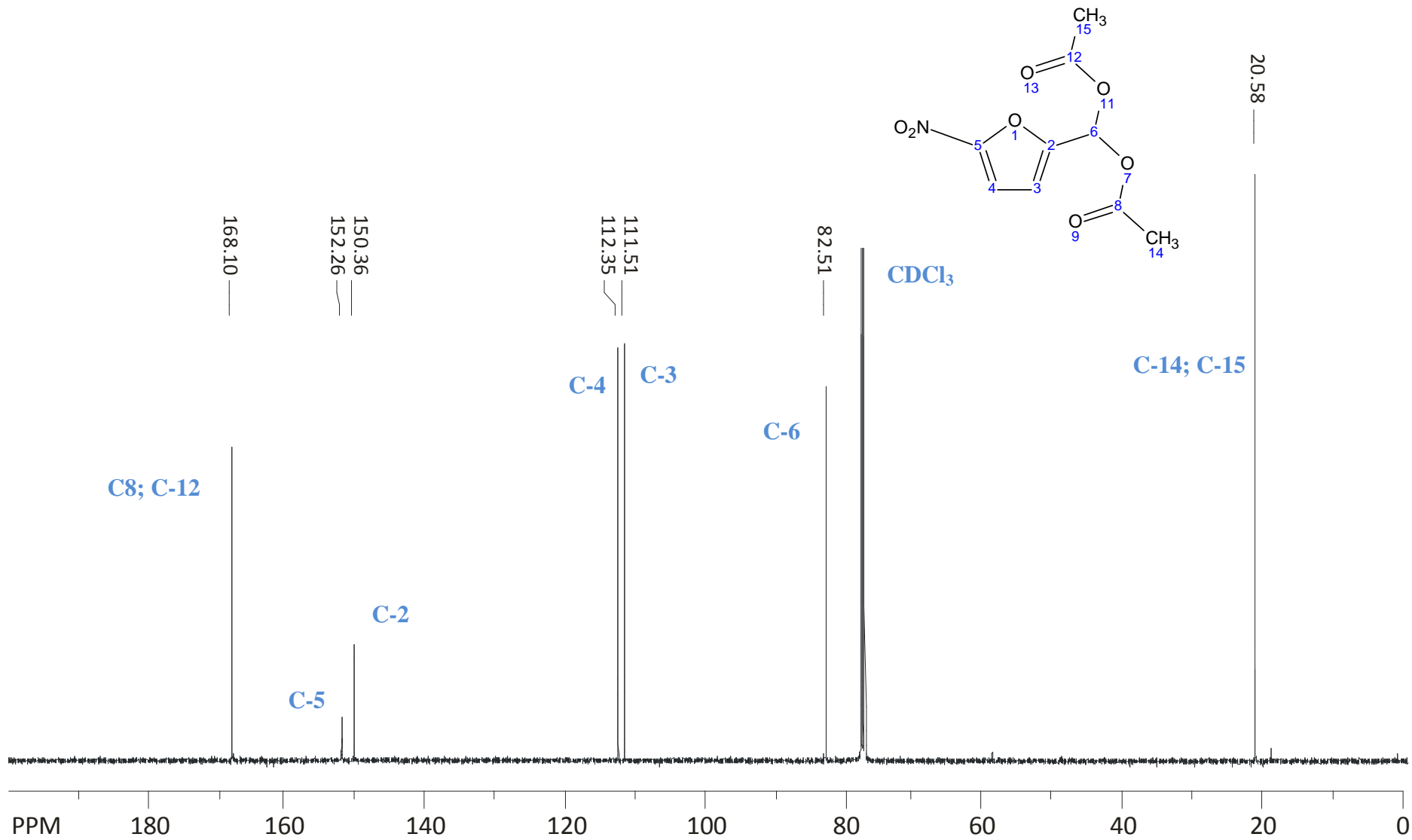


FIG. 7.2 Espectro de RMN ^{13}C do composto 31

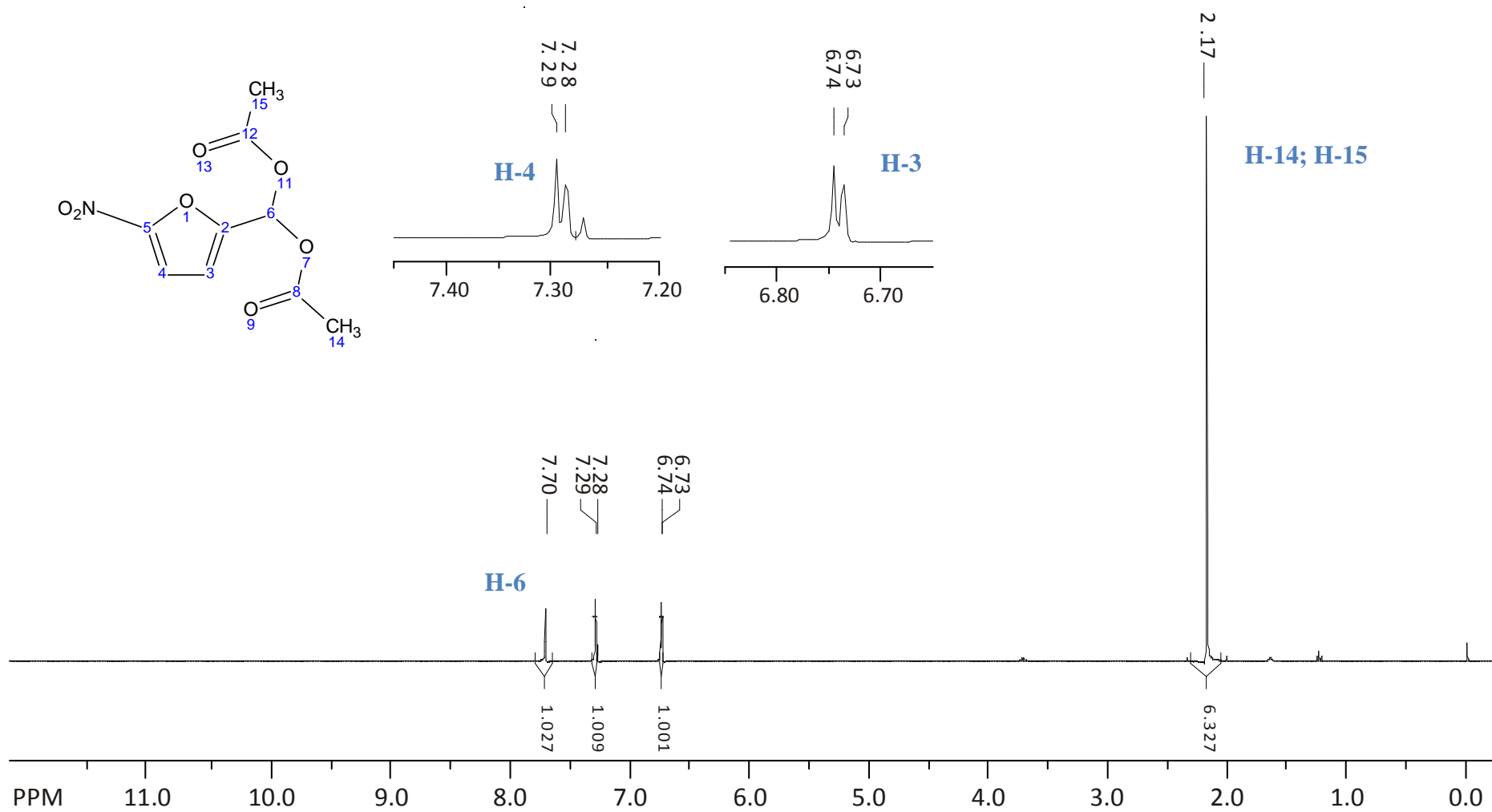


FIG. 7.3 Espectro de RMN ^1H do composto 31

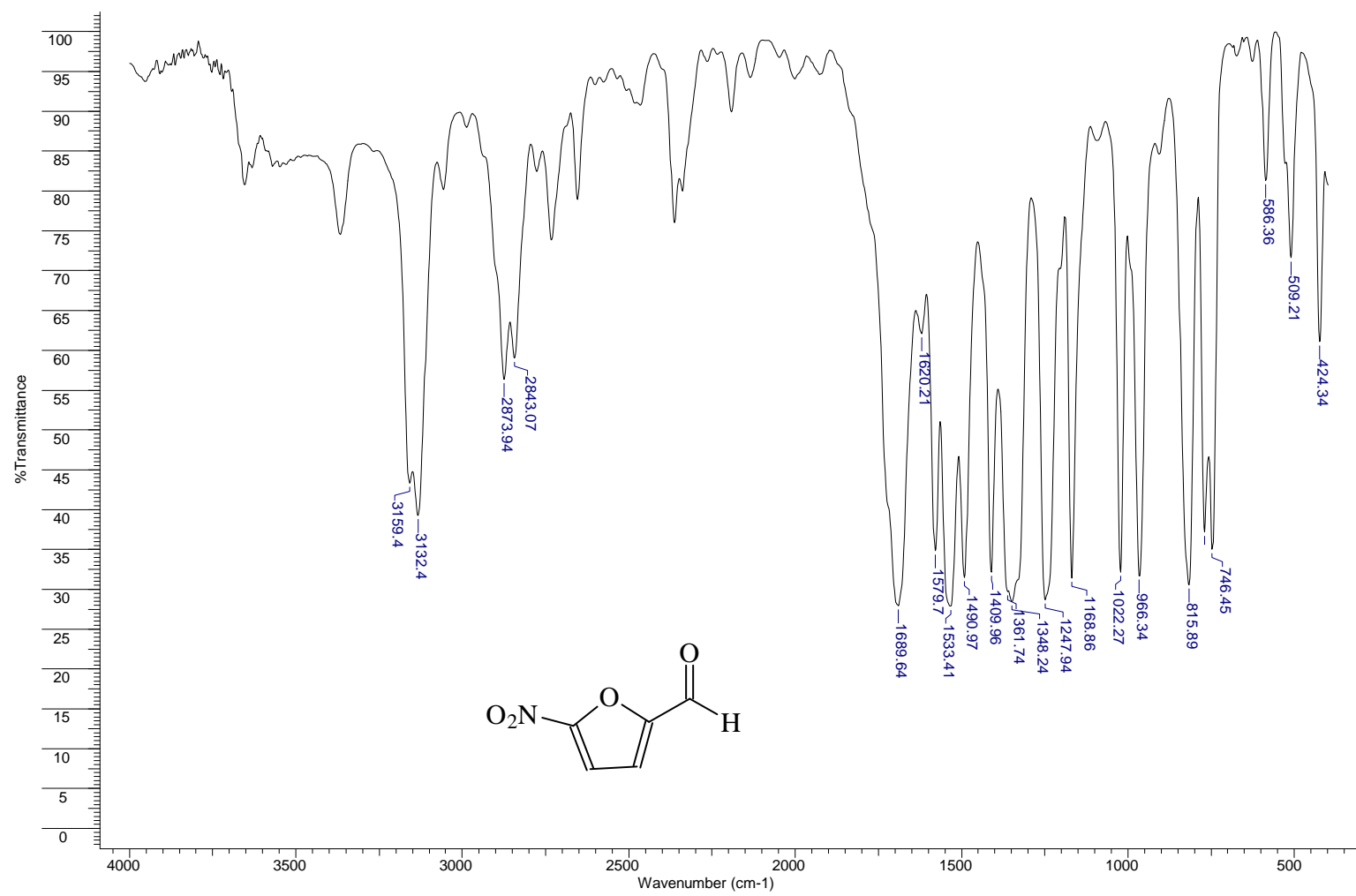


FIG. 7.4 Espectro de Infravermelho do composto 32

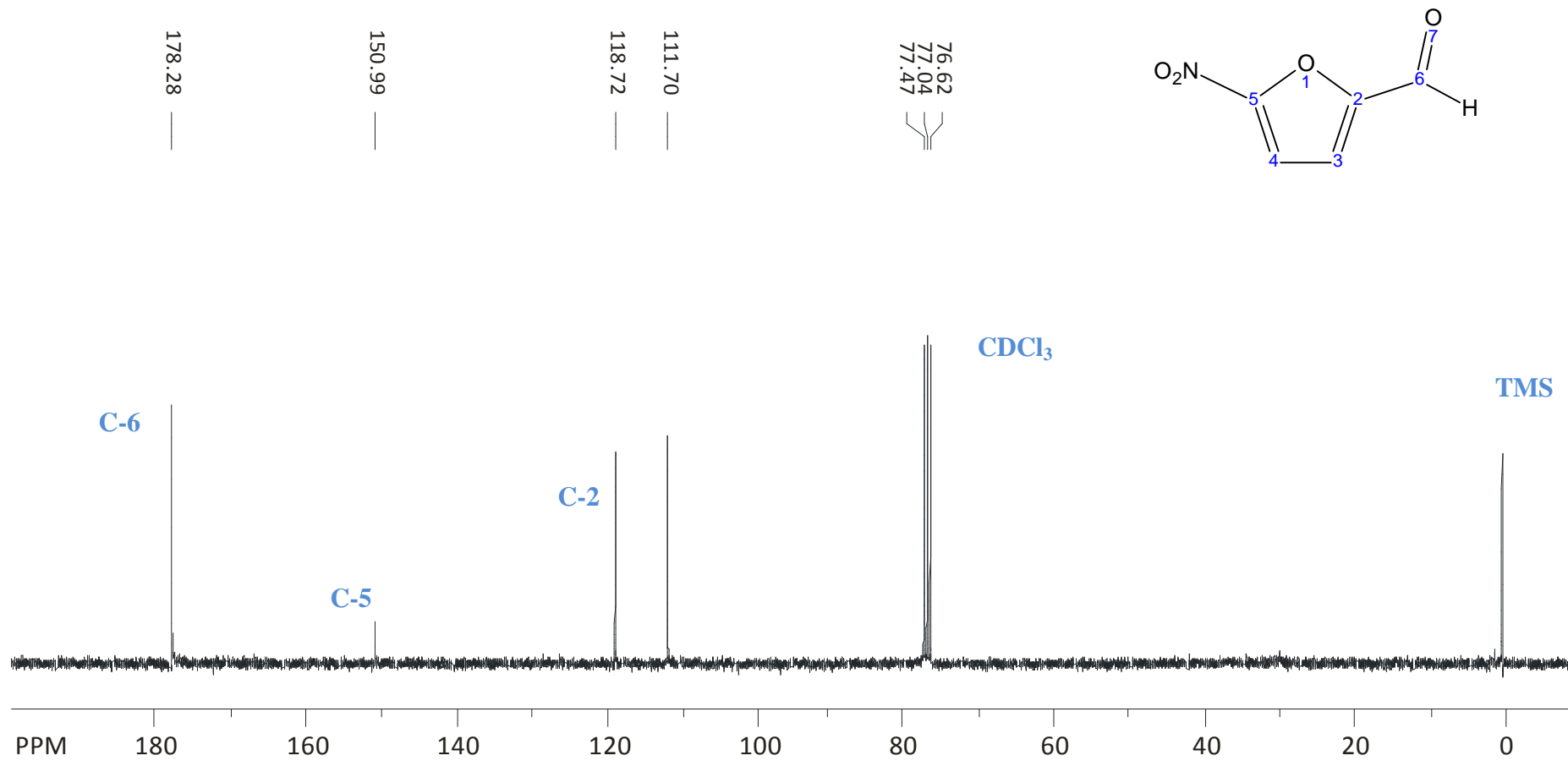


FIG. 7.5 Espectro de RMN ^{13}C do composto 32

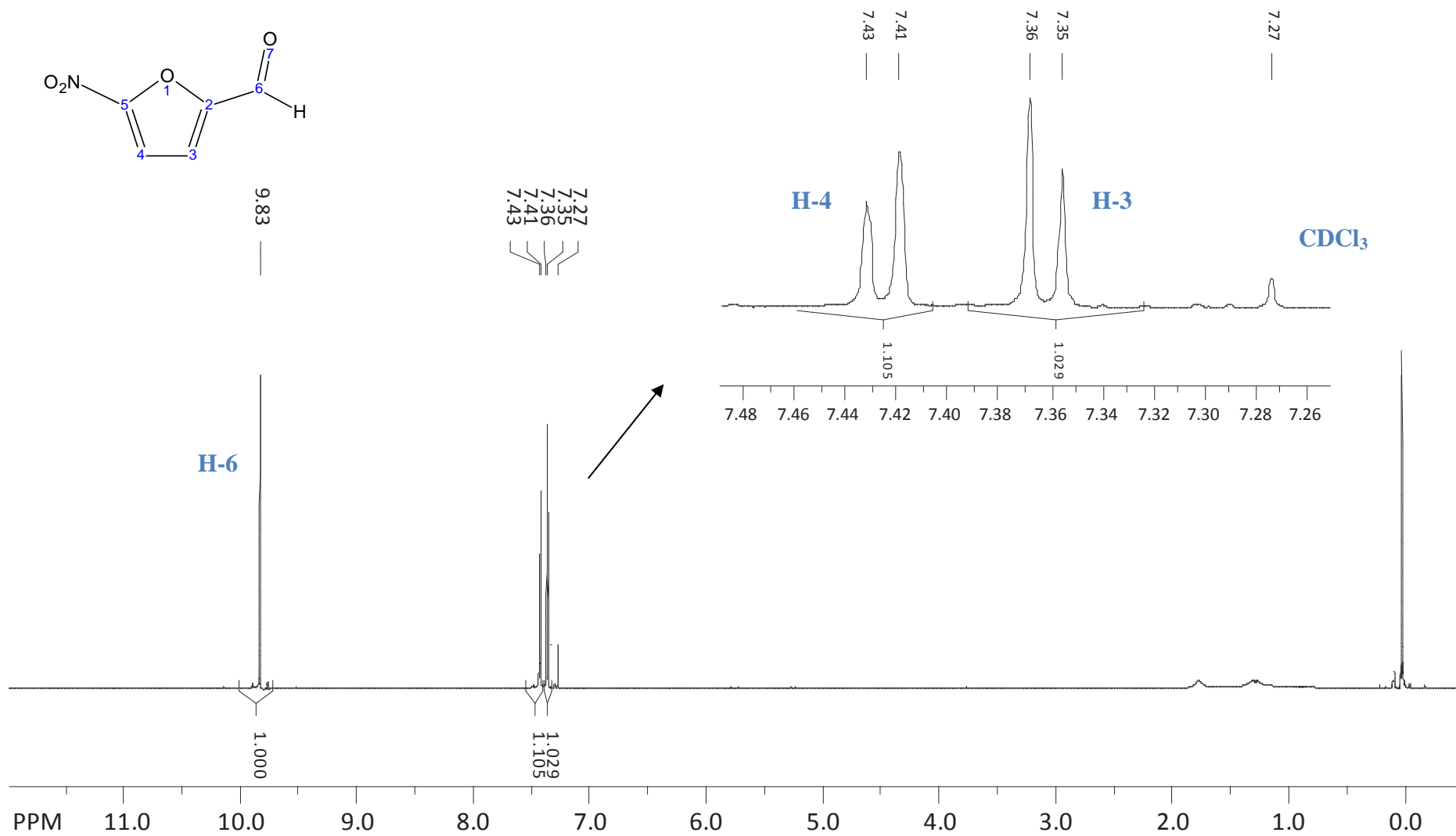


FIG. 7.6 Espectro de RMN ^1H do composto 32

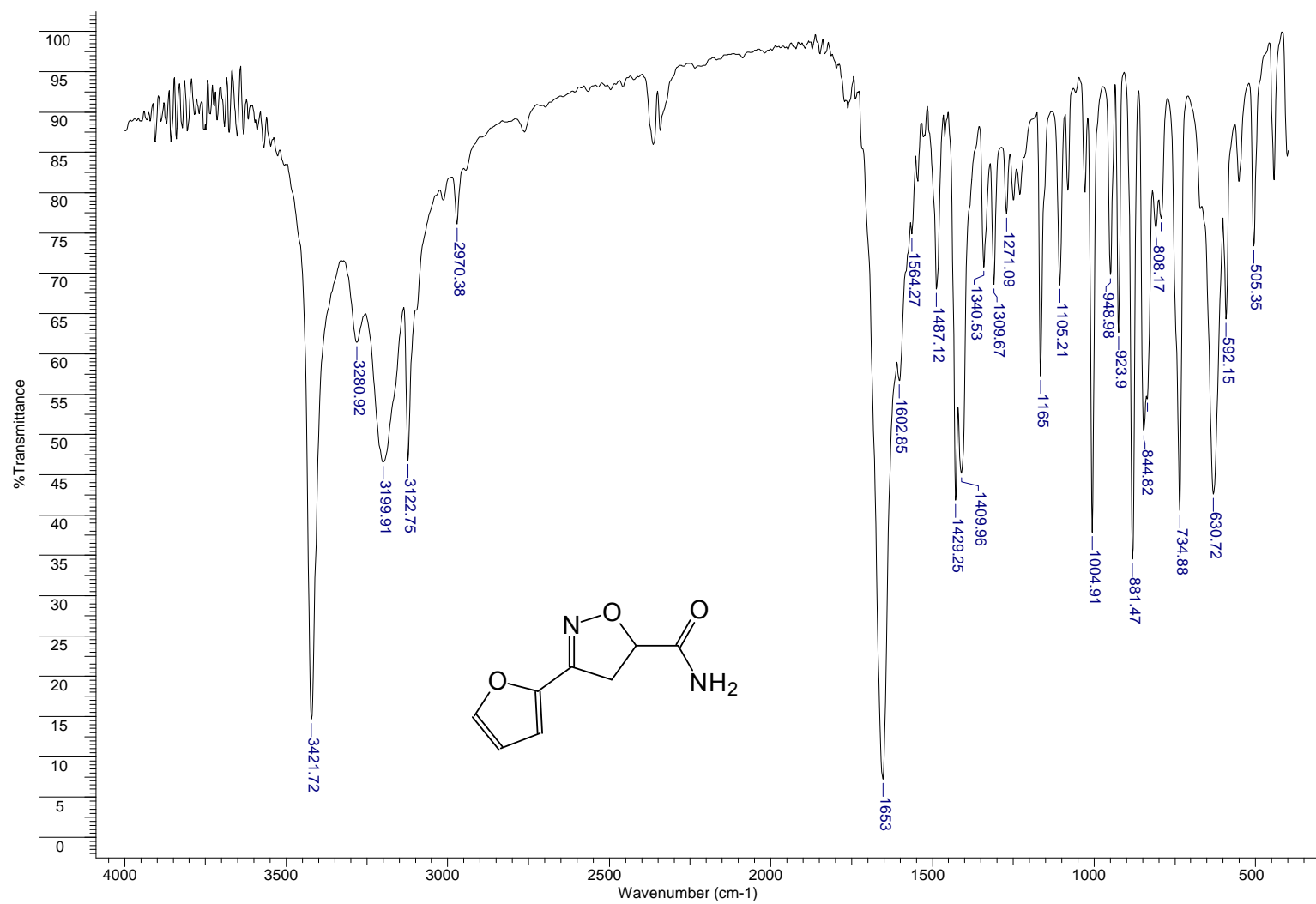


FIG. 7.7 Espectro de Infravermelho do composto 33

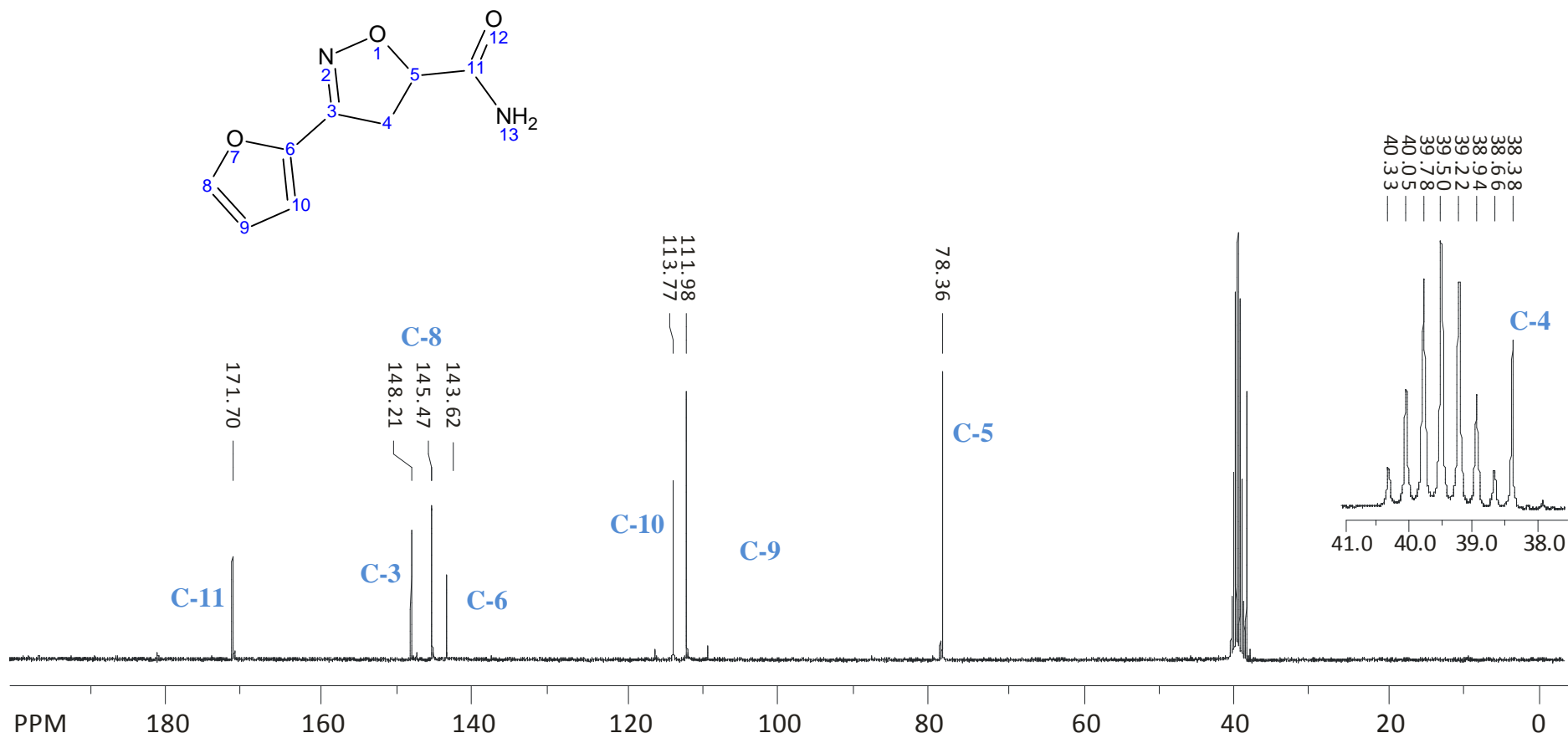


FIG. 7.8 Espectro de RMN ^{13}C do composto 33

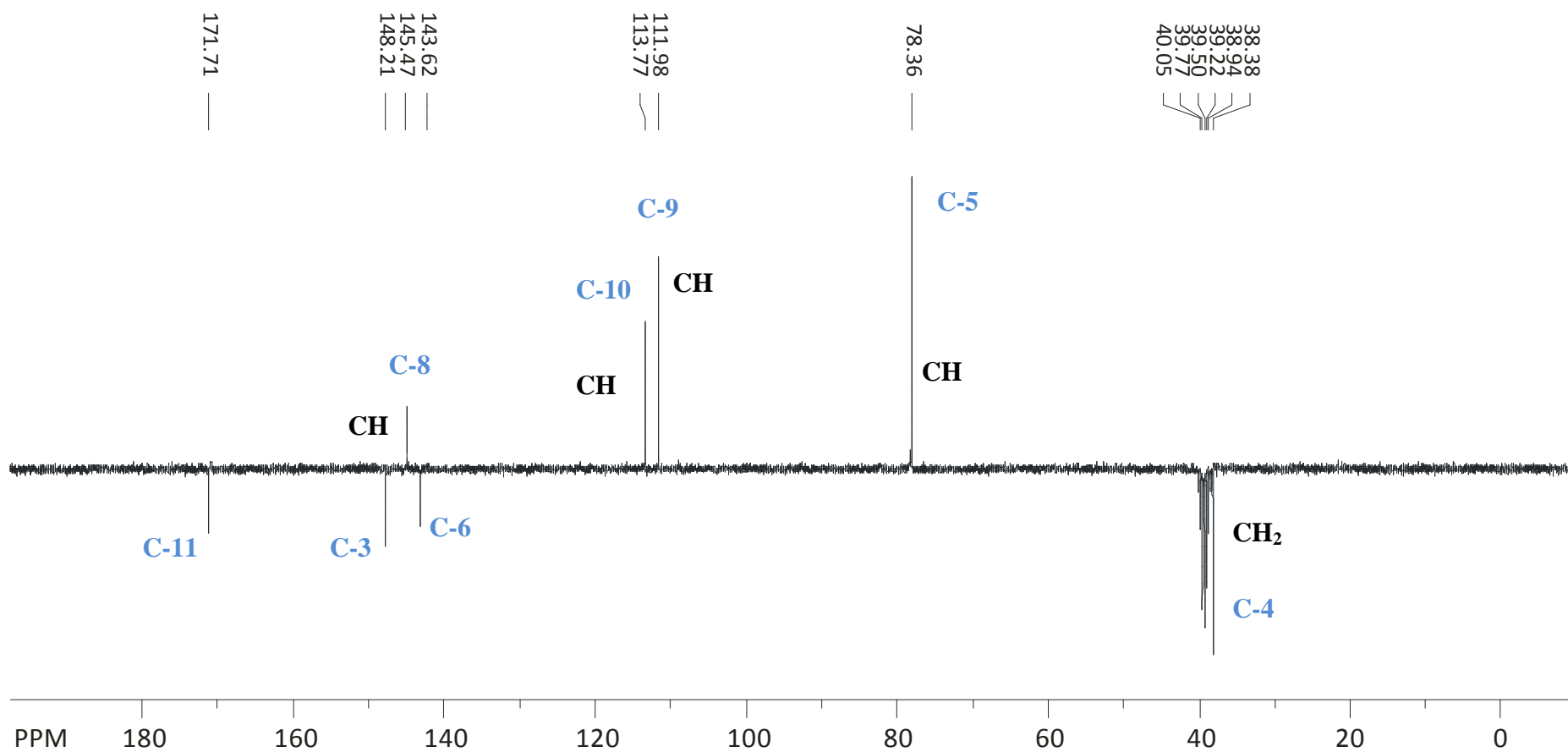


FIG. 7.9 Espectro de RMN ¹³C APT do composto 33

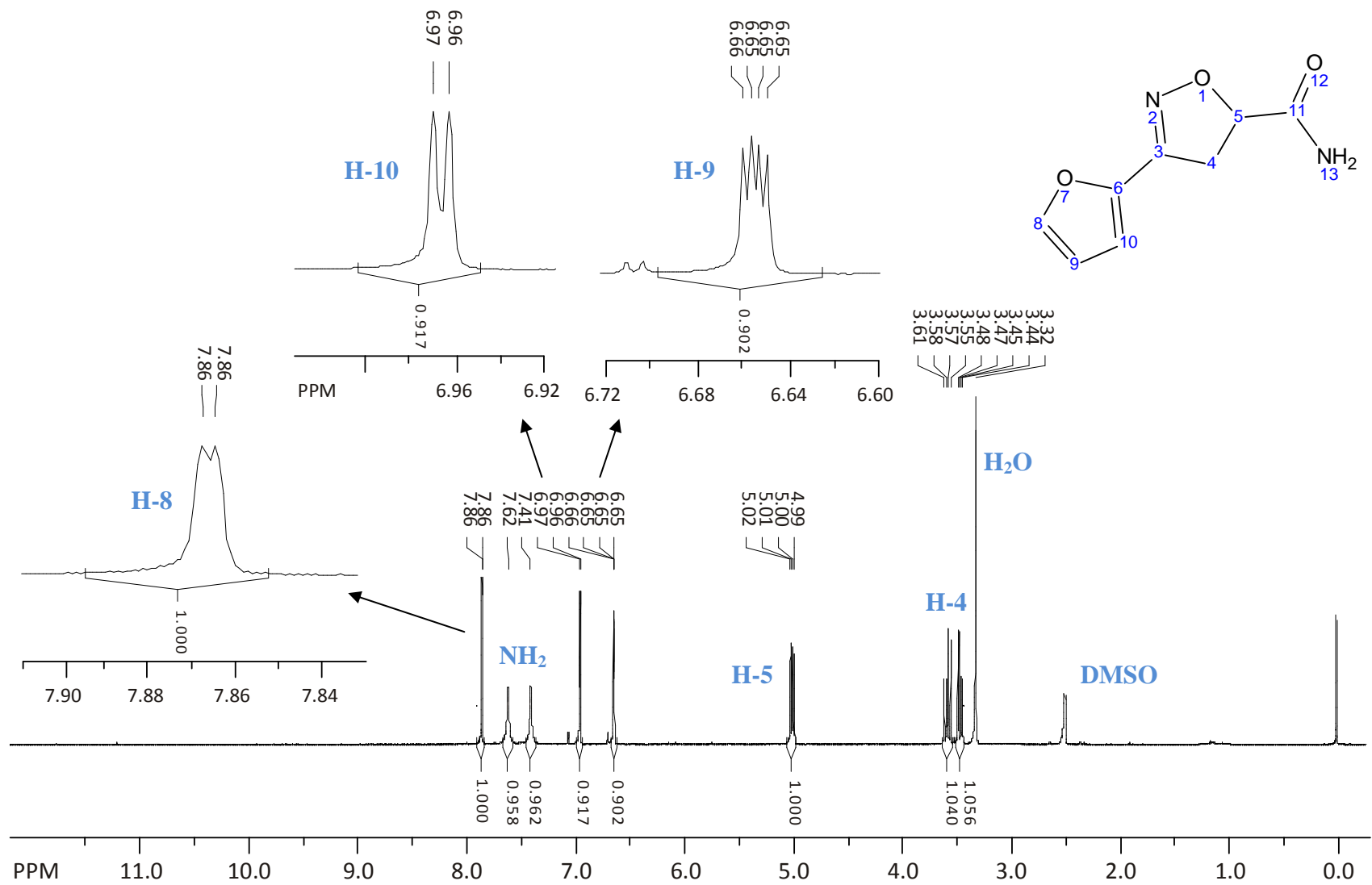


FIG. 7.10 Espectro de RMN ^1H do composto 33

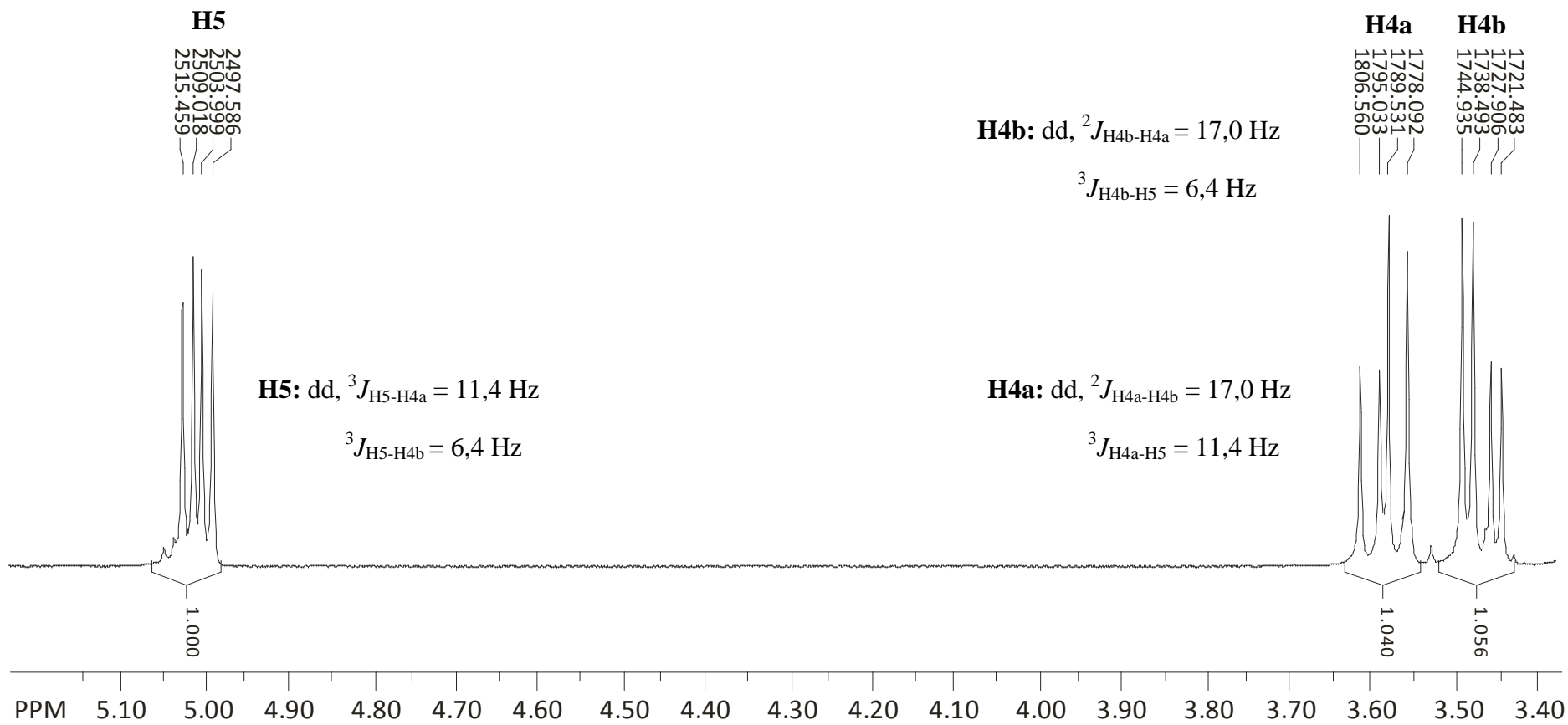


FIG. 7.11 Espectro de RMN ^1H expandido do composto 33

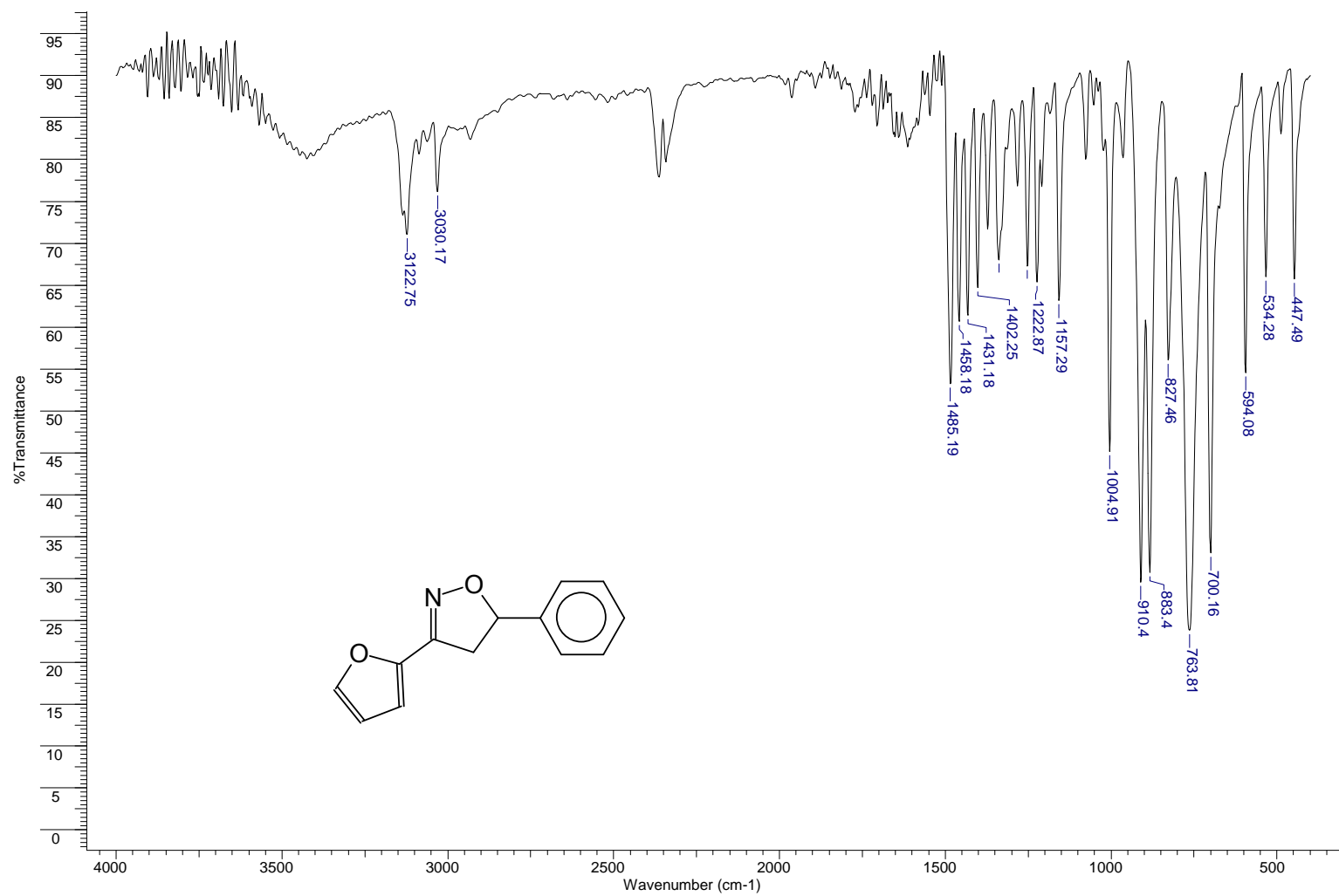


FIG. 7.12 Espectro de Infravermelho do composto 34

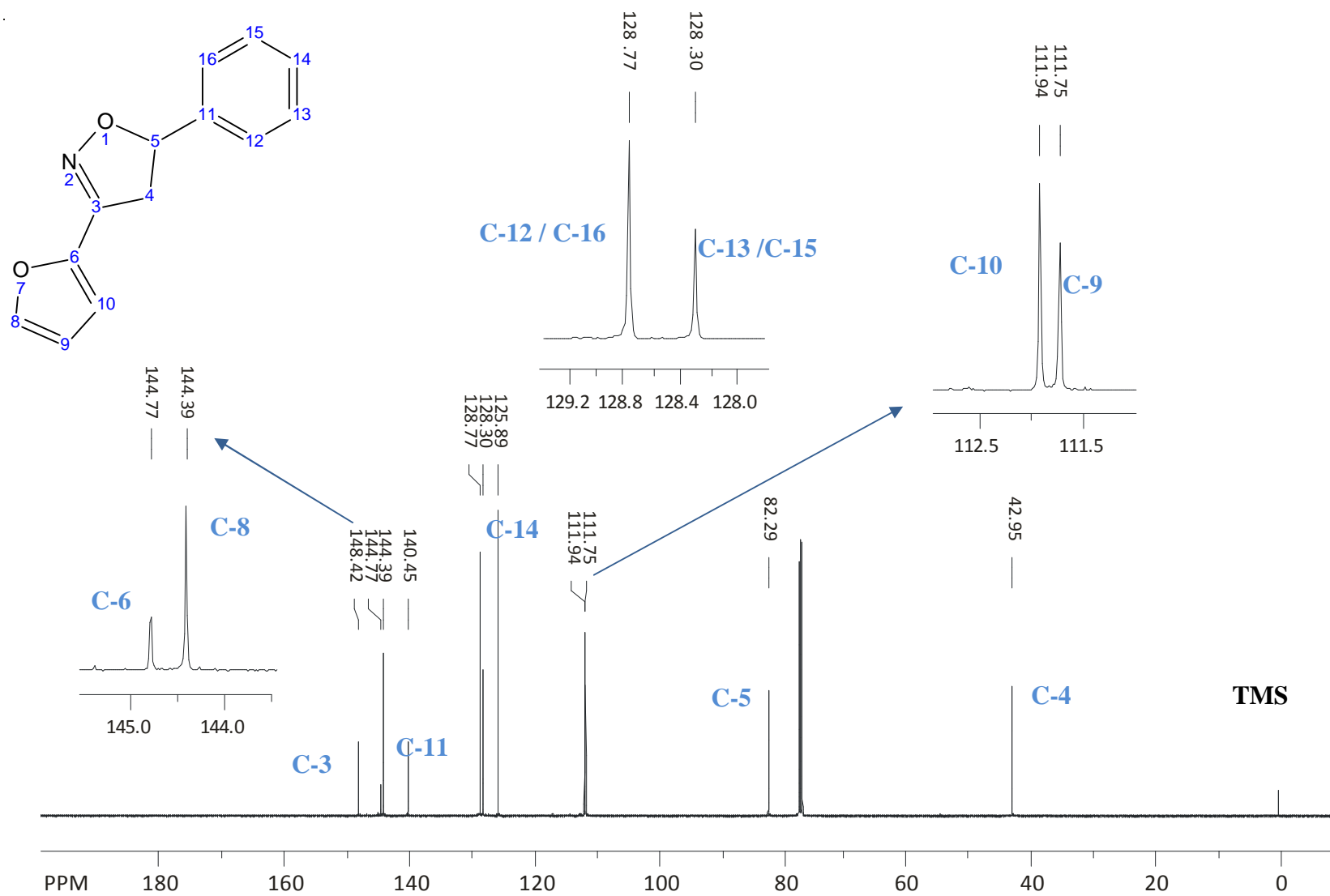


FIG. 7.13 Espectro de RMN ^{13}C do composto 34

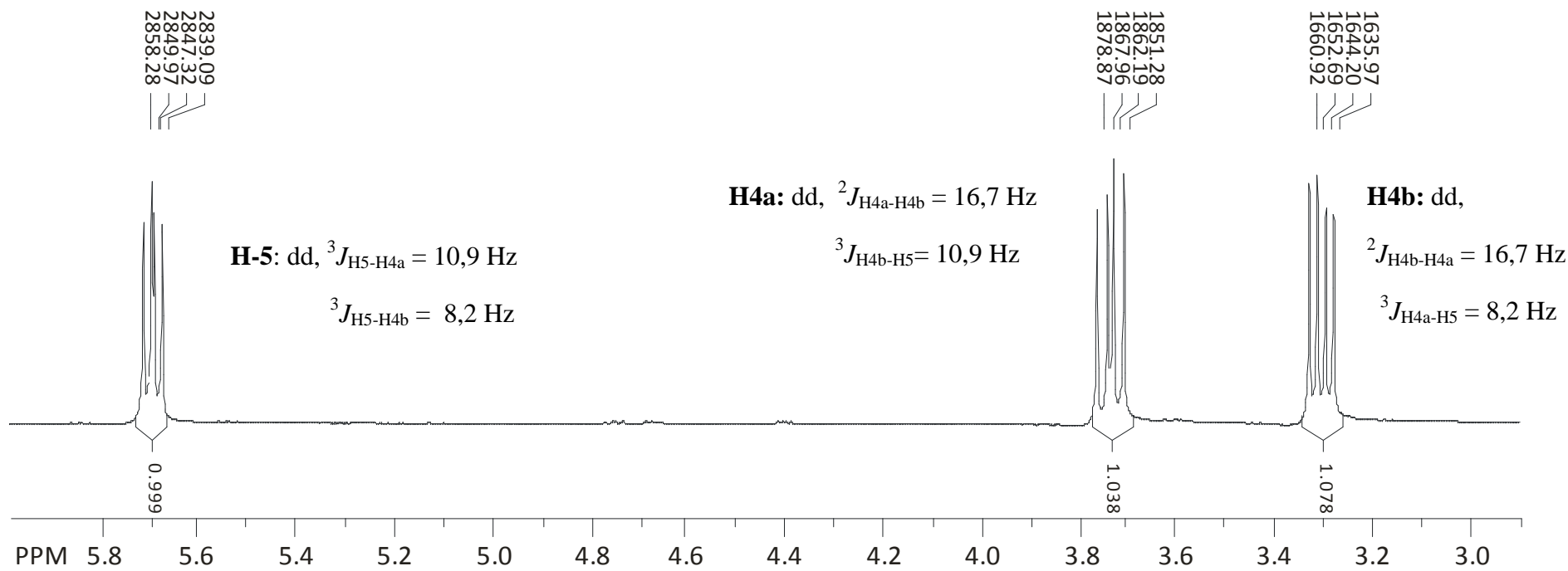


FIG. 7.15 Espectro de RMN ^1H expandido do composto 34

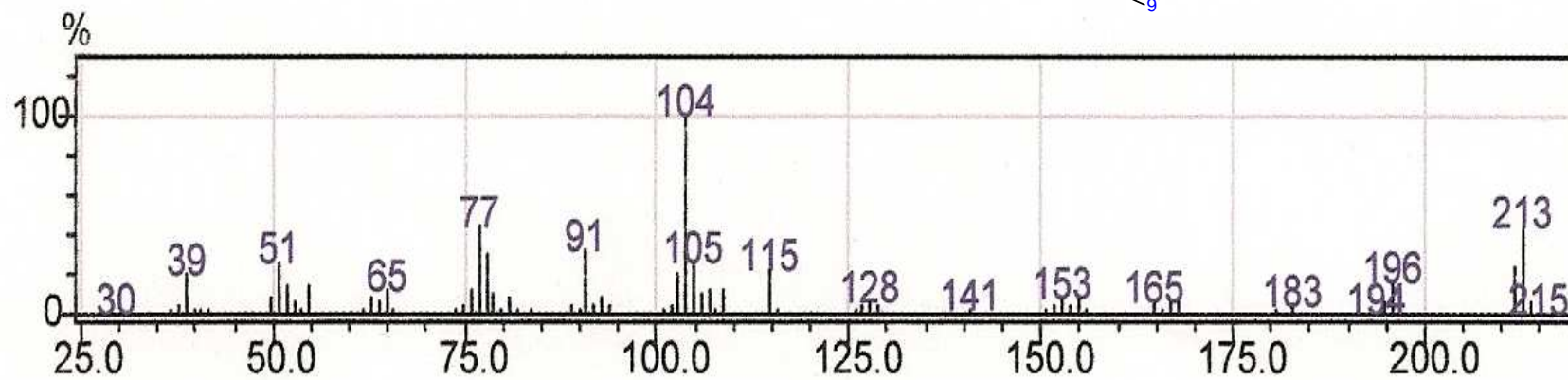
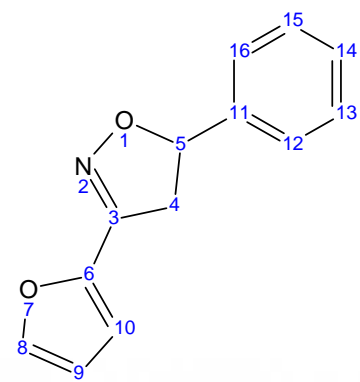


FIG. 7.16 Espectro de massas do composto 34

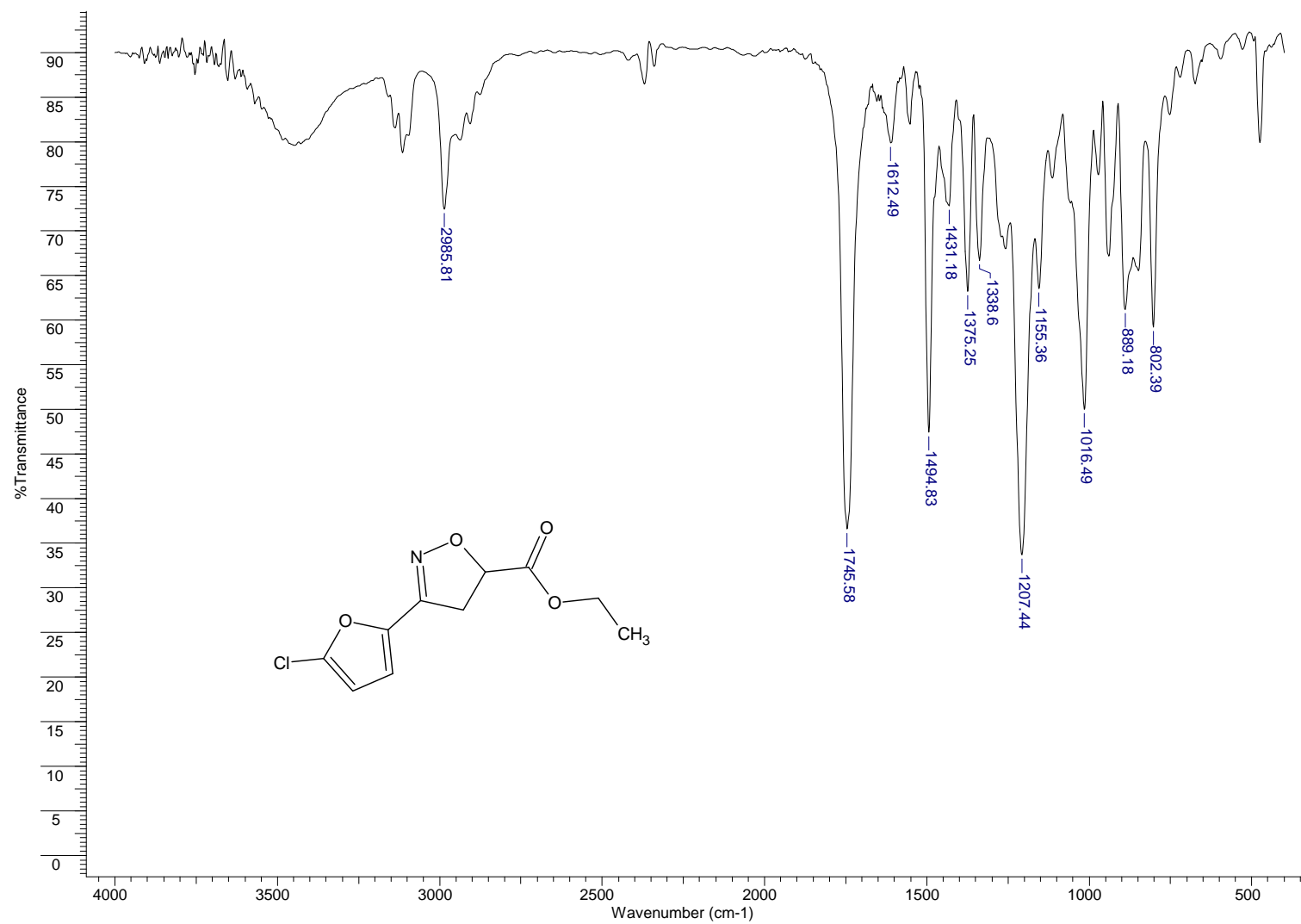


FIG. 7.17 Espectro de Infravermelho do composto 35

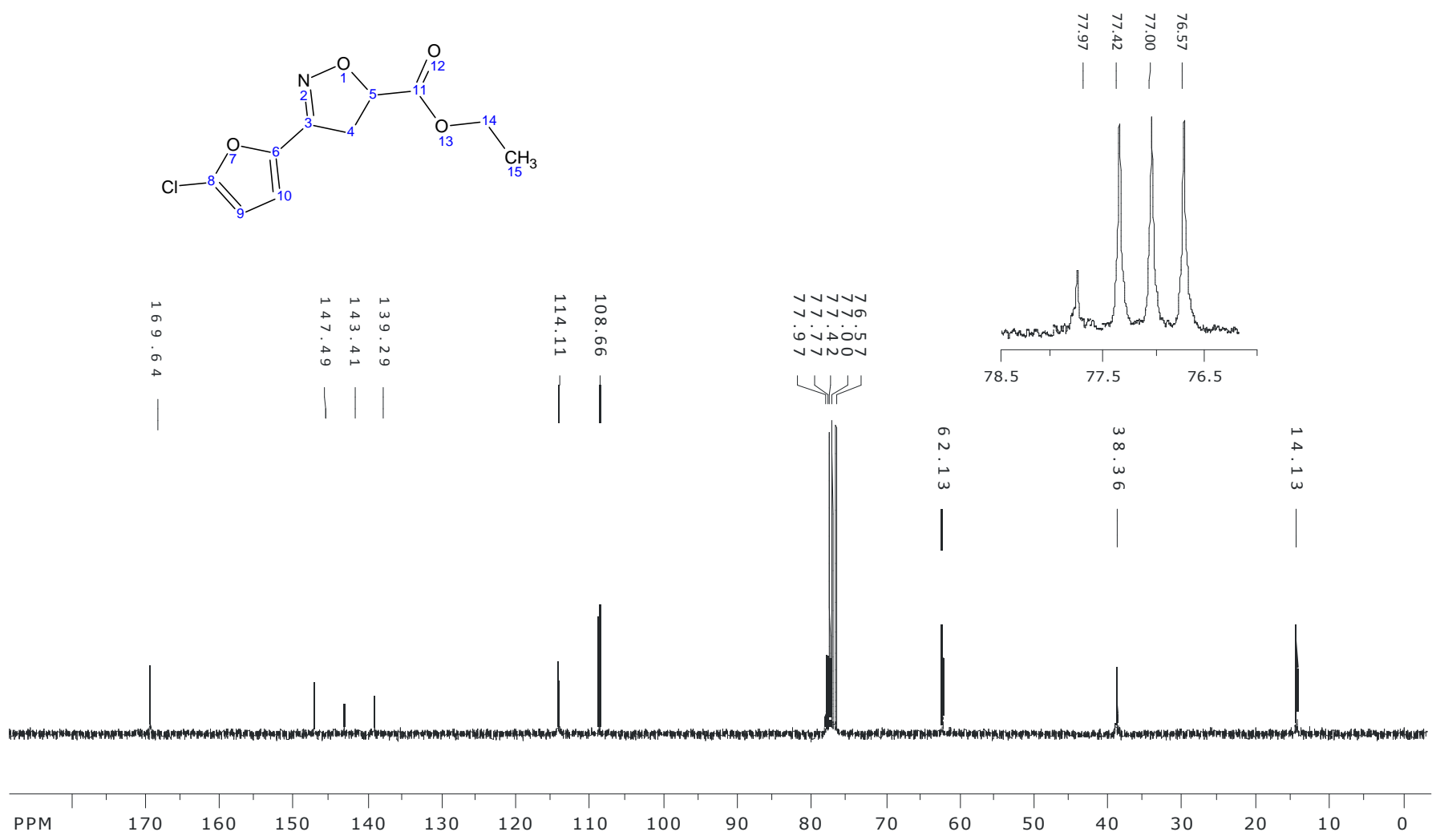


FIG. 7.18 Espectro de RMN ^{13}C do composto 35

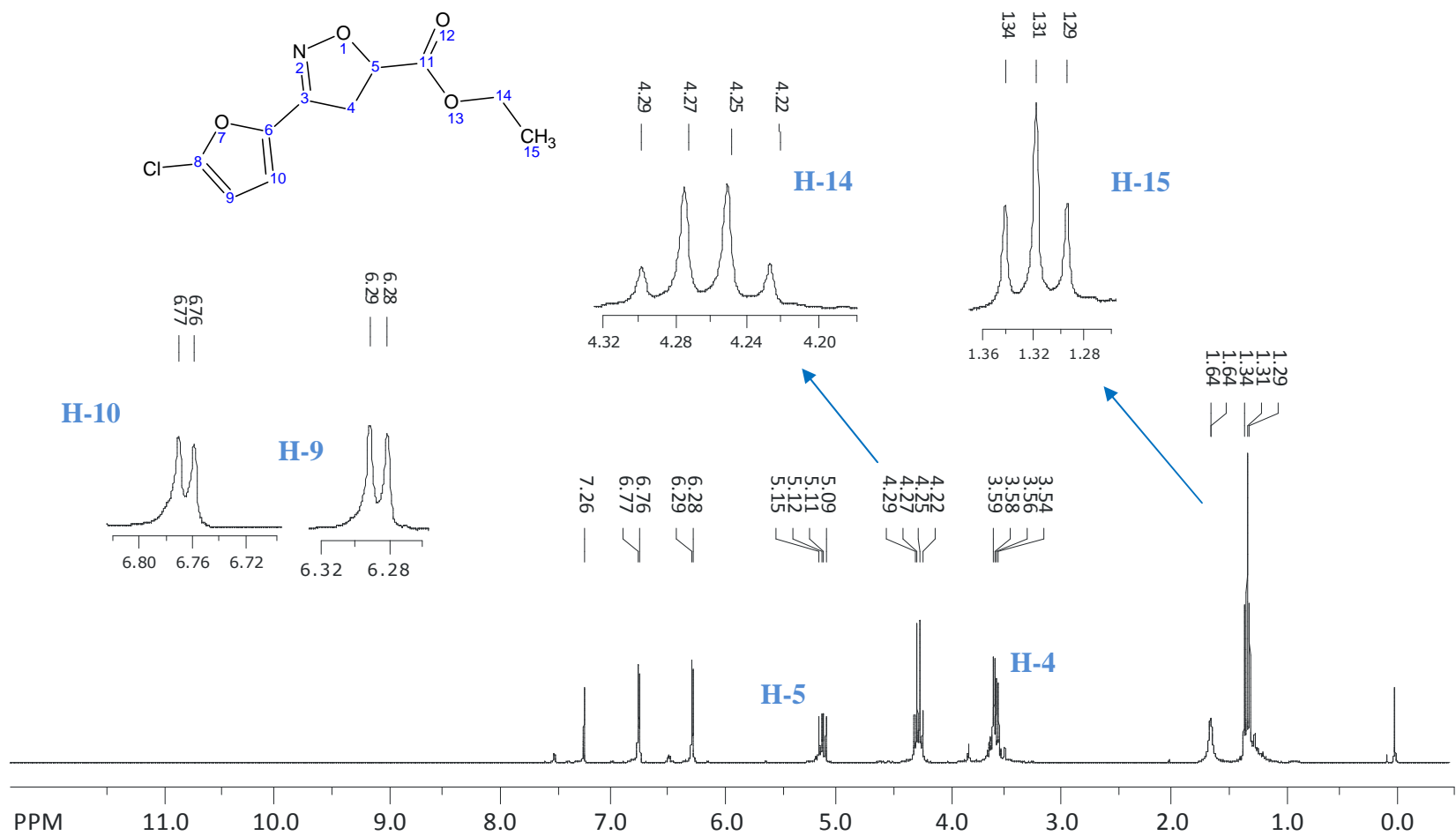


FIG. 7.19 Espectro de RMN ¹H do composto 35

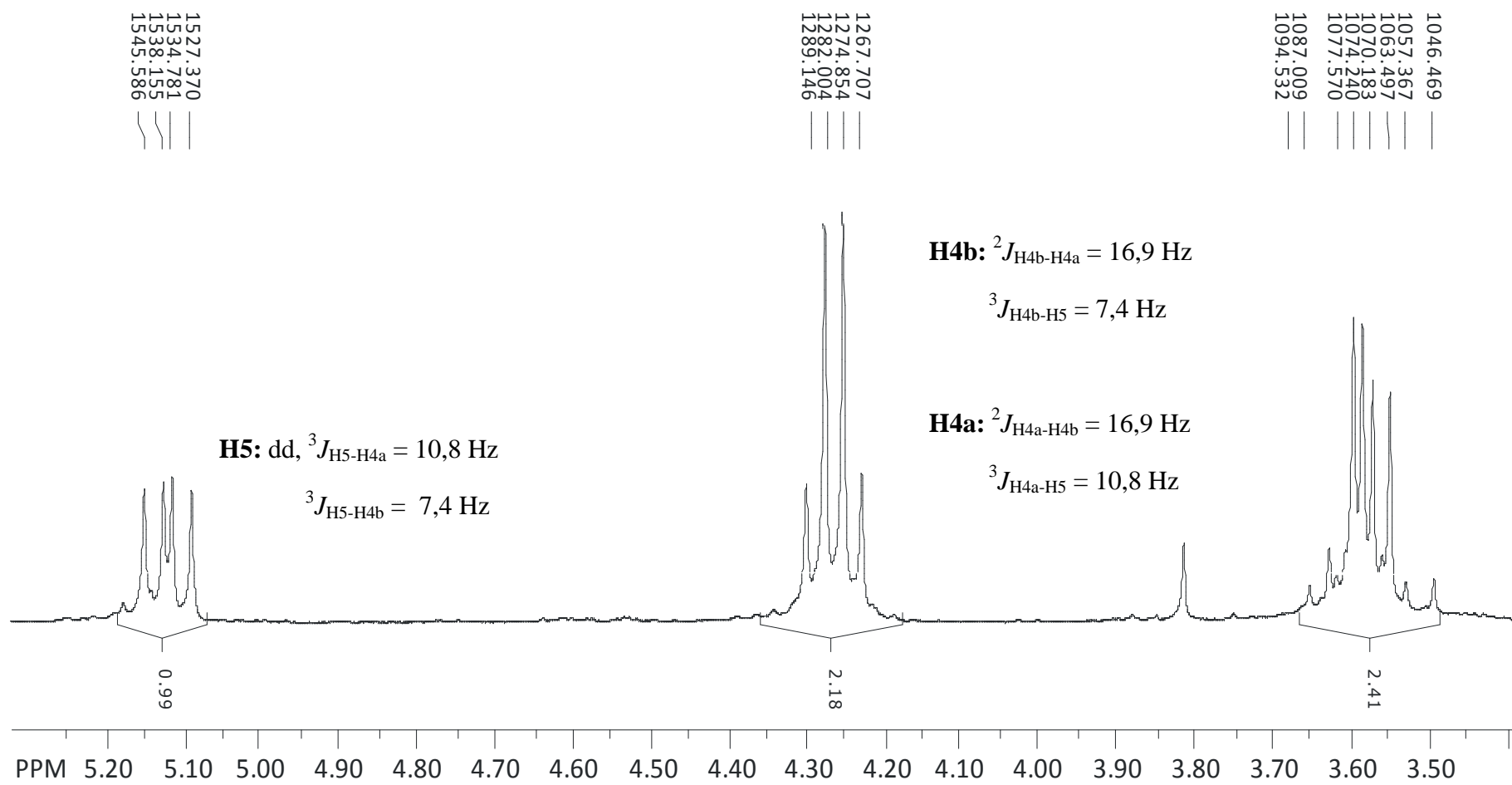


FIG. 7.20 Espectro de RMN ^1H expandido do composto 35

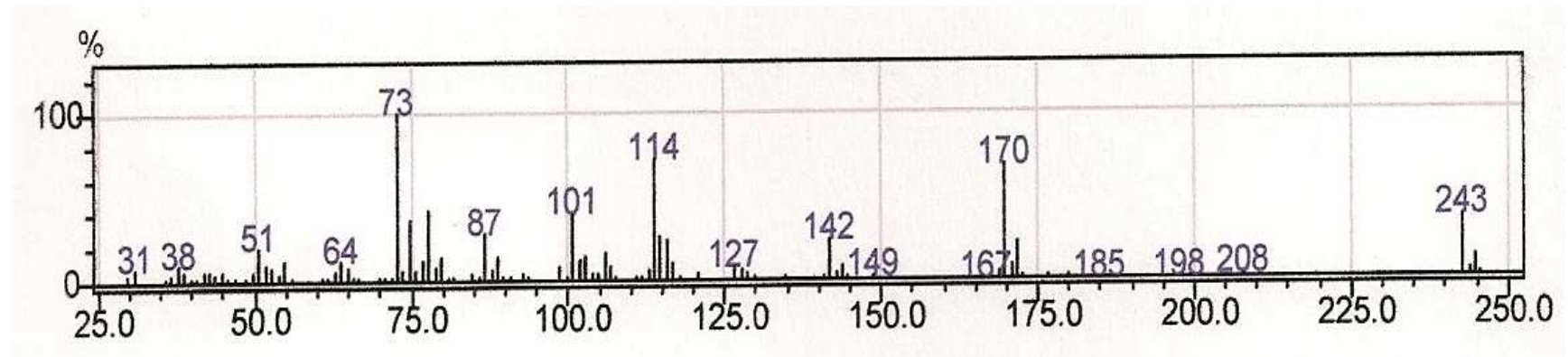
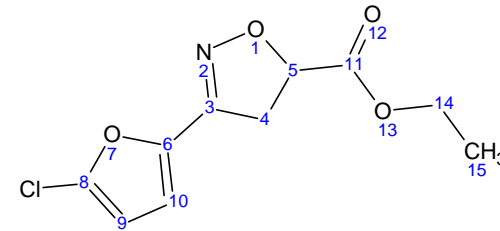


FIG. 7.21 Espectro de massas do composto 35

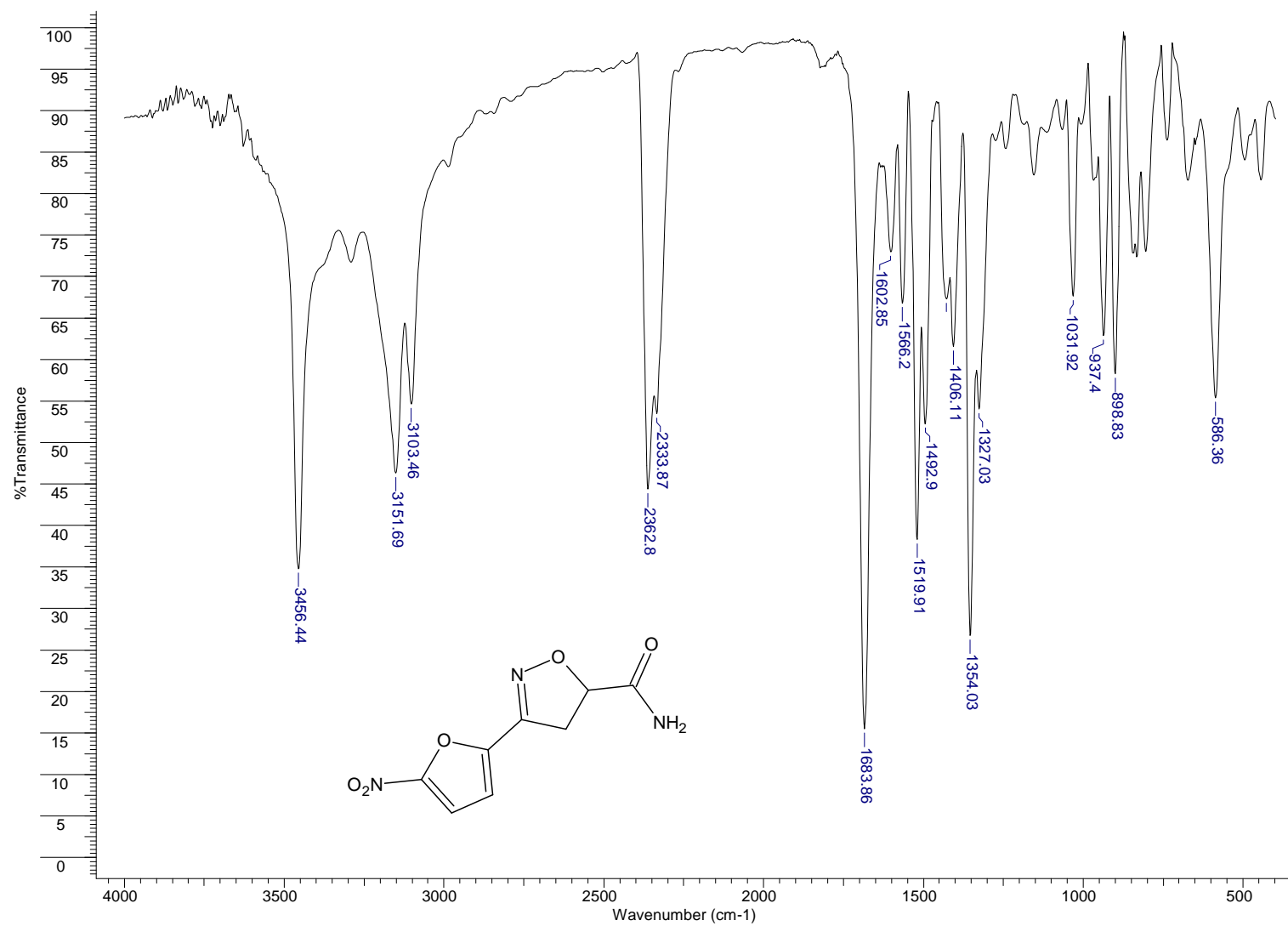


FIG. 7.22 Espectro de Infravermelho do composto 36

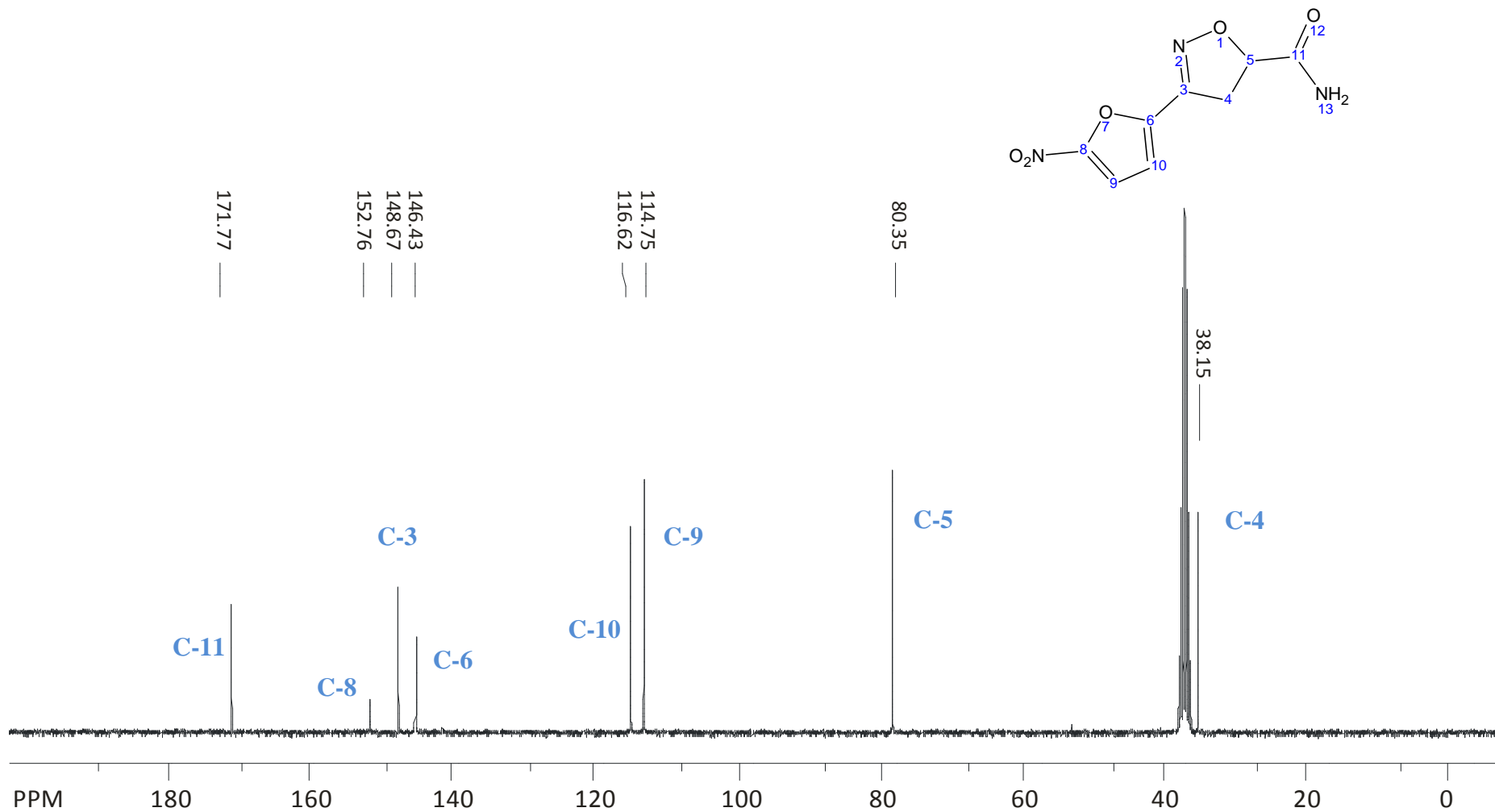


FIG. 7.23 Espectro de RMN ^{13}C do composto 36

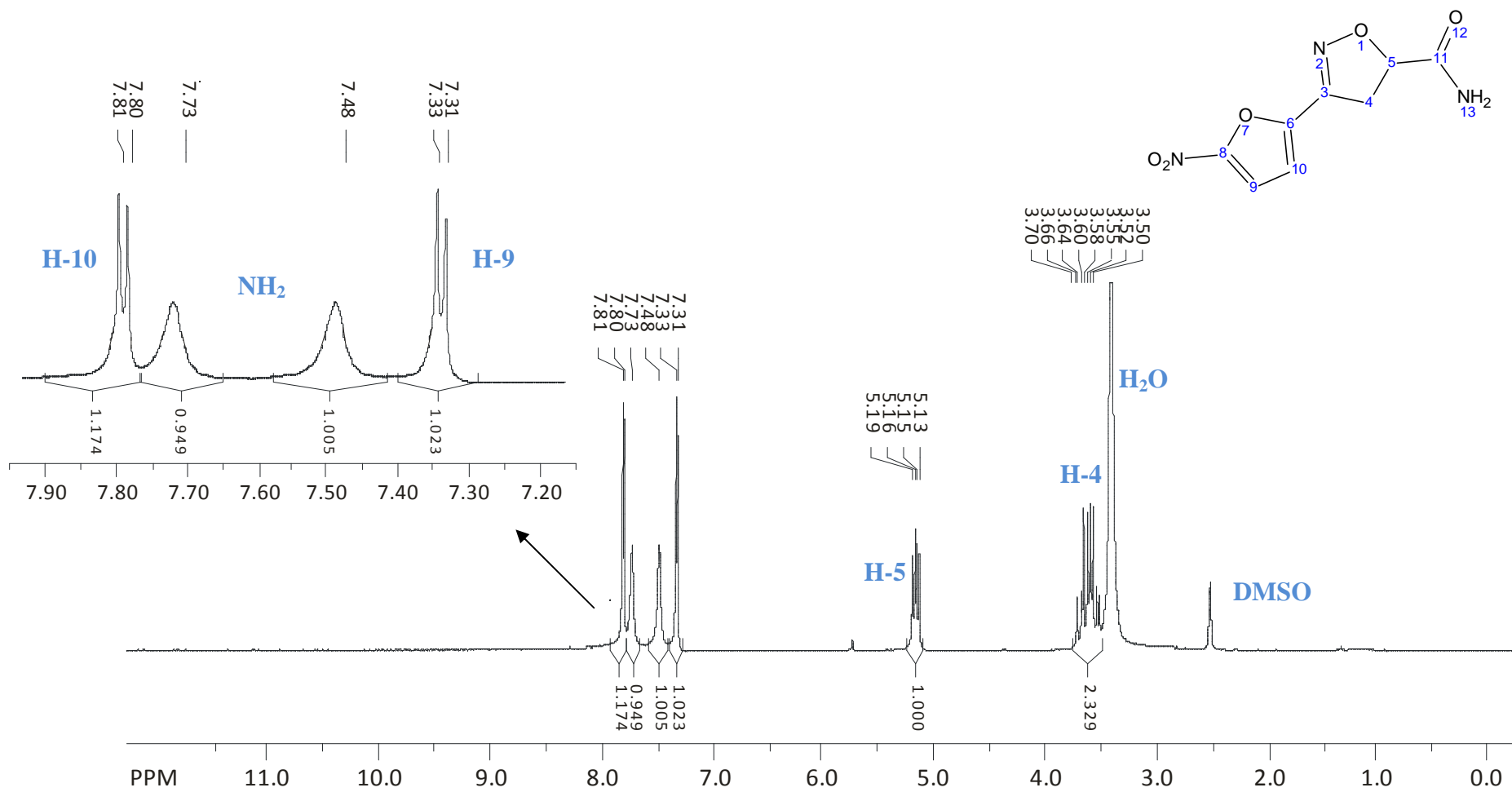


FIG. 7.24 Espectro de RMN ^1H do composto 36

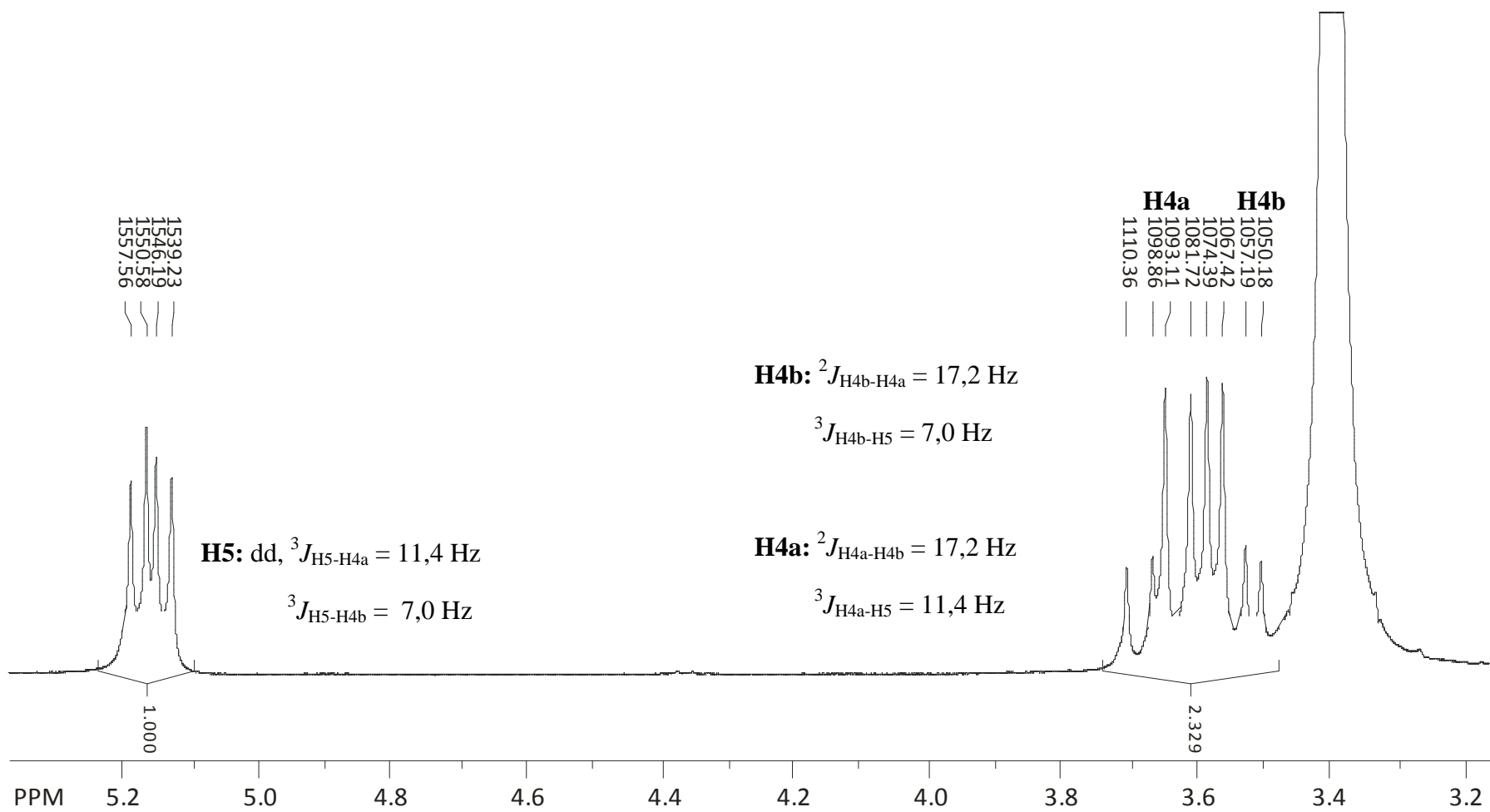


FIG. 7.25 Espectro de RMN ^1H expandido composto 36

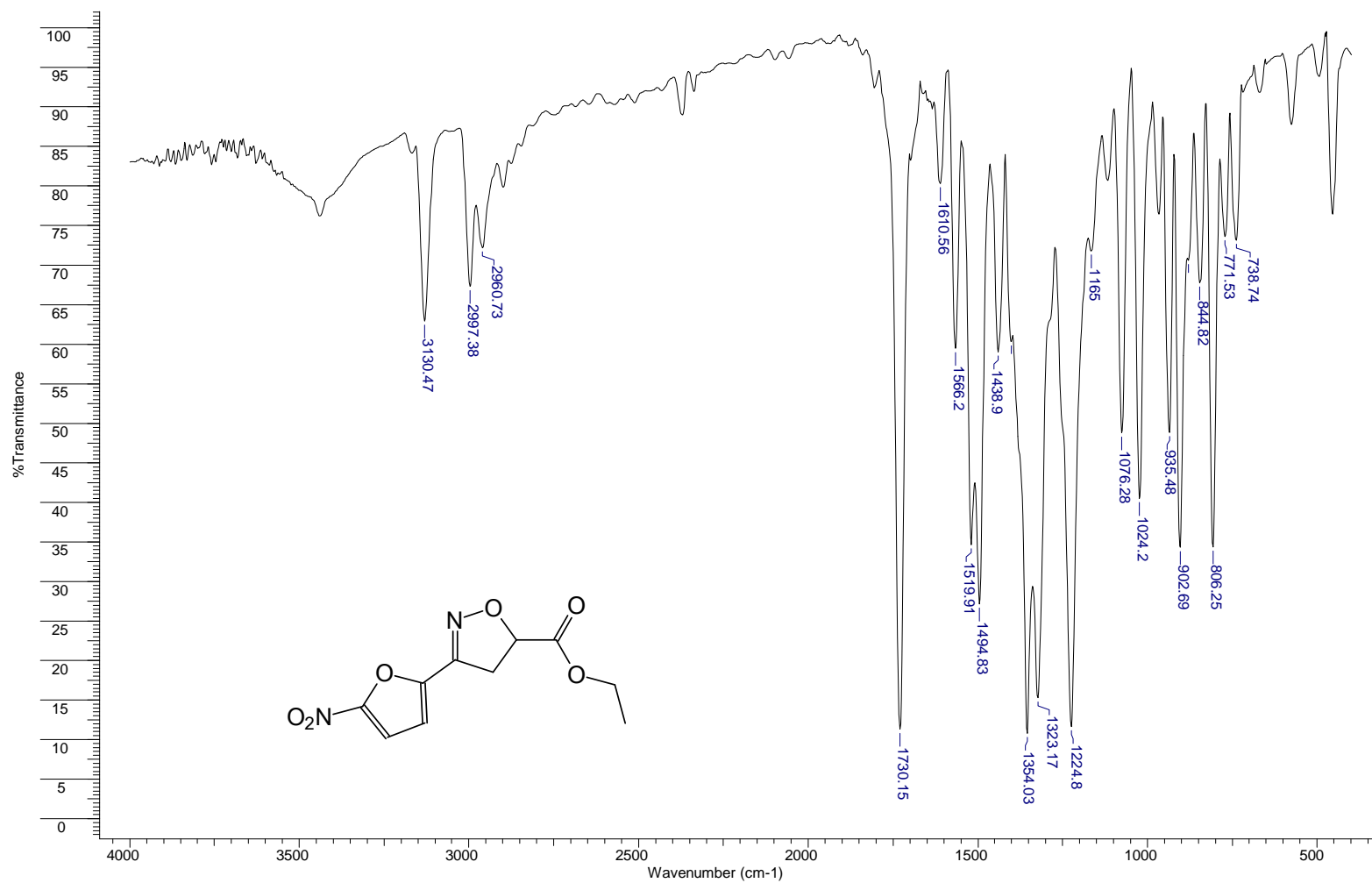


FIG. 7.26 Espectro de Infravermelho do composto 37

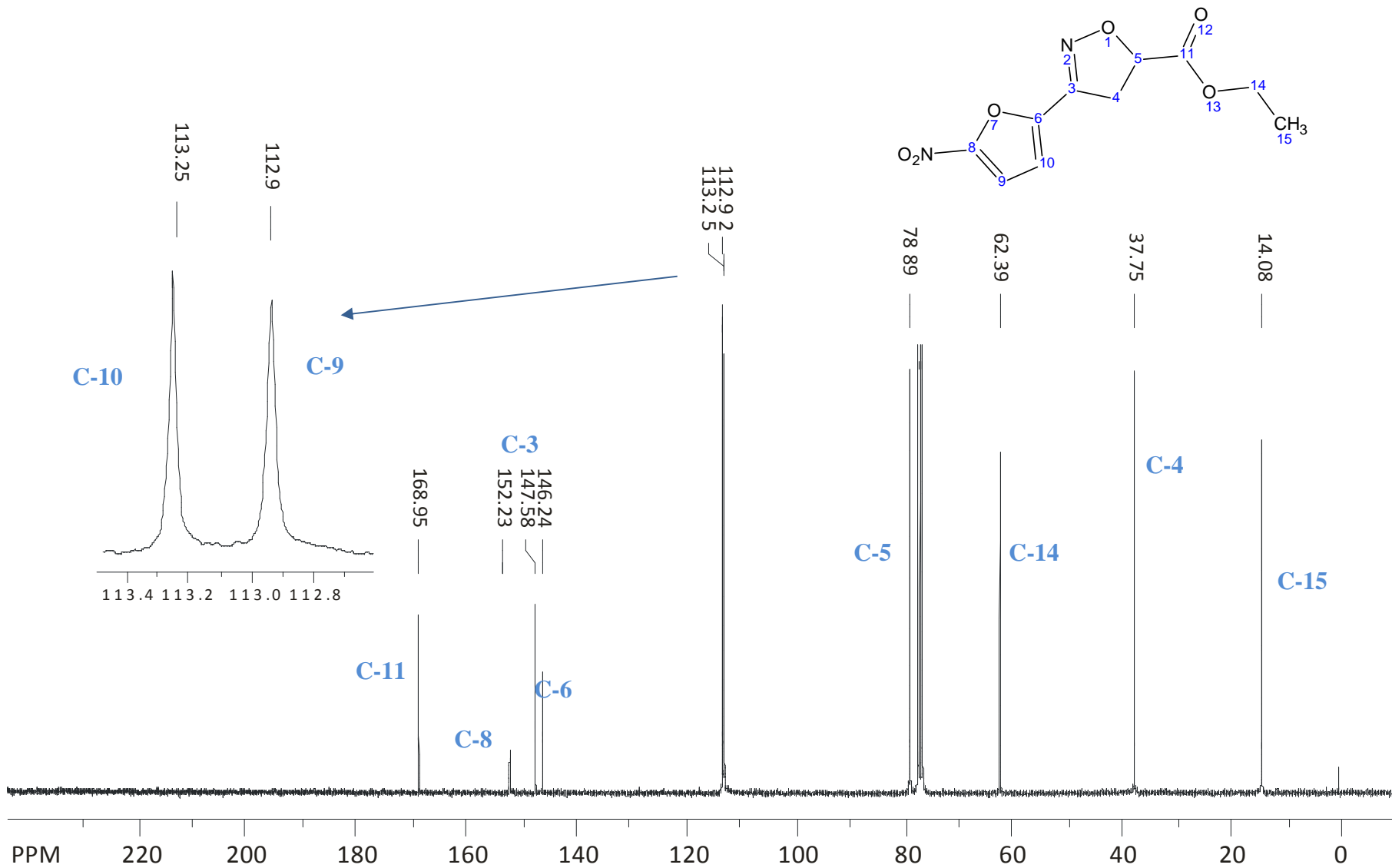


FIG. 7.27 Espectro de RMN ^{13}C do composto 37

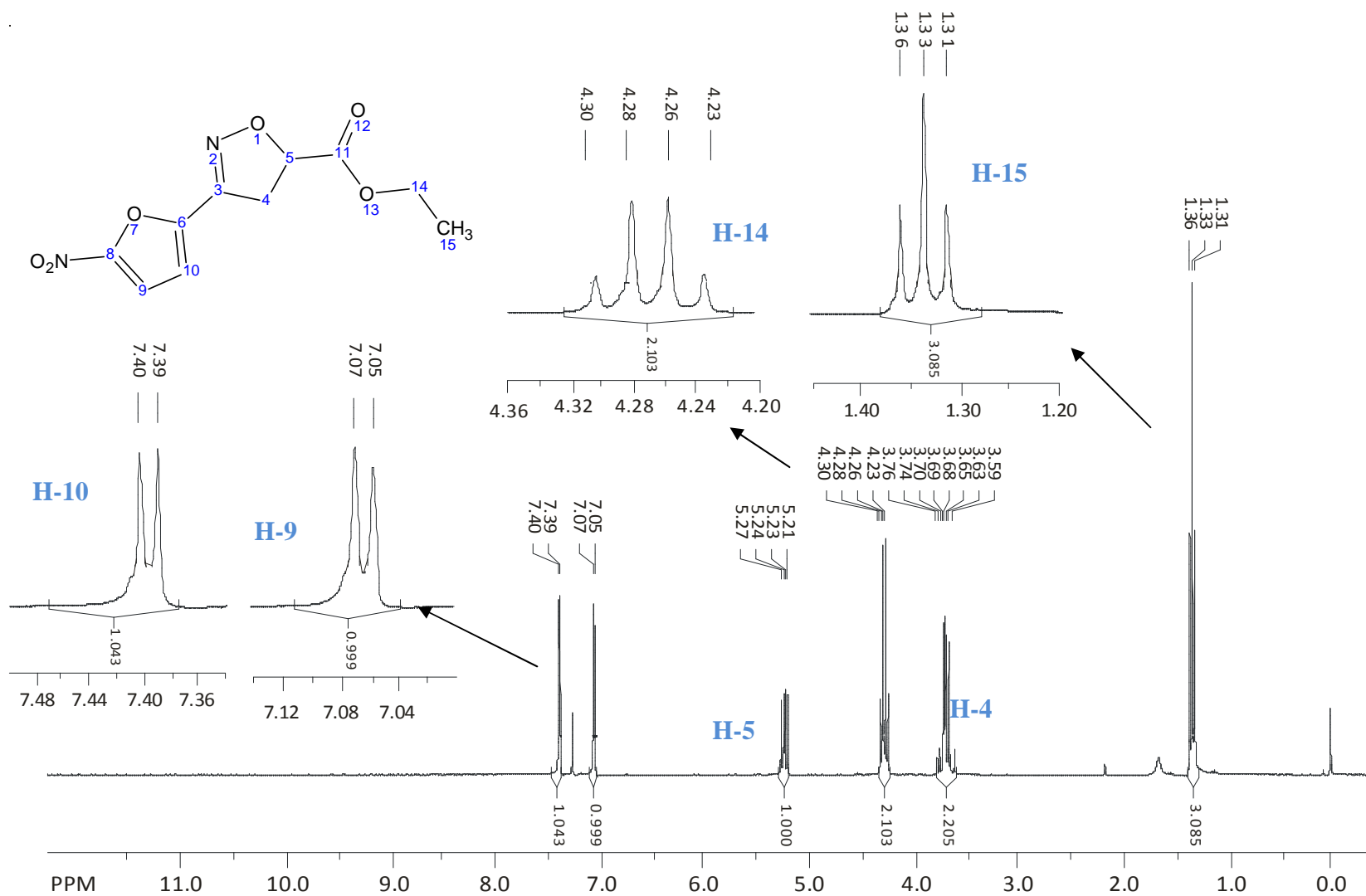


FIG. 7.28 Espectro de RMN ^1H do composto 37

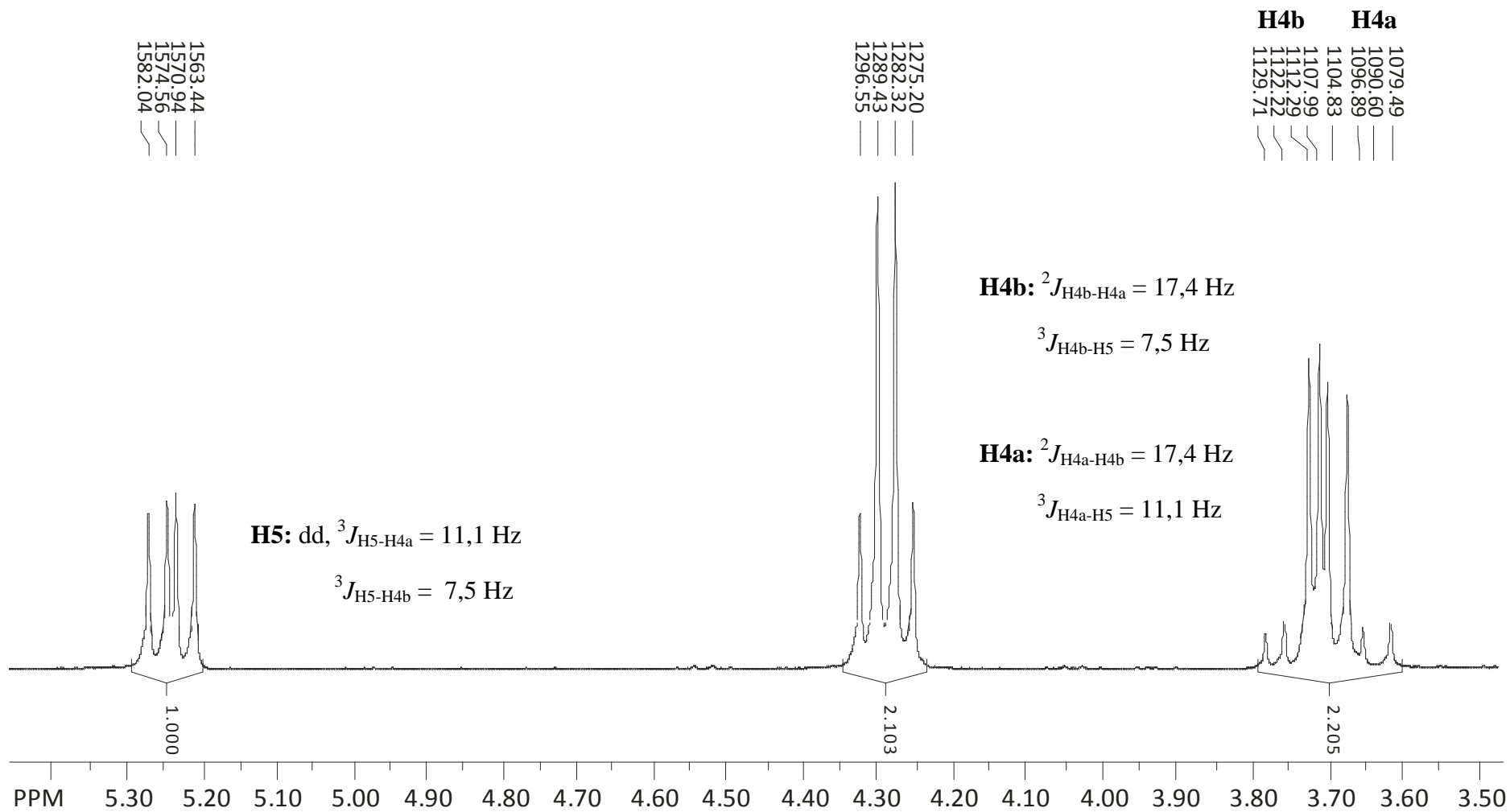


FIG. 7.29 Espectro de RMN ^1H expandido do composto 37

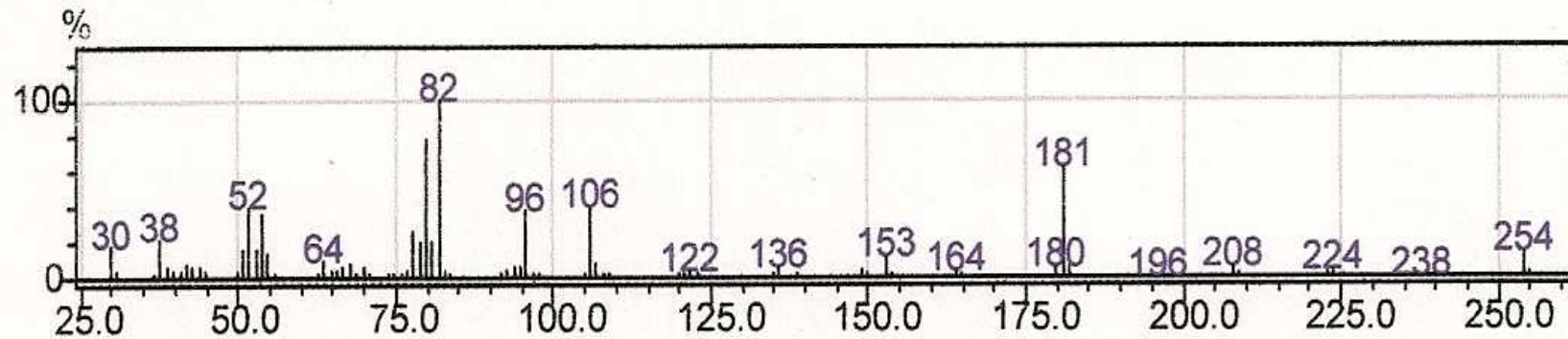
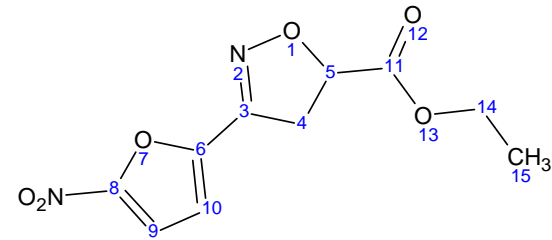


FIG. 7.30 Espectro de massas do composto 37

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)