

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

LUIZ AUGUSTUS GONÇALVES NEVES

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE DERIVADOS DE
3-ETOXICARBONIL-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

LUIZ AUGUSTUS GONÇALVES NEVES

SÍNTESE E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE DERIVADOS DE

3-ETOXICARBONIL-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: Prof. Alcino Palermo de Aguiar – D. Sc.

Rio de Janeiro

2010

C 2010

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, microfilmар 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 a referência bibliográfica completa.

Os conceitos expressos neste trabalho são de responsabilidade do autor e dos orientadores.

547.6 Neves, Luiz Augustus Gonçalves

N518 Síntese e avaliação biológica de derivados de 3-etoxicarbonil-4,5-diidro-isoxazóis/ Luiz Augustus Gonçalves Neves. – Rio de Janeiro: Instituto Militar de Engenharia, 2010.

135p:il

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

1. 4,5 –diidro-isoxazóis

2. Bioatividade

CDD 547.6

INSTITUTO MILITAR DE ENGENHARIA

LUIZ AUGUSTUS GONÇALVES NEVES

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE DERIVADOS DE
3-ETOXICARBONIL-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: Prof. Alcino Palermo de Aguiar – D. Sc.

Aprovada em 28 de Abril de 2010 pela seguinte Banca Examinadora:

Professor Alcino Palermo de Aguiar – D. Sc. do IME – Presidente

Professor José Daniel Figueroa-Villar – Ph.D. do IME

Professor Joaquim Fernando Mendes Silva – D. Sc. da UFRJ

Rio de Janeiro

2010

À minha família

AGRADECIMENTOS

A Deus, pois sem ele nada seria possível.

À minha família, pelo apoio e carinho.

À minha mãe Ednéa, razão da minha vida, por tudo que sou hoje.

Ao meu pai, Paulo, pelo carinho, apoio e incentivo.

Ao meu primo Roberto, pelo apoio, carinho e por todas as trocas de idéias.

Aos meus amigos Edvânia, Eduardo, Thiago e Marcelo pelos bons momentos de descontração.

Aos meus afilhados, Bruna e Charlys, por entenderem o sumiço do padrinho deles.

Aos meus irmãos Maria Emília, Carol, Clara, Guilherme e Júnior, e à minha madrastra, Regina, pela louca alegria dos momentos em família.

Ao Instituto Militar de Engenharia pela oportunidade de desenvolver este trabalho.

Ao Professor Alcino Palermo de Aguiar pela orientação, ensinamentos e amizade durante esta trajetória.

Aos Professores José Daniel Figueroa e Cap. Tanos França pelo apoio, incentivo e contribuições durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu amigo e parceiro de congressos, Luciano, pela ajuda e incentivo nos momentos mais difíceis dessa trajetória.

À minha amiga Edvânia, minha irmã do coração, pela amizade e por me ajudar nos momentos mais difíceis da minha vida.

À minha amiga Jacqueline, pelo companheirismo nas disciplinas cursadas e pela ajuda com a parte de bioatividade.

À minha amiga Luiza, por sua dedicação e apoio, sem a qual não teria concluído este trabalho.

Ao meu amigo Zânio, por suas opiniões sinceras e orientação dentro do laboratório.

À minha amiga Gisélia pelos conselhos e almoços sempre divertidos.

Aos amigos Giseli e Barcellos, pelo incentivo que me deram durante esse período.

Ao amigo Marcelo, por todo o apoio prestado nessa caminhada e por sua amizade.

Aos colegas de laboratório, Gabriela, Rodrigo e Daniela, pela ajuda, amizade e agradável convivência.

À Alessandra pela amizade e análises de RMN e FT-IR.

Aos amigos da FIOCRUZ Érica, Eliane e Charles pelo incentivo e análises sempre urgentes de RMN.

Aos colegas de Pós-graduação Coutinho, Andréia e Juliana pelo companheirismo e troca de idéias durante esta jornada.

A todo corpo docente do Departamento de Química e do Programa de Pós-graduação do IME, que de alguma forma colaborou para meu aprendizado e elaboração deste trabalho.

Ao professor Joaquim Fernando (UFRJ) que gentilmente aceitou o convite para compor tanto a banca da proposta de dissertação quanto da defesa final.

Ao Professor Carlos Riehl (UFRJ) e à Priscila, pelos espectros de CG-MS realizados.

Aos funcionários da Farmanguinhos/FIOCRUZ Rafael e Shirley, pelos espectros de CG-MS realizados

Ao grupo de pesquisa da Professora Judith Felcman (PUC) pelas análises elementares (CHN).

Aos funcionários do departamento de química, Gil, Resende, Avanilson, Valente, Correia e Osmaura pela atenção e ajuda nos trâmites burocráticos, e no mais que fosse necessário.

Aos membros da banca de dissertação, pelas considerações e sugestões realizadas.

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

Muito obrigado!

“O que sabemos é uma gota; o que ignoramos é um oceano.”

(Isaac Newton)

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	11
LISTA DE TABELAS.....	14
LISTA DE SIGLAS	16
1 INTRODUÇÃO.....	20
1.1 Métodos para obtenção do óxido de nitrila	21
1.1.1 Formação de óxidos de nitrila por desidrogenação de nitro-compostos	21
1.1.2 Formação de óxidos de nitrila por oxidações de aldoximas.....	24
1.1.3 Formação de óxido de nitrila partindo de glicina.....	31
1.2 Formação de 4,5-diidro-isoxazóis por ciclo-adição 1,3-dipolar	33
1.3 Derivados de 3-etoxicarbonil-4,5-diidro-isoxazóis.....	35
1.4 Objetivo	37
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
2.1 Reagentes e solventes	39
2.2 Equipamentos	40
2.3 Metodologia de síntese dos compostos.....	40
2.3.1 Esterificação da glicina	40
2.3.2 Síntese do cloreto de imidoíla.....	40
2.3.3 Síntese dos derivados de 3-etoxicarbonil-4,5-diidro-isoxazóis – SÉRIE I.....	41
2.3.4 Funcionalização do radical éster – SÉRIE II.....	42
2.4 Caracterização dos compostos sintetizados.....	43
2.4.1 Cromatografia gasosa.....	43
2.4.2 Espectrometria de massas	44
2.4.3 Espectroscopia de infravermelho.....	44
2.4.4 Ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono	44
2.5 Ensaio microbiológico dos derivados isoxazolínicos.....	44
2.5.1 Preparo do meio de cultura.....	45
2.5.2 Preparo do inoculo.....	45
2.5.3 Preparo das soluções-mãe dos derivados.....	45
2.5.4 Bioensaio em microplacas pelo método colorimétrico	45

3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
3.1	Síntese dos derivados isoxazolínicos	47
3.1.1	Síntese do óxido de carbetóxi-formonitrila	48
3.1.2	Síntese dos derivados de 3-etoxicarbonil-4,5-diidro-isoxazóis – série I.....	50
3.1.2.1	Síntese de 3-etoxicarbonil-5-fenil -4,5-diidro-isoxazol (I-1a)	51
3.1.2.2	Síntese de 3,5-dietoxicarbonil-4,5-diidro-isoxazol (I-2a)	57
3.1.2.3	Síntese de 3-etoxicarbonil-5-metil-5-metoxicarbonil-4,5-diidro-isoxazol (I-3a)...	60
3.1.2.4	Síntese de 3-etoxicarbonil-5-bromometil-4,5-diidro-isoxazol (I-4a)	63
3.1.2.5	Síntese de 3-etoxicarbonil-5-ciano-4,5-diidro-isoxazol (I-5a)	67
3.1.2.6	Síntese de 3-etoxicarbonil-5-hidroximetil-4,5-diidro-isoxazol (I-6a)	70
3.1.3	Funcionalização dos grupos ésteres - série II	73
3.1.3.1	Síntese do 5-fenil-3-carboidrazida-4,5-diidro-isoxazol (II-1b)	74
3.1.3.2	Síntese do 3,5-dicarboidrazida-4,5-diidro-isoxazol (II-2b)	77
3.1.3.3	Síntese do ácido 5-fenil-3-carbóxi-hidroxâmico-4,5-diidro-isoxazol (II-1c).....	79
3.1.3.4	Síntese do ácido 3,5-dicarbóxi-hidroxâmico-4,5-diidro-isoxazol (II-2c)	82
3.2	Teste da atividade biológica	85
3.2.1	Bioensaio em microplacas pelo método colorimétrico	85
4	CONCLUSÃO	89
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90
6	APÊNDICES	97

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIG 1.1	Exemplos de 4,5-diidro-isoxazóis com atividade biológica	19
FIG 1.2	Formação de óxido de nitrila por nitro-compostos com isocianato	20
FIG 1.3	Reação de nitro-alquenos e posterior formação de 4,5-diidro-isoxazóis	21
FIG 1.4	Produção de óxido de nitrila <i>in situ</i> a partir de nitro-alcanos e obtenção de isoxazóis(13)	22
FIG 1.5	Síntese de 4,5-diidro-isoxazóis empregando nitro-alcanos e diaminas terciárias	22
FIG 1.6	Obtenção de cloreto de imidoíla empregando cloreto de alumínio	23
FIG 1.7	Mecanismo para a formação de aldoximas	23
FIG 1.8	Óxidos de nitrila obtidos pela metodologia de Grundmann (1968)	24
FIG 1.9	Formação de óxidos de nitrila empregando TAC.....	24
FIG 1.10	Formação de cloreto de imidoíla utilizando cloro gasoso	24
FIG 1.11	Obtenção de óxido de nitrila empregando <i>N</i> -cloro-succinimida	25
FIG 1.12	Formação de óxidos de nitrila empregando hipoclorito de sódio	25
FIG 1.13	Síntese de 4,5-diidro-isoxazóis empregando cloramina-T	25
FIG 1.14	Óxido de nitrila formado pelo tratamento de aldoximas com NCBT.....	26
FIG 1.15	Tratamento de aldoximas com $(\text{Bu}_3\text{Sn})_2\text{O}$ e <i>t</i> -BuOCl	26
FIG 1.16	Formação do óxidos de nitrila pelo uso de sais de prata	26
FIG 1.17	Formação óxidos de nitrila empregando SDCC.....	27
FIG 1.18	Reações de obtenção de óxidos de nitrila por BTMA. ICl_4	27
FIG 1.19	Formação de óxidos de nitrila pela utilização de ácido tricloro-isocianúrico ..	28
FIG 1.20	Oxidação de aldoximas com iodo hipervalente.....	28
FIG 1.21	Oxidação de aldoximas por <i>N</i> -terc-butil- <i>N</i> -clorocianamida	28
FIG 1.22	Formação de óxido de nitrila pela utilização de MnO_2	29
FIG 1.23	Formação de isoxazolina e isoxazóis utilizando CrO_2	29
FIG 1.24	Esterificação da fenil-glicina utilizando cloreto de tionila	29
FIG 1.25	Formação do cloreto de imidoíla (26) por nitrosação do CGEE.....	30
FIG 1.26	Formação do óxido de nitrila específico (CEFNO)	31
FIG 1.27	(a) Formas de ressonância para o óxido de nitrila (b) Mecanismo de formação da isoxazolina.....	31
FIG 1.28	Interações dos orbitais HOMO e LUMO em ciclo-adição 1,3-dipolar.....	33
FIG 1.29	Subproduto formado por dimerização de óxidos de nitrila	33

FIG 1.30 Síntese e abertura do anel de 3-etoxicarbonil-4,5-diidro-isoxazóis.....	34
FIG 1.31 4,5-diidro-isoxazóis derivados de ésteres de cadeia longa.....	34
FIG 1.32 Síntese de 3-etoxicarbonil-4,5-diidro-isoxazóis empregando KHCO_3	34
FIG 1.33 Funcionalização do grupamento éster em 4,5-diidro-isoxazóis	35
FIG 3.1 Mecanismo de esterificação da glicina	46
FIG 3.2 Mecanismo da nitrosação do GEE.....	47
FIG 3.3 Cromatograma do cloreto de imidoíla	47
FIG 3.4 Rota sintética de formação do óxido de carbetóxi-formonitrila (27)	48
FIG 3.5 Retrossíntese da formação dos derivados isoxazolínicos –série I.....	48
FIG 3.6 Reação de formação de 5-fenil-3-etoxicarbonil-4,5-diidro-isoxazol	49
FIG 3.7 Cromatograma da síntese do composto I-1a.....	50
FIG 3.8 Possíveis regioquímicas do composto I-1a.....	50
FIG 3.9 Formas de ressonância para o anel aromático	54
FIG 3.10 Fragmento sugerido para o pico base do composto I-1a	55
FIG 3.11 Cromatograma da síntese do composto I-2a	56
FIG 3.12 Fragmentação do composto I-2a	59
FIG 3.13 Cromatograma da síntese do composto I-3a	60
FIG 3.14 Fragmento sugerido para o pico base do composto I-3a	62
FIG 3.15 Cromatograma da síntese do composto I-4a	63
FIG 3.16 Fragmento sugerido para o pico base do composto I-4a	65
FIG 3.17 Cromatograma da síntese do composto I-5a	66
FIG 3.18 Fragmento sugerido para o pico base do composto I-5a	68
FIG 3.19 Cromatograma da síntese do composto I-6a	69
FIG 3.20 Deslocamento químico de H11 com variação de temperatura	71
FIG 3.21 Fragmento sugerido para o pico base do composto I-6a	72
FIG 3.22 Esquema de utilização da microplaca.....	86
FIG 3.23 Bioatividade frente a <i>Pseudomonas aeruginosas</i>	86
FIG 6.1 Espectro de infravermelho do composto I-1a	98
FIG 6.2 Espectro de RMN ^{13}C do composto I-1a.....	99
FIG 6.3 Espectro de RMN ^{13}C / DEPT do composto I-1a	100
FIG 6.4 Espectro de RMN ^1H do composto I-1a	101
FIG 6.5 Espectro de massas do composto I-1a.....	102
FIG 6.6 Espectro de infravermelho do composto I-2a	103
FIG 6.7 Espectro de RMN ^{13}C do composto I-2a.....	104

FIG 6.8	Espectro de RMN ^{13}C / DEPT do composto I-2a	105
FIG 6.9	Espectro de RMN ^1H do composto I-2a	106
FIG 6.10	Espectro de massas do composto I-2a	107
FIG 6.11	Espectro de infravermelho do composto I-3a	108
FIG 6.12	Espectro de RMN ^{13}C do composto I-3a	109
FIG 6.13	Espectro de RMN ^1H do composto I-3a	110
FIG 6.14	Espectro de massas do composto I-3a	111
FIG 6.15	Espectro de infravermelho do composto I-4a	112
FIG 6.16	Espectro de RMN ^{13}C do composto I-4a	113
FIG 6.17	Espectro de RMN ^1H do composto I-4a	114
FIG 6.18	Espectro de massas do composto I-4a	115
FIG 6.19	Espectro de infravermelho do composto I-5a	116
FIG 6.20	Espectro de RMN ^{13}C do composto I-5a	117
FIG 6.21	Espectro de RMN ^1H do composto I-5a	118
FIG 6.22	Espectro de massas do composto I-5a	119
FIG 6.23	Espectro de infravermelho do composto I-6a	120
FIG 6.24	Espectro de RMN ^{13}C do composto I-6a	121
FIG 6.25	Espectro de RMN ^1H do composto I-6a	122
FIG 6.26	Espectro de massas do composto I-6a	123
FIG 6.27	Espectro de infravermelho do composto II-1b	124
FIG 6.28	Espectro de RMN ^{13}C do composto II-1b	125
FIG 6.29	Espectro de RMN ^1H do composto II-1b	126
FIG 6.30	Espectro de infravermelho do composto II-2b	127
FIG 6.31	Espectro de RMN ^{13}C do composto II-2b	128
FIG 6.32	Espectro de RMN ^1H do composto II-2b	129
FIG 6.33	Espectro de infravermelho do composto II-1c	130
FIG 6.34	Espectro de RMN ^{13}C do composto II-1c	131
FIG 6.35	Espectro de RMN ^1H do composto II-1c	132
FIG 6.36	Espectro de infravermelho do composto II-2c	133
FIG 6.37	Espectro de RMN ^{13}C do composto II-2c	134
FIG 6.38	Espectro de RMN ^1H do composto II-2c	135

LISTA DE TABELAS

TAB 1.1	Rendimentos de (10a-d) obtidos a partir de derivados de nitro-alcenos.....	21
TAB 1.2	Rendimentos de isoxazóis obtidos a partir de nitro-compostos	22
TAB 1.3	Avaliação da atividade de 4,5-diidro-isoxazóis como agentes anti-tuberculose	34
TAB 2.1	Reagentes e solventes utilizados	36
TAB 2.2	Equipamentos Utilizados	37
TAB 2.3	Estruturas e rendimentos das 4,5-diidro-isoxazóis – série I	38
TAB 2.4	Estruturas e rendimentos das 4,5-diidro-isoxazóis – série II	39
TAB 3.1	Principais absorções na região do IV do composto I-1a.....	48
TAB 3.2	RMN ¹³ C : deslocamentos químicos dos carbonos do composto I-1a.....	49
TAB 3.3	DEPT: Multiplicidade dos carbonos do composto I-1a	49
TAB 3.4	RMN ¹ H: Assinalamentos dos hidrogênios do composto I-1a.....	51
TAB 3.5	Análise elementar de CHN do composto I-1a.....	52
TAB 3.6	Principais absorções na região do IV do composto I-2a.....	53
TAB 3.7	RMN ¹³ C: deslocamentos químicos dos carbonos do composto I-2a	53
TAB 3.8	DEPT: Multiplicidade dos carbonos do composto I-2a	54
TAB 3.9	RMN ¹ H: Assinalamentos dos hidrogênios do composto I-2a	54
TAB 3.10	Análise elementar de CHN do composto I-2a.....	55
TAB 3.11	Principais absorções na região do IV do composto I-3a.....	56
TAB 3.12	RMN ¹³ C: Deslocamentos químicos dos carbonos do composto I-3a	57
TAB 3.13	RMN ¹ H: Assinalamentos dos hidrogênios do composto I-3a	58
TAB 3.14	Análise elementar de CHN do composto I-3a.....	58
TAB 3.15	Principais absorções na região do IV do composto I-4a.....	60
TAB 3.16	RMN: Assinalamentos de carbonos e hidrogênios do composto I-4a	60
TAB 3.17	Análise elementar de CHN do composto I-4a.....	62
TAB 3.18	Principais absorções na região do IV do composto I-5a.....	63
TAB 3.19	RMN ¹³ C: Deslocamentos químicos (δ) dos carbonos do composto I-5a	63
TAB 3.20	RMN ¹ H: Assinalamentos dos hidrogênios do composto I-5a	64
TAB 3.21	Análise elementar de CHN do composto I-5a.....	64
TAB 3.22	Principais absorções na região do IV do composto I-6a.....	65
TAB 3.23	RMN : Assinalamentos de carbonos e hidrogênios do composto I-6a.....	66

TAB 3.24	Análise elementar de CHN do composto I-6a.....	68
TAB 3.25	Principais absorções na região do IV do composto II-1b.....	69
TAB 3.26	RMN ¹³ C: Deslocamentos químicos (δ) dos carbonos do composto II-1b	70
TAB 3.27	RMN ¹ H: Assinalamentos dos hidrogênios do composto II-1b.....	70
TAB 3.28	Análise elementar de CHN do composto II-1b.....	71
TAB 3.29	Principais absorções na região do IV do composto II-2b.....	71
TAB 3.30	RMN ¹³ C: Deslocamentos químicos (δ) dos carbonos do composto II-2b	72
TAB 3.31	RMN ¹ H: Assinalamentos dos hidrogênios do composto II-2b.....	73
TAB 3.32	Análise elementar de CHN do composto II-2b.....	73
TAB 3.33	Principais absorções na região do IV do composto II-1c.....	74
TAB 3.34	RMN ¹³ C: Deslocamentos químicos (δ) dos carbonos do composto II-1c	75
TAB 3.35	RMN ¹ H: Assinalamentos dos hidrogênios do composto II-1c	76
TAB 3.36	Análise elementar de CHN do composto II-1c.....	76
TAB 3.37	Principais absorções na região do IV do composto II-2c.....	77
TAB 3.38	RMN ¹³ C: Deslocamentos químicos (δ) dos carbonos do composto II-2c	77
TAB 3.39	RMN ¹ H: Assinalamentos dos hidrogênios do composto II-2c.....	78
TAB 3.40	Análise elementar de CHN do composto II-2C	78
TAB 3.41	Posição das amostras avaliadas pelo método colorimétrico	79
TAB 3.42	CIM (µg /mL) das amostras avaliadas	81

LISTA DE SIGLAS

ATCI	ácido tricloro-isocianúrico
BTMA.ICl ₄	tetracloroiodato de benzil-trimetil-amônio
CIM	concentração inibitória mínima
DABCO	1,4-diazabicyclo[2.2.2]octano
DMA	9,10-dimetil-antraceno
DMAP	<i>N,N</i> -dimetil-4-aminopiridina
DMF	<i>N,N</i> -dimetil-formamida
DMTMM	4-[4,6-dimetóxi(1,3,5)triazina-2-ila]-4-metil-morfolinio
DEPT	(<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>) transferência de polarização acentuada sem distorção
FMO	(<i>Frontier Molecular Orbitals</i>) orbitais moleculares de fronteira
HOMO	(<i>Highest Occupied Molecular Orbital</i>) orbital molecular ocupado de maior energia
IME	Instituto Militar de Engenharia
FTIR	(<i>Fourier Transformed Infrared</i>) Infravermelho com transformada de Fourier
LUMO	(<i>Lowest Unoccupied Molecular Orbital</i>) orbital molecular desocupado de menor energia
NBS	<i>N</i> -bromo-succinimida
NCBT	1-cloro-benzotriazol
NCS	<i>N</i> -cloro-succinimida
Ph	fenila
Py	piridina
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
SDCC	(<i>sodium dichloroisocyanurate</i>) dicloroisocianurato de sódio
TAC	tetra-acetato de chumbo

RESUMO

Este trabalho reporta a síntese de derivados de 3-etoxicarbonil-4,5-dihidroisoxazóis utilizando a ciclo-adição 1,3-dipolar do óxido carboxí-formonitrila (CEFNO) a seis diferentes compostos insaturados. Estas reações apresentaram rendimento em torno de 70%. Em seguida, o grupo funcional éster foi tratado com dois compostos nucleofílicos diferentes (hidrazina e hidroxilamina) para gerar quatro novos compostos (II: 1b, 2b, 1c e 2c) com diferentes rendimentos (20 - 40%). Todos os compostos heterociclos tiveram sua atividade antimicrobiana avaliada frente a diferentes bactérias (Gram-positiva e Gram-negativa). O compostos apresentando o grupo funcional ácido hidroxâmico (II: 1c, 2c) forneceram os melhores resultados (CIM: 125 µg /mL) contra a bactéria *Escherichia coli* (ATCC 25922).

ABSTRACT

This work reports the synthesis of 3-ethoxycarbonyl-4,5-dihydroisoxazoles derivatives using the 1,3-dipolar cycloaddition of carbethoxyformonitrile oxide (CEFNO) to six different unsaturated compounds. This reaction presented yields around 70% . The ester function was treated with two different nucleofilic compounds (hydrazine or hydroxylamine chloridate) to give four new compounds (1a, 2a, 1b and 2b) with different yields (20 – 40%). All heterocyclic compounds were evaluated against different bacteria (Gram positive and Gram negative). The heterocyclic functionalized with hydroxamic acid group (1b, 2b) presented the lowest MIC (125 µg /mL) for *E.coli* (ATCC 25922).

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas vislumbramos o extraordinário progresso no desenvolvimento de novos fármacos de origem sintética, resultado da crescente preocupação do Homem com a conservação e restauração da saúde e do notável avanço das ciências biológicas, principalmente a Medicina e a Química (KOROLKOVAS, 1988; TAVARES, 2001; GILMANN, 2006).

Nos últimos anos, o planejamento molecular de estruturas pode ser utilizado para avaliar possíveis interações com alvos biológicos, otimizando o processo de descoberta de substância bioativas (GHOSE, 2006; KURTH, 2007). Dentro desse contexto, destaca-se o estudo dos compostos heterocíclicos, uma das áreas de pesquisa mais importantes dentro da química.

Os anéis heterocíclicos são constituídos basicamente por átomos de carbono e outros elementos (heteroátomos), onde os mais frequentemente encontrados são o oxigênio, nitrogênio e o enxofre. Esses compostos são muito encontrados na natureza e fundamentais na síntese de moléculas bioativas (NEWKOME, 1982; BAKER, 2007).

Os 4,5-diidro-isoxazóis (2-isoxazolininas) são anéis heterocíclicos de grande versatilidade para síntese de uma grande variedade de substâncias farmacologicamente ativas e vêm sendo sistematicamente investigados, podendo ser sintetizados através da reação de ciclo-adição 1,3-dipolar entre óxidos de nitrila e sistemas insaturados (WADE, 1997; GOTHELF, 1998; SMITH, 2002; KURTH, 2007; BHOSALE, 2009). Além disso, podem sofrer um processo de clivagem reductiva da ligação N-O dando origem a diferentes moléculas bifuncionalizadas: β -hidróxi-cetonas, cetonas α,β -insaturadas e 1,3-amino-alcoóis (KOVER, 1994; RODRIGUES, 2001; GIACOMELLI, 2003; TOKIZANE, 2008)

Muitos desses compostos apresentam diferentes atividades farmacológicas, tais como: antimicrobiana, antineoplásica, antifúngica, antiinflamatória, antipsicótica, antiviral (FIG 1.1), entre outras (AHMED, 1991; PIRRUNG, 2002; WEIDNER-WELLS, 2004; WEI-MING, 2005; LIN, 2007; ZHANG, 2007; SUN, 2009).

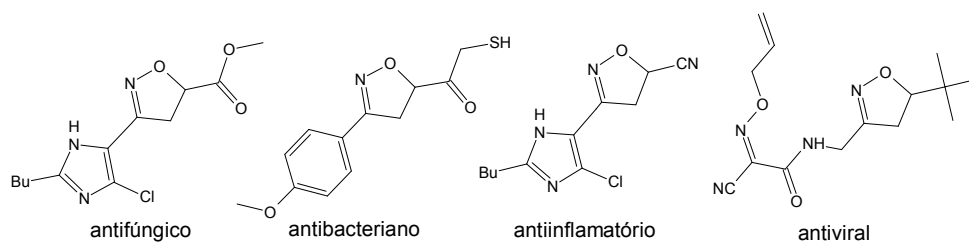


FIG 1.1 Exemplos de 4,5-diidro-isoxazóis com atividade biológica

A seguir será apresentada uma breve revisão sobre a reação de cicloadição 1,3-dipolar e os métodos de obtenção de 4,5-diidro-isoxazóis.

1.1 MÉTODOS PARA OBTENÇÃO DO ÓXIDO DE NITRILA

Basicamente os óxidos de nitrila podem ser formados por duas metodologias distintas, através de reações de desidrogenação de nitro-alcanos ou pela oxidação de aldoximas, porém também existem alguns métodos alternativos.

Devido a grande importância dos óxidos de nitrila nas reações de formação de 4,5-diidro-isoxazóis, se faz necessário revisar aqui alguns dos seus processos de preparação.

1.1.1 FORMAÇÃO DE ÓXIDOS DE NITRILA POR DESIDROGENAÇÃO DE NITRO-COMPOSTOS

Nitro-alcanos **(1)** na presença de uma base, geram o íon nitronato **(2)** que pode reagir com o fenil-isocianato **(3)** formando o composto de adição **(4)**. Este irá se decompor em óxido de nitrila **(5)** e ácido carbâmico **(6)**. No entanto, o carbono do íon nitronato também pode combinar-se com o fenil-isocianato gerando a α -nitro-amida **(7)**. O ácido carbâmico **(6)** sofre decomposição produzindo anilina **(8)** e dióxido de carbono. A anilina pode reagir também com o fenil-isocianato fornecendo a difeniluréia **(9)**, como apresentado na FIG 1.2 (MUKAIYAMA, 1960; SHVEKLGEIMER, 1976).

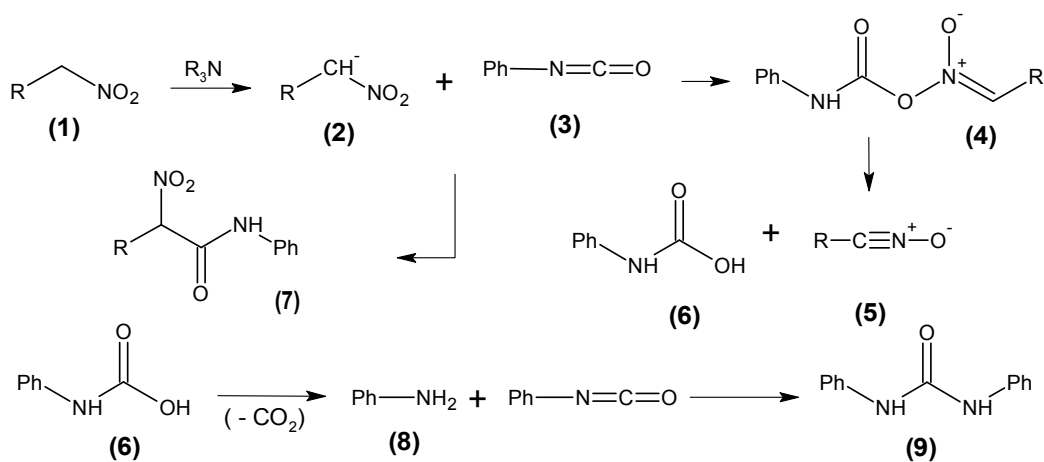


FIG 1.2 Formação de óxido de nitrila por nitro-compostos com isocianato

Empregando esta metodologia, Mukaiyama obteve compostos heterocíclicos, derivados de diidro-isoxazóis (**10a-d**), pela ciclo-adição de substratos olefínicos aos óxidos de nitrila formados. Os rendimentos podem ser considerados de moderados a bons, conforme reportado na TAB 1.1, onde estes variam de acordo com os substituíntes. Entretanto, ainda que amplamente utilizada, esta metodologia possui algumas desvantagens, que consistem na pouca disponibilidade de derivados de nitrocompostos, na possibilidade de formação de diferentes produtos e na solubilidade da difenilureia (**9**) dificultando sua separação (MUKAIYAMA, 1960).

TAB 1.1 Rendimentos de (**10a-d**) obtidos a partir de derivados de nitro-alcanos

diidro-isoxazóis	R	Substituíntes R	Rendimentos (%)
<p>(10)</p>	a	O(CH ₂) ₃ CH ₃	82
	b	Ph	79
	c	CN	79
	d	OAc	53

Mukaiyama, 1960

Outras alternativas foram reportadas substituindo o fenil-isocianato, utilizado como agente desidratante, por cloroformiato de etila (ClCO₂Et) e trietilamina (Et₃N), cloreto de benzenosulfonila (PhSO₂Cl) e trietilamina (Et₃N), anidrido acético (Ac₂O) e acetato de sódio (AcONa), cloreto de benzoila (PhCOCl) e metóxido de sódio (MeONa), e ácido p-toluenossulfônico (p-TsOH) (SHIMIZU, 1984 e 1986).

Em 2002, uma nova metodologia foi proposta para geração de óxidos de nitrila. Partindo da reação de nitro-alquenos conjugados com enolato de silício em presença de tetracloreto de titânio (TiCl_4), Yan e colaboradores sintetizaram cloreto de imidoila, que devidamente tratado com trietilamina na presença de um dipolarófilo produziu 4,5-diidro-isoxazóis com bons rendimentos, conforme reportado na FIG 1.3.

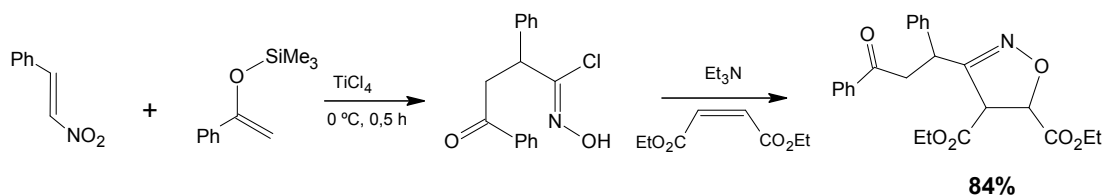


FIG 1.3 Reação de nitro-alquenos e posterior formação de 4,5-diidro-isoxazóis

Giacomelli, em 2003, reportou a reação de nitro-alcanos com uma mistura de N,N-dimetil-4-aminopiridina (DMAP) **(11)** e cloreto de 4-[4,6-dimetóxi(1,3,5)triazin-2-ila]-4-metilmorfolínio (DMTMM) **(12)** produzindo óxidos de nitrila. Estes foram gerados *in situ* e forneceram isoxazóis **(13)** na presença de alquinos como dipolarófilos (FIG 1.4). Os sistemas isoxazóis dissustituídos (13a-c) tiveram rendimentos moderados conforme apresentado na TAB 1.2.

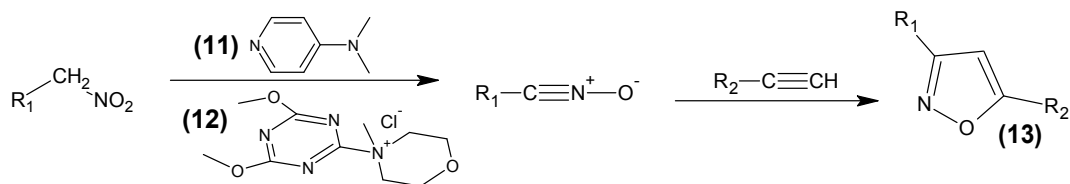
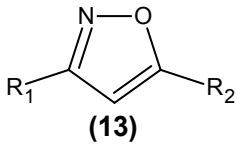


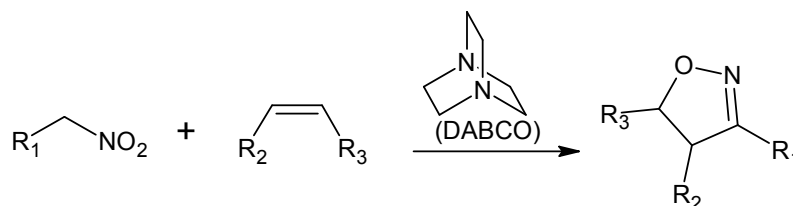
FIG 1.4 Produção de óxido de nitrila *in situ* a partir de nitro-alcanos e obtenção de isoxazóis **(13)**

TAB 1.2 Rendimentos de isoxazóis obtidos a partir de nitro-compostos

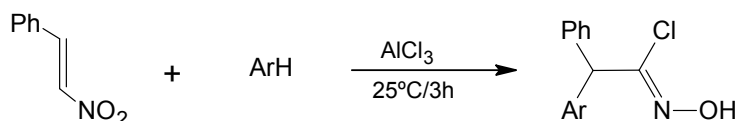
Isoxazóis	Substituintes		Rendimentos	
	R ₁	R ₂	%	
	A	Me	Ph	75
	B	H	CO ₂ Et	65
	C	H	CH(OEt) ₂	80

Giacomeli, 2003

Outro método proposto para a obtenção de 4,5-diidro-isoxazóis pela formação do óxido de nitrila intermediário proveniente de nitro-alcanos primários, consiste no tratamento desses com 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octano (DABCO) em presença do dipolarófilo, como apresentado na FIG 1.5 (CECCHI, 2006).

**FIG 1.5** Síntese de 4,5-diidro-isoxazóis empregando nitro-alcanos e diaminas terciárias

Recentemente, em 2009, Zhijay e colaboradores desenvolveram um método simples e eficiente de síntese de cloreto de imidoíla a partir de aril nitro-alquenos, utilizando cloreto de alumínio (AlCl₃) a temperatura ambiente e obtiveram excelentes rendimentos (FIG 1.6).

**FIG 1.6** Obtenção de cloreto de imidoíla empregando cloreto de alumínio

1.1.2 FORMAÇÃO DE ÓXIDOS DE NITRILA POR OXIDAÇÕES DE ALDOXIMAS

Muitos trabalhos têm sido desenvolvidos para a obtenção de óxidos de nitrila a partir da metodologia de oxidação de aldoximas. Para tanto, as aldoximas podem

ser obtidas por um método clássico. Este método consiste no tratamento de aldeídos **(14)** com hidroxilamina em meio ácido, fornecendo as respectivas aldoximas **(15)**, como apresentado no esquema mecanístico da FIG 1.7 (CHRISTL, 1973; ALLINGER, 1978).

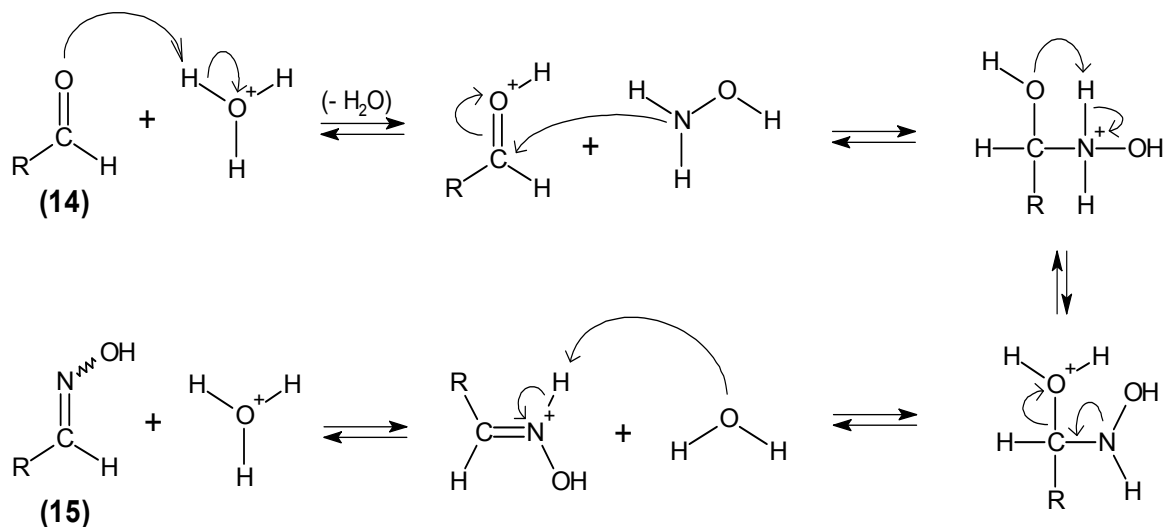


FIG1.7 Mecanismo para a formação de aldoximas

Grudmann, em um trabalho pioneiro em 1968, converteu aldoximas em óxidos de nitrila. Foram obtidos bons rendimentos à temperatura ambiente ao empregar N-bromo-succinimida (NBS) e N,N-dimetilformamida (DMF) em meio básico. Na desidrogenação de aldoximas pode-se utilizar como base o metóxido de sódio ou a trietilamina. Os óxidos de nitrila formados e seus respectivos rendimentos são apresentados na FIG 1.8.

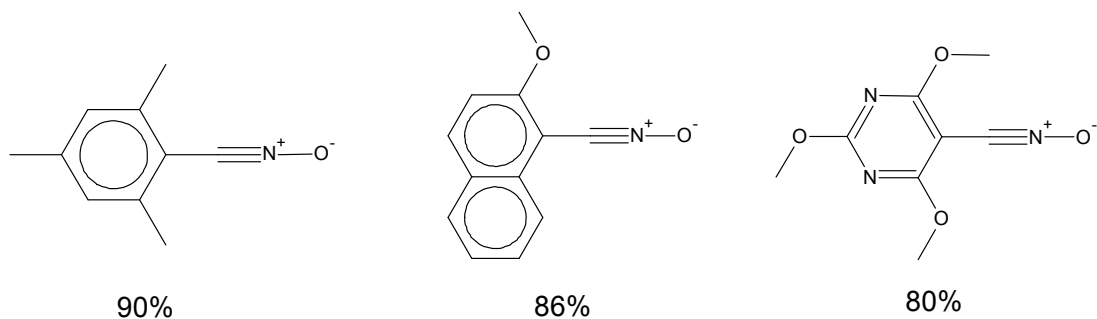


FIG 1.8 Óxidos de nitrila obtidos pela metodologia de Grundmann (1968)

No mesmo ano (1968), Just realizou a oxidação de aldoximas utilizando tetraacetato de chumbo (TAC), formando óxidos de nitrila como pode ser visto na FIG 1.9. Este processo foi realizado a uma temperatura de -78°C sendo o rendimento de 80%. Apesar da exigência de baixa temperatura para a obtenção de bons rendimentos, observou-se que com substituintes volumosos, a reação pode ser conduzida à temperatura ambiente.

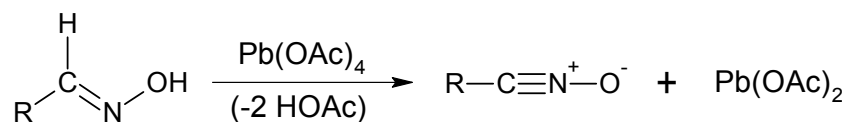


FIG 1.9 Formação de óxidos de nitrila empregando TAC

Uma pesquisa realizada por Chiang em 1971, envolvendo a reação de benzaldoximas com cloro gasoso, utilizando diferentes substituintes (elétrôn-atratores e doadores) forneceram os respectivos cloretos de imidoíla com rendimentos em torno de 50 %. Este método apresenta uma limitação devido a possibilidade de ocorrer cloração do anel aromático (FIG 1.10).

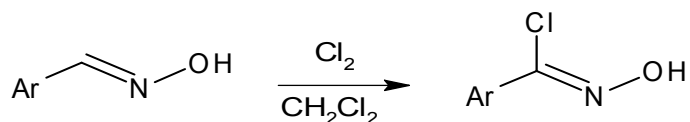


FIG 1.10 Formação de cloreto de imidoíla utilizando cloro gasoso

Aldoximas derivadas do benzaldeído, quando tratadas com *N*-cloro-succinimida (NCS) em DMF e base, fornecem óxidos de nitrila (FIG 1.11). Esta metodologia não apresenta problemas quanto à cloração do anel na etapa de formação do cloreto de imidoíla **(16)**, e ainda apresenta consideráveis rendimentos, que variam de 75 a 99% de acordo com os substituintes arílicos empregados (LIU, 1980).

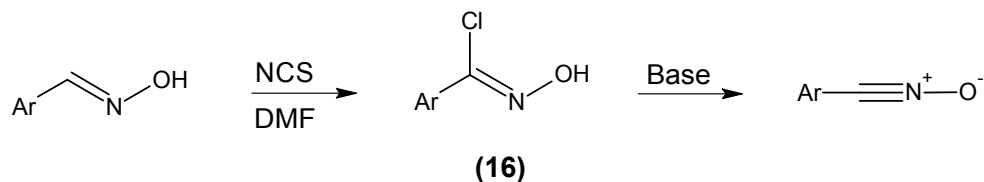


FIG 1.11 Obtenção de óxido de nitrila empregando *N*-cloro-succinimida

Lee, 1982, desenvolveu uma metodologia onde através do tratamento de aldoximas com hipoclorito de sódio (NaOCl) são produzidos os respectivos cloretos de imodóila, e a partir destes, os óxidos de nitrila pelo uso de uma base (FIG 1.12). Este método ainda é muito utilizado e o reagente NaOCl possui um baixo custo. Entretanto, seu uso requer uma constante faturação tendo em vista que o NaOCl é termo e foto-sensível. Por este método foram produzidos sistemas heterocíclicos com rendimentos que variaram de 19 a 95%.

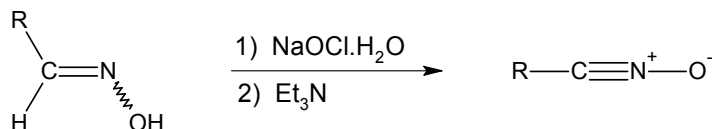


FIG 1.12 Formação de óxidos de nitrila empregando hipoclorito de sódio

Aldoximas podem ser transformadas, *in situ*, em óxidos de nitrila pelo tratamento com *cloramina-T* (*N*-cloro-*N*-sódio-metil-benzeno-sulfonamida). O produto heterocíclico pode ser obtido após três horas de reação em refluxo e o esquema da reação é apresentado na FIG 1.13, bem como seu bom rendimento (HASSNER, 1989).

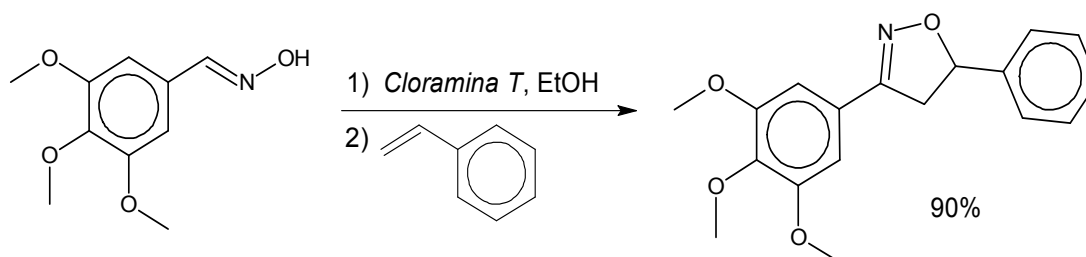


FIG 1.13 Síntese de 4,5-diidro-isoxazóis empregando *cloramina-T*

Em um outro método, a partir do tratamento de aldoximas com quantidades equimolares de *N*-cloro-benzotriazol (NCBT) em diclorometano, são obtidos os óxidos de nitrila correspondentes. No entanto, apesar do NCBT ser facilmente preparado, sua utilização é de certa forma limitada, uma vez que reage tanto com aldoximas quanto com olefinas. A formação de um óxido de nitrila específico é demonstrada na FIG 1.14 (REES, 1969 a-b; RYU, 1990).

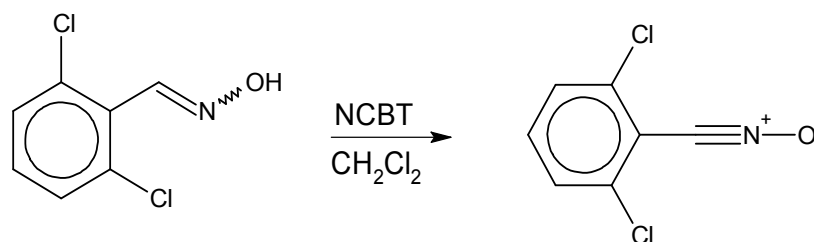


FIG 1.14 Óxido de nitrila formado pelo tratamento de aldoximas com NCBT

Óxidos de nitrila podem ser formados utilizando óxidos de *bis*-tributil-estanho em *t*-butil-hipoclorito (FIG 1.15). Esta estratégia mostrou-se eficiente para substratos que apresentam grupos sensíveis a condições reacionais, como por exemplo, meio alcalino e aquecimento. O meio no qual estas reações se processam pode ser considerado brando e neutro (MORIYA, 1994).

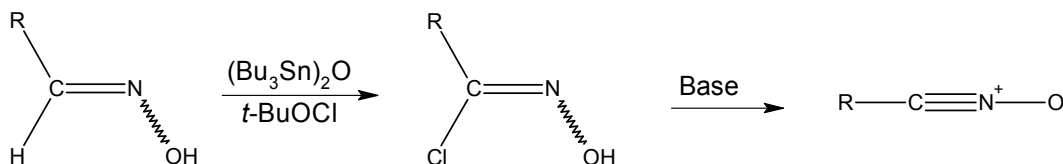


FIG 1.15 Tratamento de aldoximas com $(\text{Bu}_3\text{Sn})_2\text{O}$ e *t*-BuOCl

Tokunaga e Fukumoto, em 1996, interessados no desenvolvimento de novas metodologias, reportaram que a produção de óxidos de nitrila também pode ser feita por reações entre cloretos de imidoíla e sais de prata como acetato de prata, carbonato de prata e cianeto de prata. Esta reação envolve a desidroalogenação do cloreto de imidoíla, reportada na FIG 1.16. A metodologia em questão apresentou bons rendimentos para formação de sistemas heterocíclicos (76 – 98%), quando os substituíntes do cloreto de imidoíla e do dipolarófilo eram aromáticos ou alifáticos.

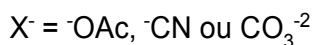
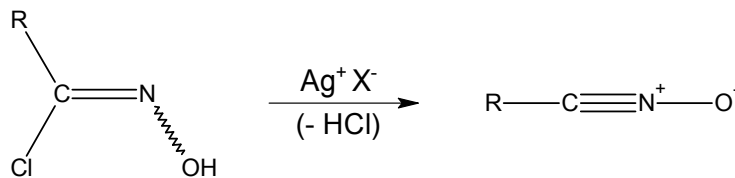


FIG 1.16 Formação do óxidos de nitrila pelo uso de sais de prata

Aldoximas, quando tratadas com dicloroisocianurato de sódio (SDCC) **(17)** na presença de alumina (óxido de alumínio) **(18)** em um sistema bifásico, formam os respectivos cloretos de imidoíla. Estes são transformados em óxidos de nitrila, como pode ser visto na FIG 1.17, e na presença de dipolarófilos formam sistemas heterocíclicos (BOUGRIN, 1999).

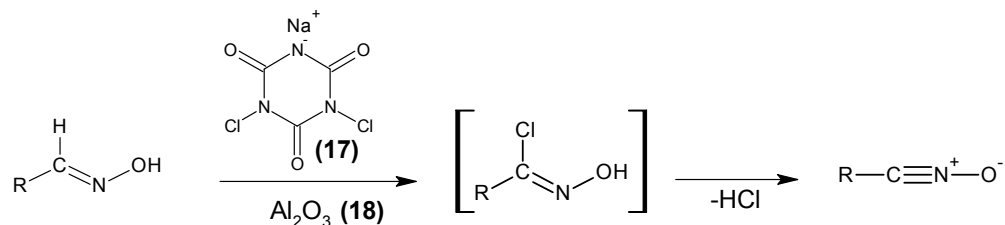


FIG 1.17 Formação de óxidos de nitrila empregando SDCC

O tratamento de aldoximas com tetracloioiodato de benzil-trimetil-amônio (BTMA. ICl_4) produz os respectivos cloretos de imodoíla que, podem ser convertidos posteriormente em óxidos de nitrila pelo uso de uma base (FIG 1.18). Este reagente também tem a capacidade de clorar sistemas aromáticos e cetonas alquílicas (KANEMASSA, 2000).

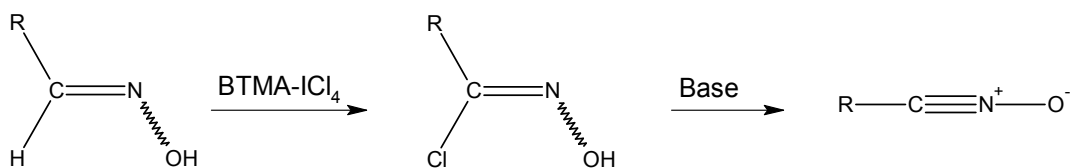


FIG 1.18 Reações de obtenção de óxidos de nitrila por BTMA. ICl_4

Rodrigues, em 2001, reportou uma nova metodologia para formação de óxidos de nitrila que possui excelentes vantagens como a utilização de reagentes de baixo custo, de boa disponibilidade e fácil manuseio, além da facilidade de separação do subproduto formado. Este método emprega como agente oxidante o ácido tricloroisocianúrico **(19)** que gera o óxido de nitrila *in situ*, na presença de quantidades catalíticas de piridina (Py) e diclorometano como solvente. O subproduto formado é o ácido isocianúrico **(20)** que após formado, precipita, podendo ser facilmente separado por filtração. Um esquema geral para a obtenção de óxidos de nitrila por este método é demonstrado na FIG 1.19.

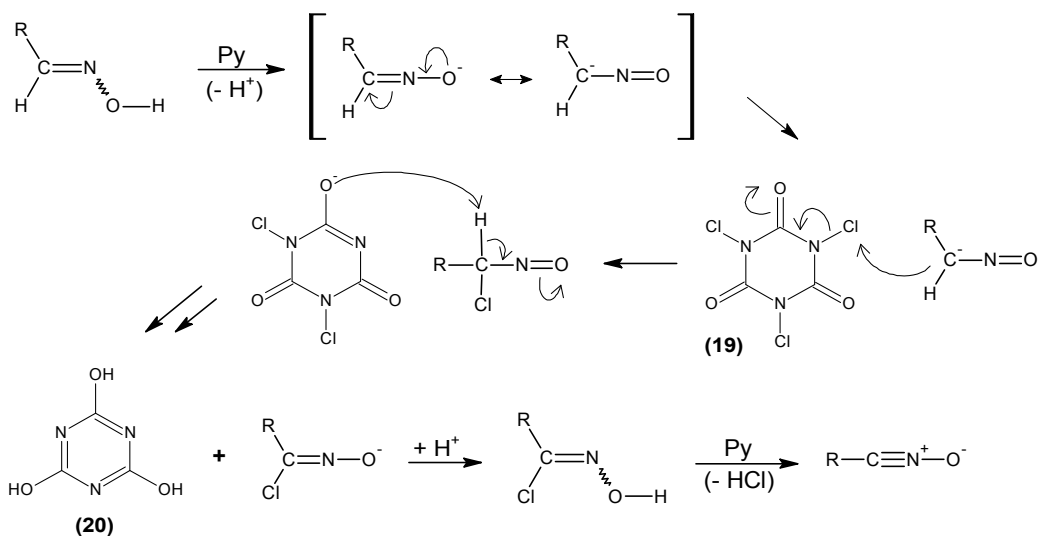


FIG 1.19 Formação de óxidos de nitrila pela utilização de ácido tricloro-isocianúrico

Em 2004, Das e colaboradores reportaram a oxidação de aldoximas utilizando iodo hipervalente, o diacetoxi-iodo-benzeno (DIB), que tratado posteriormente com um alqueno ativado (alquenos ligados a grupos elétron-doadores ou aceptores) leva a formação de 4,5-diidro-isoxazóis conforme mostrado na FIG 1.20. A conversão de aldoximas em óxido de nitrila ocorre em apenas uma etapa, obtendo-se o produto final com bons rendimentos.

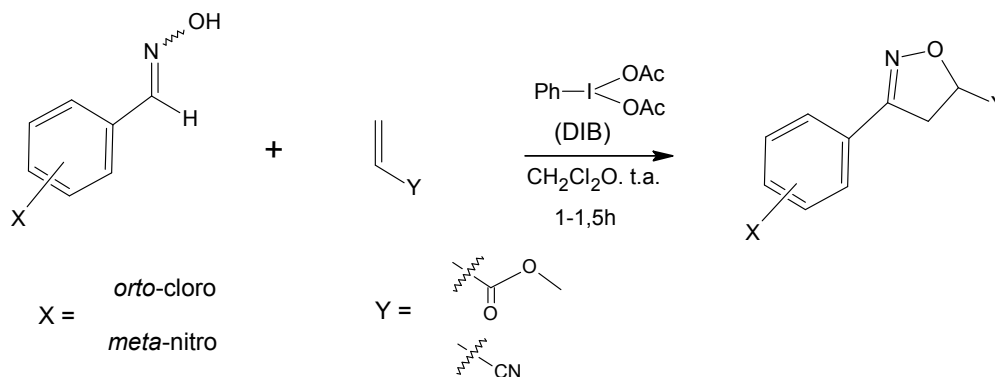


FIG 1.20 Oxidação de aldoximas com iodo hipervalente

N-terc-butil-N-cloro-cianamida tem sido utilizado como eficiente agente de cloração de aldoximas para a preparação de cloreto de imidoíla, o qual tratado posteriormente com uma base origina o óxido de nitrila (FIG 1.21), utilizado na síntese de 4,5-diidro-isoxazóis (KAUSHIK, 2006).

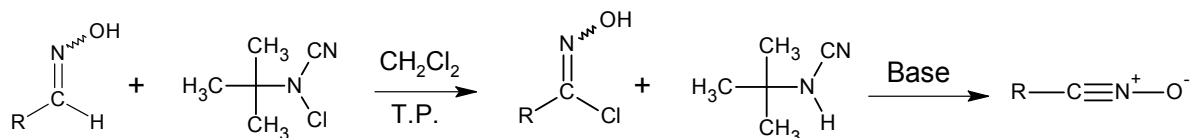


FIG 1.21 Oxidação de aldoximas por N-terc-butil-N-clorocianamida

Em 2007, Romanski e colaboradores, em seu estudo da reação de cicloadição 1,3 dipolar assimétrica produziu óxido de nitrila a partir de aldoximas empregando dióxido de manganês (FIG 1.22).

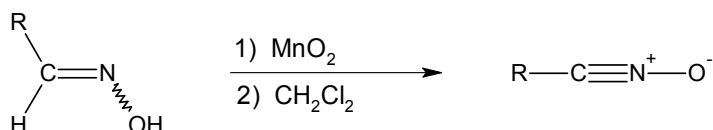


FIG 1.22 Formação de óxido de nitrila pela utilização de MnO_2

Recentemente, o dióxido de cromo (CrO_2) foi descoberto como um eficiente reagente para síntese de isoxazol e isoxazolina por produzir rapidamente óxido de nitrila, proveniente de aldoximas, na presença de dipolarófilos conforme demonstrado na FIG 1.23 (BHOSALE, 2009).

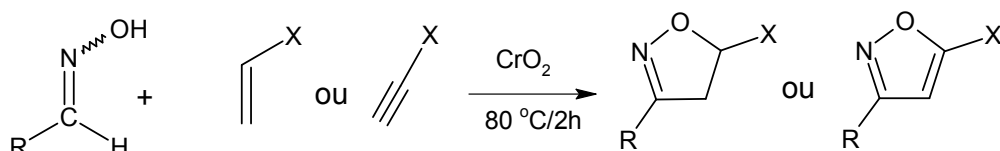


FIG 1.23 Formação de isoxazolina e isoxazois utilizando CrO_2

1.1.3 FORMAÇÃO DE ÓXIDO DE NITRILA PARTINDO DE GLICINA

Nesse tópico será descrito, passo a passo, um método alternativo para a formação de um óxido de nitrila específico, obtido por uma sequência de reações que iniciam pela esterificação da glicina.

Em 1990, Chang esterificou a fenil-glicina ao tratar uma suspensão em excesso de metanol, resfriada a 0°C , com cloreto de tionila, obtendo o cloridrato de fenilglicina-metil-éster com excelente rendimento (99%) após 10 horas de agitação, conforme demonstrado na FIG 1.24.

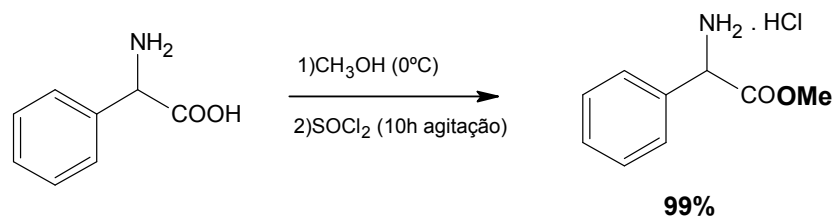


FIG 1.24 Esterificação da fenil-glicina utilizando cloreto de tionila

Skinner, em 1924, havia sintetizado cloreto de imidoíla com rendimento de aproximadamente 50% através de uma reação de nitroação do glicinato de etila hidrocloreto (GEE) **(21)** a baixa temperatura (-5°C). Primeiramente o ácido clorídrico **(22)** reage com o nitrito de sódio **(23)** formando o ácido nitroso **(24)**. O primeiro equivalente deste ao reagir com GEE **(21)** fornece um intermediário diazo-acetato **(25)**. Um segundo equivalente de ácido nitroso promove a conversão do diazo-acetato em cloreto de imidoíla **(26)**, conforme a sequência de reações observada na FIG 1.25.

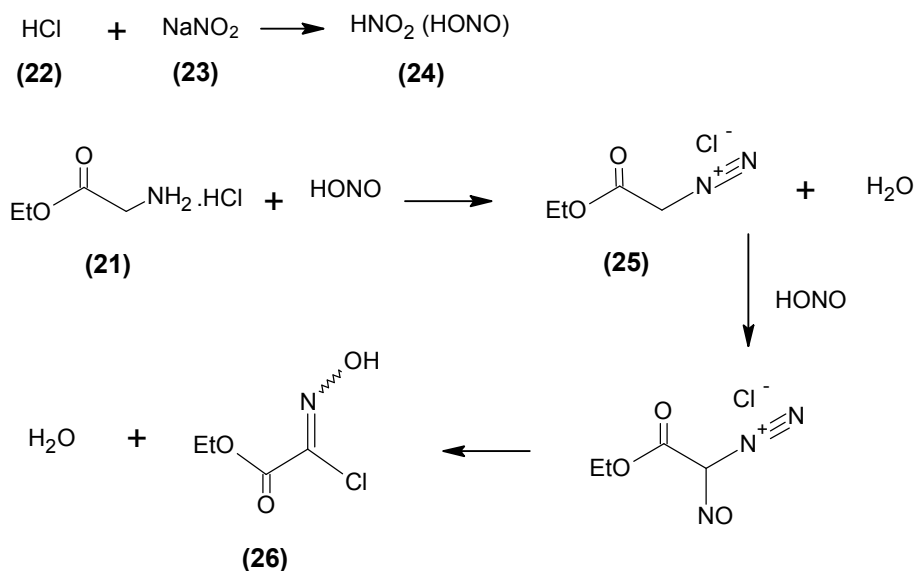


FIG 1.25 Formação do cloreto de imidoíla **(26)** por nitroação do GEE

Kozikowski, 1982, utilizou a metodologia proposta por Skinner para obter um óxido de nitrila específico, chamado de óxido de carboetóxi-formonitrila **(27)** (CEFNO), a partir da desidroalogenação do cloreto de imidoila **(26)** promovida pelo tratamento com trietilamina em éter ou carbonato de sódio aquoso (FIG 1.26).

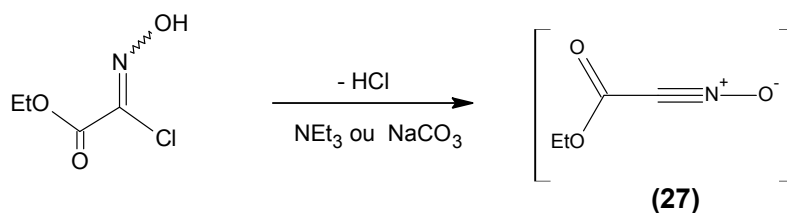


FIG 1.26 Formação do óxido de nitrila específico (CEFNO)

1.2 FORMAÇÃO DE 4,5-DIIDRO-ISOXAZÓIS POR CICLO-ADIÇÃO 1,3-DIPOLAR

As reações de ciclo-adição 1,3-dipolar são extremamente úteis para a formação de sistemas heterocíclicos e foram descobertas por Beckmann em 1888, e desde então, vem sendo largamente estudadas. Todo esse interesse é relevante devido aos compostos formados, frequentemente, apresentarem bioatividade (BECKMANN, 1888; GOTHELF, 1998, RODRIGUES, 2001; MOLINA, 2003; BRAGA, 2005; NASCIMENTO, 2007; CAPACI, 2008).

Trata-se de uma reação de ciclo-adição entre compostos insaturados chamados de dipolarófilos, que apresentam ligações do tipo π , e compostos 1,3 dipolar (dipolo) fornecendo sistemas heterocíclicos como produto. No caso dos 4,5-diidro-isoxazóis o óxido de nitrila (dipolo) deverá reagir com alquenos (dipolarófilos) (HUISGEN, 1961; KANEMASSA, 1992; WADE, 1997; GOTHELF, 1998, NAIR, 2000; YAN, 2002; LI, 2005; SHANG, 2006; KAUSHIK, 2006; KURTH, 2007; SUN, 2009).

Apesar da possibilidade de obtenção de dois regioisômeros, as reações de ciclo-adição do óxido de nitrila a alquenos monossustituídos costumam apresentar alto grau de regioseletividade, sendo geralmente governada pela teoria dos orbitais de fronteira (regra de Woodward-Hoffmann), ou seja, fornecem como produto principal o heterociclo 3,5-sustituído, devido ao oxigênio do óxido de nitrila, na sua forma 1,3 dipolar (**5''**), FIG 1.27a, se ligar preferencialmente ao átomo de carbono mais substituído do dipolarófilo (FIG 1.27b). Essas reações se processam via mecanismo concertado, onde o sistema 4π (elétron) do dipolo interage com o sistema 2π (elétron) do dipolarófilo (LEE, 1982; AHMED, 1991; GILCHRIST, 1992; KOVER, 1994; SMITH, 2002).

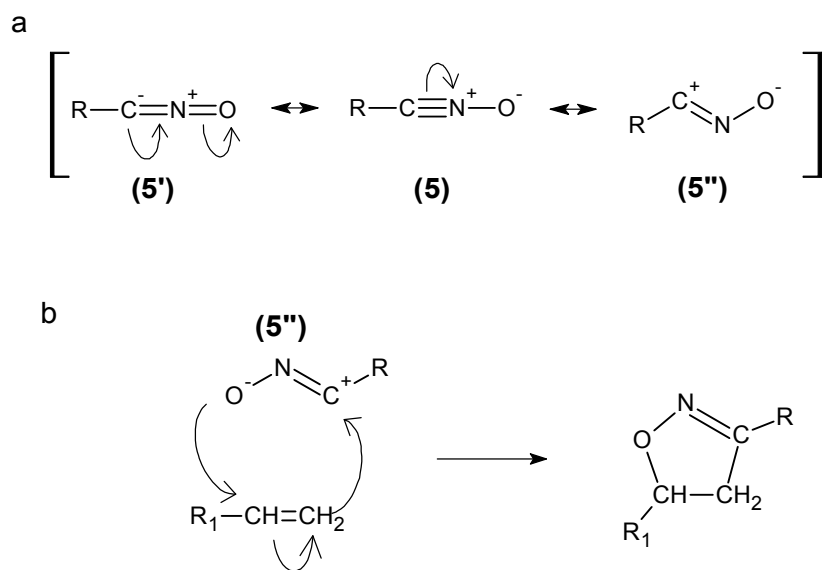


FIG 1.27 (a) Formas de ressonância para o óxido de nitrila
(b) Mecanismo de formação da isoxazolina

A interação entre os orbitais HOMO e LUMO dos reagentes participantes ocorrerá de forma a envolver uma menor diferença de energia (ΔE), ou seja, o entrosamento será entre os orbitais que possuem coeficientes energéticos próximos. Confirmando isto, Kamimura em 1994, baseado em dados experimentais (FIG 1.28), comprovou que quanto menor a diferença de energia entre os orbitais, maior será sua interação (KANEMASSA, 1990; KAMIMURA, 1994).

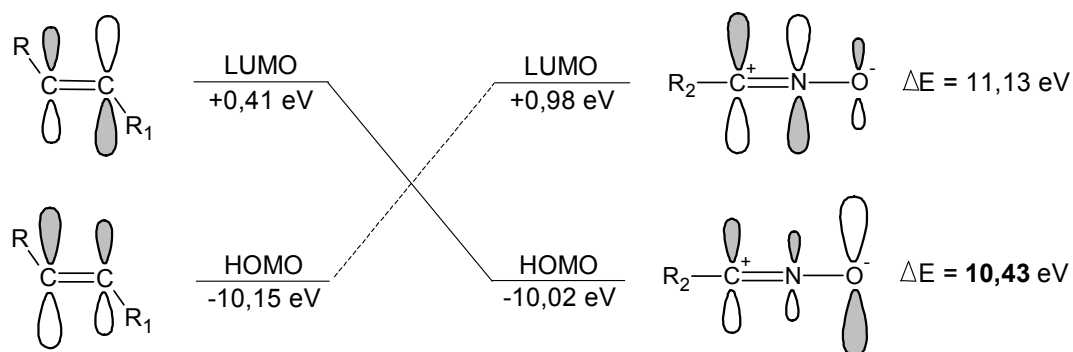


FIG 1.28 Interações dos orbitais HOMO e LUMO em ciclo-adção 1,3 dipolar

As reações de ciclo-adição do óxido de nitrila a alcenos dissustituídos geralmente fornecem uma mistura de regioisômeros, porém uma das regioquímicas pode prevalecer devido à interação estérica entre os reagentes (KAMIMURA, 1994).

É muito importante ressaltar que, no processo de formação desses heterociclos, podem ocorrer reações indesejadas de dimerizações dos óxidos de nitrila formando, principalmente, o 2-óxido de 1,2,5-oxadiazol, chamado de furoxano (FIG 1.29) (GRUNDMANN,1965). Uma maneira de se evitar essa formação indesejada é a utilização de excesso do dipolarófilo no meio racional.

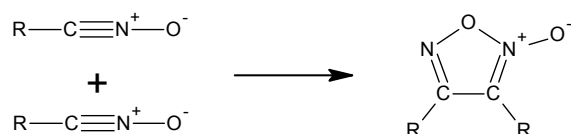


FIG 1.29 Subproduto formado por dimerização de óxidos de nitrila

1.3 DERIVADOS DE 3-ETOXICARBONIL-4,5-DIIDRO-ISOXAZÓIS

No processo de síntese de 3-etoxicarbonil-4,5-diidro-isoxazóis por reação de cicloadição 1,3-dipolar é necessário utilizar um óxido de nitrila específico, no qual a porção éster deve estar ligada diretamente ao carbono da nitrila, como ocorre no CEFNO (**27**). Portanto, os trabalhos existentes relatam em sua totalidade a utilização dos óxidos de nitrila com tal característica.

Em seu estudo sobre o preparo de β -hidroxi nitrilas, Kozikowski sintetizou diferentes 4,5-diidro-isoxazóis carboxiladas na posição 3, utilizando CEFNO (**27**), para em seguida reagir com hidróxido de sódio 10% sob aquecimento promovendo a descarboxilação e a abertura do anel conforme esquematizado na FIG 1.30 (KOZIKOWSKI, 1982).

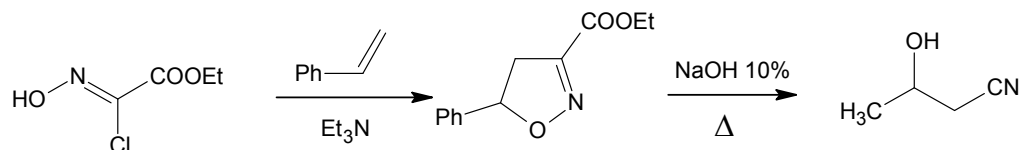


FIG 1.30 Síntese e abertura do anel de 3-etoxicarbonil-4,5-diidro-isoxazóis

Em 1991, Ahmed e colaboradores sintetizaram derivados de 3-carbetóxi- 4,5-diidro-isoxazóis através de ciclo-adição 1,3-dipolar utilizando óxido de nitrila formado *in situ* (CEFNO) e como dipolarófilos, ésteres de ácidos graxos insaturados. Obtiveram bons rendimentos, conforme reportado na FIG 1.31, chamando a atenção para a obtenção de 4,5-diidro-isoxazóis 4-substituídas como produto majoritário, ao contrário do que se é observado em grande maioria das reações de formação de 4,5-diidro-isoxazóis.

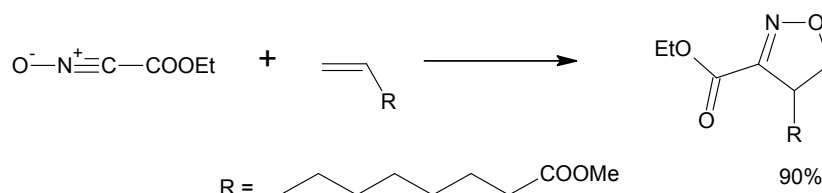


FIG 1.31 4,5-diidro-isoxazóis derivados de ésteres de cadeia longa

Conti, 2003, em seu trabalho sobre síntese de análogos do ácido glutâmico, utilizou a metodologia descrita por Kozikowski para obter CEFNO (**25**) *in situ*. Frente a diferentes dipolarófilos sintetizou de maneira simples derivados de 3-etoxicarbonil-4,5-diidro-isoxazóis empregando líquidos iônicos que estabilizavam o óxido de nitrila desfavorecendo as reações indesejadas de dimerização, além de aumentar a velocidade de reação e os rendimentos (FIG1.32).

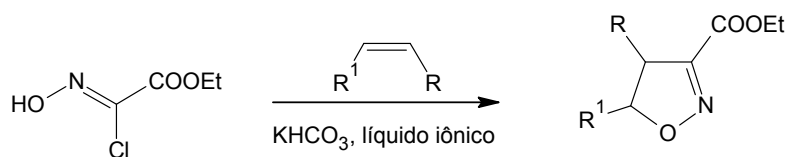


FIG 1.32 Síntese de 3-etoxicarbonil-4,5-diidro-isoxazóis empregando KHCO_3

Em 2006, Dallanoce e colaboradores, em seus estudos sobre a potencial atividade de derivados de 4,5-diidro-isoxazóis sobre receptores β -adrenérgicos, necessitaram sintetizar 3-etoxicarbonil-4,5-diidro-isoxazóis para em seguida funcionalizar a posição 3, conforme a FIG 1.33 demonstra.

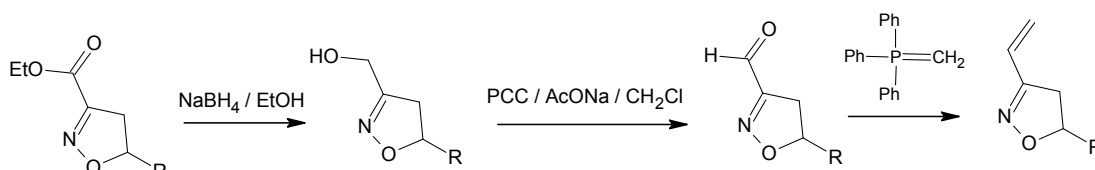


FIG 1.33 Funcionalização do grupamento éster em 4,5-diidro-isoxazóis

Em 2009, Sun, em seu estudo de novos agentes contra o *Micobacterium tuberculosis*, sintetizou derivados de éster 4,5-diidro-isoxazóis e avaliou a relação estrutura-atividade frente a diferentes substituintes nas posições 3 e 5 do anel. A descoberta mais significativa foi a comprovação da perda de atividade antibacteriana das moléculas que tiveram alteradas a posição 3 do anel, demonstrando a extrema importância da presença do grupo funcional éster nessa posição, conferindo maior carácter hidrofílico a molécula. A TAB 1.3 reporta alguns resultados obtidos (SUN,2009).

TAB 1.3 Avaliação da atividade de 4,5-diidro-isoxazóis como agentes antibacterians

ANTIBACTERIANO	R	R1	CIM ($\mu\text{g} / \text{mL}$)
	COOEt	Ph CH ₂	1,56
		COOt-Bu	0,8
	COOH	Ph CH ₂	>200
		COOBu	>200
	CONH ₂	Ph CH ₂	200

SUN, 2009

1.4 OBJETIVO

Este trabalho tem por objetivo a síntese de diferentes derivados 3-etóxicarbonil-4,5-diidro-isoxazóis 5-substituídos a partir da reação de ciclo-adição 1,3-dipolar de óxido de carboetóxi-formonitrila (CEFNO) aos alquenos: acrilato de etila, álcool alílico, acrilonitrila, brometo de alila, estireno e metacrilato de metila. Em uma segunda etapa será realizada a funcionalização do grupamento éster na posição 3 do anel isoxazólico utilizando reações com hidrazina e hidroxilamina. Os produtos serão caracterizados empregando técnicas como: FTIR, RMN ^{13}C , RMN ^1H , espectrometria de massas e análise elementar. Ao final, será avaliada a atividade antimicrobiana frente às bactérias Gram-positiva (*Staphylococcus aureus*) e Gram-negativa (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosas* e *Klebsiella pneumoniae*), objetivando investigar a influência na atividade dos diferentes substituintes ligados na posição 3 e 5 dos compostos heterocíclicos sintetizados.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 REAGENTES E SOLVENTES

A TAB 2.1 abaixo reporta os reagentes e solventes utilizados nesse trabalho.

TAB 2.1 Reagentes e solventes utilizados

Reagentes	Procedência	Grau de pureza
Acetato de etila	Vetec	P.A.
Ácido clorídrico	Merck	P.A.
Acrilato de etila	Aldrich	97%
Acrlonitrila	Aldrich	97%
Álcool alílico	Fluka e Riedel	99%
Acetona	Vetec	P.A.
Álcool etílico	Vetec	P.A.
Álcool etílico absoluto	Vetec	99%
Álcool metílico	Vetec	P.A.
Brometo de alila	Aldrich	97%
Estireno	Aldrich	97%
Éter etílico	Vetec	P.A.
Cloreto de tionila	Vetec	P.A.
Cloridrato de hdroxilamina	Merck	99%
Clorofórmio-d	Cambridge Isotope	99%
Dmso-d	Cambridge Isotope	99%
Glicina	Merck	99%
Hexano	Vetec	P.A.
Hidrazina	Vetec	P.A.
Metacrilato de metila	Aldrich	97%
Nitrito de sódio	Merck	P.A.
Sílica gel 60 F254-366	Merck	P.A.
Sílica gel 70-325 mesh	Merck	P.A.
Sílica gel 230-400 mesh	Merck	P.A.
Sulfato de magnésio anidro	Vetec	99%
Trietilamina	Vetec	P.A.

2.2 EQUIPAMENTOS

Além dos equipamentos e vidrarias comuns de laboratório, para a caracterização dos compostos foram utilizados os seguintes aparelhos descritos na TAB 2.2.

TAB 2.2 Equipamentos Utilizados

Equipamentos	Marca	Modelo
Cromatógrafo a Gás	Agilent	6820
Espectrômetro de Massas acoplado a Cromatógrafo a Gás	Agilent	6890N
Espectrofotômetro de Infravermelho com Transformada de Fourier	Perkin Elmer	1710
Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear	Bruker	Avance 500
Análise Elementar	Instruments	EA 1110 CHNS-O CE

2.3 METODOLOGIA DE SÍNTESE DOS COMPOSTOS

2.3.1 ESTERIFICAÇÃO DA GLICINA

Em um balão de 100 mL foram adicionados 0,655 mol (aproximadamente 5 g) de glicina e 50 mL de álcool etílico absoluto. A mistura foi resfriada a 0 °C sob constante agitação. Lentamente, 12 mL de cloreto de tionila foram gotejados a mistura. O resfriamento foi retirado e a mistura permaneceu sob agitação por 24 h a temperatura ambiente. Após filtração e lavagem com éter etílico foi obtido um sólido branco identificado como glicinato de etila hidrocloreto (GEE).

2.3.2 SÍNTESE DO CLORETO DE IMIDOÍLA

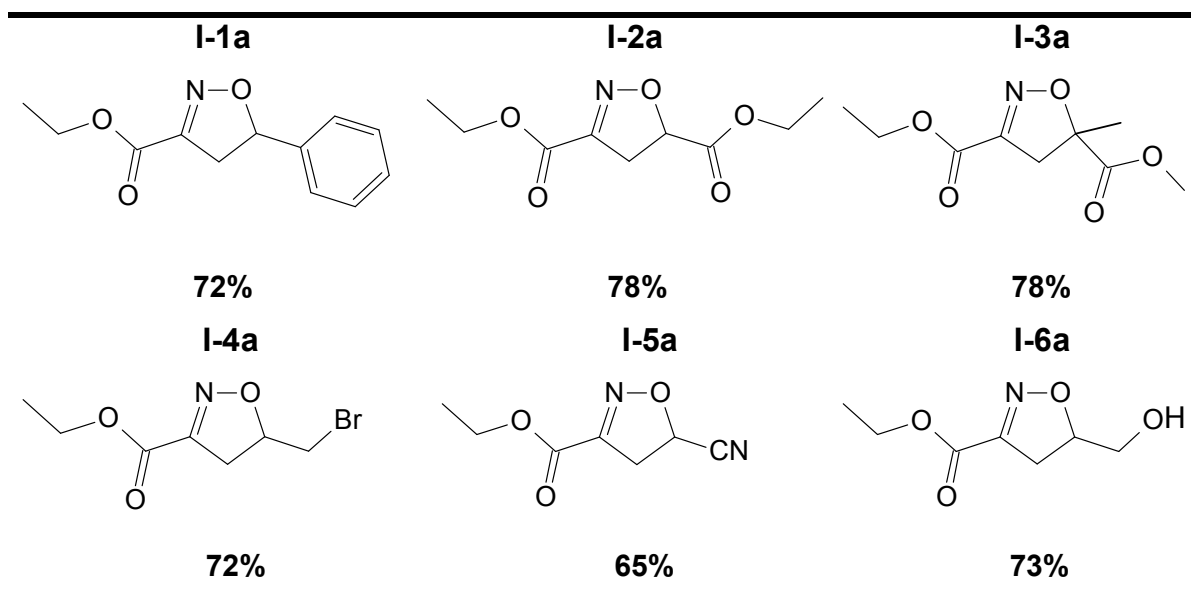
Foram transferidos 0,05 mol (7 g) de GEE para balão de 100 mL, e solubilizados em 10 mL água destilada. Foram adicionados 4,2 mL de ácido clorídrico e a mistura resfriada a – 5 °C. Sob constante agitação foi adicionado, lentamente, um equivalente de nitrito de sódio (3,5 g) à mistura. Um segundo

equivalente de ácido clorídrico e nitrito de sódio foram adicionados da mesma maneira e a mistura resultante transferida para um funil de separação. A fase orgânica foi extraída com éter, seca com sulfato de magnésio anidro e concentrada no evaporador rotatório. O cloreto de imidoíla específico foi obtido após recristalização com hexano.

2.3.3 SÍNTESE DOS DERIVADOS 3-ETOXICARBONIL-4,5-DIIDRO-ISOXAZÓIS – SÉRIE I

Em um balão de 100 mL, contendo 7,6 mmol (1,2 g) de cloreto de imidoíla solubilizado em 15 mL de éter etílico, foram adicionados de 30-40 mmol do dipolarófilo (excesso). Em seguida, 7,6 mmol (1,1 mL) de trietilamina foram gotejados lentamente gerando o intermediário reativo óxido de nitrila, *in situ*, que na presença do dipolarófilo forma o anel isoxazolínico. A reação ocorreu durante 24 horas à temperatura de 27 °C e com vigorosa agitação. Após este período a solução foi lavada com água, a fase orgânica seca com sulfato de magnésio anidro, sendo em seguida retirado por filtração e o solvente retirado em evaporador rotatório.

A purificação foi realizada por cromatografia em coluna *flash* onde um grama de sílica gel 70-325 *mesh* inicialmente impregnada com a amostra foi inserida em uma coluna recheada com 30 gramas de sílica gel 230-400 *mesh*. Foi utilizada uma mistura de hexano e acetato de etila como eluente, a qual foi determinada por cromatografia em camada fina (CCF). As 4,5-diidro-isoxazóis (1-6 a) foram sintetizadas seguindo esta metodologia e seus respectivos rendimentos são apresentados na TAB 2.3.

TAB 2.3 Estruturas e rendimentos das 4,5-diidro-isoxazóis – série I

2.3.4 FUNCIONALIZAÇÃO DO RADICAL ÉSTER – SÉRIE II

Em um balão de 50 mL, foram adicionados 20 mmol (1,38 g) de cloridrato de hidroxilamina ($\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$) e acrescentados 10 mL de metanol. A mistura foi aquecida brandamente para que houvesse a total dissolução do soluto. Em seguida, foi acrescentada ao balão uma solução de hidróxido de potássio (KOH), previamente preparada com 20 mmol (1,12 g) de KOH em 5 mL de metanol. O sistema foi mantido sob a temperatura de 4 °C, imerso em um banho de gelo, em agitação constante por 15 minutos. Logo após, a mistura foi filtrada para que o cloreto de potássio formado fosse removido (OLLIS, 1974).

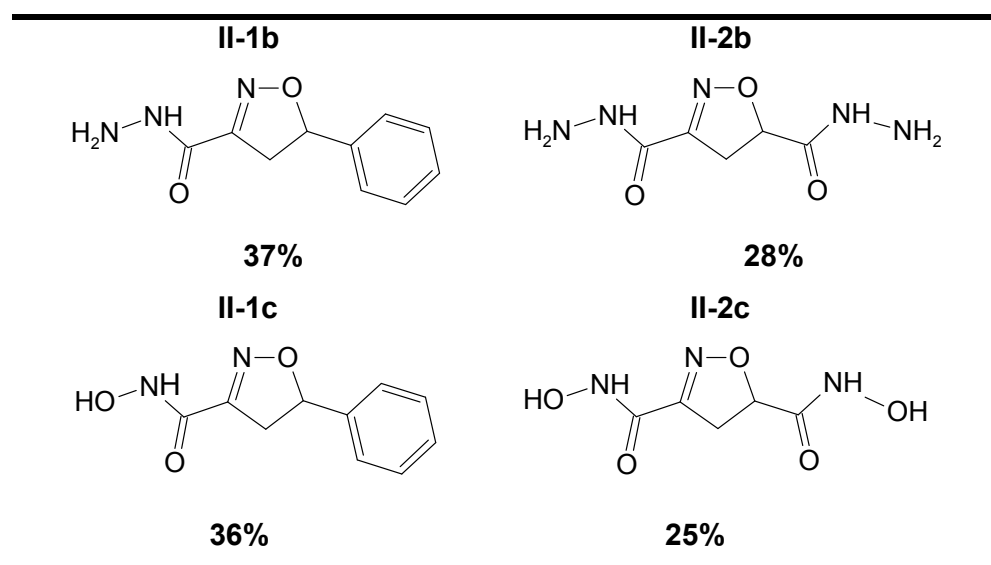
Posteriormente, adicionou-se o filtrado contendo hidroxilamina, a um balão de 50 mL com 0,80 mmol (I-1a: 0,175 g e I-2a: 0,172 g) do derivado de 3-etoxicarbonil-4,5-diidro-isoxazol, previamente dissolvido em 10 mL de metanol. O meio reacional permaneceu em refluxo a temperatura de 70 °C e agitação constante durante 24 horas. A reação foi monitorada por cromatografia gasosa até o completo desaparecimento do sinal com o tempo de retenção referente ao derivado de 3-etoxicarbonil-4,5-diidro-isoxazol de origem.

Decorrido o período de reação, o material foi levado ao evaporador rotatório até que todo solvente fosse removido e permanecesse apenas no balão o precipitado branco adquirido. Este precipitado foi submetido à recristalização com água quente,

de modo que o excesso de hidroxilamina fosse removido. Após 24 horas retirou-se o precipitado desejado através de filtração a vácuo. O precipitado foi seco em estufa a temperatura de 50 °C por 3 horas ou em temperatura ambiente por 48 horas.

Por fim, continuando o processo de funcionalização, utilizou-se o mesmo método de síntese, substituindo-se somente a hidroxilamina por hidrato de hidrazina (0,5 mmol) para se obter outros dois compostos. A TAB 2.4 reporta os compostos obtidos na série II.

TAB 2.4 Estruturas e rendimentos das 4,5-diidro-isoxazóis – série II



2.4 CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS SINTETIZADOS

2.4.1 CROMATOGRAFIA GASOSA

Os compostos foram analisados no Cromatógrafo a Gás (CG) Agilent, modelo 6820 para uso com coluna capilar, detecção por ionização de chama, coluna HP-5MS 5% fenilmetilsilicone de 30 metros com diâmetro de 320 µm, espessura do filme de 0,25 µm, com temperatura inicial de 70 °C e taxa de aquecimento de 15 °C/min até atingir 290 °C. Foi utilizado gás hidrogênio como gás carreador em um tempo de corrida de 20 minutos.

2.4.2 ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Os espectros de massas (EM) foram obtidos em um Espectrômetro de Massas acoplado a um Cromatógrafo a Gás (CG/EM) Agilent modelo 6890N, que operou em condições similares as empregadas na cromatografia gasosa. Foi utilizada a energia de ionização de 70 eV, sendo os íons fragmentados descritos com razão entre massa e carga (m/z) e abundância relativa expressa em porcentagem (%).

2.4.3 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO

Os espectros de infravermelho dos compostos foram obtidos em um Espectrofotômetro de Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR), Perkin Elmer, modelo 1710. As amostras sendo líquidas, foram aplicadas diretamente sobre células de NaCl. Os espectros obtidos foram registrados no intervalo de 4000 a 400 cm^{-1} .

2.4.4 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE HIDROGÊNIO E CARBONO

Os espectros de RMN- ^1H e RMN- ^{13}C das substâncias foram obtidos em um espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear (Bruker, modelo avance 500), com frequência de 300 MHz para ^1H e 75 MHz para ^{13}C . Cerca de 50 mg do produto purificado, previamente secos sob luz infravermelha, foi solubilizado em cerca de 0,7 mL de solventes deuterados. Os sinais de ressonância foram registrados em uma escala em ppm relativos ao padrão interno tetrametilsilano (TMS).

2.5 ENSAIO MICROBIOLÓGICO DOS DERIVADOS ISOXAZOLÍNICOS

Os ensaios microbiológicos foram realizados através do método colorimétrico em microplacas frente às cepas padrão da American Type Culture Collection (ATCC) da *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 7002), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), de acordo com a Norma M7-A6 Vol.23 No 2 2003, desenvolvida pelo NATIONAL

COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS) e regulamentada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

2.5.1 PREPARO DO MEIO DE CULTURA

O caldo Muller-Hinton utilizado como meio de cultura para o crescimento dos microorganismos, foi preparado segundo especificações do fabricante que, neste caso, sugeriu utilizar 21 g do meio para 1000 mL de água destilada. Aplicou-se esterilização por calor úmido, em autoclave operando a 121 °C por 15 minutos, tanto no meio de cultura, como nos demais materiais a serem utilizados no ensaio.

2.5.2 PREPARO DO INÓCULO

Inoculou-se 100 µL da suspensão bacteriana padrão em um tubo de ensaio contendo 10 mL de caldo Mueller-Hinton, previamente esterilizado. Posteriormente, incubou-se a cultura a 37 °C até alcançar a turbidez de uma solução padrão McFarland de 0,5. Isso resultou em uma suspensão com aproximadamente $1,0 \times 10^8$ UFC/mL. Pode-se também medir a absorbância no espectrofotômetro no comprimento de onda 625 nm ($0,1 = 10^8$ UFC/mL). Essa solução é ajustada a concentração de 10^7 UFC/mL pela diluição com meio de cultura.

2.5.3 PREPARO DAS SOLUÇÕES-MÃE DOS DERIVADOS

Para cada derivado isoxazolinico a ser testado, preparou-se 5 mL de uma solução com concentração equivalente a 1000 µg/mL no qual foram adicionados 5,0 mg do composto ao balão volumétrico de 5 mL e 1,0 mL de DMSO, em seguida uma quantidade suficiente de meio de cultura esterilizado foi transferido para avolumar 5 mL.

2.5.4 BIOENSAIO PELO MÉTODO COLORIMÉTRICO EM MICROPLACAS

O método colorimétrico em microplacas possibilita a determinação da concentração inibitória mínima (CIM). As amostras foram diluídas 1:2 partindo da

concentração inicial 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ no primeiro poço. Foi adicionado 5 μL da cultura dos microrganismos em cada poço, obtendo um volume final de 105 μL (5×10^4 CFU/mL), e as microplacas foram incubadas a 37 °C por 24 h. Clorofenicol (Sigma) foi utilizado para o controle positivo.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os derivados isoxazolínicos propostos (TAB 2.3 e 2.4) foram sintetizados utilizando a metodologia desenvolvida por Kozikowski (FIG 1.30). A caracterização desses compostos foi realizada por espectrometria de infravermelho (IV), ressonância magnética nuclear de carbono (RMN ^{13}C), ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H), espectrometria de massas (EM) e análise elementar.

A atividade antimicrobiana dos derivados heterocíclicos sintetizados foi investigada frente as bactérias Gram negativas: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas Aeruginosas*; e Gram positiva: *Staphylococcus aureus*.

Os compostos sintetizados originaram duas séries diferentes: I e II. A primeira foi sintetizada usando seis diferentes dipolarófilos: estireno, metacrilato de metila, brometo de alila, acrilonitrila, acrilato de etila e álcool alílico. Estes heterociclos foram sintetizados usando o óxido de carbetóxi-formonitrila (**27**) como material de partida formado a partir do aminoácido glicina.

Os dipolarófilos da série I foram escolhidos visando a obtenção de derivados com diferentes lipossolubilidades, uma vez que tal característica confere às moléculas do fármaco a capacidade de permearem a dupla camada fosfolipídica das membranas das células bacterianas. com maior ou menor facilidade. Este fato pode influenciar diretamente na eficácia da molécula em atingir o alvo biológico. (GILMANN, 2006; KUMAR, 2009).

A série II foi sintetizada a partir dos compostos isoxazolinicos formados pelo estireno (I-1a), mais lipofílico, e pelo acrilato de etila (I-2a), mais hidrofílico, os quais foram tratados separadamente com hidrazina (II-b) e hidroxilamina (II-c), dando origem a quatro novos compostos, II-1b, II-2b, II-1c e II-2c.

3.1 SÍNTESE DOS DERIVADOS ISOXAZOLÍNICOS

Este trabalho teve início com a síntese do cloreto de imidoíla (**26**), derivado do aminoácido glicina, que dá origem na presença de base ao óxido de carboetóxi-formonitrila (**27**), sendo sua obtenção discutida a seguir.

3.1.1 SÍNTESE DO ÓXIDO DE CARBETÓXI-FORMONITRILA (CEFNO)

O processo de síntese do óxido de carbetóxi-formonitrila a partir de glicina pode ser dividido em duas etapas: a primeira envolve a esterificação da glicina produzindo o glicinato de etila hidrocloreto (GEE) que na segunda etapa reage com ácido nitroso produzindo o respectivo cloreto de imidoíla.

O GEE foi facilmente preparado agitando-se glicina, etanol e cloreto de tionila a 0°C por um período reacional de 10 h. Foi obtido um sólido branco apresentando faixa de fusão de 143-145°C, semelhante ao reportado na literatura (HANDBOOK, 2000) e o rendimento obtido foi de aproximadamente 100%. A FIG 3.1 descreve o esquema mecanístico da reação.

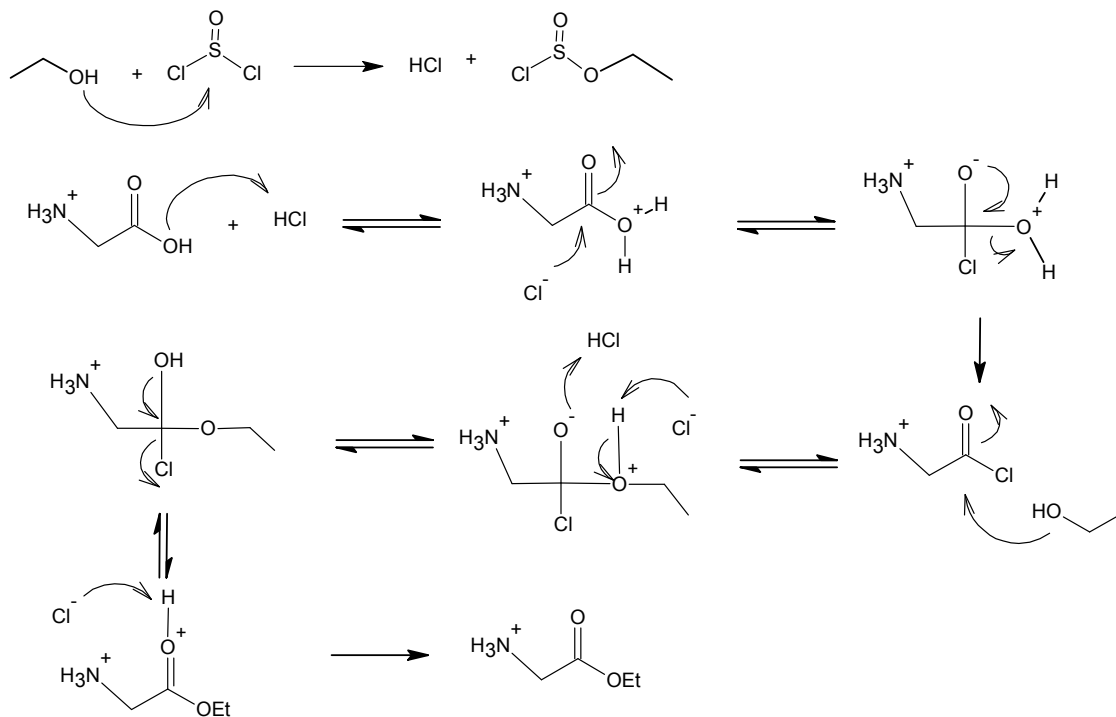


FIG 3.1 Mecanismo de esterificação da glicina)

Na segunda etapa, uma solução aquosa de GEE foi tratada com dois equivalentes de ácido nitroso, para gerar o respectivo cloreto de imidoíla. O mecanismo proposto para esta reação está descrito na FIG 3.2.

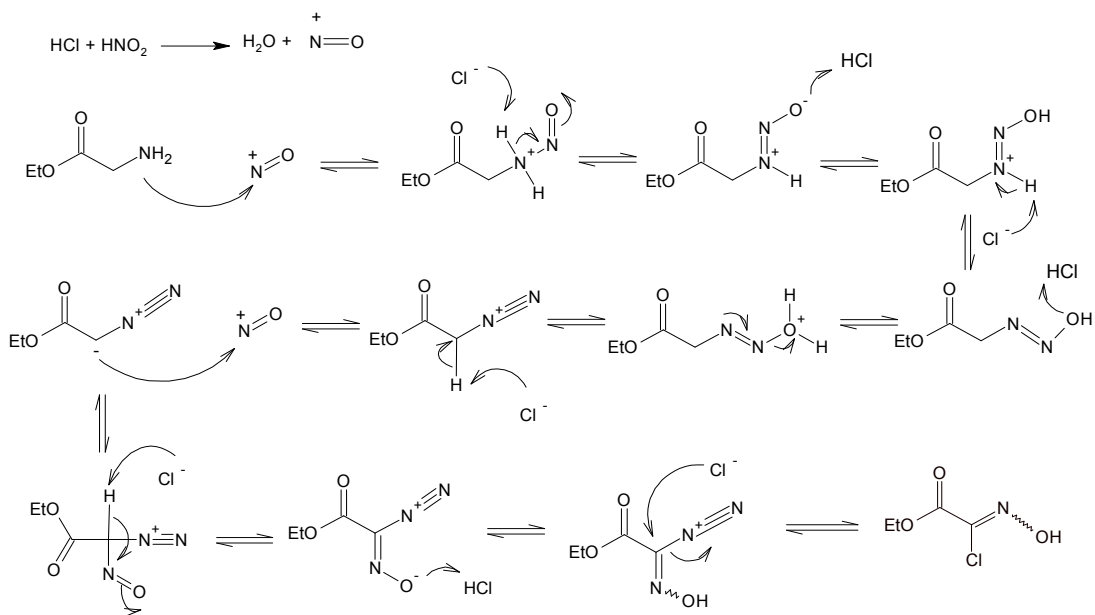


FIG 3.2 Mecanismo da nitrosação do glicinato de etila hidroclorato

O método utilizado para obtenção do cloreto de imidoíla foi o mesmo desenvolvido por Skinner em 1920 e aprimorado por Kozikowski em 1982. A reação teve seu melhor rendimento (41%) a $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ e foi monitorada por cromatografia em camada fina (CCF), observando-se um fator de retenção (RF) diferente do composto de partida, indicando a formação de um novo produto, no tempo reacional de 1 hora. Após extração por solvente (éter) e recristalização em hexano foram obtidos cristais brancos com faixa de fusão de $77\text{-}79\text{ }^{\circ}\text{C}$, semelhante ao reportado na literatura (KAZIKOWSKI, 1982). A FIG 3.3 reporta a análise por cromatografia gasosa (CG) do composto formado.

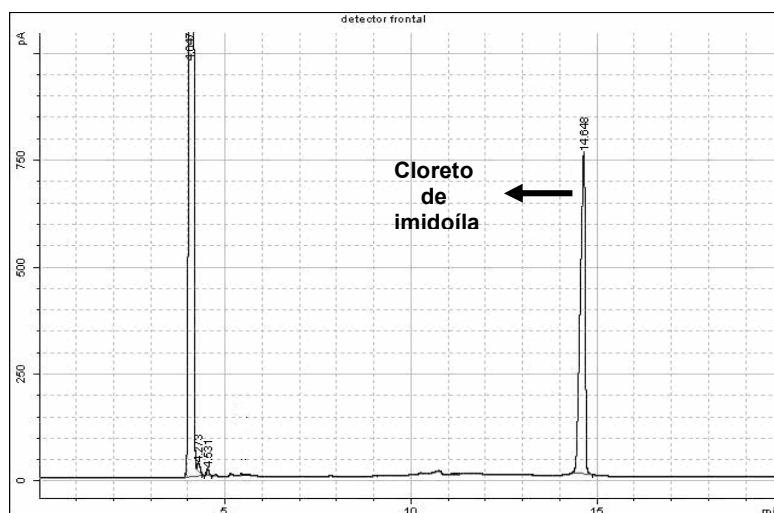


FIG 3.3 Cromatograma do cloreto de imidoíla

A desidroalogenação (*in situ*) do cloreto de imidoíla (**26**) em presença de trietilamina forneceu o óxido de carbetóxi-formonitrila (**27**). Objetivando diminuir a possibilidade de dimerização deste intermediário, ele foi gerado somente na presença de um excesso de dipolarófilo (RODRIGUES, 2001). A rota sintética de formação do óxido de nitrila encontra-se na FIG 3.4.

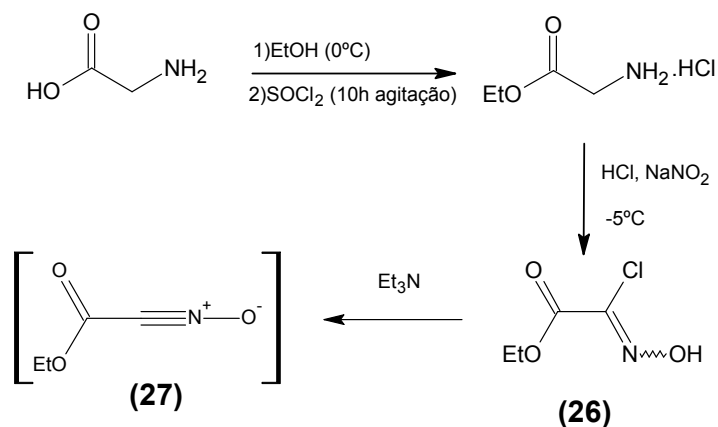


FIG 3.4 Rota sintética de formação do óxido de carbetóxi-formonitrila (**27**)

3.1.2 SÍNTESE DOS DERIVADOS DE 3-ETOXICARBONIL-4,5-DIIDRO-ISOXAZÓIS – SÉRIE I

A série I foi preparada através da reação de cicloadição 1,3-dipolar do óxido de carbetóxi-formonitrila a diferentes dipolarófilos: estireno, metacrilato de metila,

brometo de alila, acrilonitrila, acrilato de etila e álcool alílico. Foram obtidos seis produtos derivados de 3-etoxicarbonil-4,5-diidro-isoxazóis (1-6a) A FIG 3.5 apresenta a retrossíntese da formação dos derivados isoxazolínicos (série I).

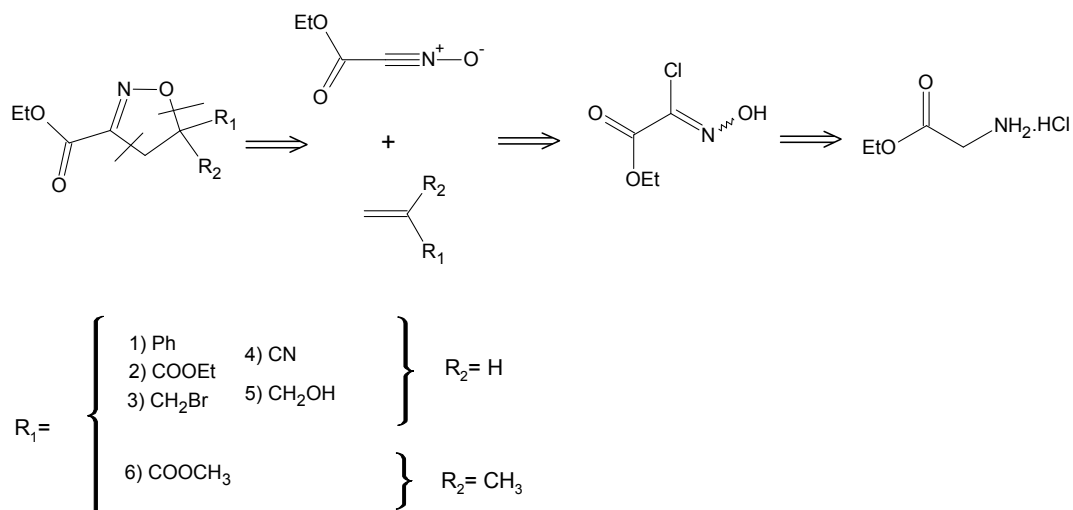


FIG 3.5 Retrossíntese da formação dos derivados isoxazolínicos – Série I

3.1.2.1 SÍNTESE DE 3-ETOXICARBONIL-5-FENIL-4,5-DIIDRO-ISOXAZOL (I-1a)

A reação foi conduzida conforme procedimento descrito no item 2.3.3 página: 29. O cloreto de imidoíla foi adicionado lentamente a solução contendo estireno, trietilamina e éter. Desta forma o dipolo foi gerado em presença de dipolarófilo, utilizando uma razão molar de 1:4, respectivamente. O mecanismo proposto para esta reação encontra-se na FIG 3.6.

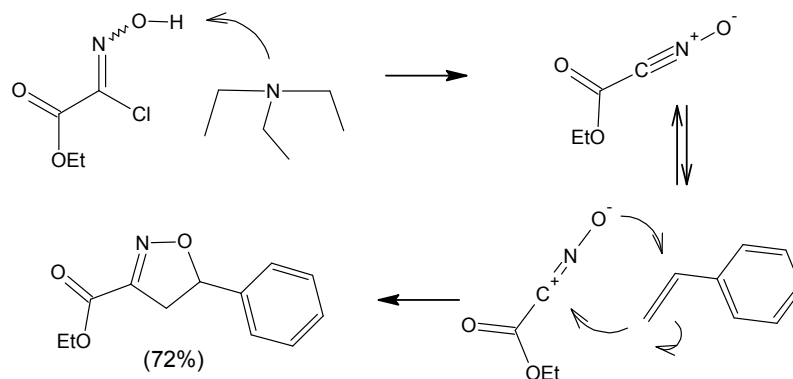


FIG 3.6 Reação de formação de 5-fenil-3-etoxicarbonil-4,5-diidro-isoxazol

A reação foi monitorada por cromatografia com fase gasosa, no qual foi observado que a conversão total ocorreu num tempo de 12 horas a 27 °C. Estas condições reacionais produziram no CG um pico predominante com tempo de retenção de 17,9 minutos (FIG 3.7).

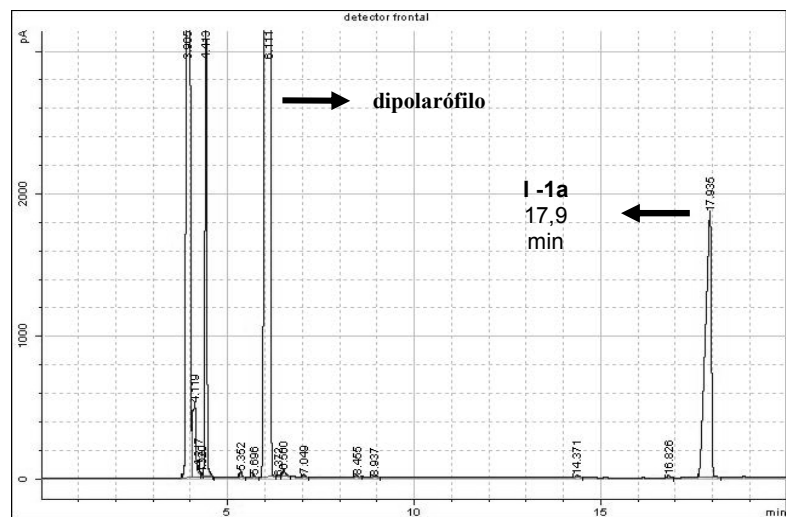


FIG 3.7 Cromatograma da síntese do composto I-1a

O produto I-1a foi purificado por cromatografia em coluna empregando uma mistura de hexano e acetato de etila (3:1), como eluente. Foi obtido 1,20 g (72%) de um líquido oleoso amarelo.

A caracterização do composto foi iniciada empregando técnica de IV (ver APÊNDICE FIG 6.1, página: 97), onde foi observada uma absorção de intensidade moderada por volta de 1589 cm^{-1} , relacionada ao estiramento da ligação C=N do anel heterociclo (DESAI, 2007). Em torno de 1720 cm^{-1} , uma absorção de forte intensidade referente ao estiramento axial do grupo C=O do éster. As absorções intensas em 1247 cm^{-1} e 1122 cm^{-1} foram associadas as vibrações axiais assimétrica e simétrica da ligação C–O, respectivamente. Por fim, as absorções em 700 cm^{-1} e 748 cm^{-1} foram relacionadas as deformações angulares fora do plano do anel aromático monossustituído, conforme reportado na TAB 3.1 (SILVEIRSTEIN, 2000).

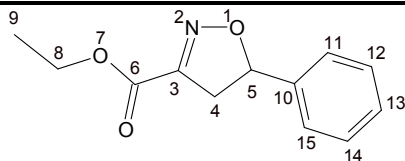
TAB 3.1 Principais absorções na região do IV do composto I-1a	
ABSORÇÃO(cm⁻¹)	ATRIBUIÇÃO
1720	vibração axial de C=O
1247	vibração axial assimétrica C—O
1122	vibração axial simétrica C—O
1589	vibração axial de C=N
700 e 748	Deformação angular fora do plano C—H

Através das análises de RMN ¹³C (ver APÊNDICE FIG 6.2, página: 98) foram obtidos os deslocamentos químicos dos carbonos do composto sintetizado, os quais são reportados na TAB 3.2.

Os deslocamentos químicos em 151,0, 41,1 e 84,7 ppm evidenciam a formação do anel isoxazolinico, uma vez que estes são semelhantes aos deslocamentos dos carbonos C-3, C-4 e C-5, respectivamente, deste heterociclo, reportados na literatura (CURRAN,1997, PIRRUNG, 2002). Os sinais 160,2 e 61,8 ppm foram associados aos carbonos C-6 e C-8, respectivamente, devido a semelhança desses valores aos relacionados a carbonos da função éster (SILVEIRSTEIN,2000).

TAB 3.2 RMN ¹³C: deslocamentos químicos dos carbonos do composto I-1a

δ	C
160,2	C-6
151,0	C-3
139,4	C-10
128,6 e 128,3	C-11–C15
125,7	C-13
84,7	C-5
61,8 e 14,1	C-8 e C-9
41,1	C-4



De modo a estabelecer a regioquímica pertinente ao produto sintetizado, foi empregada a técnica de DEPT (ver APÊNDICE FIG 6.3, página: 99). Visto que o produto da ciclo-adição, teoricamente, poderia assumir duas regioquímicas distintas (A e B), conforme apresentado na FIG 3.8. Os dados obtidos encontram-se na TAB 3.3.

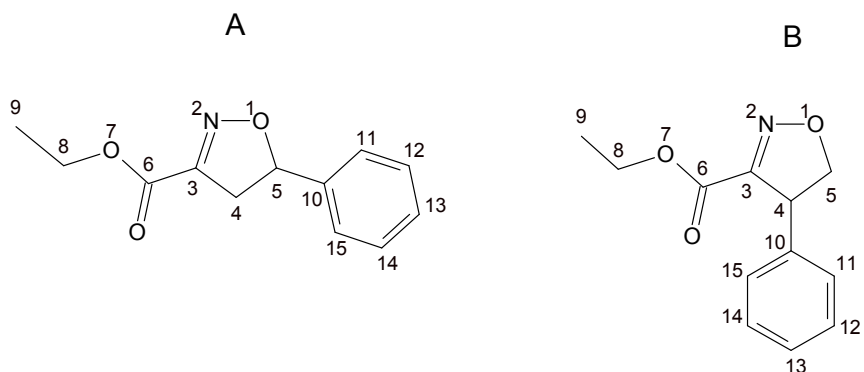


FIG 3.8 Possíveis regioquímicas do composto I-1a

A partir da TAB 3.3 pode ser observado que os deslocamentos químicos de C-4 e C-5, em 41,1 e 84,7 ppm, possuem multiplicidades de metileno e metino, respectivamente. O mais desblindado (C-5) está ligado ao átomo mais eletronegativo, no caso o oxigênio (SILVEIRSTEIN,2000). Com base nos resultados obtidos presumiu-se que a regioquímica do composto I-1a era análoga a estrutura A (FIG 3.8).

TAB 3.3 DEPT: Multiplicidade dos carbonos do composto I-1a

δ	MULTIPLICIDADE	C
128,6	CH	C-12 e C-14
128,3	CH	C-11 e C-15
125,7	CH	C-13
84,7	CH	C-5
61,8	CH ₂	C-8
41,1	CH ₂	C-4
14,1	CH ₃	C-9

O sistema aromático apresenta 5 carbonos com multiplicidade CH. O carbono C-13 em 125,7 ppm é o mais blindado dos aromáticos o que se explica pela estrutura de ressonância do anel proposta na FIG 3.9. C-10, o mais desblindado dos carbonos aromáticos, foi associado a δ 139,4 devido a ser um carbono quaternário e, assim como C-3 e C-6, não é visualizado pela técnica *DEPT*. Os dois carbonos simétricos C-12 e C-14, em 128,6 ppm, encontram-se em uma região com uma leve deficiência de elétrons com relação a C-11 e C-15, em 128,3 ppm.

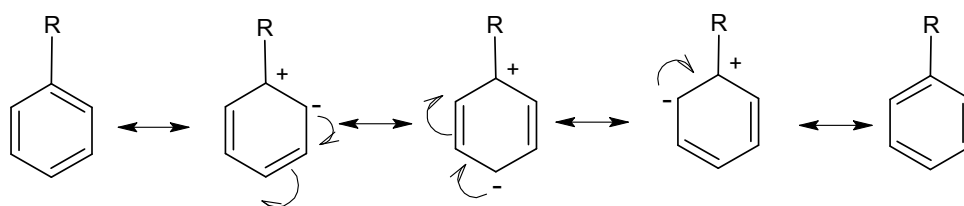
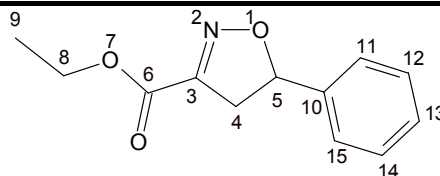


FIG 3.9 Formas de ressonância para o anel aromático

Em continuidade às caracterizações foi realizada a RMN ^1H (ver APÊNDICE FIG 6.4, página: 100), e os dados obtidos encontram-se disponibilizados na TAB 3.4 a seguir.

TAB 3.4 RMN ^1H : Assinalamentos dos hidrogênios do composto I-1a



δ	H	MULTIPLICIDADE	INTEGRAÇÃO	J (Hz)
7,30	H11-15	m	5	-
5,70	H5	dd	1	$^3J_{H5-H4a} = 11,6$; $^3J_{H5-H4b} = 8,9$
4,30	H8	q	2	$^3J_{H8-H9} = 7,0$
3,65	H4a	dd	1	$^2J_{H4a-H4b} = 17,8$; $^3J_{H4a-H5} = 11,6$
3,20	H4b	dd	1	$^2J_{H4b-H4a} = 17,8$; $^3J_{H4b-H5} = 8,9$
1,32	H9	t	3	$^3J_{H9-H8} = 7,0$

A partir dessa técnica (TAB 3.4), foi observado um duplo-duplete na região de δ 3,20, tendo este constantes de acoplamento $^2J_{H4b-H4a} = 17,8$ Hz e $^3J_{H4b-H5} = 8,9$ Hz. Um outro duplo-duplete foi detectado em δ 3,65 com constantes de acoplamento de

$^2J_{H4a-H4b} = 17,8 \text{ Hz}$ e $^3J_{H4a-H5} = 11,6 \text{ Hz}$. Ambos apresentaram integração de 1H e logo foram atribuídos aos hidrogênios pró-quirais H4a e H4b do anel isoxazólico. Foi observada a presença de um duplo-duplete em δ 5,70 característicos do hidrogênio H5 do heterociclo. Os demais sinais foram observados em 7,30 ppm, um multiplete com integração 5H associado ao sistema aromático, 4,30 e 1,32 ppm, ambos do grupamento éster da molécula.

A análise de EM (ver APÊNDICE FIG 6.5, página: 101) apresentou um íon molecular com $m/z = 219$ (27%), compatível com o valor do peso molecular do composto I-1a. O pico base observado foi de $m/z = 104$ e pode ser justificado pelo fragmento apresentado na FIG 3.10.

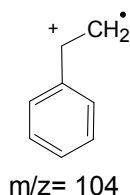
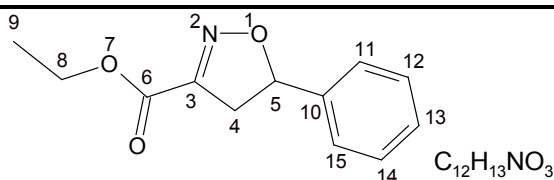


FIG 3.10 Fragmento sugerido para o pico base do composto I-1a

A análise elementar foi realizada contribuindo na verificação do grau de pureza do composto I-1a. A TAB 3.5 apresenta o resultado da porcentagem de CHN existente na substância, seguido do valor estimado e da variação entre ambos.

TAB 3.5 Análise elementar de CHN do composto I-1a



VALOR	C (% m/m)	H (% m/m)	N (% m/m)
VC ^a	65,7	5,9	6,3
VE ^b	65,9	5,6	6,7
V ^c	0,2	0,3	0,4

^a Valor calculado ^b Valor Experimental ^c Variação

3.1.2.2 SÍNTESE DE 3,5-DIETOXICARBONIL-4,5-DIIDRO-ISOXAZOL (I-2a)

Continuando o processo de formação dos derivados de 3-etoxicarbonil-4,5-diidro-isoxazóis foi sintetizado o composto I-2a utilizando acrilato de etila como dipolarófilo numa proporção 4 vezes maior em relação a quantidade de cloreto de imidoíla. A reação ocorreu durante 15 h a 27°C, em constante agitação e foi monitorada por cromatografia gasosa, onde o aparecimento de um pico predominante em 14,9 minutos evidenciou a possível formação do produto.

O produto I-2a foi isolado por cromatografia em coluna utilizando hexano e acetato de etila como eluente em uma proporção de 4:1, (FIG 3.11) sendo obtido por volta de 1,3 g (78%) de um líquido oleoso amarelo.

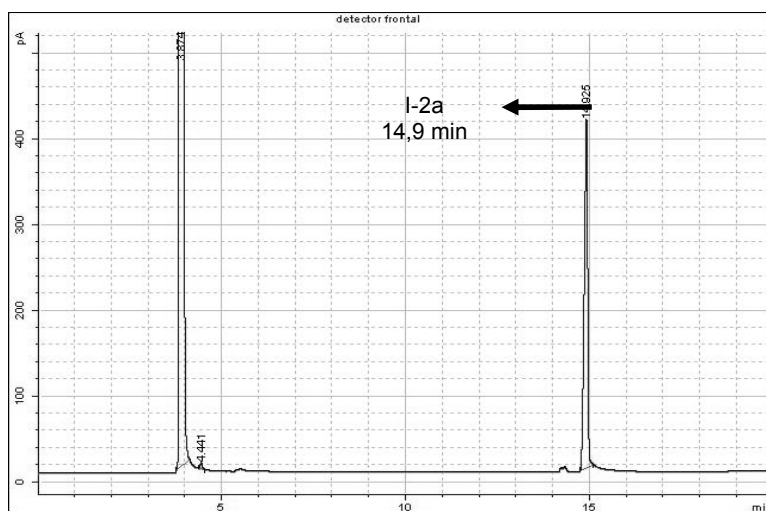


FIG 3.11 Cromatograma da síntese do composto I-2a

Utilizando a técnica de IV (ver APÊNDICE FIG 6.6, página: 102) iniciou-se o processo de caracterização do composto I-2a. Foram verificadas as absorções características conforme descrito na tabela a seguir (TAB 3.6). Em 1599 cm^{-1} e em 1740 cm^{-1} foram observadas as absorções relacionadas as vibrações axiais C=N e C=O, respectivamente. Os estiramentos simétricos e assimétricos provenientes das ligações C–O foram relacionados as absorções 1255 e 1211 cm^{-1} e as 1155 e 1126 cm^{-1} .

TAB 3.6 Principais absorções na região do IV do composto I-2a	
ABSORÇÃO(cm⁻¹)	ATRIBUIÇÃO
1740	vibração axial de C=O
1255 e 1211	vibração axial assimétrica C–O
1155 e 1126	vibração axial simétrica C–O
1599	vibração axial de C=N

Através da técnica de caracterização por análise de RMN de ¹³C (ver APÊNDICE FIG 6.7, página: 103) foi evidenciado a formação do anel isoxazolinico (C3,C4 e C5). Os assinalamentos 62,5 e 62,4 ppm, praticamente idênticos, foram relacionados aos carbonos ligados aos oxigênios (C-8 e C-12) dos substituintes ésteres e 14,2 e 14,1 ppm aos carbonos semelhantes C-9 e C-13. Os carbonos, C-6 e C-10, são característicos das carbonilas, sendo C-6 o mais blindado já que apresenta-se conjugado com C=N do anel heterociclo (SILVERSTEIN, 2000). A TAB 3.7 abaixo reporta os valores comentados:

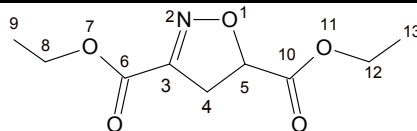
TAB 3.7 RMN ¹³C: deslocamentos químicos dos carbonos do composto I-2a

δ	C
169,0	C-10
160,0	C-6
151,2	C-3
80,0	C-5
62,5 e 62,4	C-8 e C-12
37,7	C-4
14,2 e 14,1	C-9 e C-13

A regioquímica do composto I-2a foi estabelecida com uso da técnica de DEPT (ver APÊNDICE FIG 6.8, página: 104). Observando-se as multiplicidades de C-4 e

C-5 do heterociclo pôde-se concluir a formação do isômero 5-substituído, assim como no composto I-1a. Na TAB 3.8 apresentam-se os deslocamentos químicos dos carbonos e suas multiplicidades.

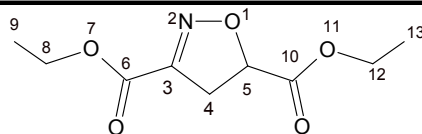
TAB 3.8 DEPT: Multiplicidade dos carbonos do composto I-2a



δ	MULTIPLICIDADE	C
80,0	CH	C-5
62,5 e 62,4	CH ₂	C-8 e C-12
37,7	CH ₂	C-4
14,2 e 14,1	CH ₃	C-9 e C-13

No espectro de RMN ¹H (ver APÊNDICE FIG 6.9, página: 105) foram observados os assinalamentos e multiplicidades dos hidrogênios dos substituintes ésteres, característicos do composto I-2a: dois tripletos bastante próximos em 1,32 e 1,37 ppm, associados a H13 e H9, e dois quartetos em 4,27 e 4,34 ppm relacionados a H12 e H8. Também foram observados os hidrogênios característicos do anel isoxazolinico, H4a, H4b e H5, em δ 3,51 (²J_{H4a-H4b} = 17,8; ³J_{H4a-H5} = 11,5), δ 3,48 (²J_{H4b-H4a} = 17,8; ³J_{H4b-H5} = 7,8) e δ 5,18 (³J_{H5-H4a} = 11,5; ³J_{H5-H4b} = 7,8), respectivamente (TAB 3.9).

TAB 3.9 RMN ¹H: Assinalamentos dos hidrogênios do composto I-2a



δ	H	MULTIPLICIDADE	INTEGRAÇÃO	J (Hz)
5,18	H5	dd	1	³ J _{H5-H4a} = 11,5; ³ J _{H5-H4b} = 7,8
4,34	H8	q	2	³ J _{H8-H9} = 7,0
4,27	H12	q	2	³ J _{H12-H13} = 7,0
3,51	H4a	dd	1	² J _{H4a-H4b} = 17,8; ³ J _{H4a-H5} = 11,5
3,48	H4b	dd	1	² J _{H4b-H4a} = 17,8; ³ J _{H4b-H5} = 7,8
1,37	H9	t	3	³ J _{H9-H8} = 7,0
1,32	H13	t	3	³ J _{H13-H12} = 7,0

Esperava-se encontrar um íon molecular (M^+) discreto com $m/z = 215$ na análise por espectrofotometria de massa (EM), o que não ocorreu, no entanto, foi observado um íon $M+1$, $m/z = 216$, pouco visível ($<0,5\%$) (ver APÊNDICE FIG 6.10, página: 106). É comum em moléculas contendo heteroátomos (N, O e S) ocorrerem colisões bimoleculares onde há doação de um próton de uma molécula neutra à outra, o que explica $M+1$. O pico base foi observado em $m/z=142$ e justificado pela fragmentação apresentada na FIG 3.12 (SILVERSTEIN,2000).

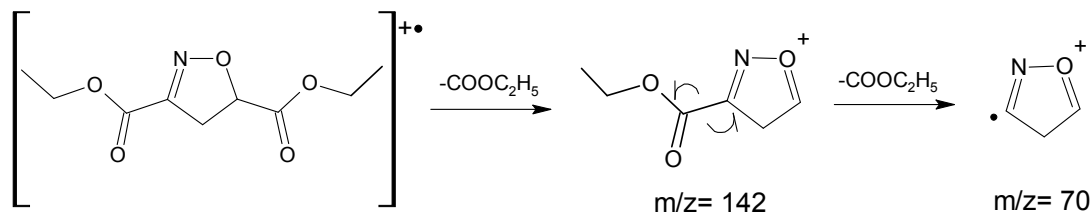
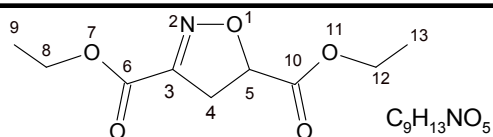


FIG 3.12 Fragmentação do composto I-2a

A análise elemental concluiu a caracterização do composto I-2a, sendo os valores experimental obtidos pela média das três replicatas realizadas apresentado na TAB 3.10.

TAB 3.10 Análise elemental de CHN do composto I-2a



VALOR	C (% m/m)	H (% m/m)	N (% m/m)
VC ^a	50,2	6,0	6,5
VE ^b	50,8	5,7	6,9
V ^c	0,6	0,3	0,4

^a Valor calculado ^b Valor Experimental ^c Variação

3.1.2.3 SÍNTESE DE 3-ETOXICARBONIL-5-METIL-5-METOXICARBONIL-4,5-DIIDRO-ISOXAZOL (I-3a)

A reação foi iniciada empregando o metacrilato de metila em excesso (4:1) na presença de trietilamina, em sequência, adicionando lentamente o cloreto de imidofila (**26**) de modo a formar o dipólo, óxido de carbetóxi-formonitrila (**27**), na

presença do dipolarófilo. O sistema foi mantido a 27°C, sob constante agitação, por 12 horas. Após este período, realizou-se a análise por cromatografia gasosa e foi observado o aparecimento de um pico predominante com tempo de retenção 14,1 minutos (FIG 3.13), posterior ao material de partida.

O produto I-3a foi isolado por cromatografia em coluna utilizando hexano e acetato de etila como eluente em uma proporção de 4:1, sendo obtido por volta de 1,3 g (78%) de um líquido oleoso amarelo.

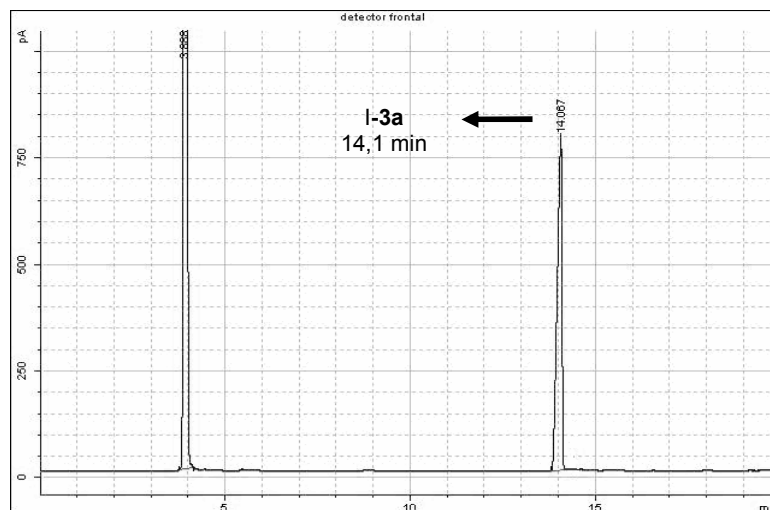


FIG 3.13 Cromatograma da síntese do composto I -3a

Inicialmente, a análise por espectrofotometria de IV (ver APÊNDICE FIG 6.11, página: 107) evidenciou absorções características dos derivados isoxazolínicos contendo éster conforme observado na tabela TAB 3.11 abaixo.

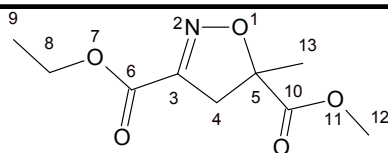
TAB 3.11 Principais absorções na região do IV do composto I-3a	
ABSORÇÃO(cm⁻¹)	ATRIBUIÇÃO
1740	vibração axial de C=O
1267 e 1201	vibração axial assimétrica C–O
1132 e 1109	vibração axial simétrica C–O
1597	vibração axial de C=N

Seguindo o processo de identificação do composto foi realizada a análise de ressonância magnética nuclear de ^{13}C (APÊNDICE FIG 6.12, página: 108), confirmando a formação do anel isoxazolinico (C3, C4 e C5). Os respectivos deslocamentos químicos foram alocados na TAB 3.12:

TAB 3.12 RMN ^{13}C : Deslocamentos químicos dos carbonos do composto I-3a

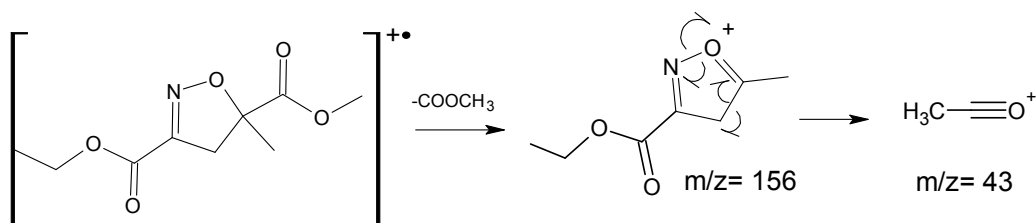
δ	C
171,1	C-10
160,0	C-6
151,0	C-3
88,4	C-5
62,1 e 14,0	C-8 e C-9
53,1	C-12
43,3	C-4
23,3 e	C-13

A RMN ^1H (ver APÊNDICE FIG 6.13, página: 109) apresentou sinais relacionados a H4a e H4b como dois dupletos com sinais δ 3,00 e δ 3,60, respectivamente. Esta multiplicidade (H4) explica a ausência do H5 nesta molécula, pois em seu lugar há uma metila originando um sinal em δ 1,55 relacionado a H13. Os assinalamentos, δ 4,25 e δ 3,70, e as respectivas multiplicidades confirmam os grupos metileno (H-8) e metila (H-12) ligados aos oxigênios dos substituintes ésteres (TAB 3.13).

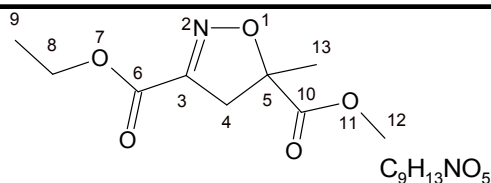
TAB 3.13 RMN ¹H: Assinalamentos dos hidrogênios do composto I-3a

δ	H	MULTIPLICIDADE	INTEGRAÇÃO	J (Hz)
4,25	H8	q	2	$^3J_{H8-H9} = 7,0$
3,70	H12	s	3	-
3,60	H4a	d	1	$^2J_{H4a-H4b} = 18,0$
3,00	H4b	d	1	$^2J_{H4b-H4a} = 18,0$
1,55	H13	s	3	-
1,25	H9	t	3	$^3J_{H9-H8} = 7,0$

Finalizando a caracterização do composto I-3a foi realizada a EM (APÊNDICE FIG 6.14, página: 110), na qual foi detectado um íon M+1, m/z= 216, pouco visível (<0,5%) similar ao encontrado para o composto (I-2a). O íon molecular (M+) de 215 não foi observado. O pico base observado foi de m/z=43, bastante característico em ésteres e pode ser justificado pelo fragmento apresentado na FIG 3.14 (SILVERSTEIN,2000).

**FIG 3.14** Fragmento sugerido para o pico base do composto I-3a

A caracterização do composto I-3a foi concluída por Análise Elementar e o resultado experimental foi obtido a partir da média de três replicatas realizadas (TAB 3.14).

TAB 3.14 Análise elementar de CHN do composto I-3a

VALOR	C (% m/m)	H (% m/m)	N (% m/m)
VC ^a	50,2	6,0	6,5
VE ^b	50,5	5,8	7,0
V ^c	0,3	0,2	0,5

^a Valor calculado ^b Valor Experimental ^c Variação

3.1.2.4 SÍNTESE DE 3-ETOXICARBONIL-5-BROMOMETIL-4,5-DIIDRO-ISOXAZOL (I-4a).

A síntese teve início empregando um excesso de brometo de alila (4:1) na presença trietilamina, em sequência, adicionando lentamente o cloreto de imidoíla, de modo a formar o óxido de carbetóxi-formonitrila (**27**), na presença do dipolarófilo, minimizando a formação de dímeros. O sistema foi mantido a temperatura de 27 °C, sob agitação constante, por 18 horas. Após este período, foi realizada a análise por cromatografia gasosa e verificado um pico predominante com tempo de retenção posterior ao material de partida, 14,4 minutos. (FIG 3.15).

O isolamento do produto foi conduzido por cromatografia em coluna empregando uma mistura de hexano e acetato de etila (3:1) como eluente, sendo obtido por volta de 1,3 g (72%) de um líquido oleoso levemente amarelado.

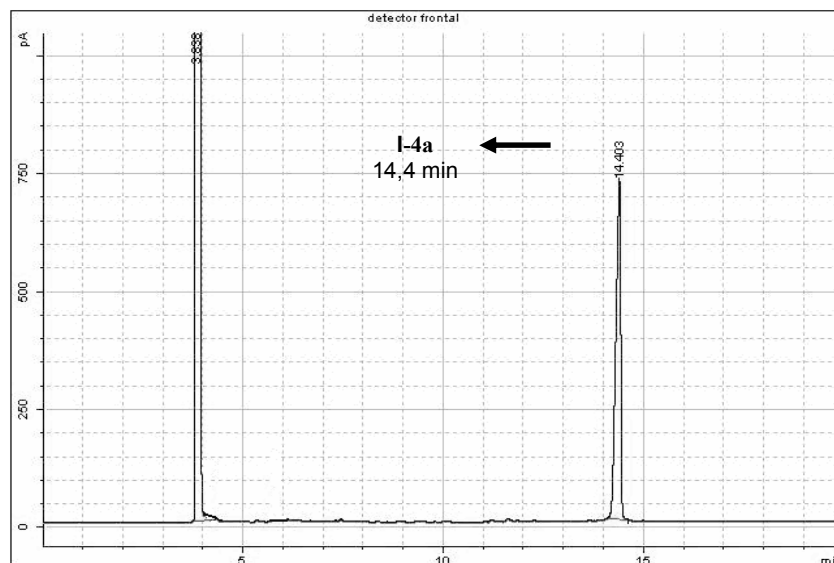


FIG 3.15 Cromatograma da síntese do composto I-4a.

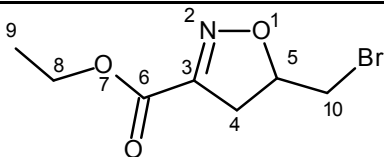
O processo de caracterização do composto I-4a foi iniciado utilizando a técnica de IV (ver APÊNDICE FIG 6.15, página: 111). Foi observada presença de absorções características em 1593 cm^{-1} , deformação axial C=N, em 1720 cm^{-1} , deformação axial C=O, além das deformações axiais provenientes da ligação C–O em 1260 e 1125 cm^{-1} . Uma vibração característica da ligação C–Br em 659 cm^{-1} (SILVEIRSTEIN,2000) também foi observada e reportada na TAB 3.15 a seguir.

TAB 3.15 Principais absorções na região do IV do composto I-4a

ABSORÇÃO(cm^{-1})	ATRIBUIÇÃO
1720	vibração axial de C=O
1260	vibração axial assimétrica C–O
1125	vibração axial simétrica C–O
1593	vibração axial de C=N
659	Vibração C–Br

A tabela a seguir (TAB 3.16) apresenta os resultados da análise por RMN ^{13}C (ver APÊNDICE FIG 6.16, página: 112), com os respectivos assinalamentos de carbono do composto I-4a. Nela observa-se os sinais de C3, C4 e C5 em $\delta\ 151,3$, $\delta\ 38,4$ e $\delta\ 82,0$ ppm, respectivamente, característicos da formação do anel isoxazolínic.

TAB. 3.16 RMN: Assinalamentos de carbonos e hidrogênios do composto I-4a



Posição	$\delta^1\text{H}$ (J / Hz)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)
3	-	151,3
4a	3,35 (dd, $^2J_{H4a-H4b} = 18,1$; $^3J_{H4a-H5} = 7,1$ Hz, 1H)	38,4
4b	3,20 (dd, $^2J_{H4b-H4a} = 18,1$; $^3J_{H4b-H5} = 11,1$ Hz, 1H)	
5	5,10 (m, 1H)	82,0
6	-	160,4
8	4,35 (q, $^3J_{H8-H9} = 7,0$ Hz, 2H)	62,4
9	1,35 (t, $^3J_{H9-H8} = 7,0$ Hz, 3H)	14,3
10a	3,55 (dd, $^2J_{H10a-H10b} = 10,6$; $^3J_{H10a-H5} = 7,3$ Hz, 1H)	32,7
10b	3,43 (dd, $^2J_{H10b-H10a} = 10,6$; $^3J_{H10b-H5} = 4,0$ Hz, 1H)	

Os carbonos C-6 e C-8, foram associados aos sinais δ 160,2 e δ 61,8 ppm, respectivamente, devido a semelhança desses valores aos relacionados com carbonos que compoem gupamentos ésteres (SILVERSTEIN, 2000). Outro assinalamento importante é δ 32,8 ppm atribuído ao C10, característico de carbono metilênico ligado diretamente ao átomo de bromo (RODRIGUES, 2001; CAPACI, 2008). Este apresenta-se menos deslocado que o C-4 isoxazolícnico, devido ao efeito de blindagem exercido uma pela nuvem eletrônica do bromo.

Na mesma tabela (TAB 3.16) é reportad os sinais obitidos na RMN ^1H (ver APÊNDICE FIG 6.17, página: 113), a qual apresenta um duplo-dupleto na região de δ 3,35 com constantes de acoplamento de $^2J_{H4a-H4b} = 18,1$ e; $^3J_{H4a-H5} = 7,1$ Hz. Um outro duplo-dupleto foi detectado em δ 3,20 com constantes de acoplamento de $^2J_{H4b-H4a} = 18,1$; $^3J_{H4b-H5} = 11,1$ Hz. Ambos apresentaram integração de 1H. Logo, foram atribuídos aos hidrogênios pró-quirais H4a e H4b do heterociclo. Foi verificado um multiplete em δ 5,10, associado ao H5 do anel.

Em δ 3,55 e δ 3,43 foram detectados novamente dois duplos-dupletos, ambos com valor de integração de 1H. Estes apresentaram constantes de acoplamento de a) , $^2J_{H10a-H10b} = 10,6$ e $^3J_{H10a-H5} = 7,3$ Hz; b) $^2J_{H10b-H10a} = 10,6$ e $^3J_{H10b-H5} = 4,0$ Hz; respectivamente. Estas multiplicidades foram relacionadas aos hidrogênios H10a e H10b, sugerindo que estes se encontravam em ambientes químicos distintos devido a conformação preferencial admitida pelo bromo.

A análise de EM (ver APÊNDICE FIG 6.18, página: 114) apresentou um ion molecular com $m/z = 235$ (58%) e um íon M+2 de igual intensidade , compatíveis com os valores e descrição da literatura (SILVERSTEIN,2000). O pico base observado foi de $m/z = 142$ (M-93) e pode ser justificado pelo fragmento apresentado na FIG 3.16.

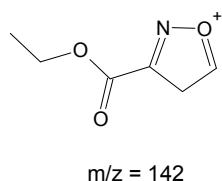


FIG 3.16 Fragmento sugerido para o pico base do composto I-4a

A análise elemental contribui para a verificação da pureza do composto I-4a, quantificando o percentual de C, H, N presentes no composto sintetizado. Na TAB 3.17, encontram-se os valor experimental que é resultado das média das três replicatas realizadas.

TAB 3.17 Análise elemental de CHN do composto I-4a

$C_7H_{10}BrNO_3$

VALOR	C (% m/m)	H (% m/m)	N (% m/m)
VC ^a	35,7	4,2	6,0
VE ^b	36,2	4,1	6,4
V ^c	0,5	0,1	0,4

^a Valor calculado ^b Valor Experimental ^c Variação

3.1.2.5 SÍNTESE DE 3-ETOXICARBONIL-5-CIANO-4,5-DIIDRO-ISOXAZOL (I-5a)

A formação do composto I-5a foi realizada conforme descrito no item 2.33, página: 29 e ao término de 15 horas de reação, foi observado através da análise por CG um pico predominante com tempo de retenção de 12,7 minutos (FIG 3.17).

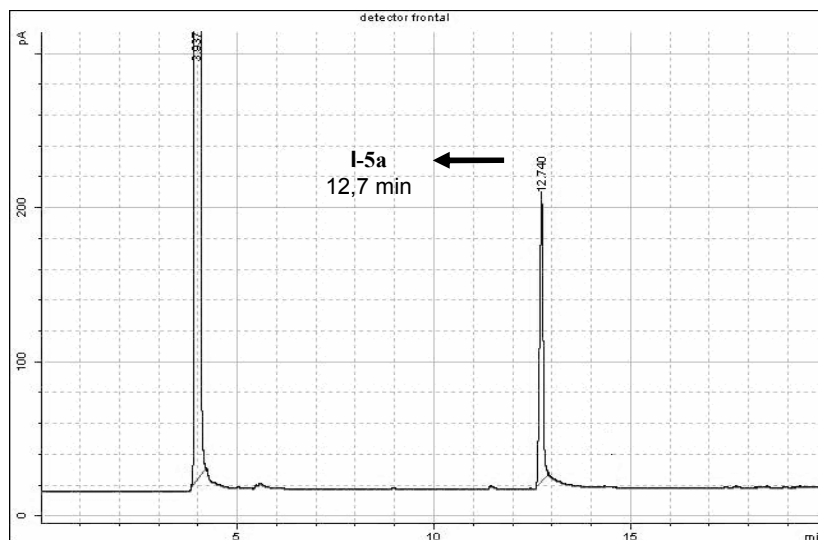


FIG 3.17 Cromatograma da síntese do composto I-5a

O produto foi purificado por cromatografia em coluna utilizando hexano e acetato de etila (4:1). Foi obtido 0,8 g (65%) de um líquido oleoso amarelo.

Utilizando a técnica de IV (ver APÊNDICE FIG 6.19, página: 115) foi iniciada a caracterização do composto I-5a. Em 2227 cm^{-1} foi observada uma absorção de intensidade fraca relacionada a vibração axial da ligação tripla da nitrila. A tabela a seguir (TAB 3.18) reporta as principais absorções encontradas.

TAB 3.18 Principais absorções na região do IV do composto I-5a	
ABSORÇÃO(cm⁻¹)	ATRIBUIÇÃO
2227	vibração da ligação C≡N
1730	vibração axial de C=O
1271	vibração axial assimétrica C–O
1128	vibração axial simétrica C–O
1606	vibração axial de C=N

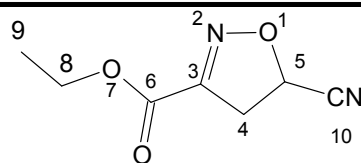
A caracterização por RMN ¹³C (ver APÊNDICE FIG 6.20, página: 116) foi realizada e os assinalamentos de carbono encontram-se a seguir (TAB 3.19).

TAB 3.19 RMN ¹³C: Deslocamentos químicos (δ) dos carbonos do composto I-5a

δ	C
159,1	C-6
151,0	C-3
116,1	C-10
68,3	C-5
63,1	C-8
40,1	C-4
14,0	C-9

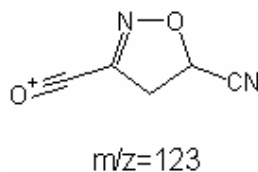
O assinalamento em δ 116,1 foi relacionado a C-10 devido a semelhança com carbono constituinte de nitrila, conforme previsto na literatura (SILVERSTEIN, 2000). Os demais sinais de carbono, já foram discutidos em produtos anteriores (I-1a, 2a,3a e 4a).

Em seguida foi realizada a ressonância magnética nuclear ¹H (ver APÊNDICE FIG 6.21, página: 117), e os assinalamentos dos hidrogênios, já discutidos anteriormente, foram reportados na TAB 3.20 abaixo.

TAB 3.20 RMN ¹H: Assinalamentos dos hidrogênios do composto I-5a

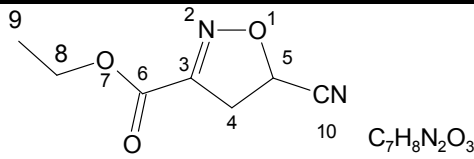
δ	H	MULTIPLICIDADE	INTEGRAÇÃO	J (Hz)
5,41	H5	dd	1	$^3J_{H5-H4a} = 10,9; ^3J_{H5-H4b} = 7,3$
4,34	H8	q	2	$^3J_{H8-H9} = 7,0$
3,65	H4a	dd	1	$^2J_{H4a-H4b} = 17,8; ^3J_{H4a-H5} = 7,3$
3,61	H4b	dd	1	$^2J_{H4b-H4a} = 17,8; ^3J_{H4b-H5} = 10,9$
1,39	H9	t	3	$^3J_{H9-H8} = 7,0$

O espectro de massa (ver APÊNDICE FIG 6.22, página: 118) apresentou um pico base com $m/z=123$ (M-45) que pode ser justificado pelo fragmento apresentado na FIG 3.18. O íon molecular (M^+) com $m/z=168$ apresentou-se discreto (<1%).

**FIG 3.18** Fragmento sugerido para o pico base do composto I-5a

De forma conclusiva para a caracterização do composto I-5a foi realizada a análise elementar, obtendo o valor experimental da porcentagem dos átomos de C, H, N próximo ao valor calculado, conforme demonstrado na TAB 3.21.

TAB 3.21 Análise elementar de CHN do composto I-5a



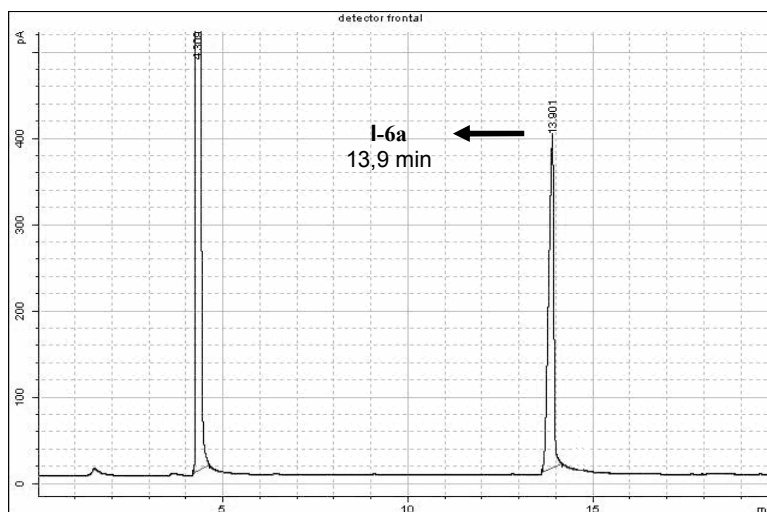
$C_7H_8N_2O_3$

VALOR	C (% m/m)	H (% m/m)	N (% m/m)
VC ^a	50,0	4,8	16,7
VE ^b	50,3	4,5	17,1
V ^c	0,3	0,3	0,4

^a Valor calculado ^b Valor Experimental ^c Variação

3.1.2.6 SÍNTESE DE 3-ETOXICARBONIL-5-HIDROXIMETIL-4,5-DIIDRO-ISOXAZOL (I-6a)

A síntese do produto I-6a foi realizada por reação de ciclo-adição do óxido de carbetóxi-formonitrila (dipolo) ao álcool alílico (dipolarófilo) em excesso (5:1), a 25 °C, com agitação constante e durante 18 horas. Aproximadamente 1g (73%) de um líquido oleoso amarelo foi obtido após purificação por cromatografia em coluna utilizando-se hexano e acetato de etila como eluente na proporção de 3:1. Um pico com tempo de retenção de 13,9 minutos foi observado na análise por CG (FIG 3.19).

**FIG 3.19** Cromatograma da síntese do composto I -6a

A TAB 3.22 abaixo reporta as principais absorções no espectro IV (ver APÊNDICE FIG 6.23, página: 119) do composto I-6a, iniciando o processo de

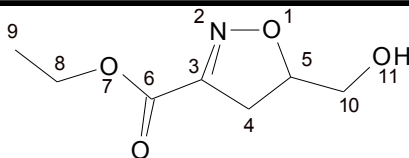
caracterização. Observa-se em 3416 cm^{-1} uma banda larga associada a vibração da ligação O–H característica de álcoois. As demais absorções observadas são comuns aos compostos discutidos anteriormente.

TAB 3.22 Principais absorções na região do IV do composto I-6a

ABSORÇÃO(cm^{-1})	ATRIBUIÇÃO
3416	vibração da ligação O–H
1722	vibração axial de C=O
1257	vibração axial assimétrica C–O
1130	vibração axial simétrica C–O
1593	vibração axial de C=N

As análises de RMN ^{13}C (ver APÊNDICE FIG 6.24, página: 120) e RMN ^1H (ver APÊNDICE FIG 6.25, página: 121) deste composto foram realizadas e os assinalamentos alocados na TAB 3.23:

TAB. 3.23 RMN : Assinalamentos de carbonos e hidrogênios do composto I-6a



Posição	$\delta^1\text{H}$ (J / Hz)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)
3	-	152,1
4a	3,24 (dd, $^2J_{H4a-H4b} = 17,7$; $^3J_{H4a-H5} = 11,2$ Hz, 1H)	35,0
4b	3,16 (dd, $^2J_{H4b-H4a} = 17,7$; $^3J_{H4b-H5} = 8,3$ Hz, 1H)	35,0
5	4,92 (m, 1H)	84,0
6	-	160,5
8	4,35 (q, $^3J_{H8-H9} = 7,1$ Hz, 2H)	62,2
9	1,36 (t, $^3J_{H9-H8} = 7,1$ Hz, 3H)	14,1
10a	3,86 (dd, $^2J_{H10a-H10b} = 12,3$; $^3J_{H10a-H5} = 3,0$ Hz, 1H)	63,2
10b	3,64 (dd, $^2J_{H10b-H10a} = 12,3$; $^3J_{H10b-H5} = 4,5$ Hz, 1H)	63,2
11	2,14 (simpleto largo, 1H)	-

Foram observadas, conforme os compostos anteriores, os assinalamentos dos carbonos do heterociclo (C-3, C-4 e C-5) e do grupo éster (C-6, C-8 e C-9). O C-10, carbono do substituinte álcool metílico na posição 5 do anel, apresenta δ 63,2 característico de carbono ligado a oxigênio (SILVERSTEIN 2000).

Na análise de RMN ^1H , foi observado um duplo-duplete em δ 3,86 com constantes de acoplamento $^2J_{\text{H}10\text{a}-\text{H}10\text{b}} = 12,3$; $^3J_{\text{H}10\text{a}-\text{H}5} = 3,0$ Hz e outro em δ 3,64 com $^2J_{\text{H}10\text{b}-\text{H}10\text{a}} = 12,3$; $^3J_{\text{H}10\text{b}-\text{H}5} = 4,5$ Hz. Ambos apresentaram integração de 1H. Estas multiplicidades foram relacionadas aos hidrogênios H10a e H10b, sugerindo que estes se encontravam em ambientes químicos distintos proporcionado pela formação de um sistema rígido (TAB 3.23).

O gráfico a seguir (FIG 3.20) reporta o experimento com aumento gradativo de temperatura realizado em RMN ^1H . Foi observado que o H11 é deslocado para a direita, a medida que a temperatura aumenta, comprovando que a hidroxila não se apresenta na forma livre neste composto e sim em um sistema rígido onde provavelmente ocorre a ligação do hidrogênio H11 (hidroxila) com o oxigênio do heterociclo.

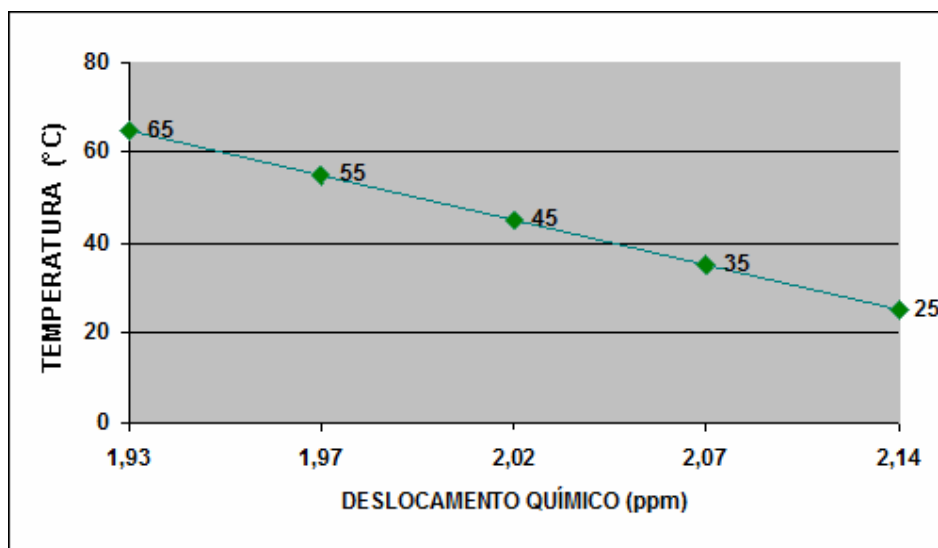
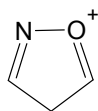


FIG 3.20 Deslocamento químico de H11 com variação de temperatura

Continuando o processo de caracterização do composto I-6a foi realizada a EM (ver APÊNDICE FIG 6.26, página: 122), no qual foi observado o íon molecular (173), coerente com o peso molecular do composto. O fragmento com $m/z = 70$,

referente ao pico base, demonstrado na (FIG 3.21), pode ser justificado, de modo semelhante ao processo de fragmentação apresentado na FIG 3.12 para o composto I-2a.

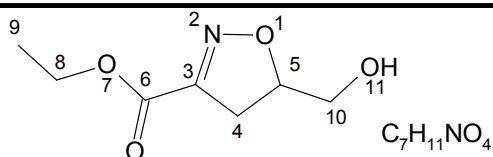


$m/z = 70$

FIG 3.21 Fragmento sugerido para o pico base do composto I-6a

A análise elementar de C, H e N é apresentada na TAB 3.24 e o valor experimental obtido é a média da triplicata realizada.

TAB 3.24 Análise elementar de CHN do composto I-6a



VALOR	C (% m/m)	H (% m/m)	N (% m/m)
VC ^a	48,5	6,4	8,1
VE ^b	48,7	6,3	8,4
V ^c	0,2	0,1	0,3

^a Valor calculado ^b Valor Experimental ^c Variação

Os seis compostos obtidos na série I possuem pelo menos um radical éster que pode ser facilmente substituído alterando a função orgânica e características do composto. A série II a seguir trata da funcionalização dos grupos ésteres.

3. 1.3 FUNCIONALIZAÇÃO DOS GRUPOS ÉSTERES - SÉRIE II

A série II foi conduzida empregando duas 4,5-diidro-isoxazóis formadas na série I (I-1a e I-2a), onde, os radicais ésteres presentes no heterociclo foram funcionalizados e convertidos a hidrazidas e ácidos hidroxâmicos por meio da reação com hidrazina (SZARVASI, 1973) e hidroxilamina (OLLIS, 1975), respectivamente. Esta série foi planejada partindo do preceito que hidrazidas e

ácidos hidroxâmicos constituem importantes grupamentos para a atividade biológica (SAHIN,2003).

A molécula da isoniazida é um exemplo bastante conhecido da importância do radical hidrazida como grupo farmacofórico. Ela age se ligando covalentemente a parte do sítio ativo da enzima enoil-ACP redutase (ENR) inativando-a e consequentemente inibindo a síntese de ácidos graxos constituintes da parede celular micobacteriana, no caso do *Mycobacterium tuberculosis*. (SANDY, 2002).

O ácido hidroxâmico, recentemente, vem sendo pesquisado como inibidor da biosíntese do Lipídio A, componente da membrana externa de bactérias Gram-negativas, necessário para o crescimento bacteriano (RAETZ, 1996; PIRRUNG, 2003).

A seguir serão abordadas individualmente as sínteses e caracterizações dos derivados da série II. Entretanto, não foi possível a caracterização desses compostos por EM por não possuírem solubilidade em solvente apropriado.

3.1.3.1 SÍNTESE DO 5-FENIL-3-CARBOIDRAZIDA-4,5-DIIDRO-ISOXAZOL (II-1b)

A síntese do composto seguiu o procedimento descrito no item 2.3.4 página 38, no qual 0,110 g (0,5 mmol) da isoxazolina de partida, I-1a, foi tratada com excesso de hidrato de hidrazina (1 mmol) e mantido sob refluxo a 90 °C por 24h. A reação foi monitorada por CG, onde foi verificado o consumo total do composto de origem. A purificação do produto foi realizada por recristalização com água quente, onde foi obtido cerca de 0,04 g (37 %) de um produto sólido, branco com P.F entre 113-115 °C.

A caracterização foi iniciada pela análise de FT-IR (ver APÊNDICE FIG 6.27, página: 123). As principais bandas obtidas encontram-se assinaladas na tabela a seguir (TAB 3.25).

Foram observadas as absorções características do heterociclo, em 1601 cm^{-1} , vibração axial de C=N, e em 1273 cm^{-1} , vibração axial da ligação C–O, (DESAI, 2007). A vibração axial do grupo C=O ocorreu em frequência mais baixa, em torno de 1661 cm^{-1} , quando comparado com o derivado isoxazolínico de partida (I-1a), que caiu por volta de 1720 cm^{-1} . Isso se deve ao fato deste grupamento agora estar ligado a um átomo menos eletronegativo que a substância de origem, aumentando

assim, o comprimento dessa ligação (SILVERSTEIN, 2000). As bandas em 3356 cm^{-1} e 3302 cm^{-1} são características das deformações axiais das ligações N–H, do grupamento hidrazida (KUMAR, 2009).

TAB 3.25 Principais absorções na região do IV do composto II-1b

ABSORÇÃO(cm^{-1})	ATRIBUIÇÃO
3356 e 3302	deformação axial de N–H
1661	deformação axial de C=O
1601	deformação axial de C=N
1273	deformação axial C–O

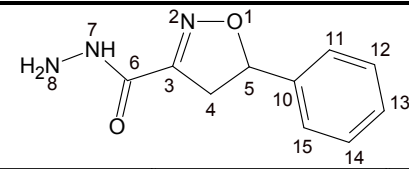
Através da RMN ^{13}C (ver APÊNDICE FIG 6.28, página: 124) foi possível evidenciar a permanência dos carbonos isoxazolínicos C-3, C-4 e C-5 em δ 159,6; 41,9 e 83,2 (CURRAN, 1997; PIRRUNG, 2002) e a ausência dos carbonos referentes ao material de partida (I-1a) C-8 e C-9 em δ 61,8 e 14,1, respectivamente. Na tabela TAB 3.26 encontram-se os demais sinais obtidos.

TAB 3.26 RMN ^{13}C : Deslocamentos químicos (δ) dos carbonos do composto II-1b

δ	C
159,0	C-6
153,4	C-3
140,6	C-10
129,2	C-12 e C-14
128,8	C-11 e C-15
126,6	C-13
83,2	C-5
41,9	C-4

Conforme apresentado na tabela a seguir (TAB 3.27), através da RMN ^1H (ver APÊNDICE FIG 6.29, página 125), foram identificados os hidrogênios isoxazolínicos H-4a, H-4b e H-5 foram identificados em δ 3,66 (dd, $^2J_{\text{H4a-H4b}} = 17,8$; $^3J_{\text{H4a-H5}} = 11,6$, 1H), δ 3,56 (dd, $^2J_{\text{H4a-H4b}} = 17,8$; $^3J_{\text{H4a-H5}} = 8,9$, 1H) e δ 5,71 (m, 1H), respectivamente. Em δ 9,85 e δ 4,52 foram observados dois simpletos largos característicos dos hidrogênios H-7 (1H) e H-8 (2H).

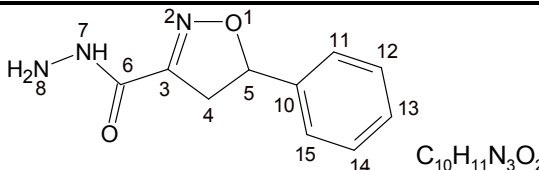
TAB.3.27 RMN ^1H : Assinalamentos dos hidrogênios do composto II-1b



δ	H	MULTIPLICIDADE	INTEGRAÇÃO	J (Hz)
9,85	H-7	s	1	-
7,35	H11-15	m	5	-
4,52	H-8	s	2	-
5,71	H5	m	1	-
3,66	H4a	dd	1	$^2J_{\text{H4a-H4b}} = 17,8$; $^3J_{\text{H4a-H5}} = 11,6$
3,14	H4b	dd	1	$^2J_{\text{H4b-H4a}} = 17,8$; $^3J_{\text{H4b-H5}} = 8,9$

Finalizando a caracterização do composto II-1b foi realizada a Análise Elementar de CHN. O valor experimental adquirido a partir da média das três replicatas realizadas encontra-se na TAB 3.28, assim como, o valor calculado e a diferença ente eles.

TAB 3.28 Análise elementar de CHN do composto II-1b



VALOR	C (% m/m)	H (% m/m)	N (% m/m)
VC ^a	58,5	5,4	20,5
VE ^b	58,4	5,4	19,9
V ^c	0,1	0,0	0,6

^a Valor calculado ^b Valor Experimental ^c Variação

3.1.3.2 SÍNTESE DO 3,5-DICARBOIDRAZIDA-4,5-DIIDRO-ISOXAZOL (II-2b)

A síntese do composto foi conduzida conforme descrito no item 2.3.4 página 38, no qual a isoxazolina de partida, I-2a, foi tratada com hidrato de hidrazina em excesso. A reação foi monitorada por CG, onde foi verificado, após 24h de reação sob refluxo a 90 °C por 24h., o desaparecimento do pico referente ao material de partida. A purificação do produto foi realizada por recristalização com água destilada, e desse modo, obtido cerca de 0,03 g (28 %) de um produto sólido, branco com P.F entre 150-153 °C.

A caracterização do produto formado foi iniciada por análise de IV (ver APÊNDICE FIG 6.30, página 126), no qual foi possível evidenciar a presença do anel isoxazolínico por meio das absorções em 1601 cm^{-1} e 1279 cm^{-1} provenientes das ligações de C=N e C–O do heterociclo, respectivamente (DESAI, 2007). As ligações C=O e N–H, referentes ao grupamento carboidrazida, apresentaram absorções características em: 1674 e 3329-3279 cm^{-1} , respectivamente, conforme descrito na TAB 3.29.

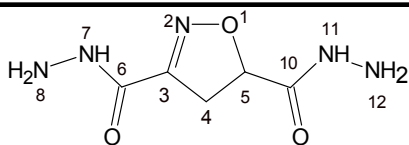
ABSORÇÃO(cm^{-1})	ATRIBUIÇÃO
3329 e 3279	deformação axial de N–H
1674	deformação axial de C=O
1601	deformação axial de C=N
1279	deformação axial C–O

Em continuidade a caracterização do composto sintetizado foi realizada a RMN ^{13}C (ver APÊNDICE FIG 6.31, página: 127). A presença do anel isoxazolínico foi evidenciada através dos sinais em δ 153,3; 38,1 e 79,1, referentes aos carbonos C-3, C-4 e C-5, respectivamente (CURRAN, 1997; PIRRUNG, 2002). Os carbonos, C-6 e C-10, são característicos de grupamentos carbonila sendo C-6 o mais blindado já que apresenta-se conjugado com C=N do anel heterociclo (SILVERSTEIN, 2000). A TAB 3.30 abaixo reporta os valores comentados.

TAB 3.30 RMN ^{13}C : Deslocamentos químicos (δ) dos carbonos do composto II-2b

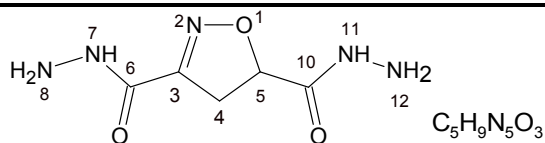
δ	C
167,8	C-10
158,5	C-6
153,3	C-3
79,1	C-5
38,1	C-4

Em seguida foi realizada a RMN ^1H (ver APÊNDICE FIG 6.32, página: 128), onde foram observados os hidrogênios isoxazolínicos (TAB 3.31) H-4a, H-4b e H-5 detectados em δ 3,41 ($^2J_{\text{H}4\text{a}-\text{H}4\text{b}} = 17,6$; $^3J_{\text{H}4\text{a}-\text{H}5} = 11,5$ Hz), δ 3,30 ($^2J_{\text{H}4\text{b}-\text{H}4\text{a}} = 17,6$; $^3J_{\text{H}4\text{b}-\text{H}5} = 7,4$ Hz) e δ 4,91 ($^3J_{\text{H}5-\text{H}4\text{a}} = 11,5$; $^3J_{\text{H}5-\text{H}4\text{b}} = 7,4$ Hz), respectivamente. Em δ 9,78 e δ 9,52 foram observados dois simpletos com aspecto distinto, um largo e o outro alongado, relacionados aos hidrogênios, H11 e H7. Da mesma forma, dois simpletos seguidos e distintos foram observados em δ 4,50 e δ 4,31 e associados aos hidrogênios, H12 e H8. Este alargamento de sinal pôde ser atribuído a facilidade de troca destes hidrogênios. Entretanto, no caso do hidrogênio ligado ao nitrogênio estavam sujeitos também ao desacoplamento parcial ou total pelos efeitos do quadrupolo elétrico (SILVERSTEIN, 2000).

TAB 3.31 RMN ¹H: Assinalamentos dos hidrogênios do composto II-2b

δ	H	MULTIPLICIDADE	INTEGRAÇÃO	J (Hz)
9,78	H11	s (largo)	1	-
9,52	H7	s	1	-
4,98	H5	dd	1	$^3J_{H5-H4a} = 11,5$; $^3J_{H5-H4b} = 7,4$
4,38	H8	s	2	-
4,50	H12	s (largo)	2	-
3,41	H4a	dd	1	$^2J_{H4a-H4b} = 17,6$; $^3J_{H4a-H5} = 11,5$
3,30	H4b	dd	1	$^2J_{H4a-H4b} = 17,6$; $^3J_{H4a-H5} = 7,4$

A Análise Elementar de CHN foi realizada finalizando a caracterização do composto II-2b. Foram obtidos os percentuais de C, H e N presentes no composto sintetizado. Na TAB 3.32, encontram-se os valores experimentais resultados da média das três replicatas realizadas.

TAB 3.32 Análise elementar de CHN do composto II-2b

VALOR	C (% m/m)	H (% m/m)	N (% m/m)
VC ^a	32,1	4,8	37,4
VE ^b	32,2	4,9	35,9
V ^c	0,1	0,1	1,5

^a Valor calculado ^b Valor Experimental ^c Variação

3.1.3.3 SÍNTESE DO ÁCIDO 5-FENIL-3-CARBÓXI-HIDROXÂMICO-4,5-DIIDRO-ISOXAZOL (II-1c)

A síntese deste composto foi realizada de acordo com o procedimento relatado no item 2.3.4 página 38, no qual inicialmente o cloridrato de hidroxilamina foi tratado com hidróxido de potássio, o cloreto de potássio gerado foi retirado do meio por

filtração e a hidroxilamina presente na solução foi adicionada a 0,8 mmol (0,175 g) do derivado I-1a sintetizado na série I. Este sistema foi mantido a 70 °C por 24h. Em seqüência, foi realizado o monitoramento por CG, onde foi verificado o total consumo do composto de origem. A purificação do produto foi realizada por recristalização com água quente, onde foi obtido 0,06 g (36 %) de um sólido branco com P.F entre 161-163 °C.

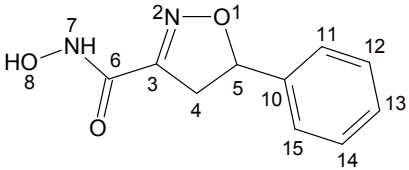
A caracterização foi iniciada pela análise de IV (ver APÊNDICE FIG 6.33, página: 129). As principais bandas obtidas encontram-se assinaladas na tabela a seguir (TAB 3.33).

TAB 3.33 Principais absorções na região do IV do composto II-1c	
ABSORÇÃO(cm⁻¹)	ATRIBUIÇÃO
3174	vibração da ligação O–H
1654	vibração axial de C=O
1593	vibração axial de C=N
1285	vibração axial C–O
1053	deformação angular simétrica de N–H

A presença do anel isoxazolínico pôde ser evidenciada através das absorções em 1593 cm⁻¹ e 1285 cm⁻¹ características da vibração axial de C=N e da vibração axial da ligação C–O, respectivamente, do heterociclo (DESAI, 2007). Em torno de 1053 cm⁻¹ foi evidenciada a vibração de deformação angular simétrica fora do plano de N–H, no entanto, pela literatura um grupamento amida normal apresentaria absorção na faixa de 800 a 666 cm⁻¹. Este fato foi atribuído ao menor comprimento da ligação N–H, uma vez que este nitrogênio encontra-se ligado diretamente ao átomo de oxigênio. A vibração axial do grupo C=O ocorreu em frequência mais baixa, em torno de 1653 cm⁻¹, quando comparado com o derivado isoxazolínico de partida (I-1a), que caiu por volta de 1720 cm⁻¹. Isso se deve ao fato deste grupamento agora estar ligado a um átomo menos eletronegativo que a substância de origem, aumentando assim, o comprimento dessa ligação. A banda larga e intensa em 3174 cm⁻¹ foi relacionada a deformação axial simétrica da ligação do O–H (SILVERSTEIN, 2000).

Através da análise de RMN ^{13}C (ver APÊNDICE FIG 6.34, página: 130) foram observados os sinais pertinentes aos carbonos C-3, C-4 e C-5 do heterociclo, os quais foram associados a δ 152,5; 41,5 e 82,5, respectivamente (CURRAN, 1997; PIRRUNG, 2002), demonstrando que o anel do heterociclo permaneceu intacto mesmo submetido a temperatura de 70 °C. O carbono C-6 apresentou-se com δ 156,5 inferior ao derivado de partida que teve δ 160,2, o que foi considerado coerente, pois tratava-se de um carbono mais desblindado por estar ligado a dois átomos de oxigênio. Os demais δ obtidos encontram-se na a seguir (TAB 3.34).

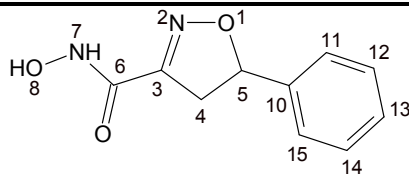
TAB 3.34 RMN ^{13}C : Deslocamentos químicos (δ) dos carbonos do composto II-1c



δ	C
156,5	C-6
152,5	C-3
140,0	C-10
128,6	C-11 e C-15
128,3	C-12 e C-14
126,1	C-13
82,5	C-5
41,5	C-4

A análise de RMN ^1H (ver APÊNDICE FIG 6.35, página: 131) foi realizada posteriormente, sendo os hidrogênios isoxazolínicos H-4a, H-4b e H-5 detectados em δ 3,66 ($^2J_{\text{H}4\text{a}-\text{H}4\text{b}} = 17,8$; $^3J_{\text{H}4\text{a}-\text{H}5} = 11,6$ Hz), δ 3,14 ($^2J_{\text{H}4\text{b}-\text{H}4\text{a}} = 17,8$; $^3J_{\text{H}4\text{b}-\text{H}5} = 8,9$ Hz) e δ 5,70 ($^3J_{\text{H}5-\text{H}4\text{a}} = 11,6$; $^3J_{\text{H}5-\text{H}4\text{b}} = 8,9$ Hz), respectivamente. A conversão a ácido hidroxâmico foi evidenciada pelos simpletos largos em δ 9,26 e 6,57, no qual foram atribuídos aos hidrogênios H-8 e H-7, respectivamente (TAB 3.35).

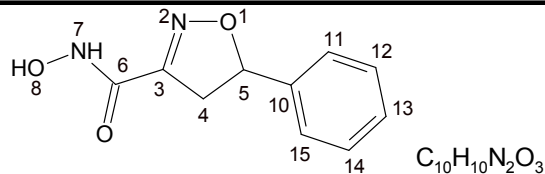
TAB 3.35 RMN ¹H: Assinalamentos dos hidrogênios do composto II-1c



δ	H	MULTIPLICIDADE	INTEGRAÇÃO	J (Hz)
9,26	H-7	s	1	-
7,36	H11-15	m	5	-
6,57	H-8	s	1	-
5,70	H5	dd	1	$^3J_{H5-H4a} = 8,9$; $^3J_{H5-H4b} = 11,6$
3,66	H4a	dd	1	$^2J_{H4a-H4b} = 17,8$; $^3J_{H4a-H5} = 8,9$
3,14	H4b	dd	1	$^2J_{H4b-H4a} = 17,8$; $^3J_{H4b-H5} = 11,6$

Finalizando a caracterização, através da mensuração da pureza do composto II-1c foi realizada a análise elementar de C, H e N e o valor experimental adquirido a partir da média das três replicatas realizadas encontra-se dispostos na TAB 3.36, assim como, o valor calculado e a diferença entre eles.

TAB 3.36 Análise elementar de CHN do composto II-1c



VALOR	C (% m/m)	H (% m/m)	N (% m/m)
VC ^a	58,2	4,9	13,6
VE ^b	56,7	4,9	13,4
V ^c	1,5	0,0	0,2

^a Valor calculado ^b Valor Experimental ^c Variação

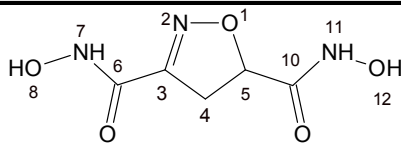
3.1.3.4 SÍNTESE DO ÁCIDO 3,5-CARBÓXI-HIDROXÂMICO-4,5-DIIDRO-ISOXAZOL (II-2c)

A síntese deste composto foi realizada de acordo com o item 2.3.4 página 38. Decorrido às 24 horas de reação sob refluxo a 70 °C foi verificado por CG o total desaparecimento do pico referente ao derivado isoxazolínico de partida (I-2a). O material foi purificado por recristalização, utilizando água destilada como solvente, onde foi obtido 0,04 g (25 %) de produto sólido, branco com ponto de fusão entre 137-142 °C.

A caracterização do produto formado foi iniciada por IV (ver APÊNDICE FIG 6.36, página: 132), no qual foi possível evidenciar a presença do anel isoxazolínico por meio das absorções em 1591 cm^{-1} e 1267 cm^{-1} provenientes das ligações de C=N e C–O do heterociclo, respectivamente (DESAI, 2007). As ligações referentes ao ácido hidroxâmico: C=O, N–H e O–H, foram constatadas através das bandas de absorção em: 1639, 1006, 3183 cm^{-1} e respectivamente (TAB 3.37).

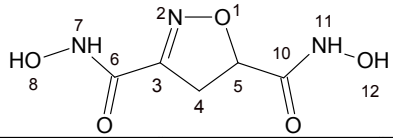
ABSORÇÃO(cm^{-1})	ATRIBUIÇÃO
3183	vibração da ligação O–H
1639	vibração axial de C=O
1591	vibração axial de C=N
1267	vibração axial C–O
1006	deformação angular simétrica de N–H

Em continuidade a caracterização do composto sintetizado foi realizada a RMN ^{13}C (ver APÊNDICE FIG 6.37, página: 133). A presença do anel isoxazolínico foi evidenciada através dos sinais em δ 152,7; 37,6 e 77,9, referentes aos carbonos C-3, C-4 e C-5, respectivamente (CURRAN, 1997; PIRRUNG, 2002). Os demais deslocamentos químicos obtidos encontram-se descrito na tabela a seguir (TAB 3.38).

TAB 3.38 RMN ¹³C: Deslocamentos químicos (δ) dos carbonos do composto II-2c


δ	C
165,0	C-10
156,5	C-6
152,7	C-3
77,9	C-5
37,6	C-4

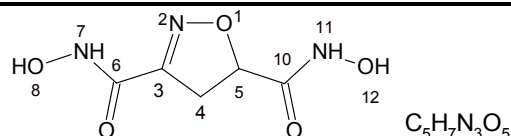
Posteriormente foi realizada a RMN ¹H (ver APÊNDICE FIG 6.38, página: 134), no qual foi possível detectar os hidrogênios isoxazolínicos (TAB 3.39) H-4a, H-4b e H-5 em δ 3,41 (²J_{H4a-H4b} = 17,8; ³J_{H4a-H5} = 11,5 Hz), δ 3,14 (²J_{H4b-H4a} = 17,8; ³J_{H4b-H5} = 7,8 Hz) e δ 4,91 (³J_{H5-H4a} = 11,5; ³J_{H5-H4b} = 7,8 Hz), respectivamente. Contrário do previsto neste composto foi observado somente um simpleto largo em δ 8,39, no entanto apresentou integração 4H, sendo relacionado a todos os hidrogênios hidroxâmicos da molécula H7, H8, H11 e H12. Este alargamento de sinal pôde ser atribuído a facilidade de troca destes hidrogênios. Entretanto, no caso do hidrogênio ligado ao nitrogênio estavam sujeitos também ao desacoplamento parcial ou total pelos efeitos do quadrupolo elétrico (SILVERSTEIN, 2000).

TAB. 3.39 RMN ¹H: Assinalamentos dos hidrogênios do composto II-2c


δ	H	MULTIPLICIDADE	INTEGRAÇÃO	J (Hz)
8,39	H(7,8,11,12)	s (largo)	4	-
4,91	H5	dd	1	³ J _{H5-H4a} = 11,5; ³ J _{H5-H4b} = 7,8
3,41	H4a	dd	1	² J _{H4a-H4b} = 17,8; ³ J _{H4a-H5} = 11,5
3,35	H4b	dd	1	² J _{H4a-H4b} = 17,8; ³ J _{H4a-H5} = 7,8

Finalizando a caracterização do composto II-2c foi realizada a análise elementar de C, H e N, porém não foi possível a realização do EM, devido a difícil solubilização da substância em solvente apropriado. Na tabela a seguir (TAB 3.40) encontram-se os resultados obtidos através desta técnica, assim como, o valor calculado e a diferença entre eles.

TAB 3.40 Análise elementar de CHN do composto II-2C



VALOR	C (% m/m)	H (% m/m)	N (% m/m)
VC ^a	31,7	3,7	22,2
VE ^b	30,7	3,6	21,5
V ^c	1,0	0,1	0,7

^a Valor calculado ^b Valor Experimental ^c Variação

3.2 TESTE DA ATIVIDADE BIOLÓGICA

As 4,5-diidro-isoxazóis sintetizadas tiveram a sua atividade antimicrobiana avaliada através do bioensaio em microplacas. A avaliação da bioatividade foi conduzida de acordo como procedimento descrito (capítulo 2, item 2.5) e a escolha das bactérias se deu dentro de dois parâmetros principais: quanto a coloração de Gram e a virulência. Gram positiva: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e Gram negativas: *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27853) e *Escherichia coli* (ATCC 25922). Com relação a capacidade patogênica, estas bactérias estão entre as principais responsáveis por infecções hospitalares e produzem enzimas, entre elas as β -lactamases, que conferem resistência à penicilina e a outros antimicrobianos. (ESMERINO, 2003; SOUZA, 2005; NOGUEIRA 2009).

3.2.1 BIOENSAIO EM MICROPLACAS PELO MÉTODO COLORIMÉTRICO

Na Tabela abaixo (TAB 3.41) foram reportados os nome e a posição na placa das amostras avaliadas pelo método colorimétrico.

TAB 3.41 Posição das amostras avaliadas pelo método colorimétrico.

Coluna	Amostras
1	3-etoxicarbonil-5-fenil-4,5-diidro-isoxazol (I-1a)
2	3,5-dietoxicarbonil-4,5-diidro-isoxazol (I-2a)
3	3-etoxicarbonil-5-metil-5-metoxicarbonil-4,5-diidro-isoxazol (I-3a)
4	3-etoxicarbonil-5-bromometil-4,5-diidro-isoxazol (I-4a)
5	3-etoxicarbonil-5-ciano-4,5-diidro-isoxazol (I-5a)
6	3-etoxicarbonil-5-hidroximetil-4,5-diidro-isoxazol (I-6a)
7	3-carboidrazida-5-fenil -4,5-diidro-isoxazol (II-1b)
8	3,5-dicarboidrazida-4,5-diidro-isoxazol (II-2b)
9	ácido 3-carbóxi-hidroxâmico-5-fenil-4,5-diidro-isoxazol (II-1c)
10	ácido 3,5-dicarbóxi-hidroxâmico-4,5-diidro-isoxazol (II-2c)

A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada através de método colorimétrico em microplacas (Eloff, 1998; Langfield, 2004). As amostras foram diluídas até atingir concentração inicial de 500 µg /mL no poço A da coluna 1 a 10, sendo feita a diluição seriada verticalmente na microplaca em 250, 125, 62,5, 31,2, 15,6, 7,8 e 3,9 µg /mL, respectivamente, Adicionou-se 5µL da cultura dos microorganismos (5×10^4 CFU/mL) em cada poço, e as microplacas foram incubadas a 37°C por 24 horas (NCCLS, 2003). O controle positivo foi realizado na coluna 11 utilizando-se o antibiótico Cloranfenicol (Sigma), o qual foi adicionado no poço 11A na mesma concentração inicial das amostras e diluído em série. A coluna 12 foi dividida para realização dos controles de solvente, esterilidade e negativo, utilizando DMSO inicialmente a 20% (12A, 12B e 12C), meio de cultura Mueller Hinton Broth (12D e 12E) e meio de cultura juntamente com o microorganismo testado (12F), respectivamente. A FIG 3.22 demonstra o esquema de organização das amostras na microplaca.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	500												
B	250												
C	125												
D	62,5												
E	31,2												
F	15,6												
G	7,8												
H	3,9												

FIG 3.22 Esquema de utilização da microplaca.

Na última etapa do teste é realizada a revelação das microplacas. Foi adicionado 20µL do revelador *p*-iodonitrotetrazolium (Sigma) em cada um dos poços das quatro microplacaplacas e incubado a 37°C por 2h. O CIM foi determinado como a menor concentração da amostra capaz de inibir o crescimento dos microorganismos. Abaixo é reportado o bioensaio em microplaca pelo método colorimétrico para a *Pseudomonas aeruginosa* (FIG 3.23). Observa-se facilmente onde houve crescimento bacteriano devido a presença da coloração rosa.

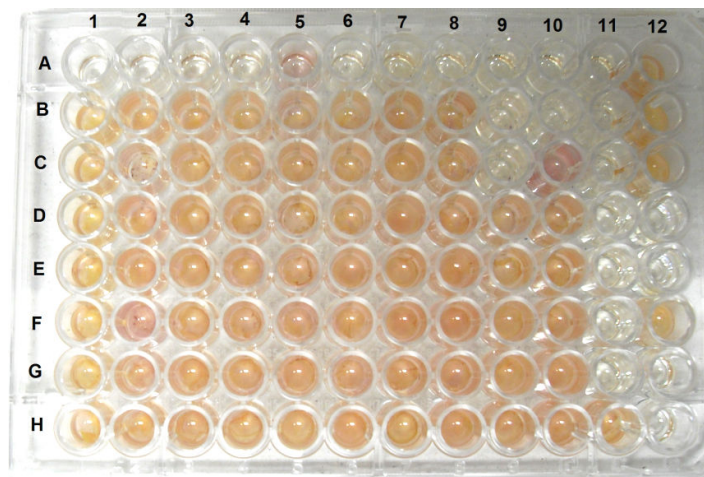


FIG 3.23 Bioatividade frente a *Pseudomonas aeruginosa*s.

Foi realizada a leitura das microplacas a fim de determinar a concentração mínima inibitória dos compostos avaliados e os valores foram alocados na TAB 3.42.

TAB 3.42 CIM ($\mu\text{g} / \text{mL}$) das amostras avaliadas.

Amostras	<i>E.coli</i>	<i>S.aureus</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>K.pneumoniae</i>
I-1a	250	500	500	N
I-2a	500	N	500	N
I-3a	500	500	500	500
I-4a	500	500	500	500
I-5a	500	500	N	500
I-6a	500	N	500	500
II-1b	250	N	500	500
II-2b	250	500	500	500
II-1c	125	500	125	250
II-2c	125	500	250	250
Antibiotico	4	8	8	8

*** N – sem inibição na concentração testada.**

A eficácia das substâncias está relacionada com a concentração inibitória mínima (CIM), de forma que quanto menor a CIM mais potente é a substância. Nenhum composto inibiu o crescimento da bactéria Gram positiva (*S. aureus*) em CIM menores que $500 \mu\text{g} / \text{mL}$. Os compostos contendo o grupamento hidroxâmico (II-1c e II-2c) apresentaram os melhores resultados dentre as amostras estudadas frente bactérias Gram-negativas. A substância II-1c apresentou melhor desempenho (CIM = $125 \mu\text{g} / \text{mL}$) para *E.coli* e *P. aeruginosa*

4 CONCLUSÃO

Foram sintetizados 6 (seis) derivados 4,5-diidro-isoxazóis, através da cicloadição 1,3-dipolar entre o dipólo específico gerado a partir do aminoácido glicina, o óxido de carbetóxi-formonitrila e seis diferentes dipolarófilos (estireno, acrilato de etila, metacrilato de metila, brometo de alila, acrilonitrila e álcool alílico) – série I, no qual apresentaram rendimentos em torno de 70 %.

Os derivados isoxazolínicos sintetizados na série I apresentaram o grupamento éster da posição 3 do heterociclo e dois desses (I-1a e I-2a) foram convertidos a carbohidrazidas e ácidos hidroxâmicos, pelo tratamento com hidrato de hidrazina e hidroxilamina, respectivamente gerando outros quatro derivados (série II), com rendimentos entre 25 a 35 %

Todos os compostos apresentaram a mesma regioseletividade, onde o oxigênio do dipolo fez uma ligação com o carbono mais substituído do dipolarófilo produzindo o heterociclo substituído nas posições 3 e 5. Essa regioquímica foi confirmada pelo estudo da multiplicidade e do deslocamento químico do C-5 através da técnica DEPT.

Dentre os derivados heterocíclicos sintetizados três apresentaram a sua estrutura química inédita (Série II: II-2b, II-1c, II-2c), visto que não foram encontradas na literatura pesquisada.

Os dez derivados isoxazolínicos tiveram a sua bioatividade investigada *in vitro* contra as bactérias *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella Pneumoneae* e *Staphylococcus aureus*. Os compostos da série I não apresentaram atividade nas concentrações avaliadas exceto o composto 3-etoxicarbonil-4,5-diidro-isoxazol-5-fenil (I-1a) com uma concentração inibitória mínima (CIM) igual a 250 µg/mL. Os melhores resultados do teste de atividade biológica foram para os compostos da série II, especialmente para os compostos Ácido 5-fenil-3-carbóxi-hidroxâmico-4,5-diidro-isoxazol (II-1c) e Ácido 3,5-dicarbóxi-hidroxâmico-4,5-diidro-isoxazol (II-2c), que apresentaram a CIM frente a cepa padrão de *Escherichia coli* igual a 125 µg/mL. Nenhum dos compostos sintetizados inibiu o crescimento da bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* em concentrações inferiores a 500 µg/mL.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMED, M.A., MUSTAFA, J., OSMAN, S.M. 1,3-cycloaddition of nitrile oxide to olefinic acid esters: synthesis of isoxazolines. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, 886,1991.
- ALLINGER, N.L., CAVA, M.P., DE JONGH, D.C., JOHNSON, C.R., LEBEL, N.A., STEVENS, C.L. **Química Orgânica**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 1978.
- ALMEIDA, V. M.; SANTOS, R. J.; GÓES, A. J. S.; LIMA, J. G.; CORREIA, C. R. D.; FARIA, A.R.; **Tetrahedron Letters** **2009**, 50, 684.
- BAKER, D. D.; OZA, M. C. U.; RAJGARHIA V. **The value of natural products to future pharmaceutical discovery**. Natural Product Reports. v. 24, p. 1225–1244, 2007.
- BECKMANN, E. Ber. Dtsch. Chem. Ges., **1888**, v.21, p. 2637. *In*: GOTHELF, K.V., JORGENSEN, K.A. Asymmetric 1,3 dipolar cycloaddition reactions. **Chemical Reviews**, v. 98, n. 2, p. 863-909, 1998.
- BHOSALE, S.,KURHADE, S., PRASAD, U. V., PALLE, V. P., BHUNIYA, D. Efficient synthesis of isoxazoles and isoxazolines from aldoximes using Magtrieve™ (CrO₂) **Tetrahedron Letters**. 50, 3948–3951, 2009.
- BOUGRIN, K., SOUFIAQUI, M. Nouvelle méthode de synthèse des 4,5-dihydroisoxazoles em milieu biphasique solide-liquide et par activation ultrasonique. **Tetrahedron Letters**, v. 40, p. 7205-7209, 1999.
- BRAGA, C. P.; AGUIAR, A. P.; Desenvolvimento de 1,2,4-oxadiazóis com Potencial Bioatividade. **Revista Militar de Ciência e Tecnologia**, v. 22, n. 1, p. 4-9, 2005.
- CAPACI, G.R.; **Síntese e avaliação antibacteriana de derivados de 3-aryl-4,5-diidroisoxazóis**. Dissertação (Mestrado em Química), Instituto Militar de Engenharia (IME), 2008.
- CECCHI, L. F. DE SARLO, F. MACHETTI, 1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octane (DABCO) as an Efficient Reagent for the Synthesis of Isoxazole Derivatives from Primary Nitro Compounds and Dipolarophiles: The Role of the Base. **Eur. J. Org. Chem.**,4852-4860, 2006
- CHANG, ZEN-YU.; COATES, R. M. Enantioselective synthesis of primary amines via grignard additions to stereogenic *N*-(α -Phenyl- β -(benzyloxy)ethyl)nitrones. **Journal of Organic Chemistry**. V.55, 3475-3483, 1990.
- CHIANG, Y.H. Chlorination of Oximes. I. Reaction and Mechanism of the chlorination of oximas in commercial chloroform and methylene chloride. **Journal of Organic Chemistry**, v.36, n.15, p.2146-2155, 1971.

- CHRISTL, M.; HUISGEN, R. 1,3-Dipolar Cycloadditions, Orientation Phenomena in Cycloadditions of Aliphatic and Aromatic nitrile Oxides to Alpha, Beta- nsaturated Carboxylic Esters. **Chemische Berichte-Recueil**, v.106, n.10, p.3345-3367, 1973.
- CONTI, D.; RODRIGUEZ, M.; SEGA, A.; TADDEI, M. 1,3-cycloaddition of nitrile oxides in ionic liquids. an easier rout to 3-carboxy isoxazolines, potencial constrained glutamic acid analogues. **Tetrahedron Letters**, v.44, 5327-5330, 2003.
- DALLANOCE, C.; MERONI, G.; AMICI, M.DE; HOFFMANN, C.; KLOTZ, K.N.; MICHELI, C. DE. Sythesis of enantiopure Δ^2 -isoxazoline derivatives and evaluation of their affinity and efficacy profiles at human β - adrenergic receptor subtypes. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 14, p. 4393-4401, 2006.
- DAS, B.; HOLLA, H., MAHERDER, G., BANERJEE, J., REDDY, M.R. Hypervalent iodine-mediated interaction of aldozimes with activated alkenes including Baylis-Hillman adducts: a new and efficient method for praparation of nitrile oxides from aldoximes. **Tetrahedron Letters**, v. 45, p.7347-7350, 2004.
- DESAI, V.; SHAH, T. Synthesis and antibacterial studies of some novel isoxazoline derivatives. **Journal of the Serbian Society**. v. 72, n. 5, p. 443–449, 2007.
- ELOFF, J. N. A sensitive and quick microplate method to determinate the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. **Planta Medica**. 65:711-713, 1998.
- ESMERINO, L.A., GONÇALVES, L.G., SCHELESKY, M.E. Antimicrobial sensitivity profile of *Escherichia coli* strains isolated from comunitary urinary infections. **Biological Health Science**, v. 9, n. 1, p. 31-39, 2003.
- GHOSE, A. K.; HERBETZ, T; SALVINO, J.M.; MALLANO, J. P. Knowledge-based Chemoinformatic Approaches to drug desin. **Drug Discobery Today**, 11, 1107-1114
- GIACOMELLI, G., DE LUCA, L., PORCHEDDU, A. A method for generating nitrile oxides from nitroalkanes: A microwave assisited rote for isoxazoles. **Tetrahedron**, v. 59, p. 5437-5440, 2003.
- GILCHRIST, T.L. **Heterocyclic Chemistry**. 2. ed. United States of America: Wiley-Interscience, 1992. p. 321-327. ISBN 0-582-06420-1.
- GILMANN, A.G.; RALL,T.W.; NIES, A.S.; TAYLOR, P. **Goodmann & Gilman – As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 11ª ed., Guanabara koogan: Rio de Janeiro, 2006.
- GOTHELF, K.V., JORGENSEN, K.A. Asymmetric 1,3 dipolar cycloaddition reactions. **Chemical Reviews**, v. 98, n. 2, p. 863-909, 1998.

- GRUNDMANN, C., DEAN, J.M. Nitrile oxide. V. Stable Aromatic Nitrile Oxides. **Journal of Organic Chemistry**, v.30. p.2809, 1965 .
- GRUNDMANN, C., RITCHER, R. Nitrile oxide. An improved method for preparation of the nitrile oxide from the aldoximes. *Journal of Organic Chemistry*, v. 33, p.476-478, 1968.
- HUISGEN, R. 1,3-Dipolar Cycloaddition. **Proc. Chem. Soc.**, 357-369, 1961.
- JUST, G., DAHL, K. Lead tetraacetate oxidation of aldoximes. **Tetrahedron**, v. 24, n. 15,
- KAMIMURA, A., HORI, K. Reversing the regiochemical course of 1,3 – dipolar cycloaddition of nitrile oxides by modification of dipolarophyles. **Tetrahedron**, v. 50, n. 27, p.7979-7980, 1994.
- KANEMASSA, S.; NISHIUCHI, M.; WADA, E. regiocontrol of nitrile oxide cycloadditions to allyl alcohols. Synthesis of 4-substituted and 4,4-disubstituted 5-hydroxymethyl-2-isoxazolines. **Tetrahedron letters**, v. 33, n. 11, p.1357-1360. 1992.
- KANEMASSA, S., MATSUDA, H., KAMIMURA, A., KAKINAMI, T. Synthesis of hydroximoyl chlorides from aldoximes and benzyltrimethylammonium tetrachloroiodate (BTMA.ICl₄). **Tetrahedron**, v. 56, p. 1057-1064, 2000.
- KANEMASSA, S. TSUGE, O. **Heterocycles**, v. 30, p. 719-736, 1990.
- KAUSHIK M.P., KUMAR, V. A novel one pot synthesis of hydroximoyl chlorides and 2-isoxazolines using N-terc-butyl-N-chlorocyanamide. **Tetrahedron Letters**, v. 47, p. 1457-1460, 2006.
- KOROLKOVAS, A., BURCKHALTER, J.H. **Química Farmacêutica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988. p. 3, 125-277, 453. ISBN 85-703-0144-8.
- KOVER, W.B., MATTOS, M.C. Ciclo adição de óxido de nitrila ao limoneno: síntese quimio e regioespecífica de 2-isoxazolina 3-substituída. **Química Nova**, v. 17, n. 2, p. 119-122, 1994.
- KOZIKOWSKI, A. P.; ADAMCZYK, M. Methods for the stereoselective cis cyanohydroxylation and carboxyhydroxylation of oleofins. **Journal of Organic Chemistry**, v.48, 366-372, 1983.
- KÜÇÜKGÜZEL, S.G.; MAZI, A.; SAHIN, F.; OZTÜRK, S.; STABLES, J. Synthesis and biological activities of diflunisal hydrazide-hydrazones. **Eur J Med Chem**. 38, 1005-1013, 2003.
- KUMAR, S. G.; MALLIKARJUNA, B.P.; SASTRY, B.S.; RAJENDRAPRASAD, Y.; CHANDRASHEKAR, S.M.; SATHISHA K.; Synthesis of new 4-isopropylthiazole hydrazide analogs and some derived clubbed triazole, oxadiazole ring systems –

- A novel class of potential antibacterial, antifungal and antitubercular agents, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 1–8, 2009.
- 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*. v. 9, n. 06, p. 1.041-1.045, 2007.
- LA ROSA, C.; CREMONESI, G. CROCE, P. D., FORNI, A.; GALLANTI, M.; GANDOLFI, R.; **Tetrahedron: Asymmetry**, 20, 1940, 2009.
- LEE, G.A. Simplified synthesis of unsaturated nitrogen heterocycles using nitrile betaines. *Synthesis*, v. 6, p. 508-509, 1982.
- LEE, S.Y., LEE B.S., LEE C.W. Synthesis of 4-Oxo-2-alkenylphosphonates via Nitrile Oxide Cycloaddition: γ -Acylation of Allylic Phosphonates. *Journal of Organic Chemistry*, v. 65, p. 256-257, 2000.
- LI, X.; ZHUANG; LI, Y.; LIU, H.; WANG, S.; ZHU, D. Synthesis of isoxazolinefused chlorines and bacterioclorins by 1,3-dipolar cycloaddition reaction of porphyrin with nitrile oxides. *Tetrahedron Letters*, v. 46, p. 1555-1559, 2005.
- LIDE, D. R.; **Handbook of Chemistry and Physics**, CRC Press, 81^a ed., EUA, 2000.
- LIU, K.J., SHELTON, B.R., HOWE, R.K. A particularly convenient preparation of benzohydroximinoyl chlorides: Nitrile oxide precursors. *Journal of Organic Chemistry*, v. 45, p. 3916-3919, 1980.
- LIN, H.; HAN, L.; YAP, C. Prediction of factor Xa inhibitors by machine learning methods. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, v. 26, p. 505–518, 2007.
- MILLER, B. **Advanced Organic Chemistry: Reactions and Mechanisms**. New Jersey: Prentice Hall, 1998.
- MOLINA, C.T.; DE AGUIAR, A.P.; Synthesis of new 4,5-dihydroisoxazoles with potential anti-inflammatory activity. *Heterocyclic Communications*, v. 9, n. 5, p. 535-538, 2003.
- MORIYA, O., TAKENAKA, H., MASAICHI, I., URATA, Y., ENDO, T. Generation of nitrile oxide by O-tributylstannyl aldoximes: Application to the synthesis of isoxazolines and isoxazoles. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions*, v. 1, p.413-417, 1994.
- MUKAIYAMA, T., HOSHINA, T. The reactions of primary nitroparaffins with isocyanates. *Journal of the American Chemical Society*, v. 82, n. 2, p. 5339-5342, 1960.

- NAIR, V.; NANDAKUMAR, M.V.; MALIAKAL, D; MATHEN, J.S.; RATH, N. P. 1,3-Dipolar Cycloaddition Reaction of Nitrine N-Oxide to 6-(2-Phenylethenyl)fulvene. **Tetrahedron**, v. 56, p. 8001-8005, 2000.
- NASCIMENTO, L. F.; AGUIAR, A. P.; Síntese de 1,2,4-oxadizóis 3,5-dissubstituídos: aquecimento convencional x irradiação por microondas. **Revista Militar de Ciência e Tecnologia**, v. 24, p. 8-11, 2007.
- NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS) – M7-A6, 2003.
- NEWKOME, G.R., PAUDLER, W.W. **Contemporary Heterocyclic Chemistry**. United States of America: Wiley-Interscience, p. 1-5, 1982.
- NOGUEIRA, P. S. F., MOURA, E. R. F., COSTA, M. M. F., MONTEIRO, W. M. S., BRONDI, L. Perfil da infecção hospitalar em um hospital universitário. **Rev. enferm. UERJ**, 17(1), p. 96-101, 2009
- OLLIS, W.D.; DEVLIN, J.P.; THORPE, J.,E. Studies concerning the antibiotic actinonin. Part V. Synthesis of structural analogues of actinonin by anhydride-ester method. **Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 1**. v. 9, p. 846-848, 1975.
- ONISHI, R. H.; PELAK, B. A.; GERCKENS, L. S.; SILVER, L. L.; KAHAN, F. M.; CHEN, M.; PATCHETT, A. A.; GALLOWAY, S. M.; HYLAND, S. A.; ANDERSON, M. S.; RAETZ, C. R. H. Antibacterial agents that inhibit lipid A biosynthesis. **Science** v. 274, p. 980-982, 1996.
- 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**, v. 45, n. 19, p. 4359-4370, 2002.
- PIRRUNG M. C.; TUMEY L. N.; MCCLERREN A. L.; RAETZ C. R. H. High-Throughput Catch-and-Release Synthesis of Oxazoline Hydroxamates. Structure-Activity Relationships in Novel Inhibitors of Escherichia coli LpxC: In Vitro Enzyme Inhibition and Antibacterial Properties. **Journal of the American Chemical Society**. v. 125, p. 1575-1586, 2003.
- REES, C.W., STORR, R.C. 1-chlorobenzotriazole: a new oxidant. **Journal of the Chemical Society C**, p. 1474-1476, 1969. (a)
- REES, C.W., STORR, R.C. Addition of 1-chlorobenzotriazole to olefins. **Journal of the Chemical Society C**, p. 1478-1483, 1969. (b)

- RODRIGUES, R. C.; AGUIAR, A. P. A Simple and Efficient Method for the Synthesis of Nitrile Oxide from Aldoxime by Trichloroisocyanuric Acid.. **Synthetic Communications**, v. 31, n. 20, p. 3075-3080, 2001.
- ROMANSKI, J.; JÓZWIK J.; CHAPUIS, C.; ASZTEMBORSKA, M. AND JURCZAK J. Asymmetric 1,3-dipolar cycloadditions of chiral carboxyloyl nitrile oxides to cycloalkenes. **Tetrahedron: Asymmetry** 18, 865–872, 2007.
- RYU, E.K., KIN, J.N. A convenient synthesis of nitrile oxides from aldoximes by 1-chlorobenzotriazole. **Synthesis Communication**, v. 20, n. 9, p. 1373-1399, 1990.
- SADER, H. S. et al. Perfil de sensibilidade a antimicrobianos de bactérias isoladas do trato respiratório baixo de pacientes com pneumonia internados em hospitais brasileiros: resultados do Programa SENTRY, 1997 e 1998. **J. Pneumologia** . 2001, vol.27, n.2, p. 59-67.
- SANDY J, MUSHTAQ A, KAWAMURA A, SINCLAIR J, SIM E, NOBLE M. The structure of arylamine N-acetyltransferase from Mycobacterium smegmatis--an enzyme which inactivates the anti-tubercular drug, isoniazid. **J Mol Biol.** 318(4), p. 1071-83, 2002.
- SHANG Y.; JIM, J.; WANG, Y. Nitrile Oxides Cycloadditions to PEG-bounded Alkene Dipolarophiles. **Reactive & Functional Polymers**, v. 66, p. 447-453, 2006.
- SHIMIZU, T., HAYASHI, Y., TERAMURA, K. The reaction of primary nitro compounds with dipolarophiles in the presence of p-toluenesulfonic acid. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, v. 57, p. 2531-2534, 1984.
- SHIMIZU, T.; HAYASHI, Y.; SHIBAFUCHI, H.; TERAMURA, K. A Convenient Preparative Method of Nitrile Oxides by the Dehydration of Primary Nitro Compounds with Ethyl Chloroformate or Benzenesulfonyl Chloride in the Presence of Triethylamine. **Bulletin the Chemical Society of Japan**, v. 59, p. 2827-2831, 1986.
- SHVEKLGEIMER, G.A. Reactions of benzonitrile oxides with conjugated nitroalkenes. **Synthesis**, v. 9, p. 612-614, 1976.
- SILVERSTEIN, R.M., BASSLER, G.C., MORRIL, T.C. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.
- SKINNER, G. S. Deamination. III. evidence of the existence of aliphatic diazonium salts from the formation of chloro-oximino compounds. **Journal of the American Chemical Society**. v.46,731-741, 1924.
- SMITH, M.B. **Organic Synthesis**. 2. ed. New York: McGraw-Hill, 2002. p.917-926, 999-1004.
- SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B. **Organic Chemistry**. 8^a ed., LTC, 2006.

- SOUZA, M.V., REIS, C., PIMENTA, F.C. Revisão sobre a aquisição gradual de resistência de *Staphococcus aureus* aos antimicrobianos. **Revista de Patologia Tropical**, v. 34, n. 1, p. 27-36, 2005.
- SUN, R.D., LEE, R.B., TANGALLAPALLY, R.P., LEE, R.E. Synthesis, optimization and structure–activity relationships of 3,5-disubstituted isoxazolines as new anti-tuberculosis agents . **European J. of Medicinal Chemistry**, **460-472 (44)**, 2009.
- SZARVASI, E.; FONTAINE, L.; BETBEDER-MATIBET, A. Antimicrobials. New Nitrofurans Derivatives. **Journal of Medicinal Chemistry**, 1973, Vol. 16, No. 3, p. 281-287.
- TAVARES, W. **Manual de antibióticos e quimioterápicos antiinfeciosos**, Atheneu: Belo Horizonte, 2001.
- TOKIZANE, M.; SATO, K.; OHTA, T.; ITO, Y. Asymmetric reduction of racemic 2-isoxazolines. *Tetrahedron: Asymmetry*. 19 , 2519–2528, 2008.
- TOKUNAGA, Y., IHARA, M., FUKUMOTO, K., Silver (I) salt promoted generation of nitrile oxide from hydroximoyl chlorides. **Heterocycles**, v. 43, n. 8, p. 1771-1775, 1996.
- WADE, P.A.; AMBROSIO, G.S. ; RAO, A.J.; SHAH-PATEL, S., COLE, T.D.; MURRAY K.J.; CARROL J.P. Synthesis of L-Dauosamine derivatives on the basis of the asymmetric dihydroxylation of 3-(3)-4,5-dihydroisoxazole. **Journal Organic Chemistry**, v. 62, p.3671-3977, 1997.
- WEIDNER-WELLS, M. A.; FRAGA-SPANO, S. A.; TURCHI, I. J. Unusual regioselectivity of dipolar cycloaddition reactions of nitrile oxides and tertiary cinnamides and crotonamides. **Journal of Organic Chemistry**, v.63, 6319-6328,1998.
- WEIDNER-WELLS, M. A.; 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 isoxazolinyl oxazolidinones. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 14, p. 3069-3072, 2004.
- WEI-MING, X.; HUANG, X.; TANG, E. Solid-phase synthesis of 1,2-diheterocyclic-substitued (e)-oleofins from supported selenium resin. **Journal of Combinatorial Chemistry**, 7, 726-733, 2005.
- YAN, M.C.; TU Z.; LIN C.; YAO C.F. An easy and efficient method for the synthesis of hydroximoyl chloride from nitro olefin and silyl enol ether. **Tetrahedron Letters**, v. 43, p. 7991-7994, 2002.
- ZHANG, P.; LI, X.; CHEN, H. The synthesis and biological activity of novel spiro-isoxazoline C-disaccharides based on 1,3-dipolar cycloaddition of exo-glycals and sugar nitrile oxides. **Tetrahedron Letters**, v. 48, p. 7813–7816, 2007.

ZHIJAY, T.; RAJU, R.; LIOU, T. R.; KAVALA, R.; KUO, C.; JANG, Y.; SHIH, H., WANG, C.; YAO, C. An efficient method for the synthesis of α -arylated nitroalkanes and α -arylated hydroximoyl chlorides mediated by $AlCl_3$. **Tetrahedron** 65, 2436–2442, 2009.

6 APÊNDICES

6.1 ESPECTROS DO COMPOSTO 5-FENIL-3-ETOXICARBONIL-4,5-DIIDRO-ISOXAZOL (I-1a)

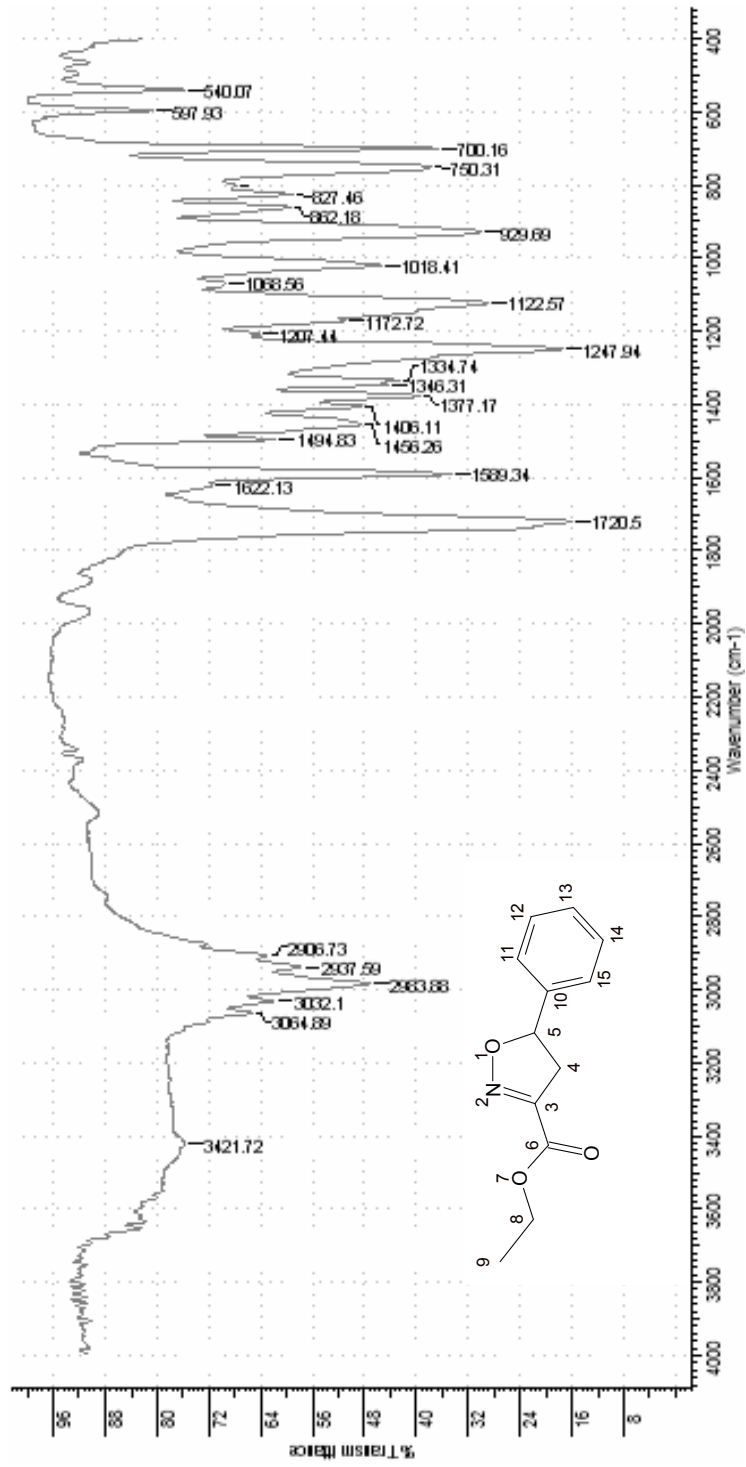


FIG 6.1 Espectro de infravermelho do composto I-1a

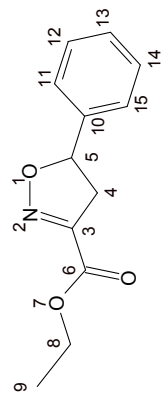
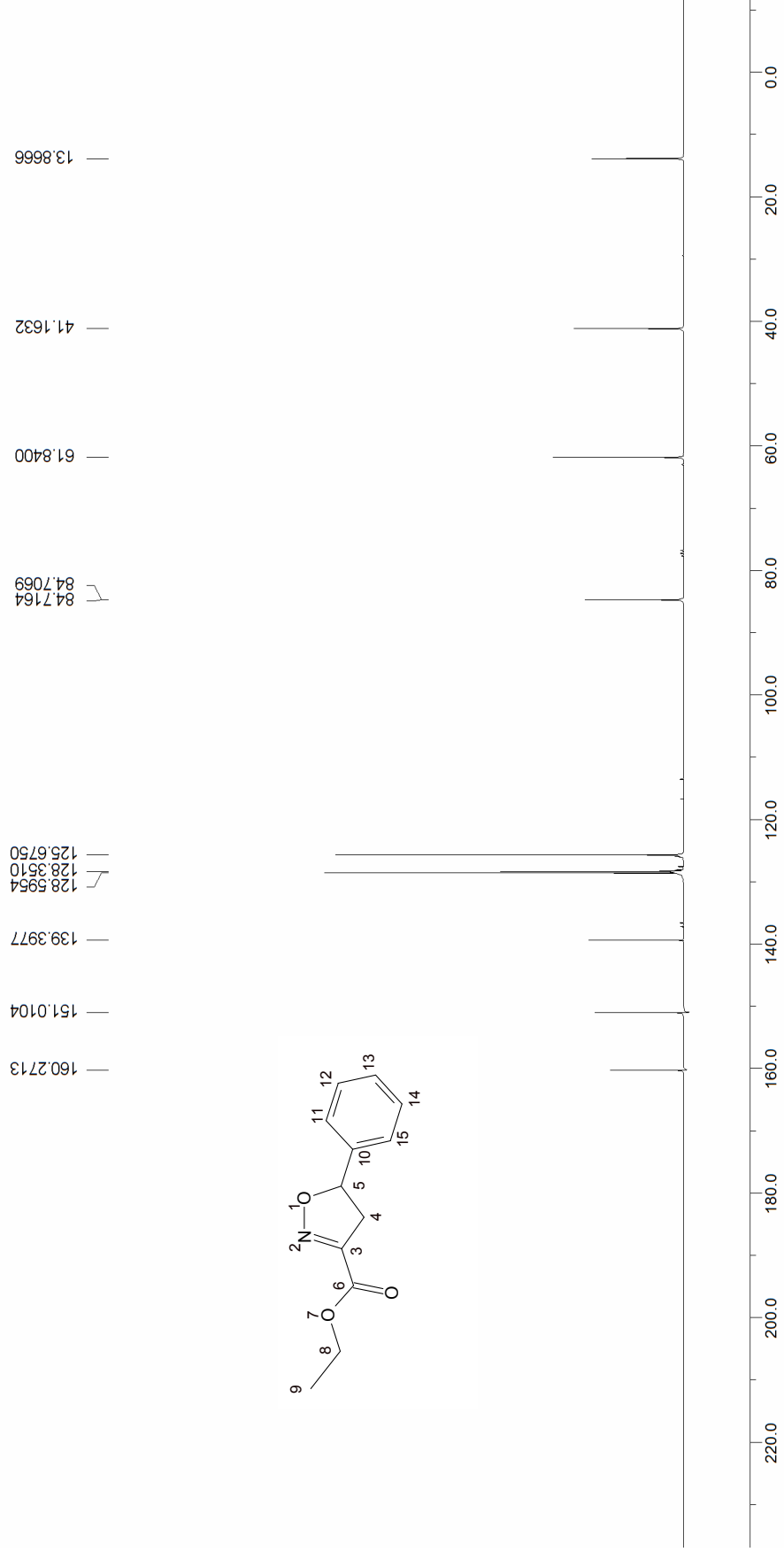


FIG 6.2 Espectro de RMN ¹³C do composto I-1a

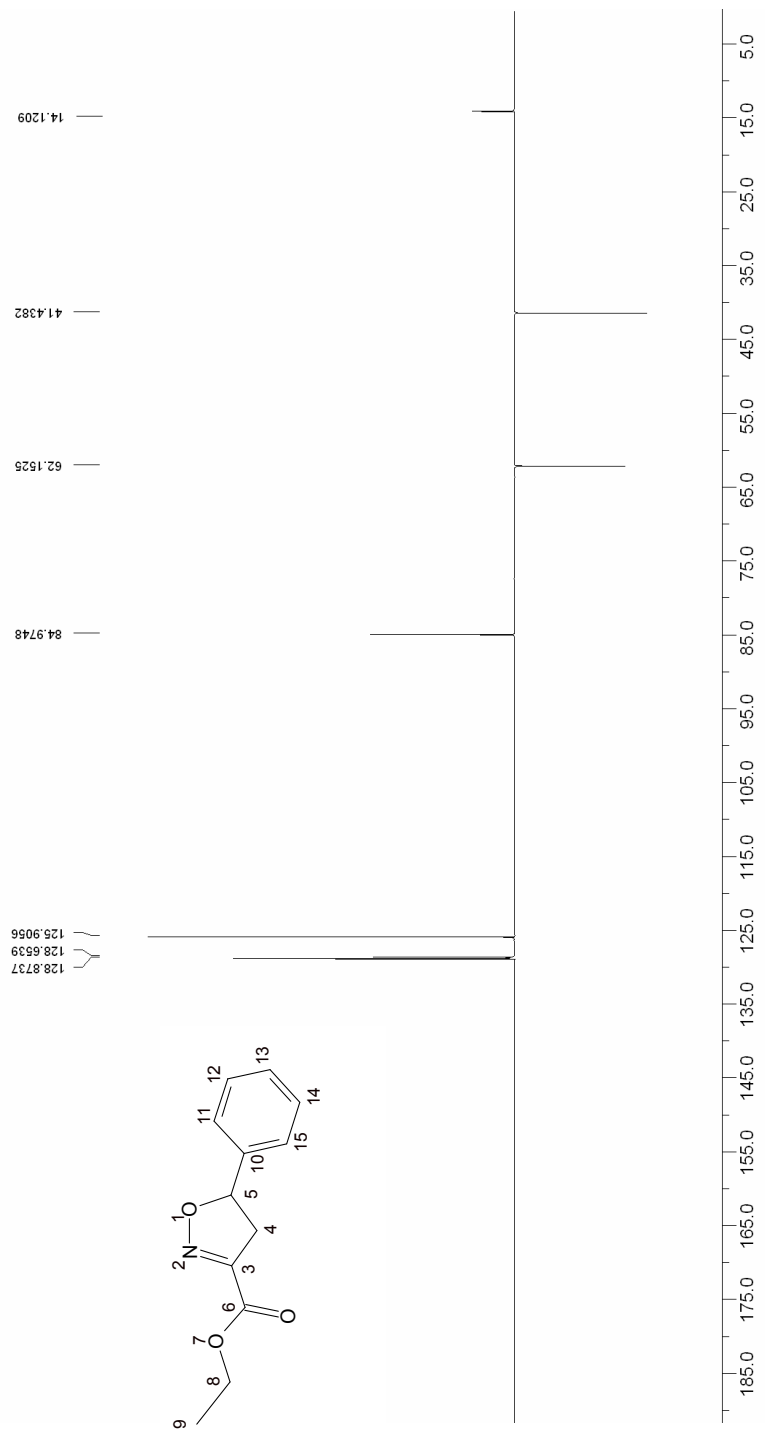


FIG 6.3 Espectro de RMN ^{13}C / DEPT do composto I-1a

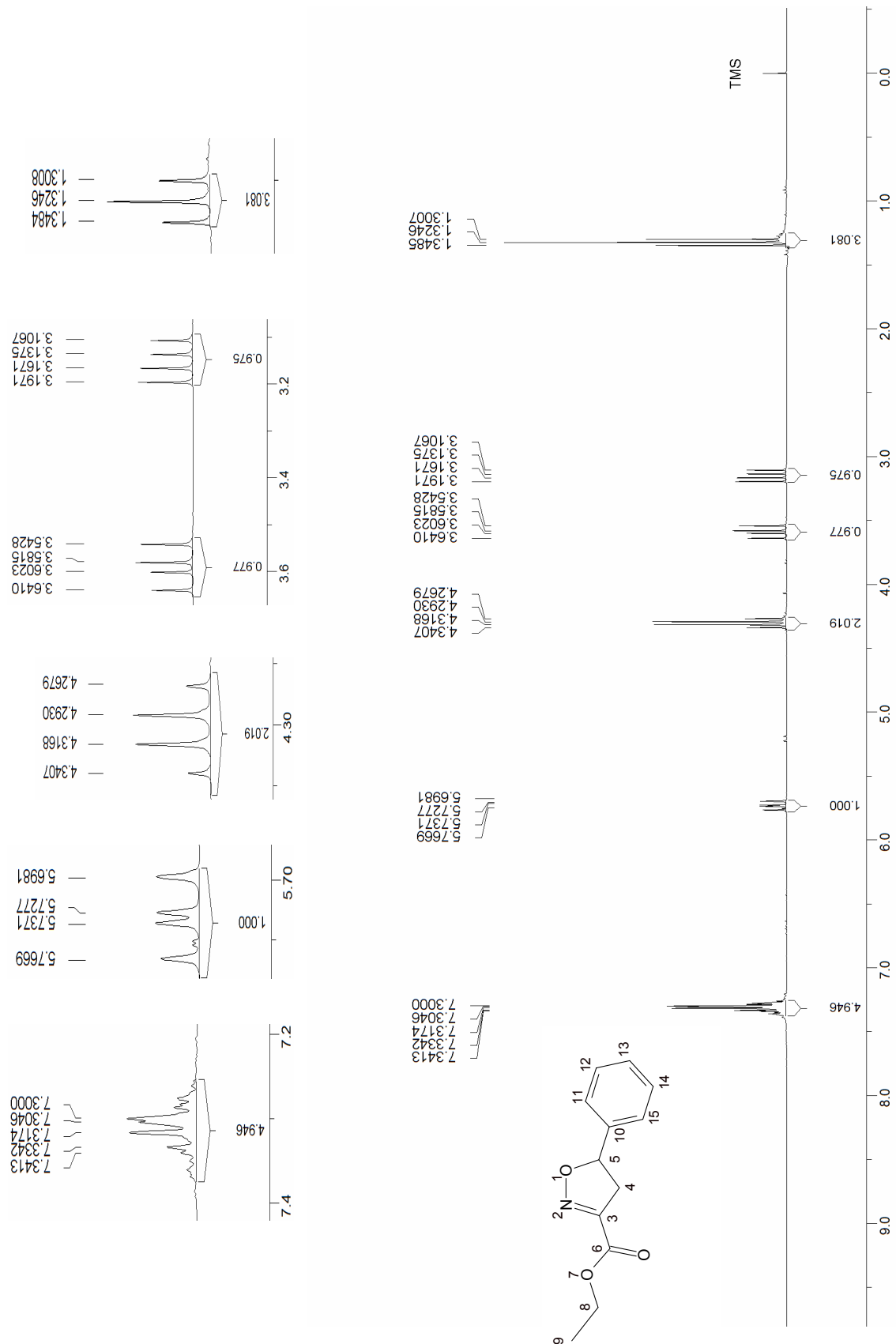


FIG 6.4 Espectro de RMN ¹H do composto I-1a

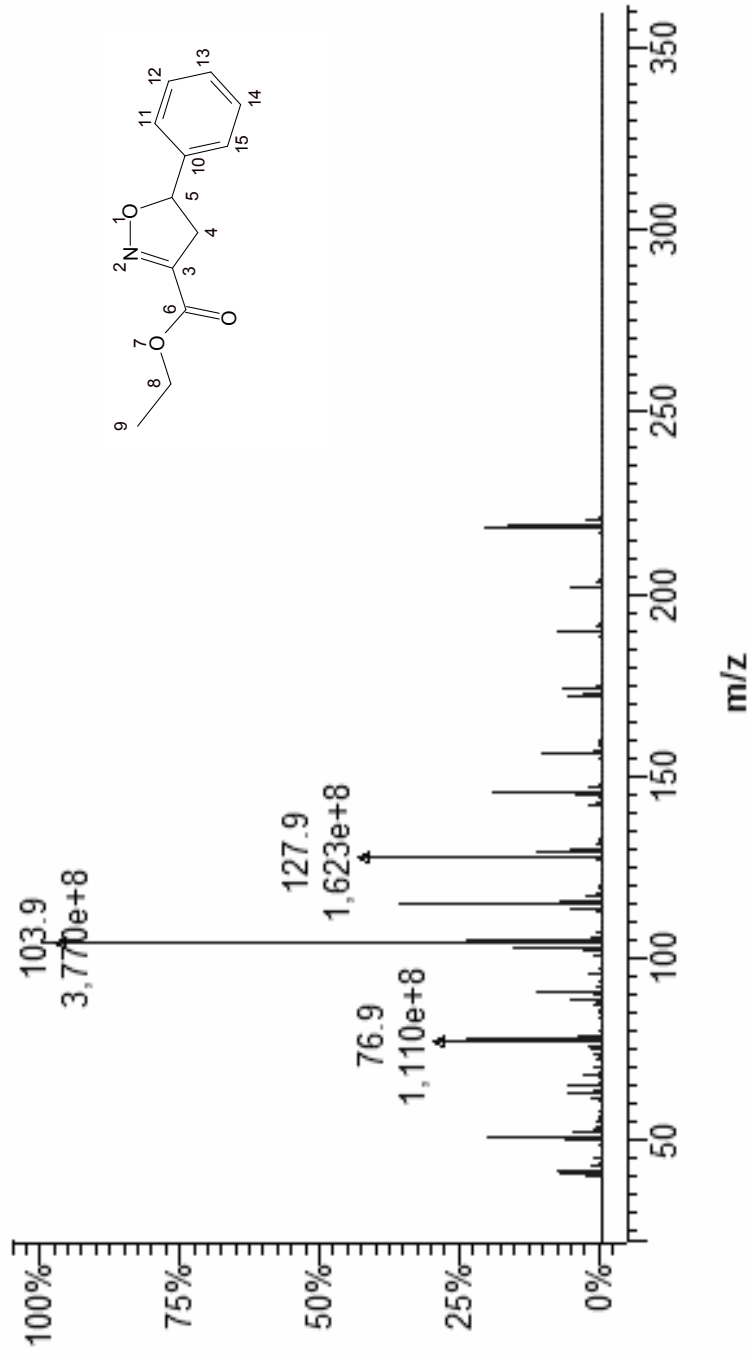


FIG 6.5 Espectro de massas do composto I-1a

6.2 ESPECTROS DO COMPOSTO 3,5-DIETOXICARBONIL-4,5-DIIDRO-ISOXAZOL (I-2a)

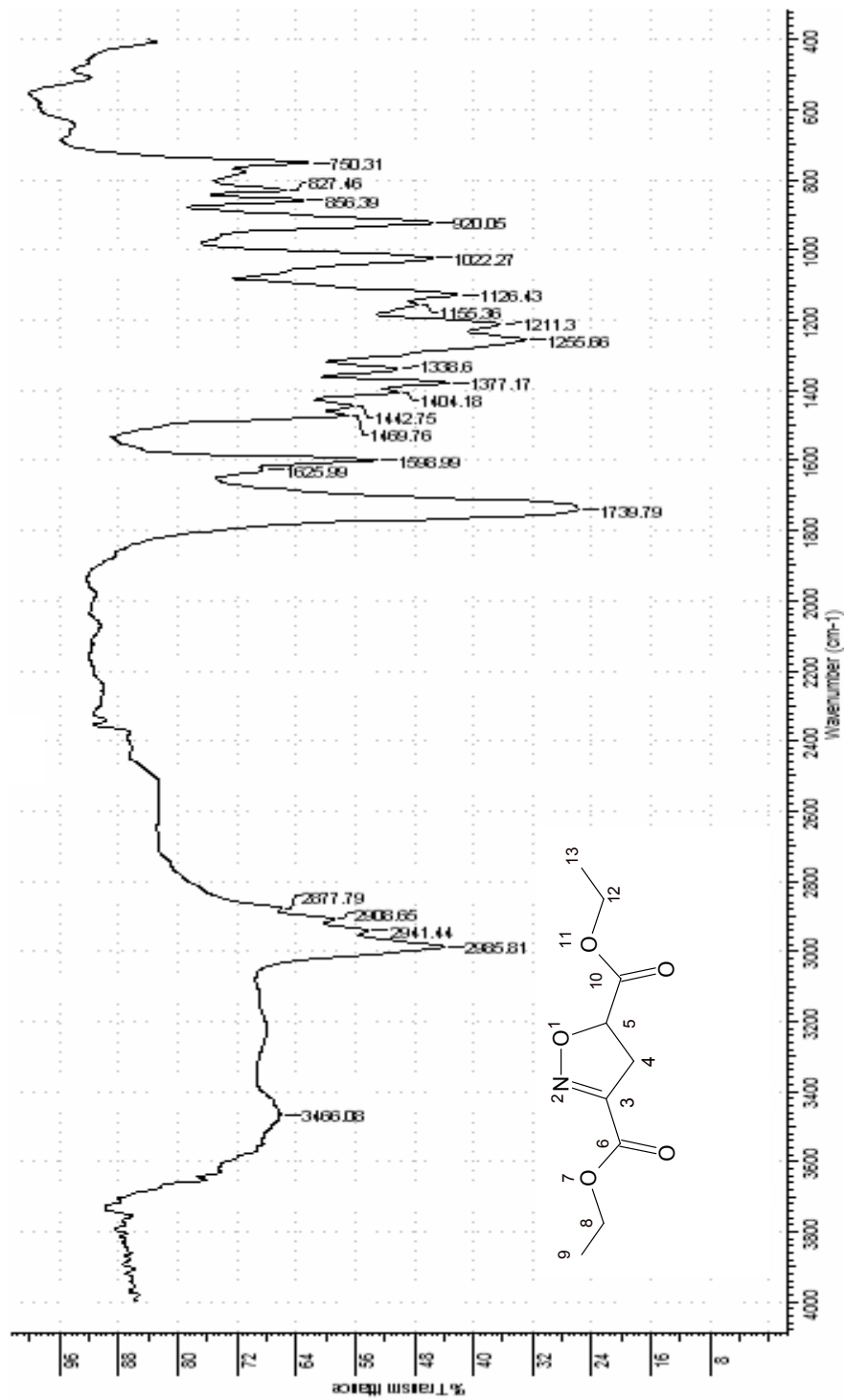


FIG 6.6 Espectro de infravermelho do composto I-2a

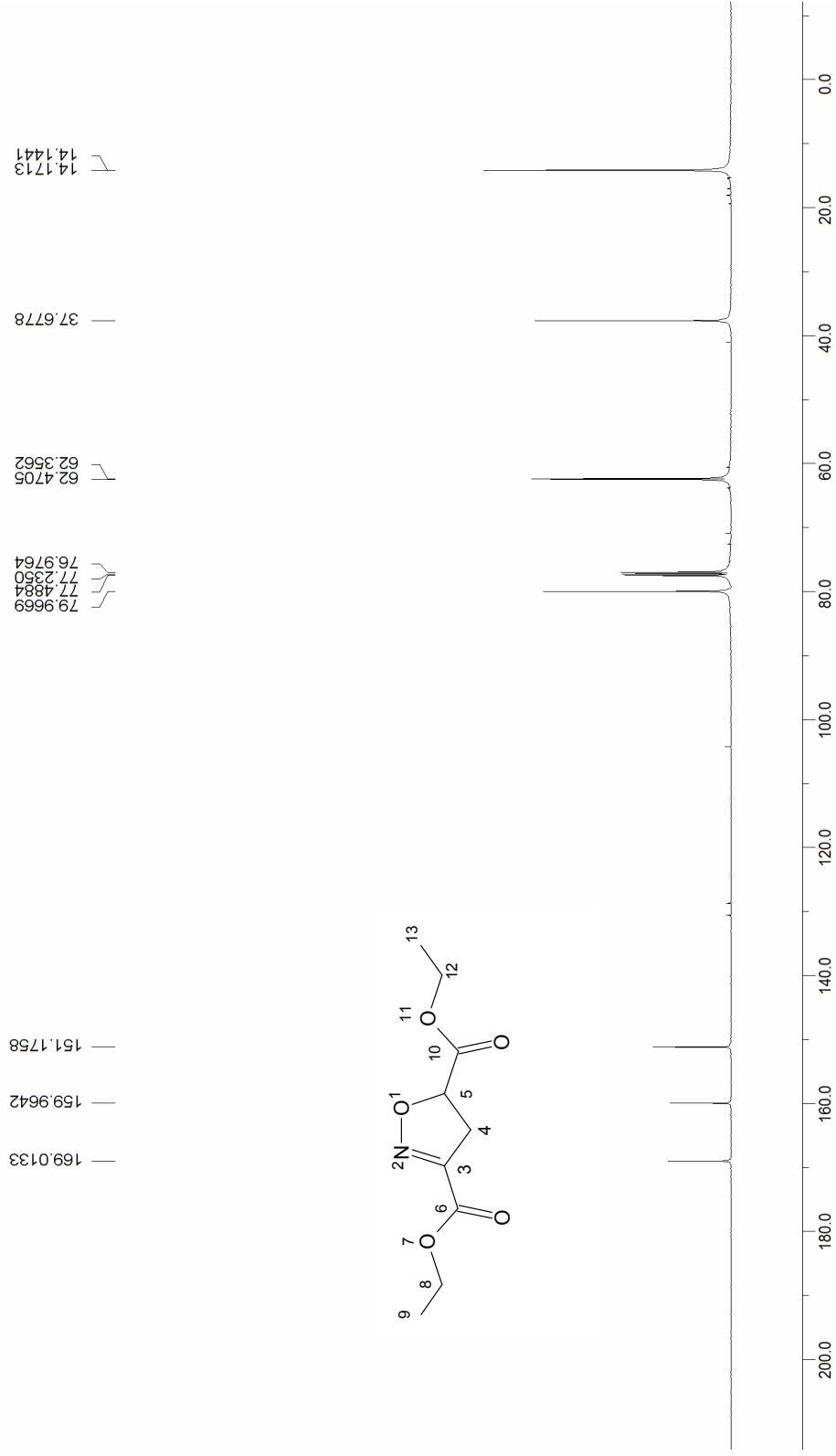


FIG 6.7 Espectro de RMN ^{13}C do composto I-2a

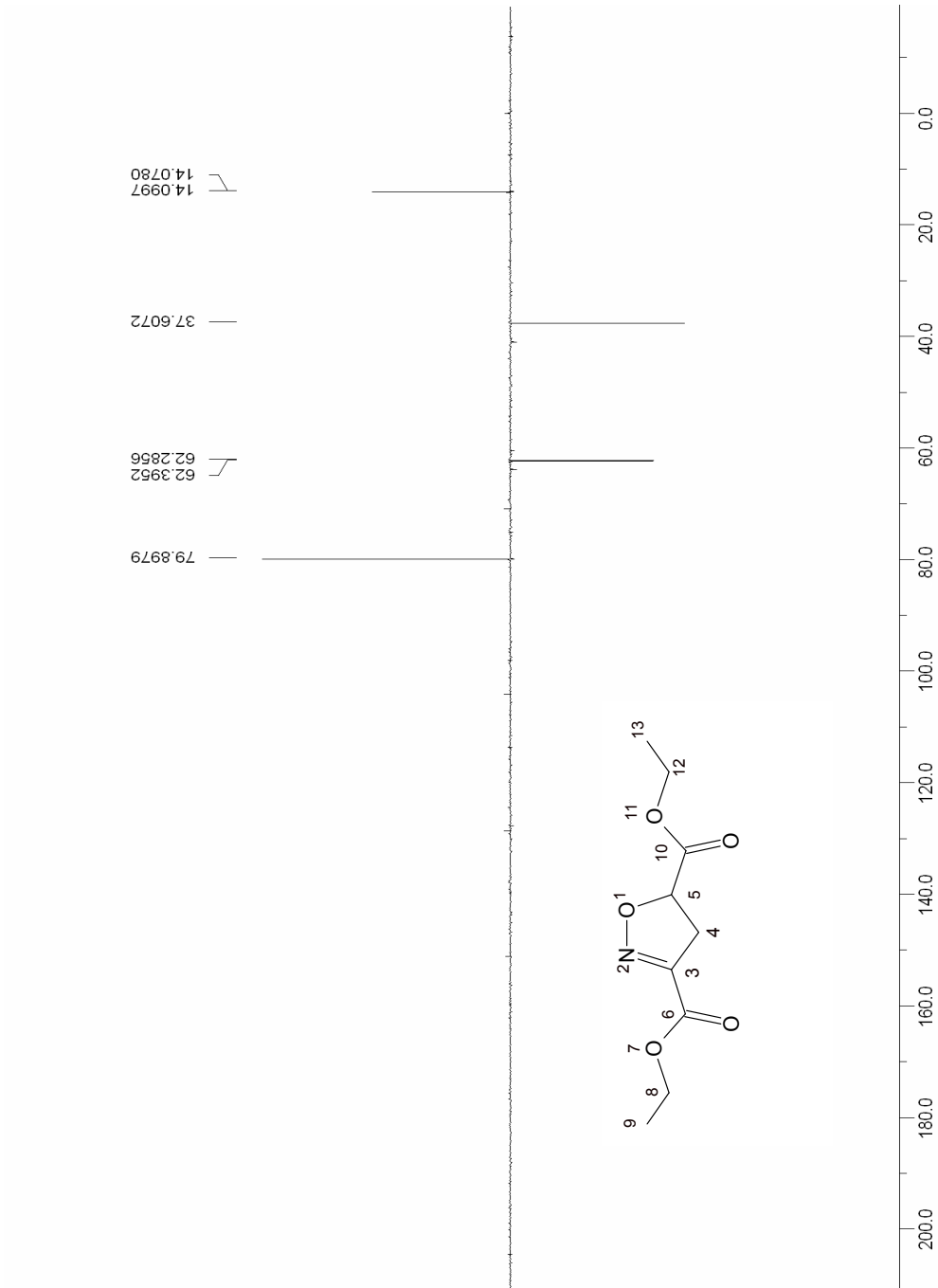


FIG 6.8 Espectro de RMN ¹³C/ DEPT do composto I-2a

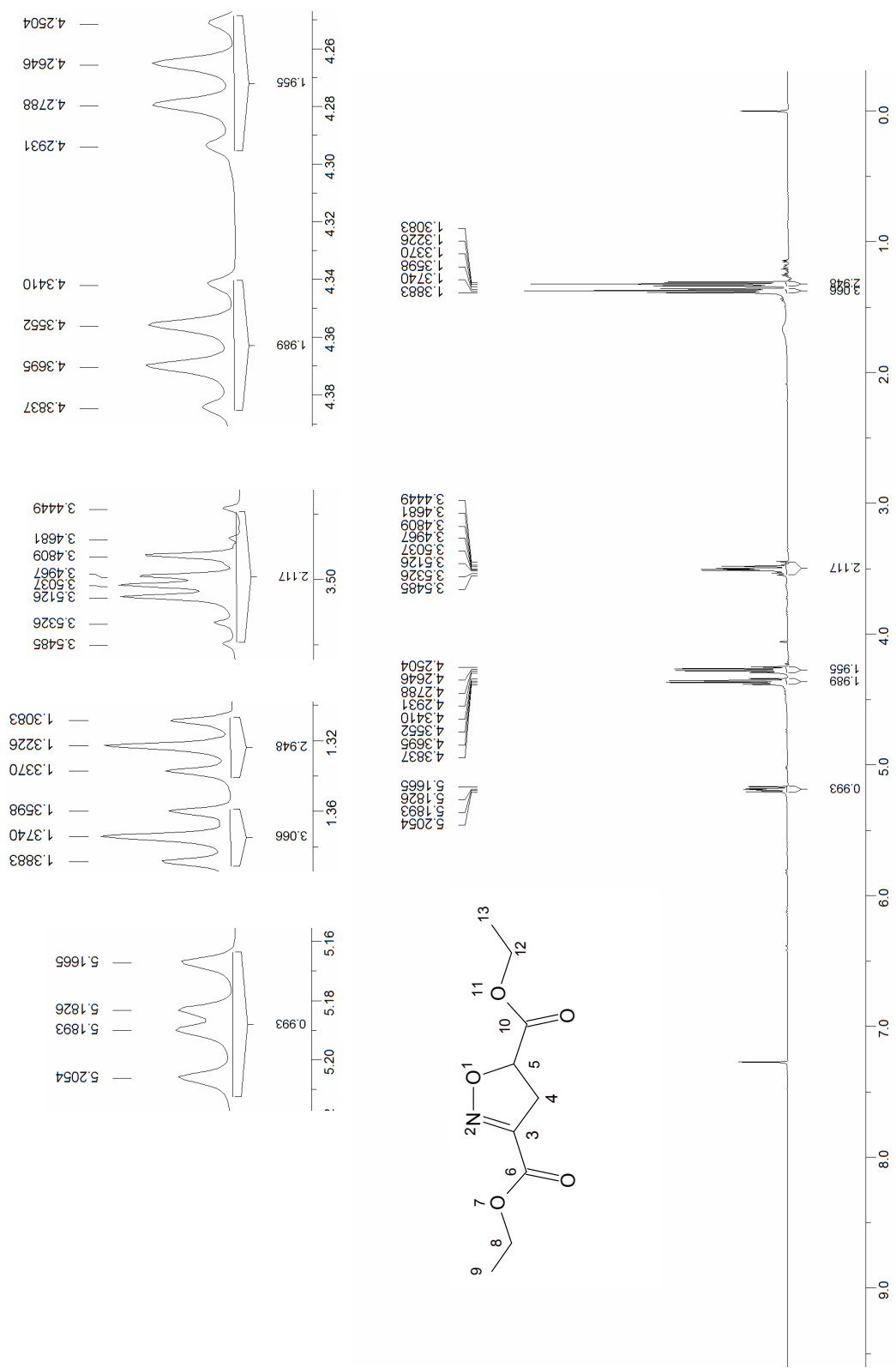


FIG 6.9 Espectro de RMN ^1H do composto I-2a

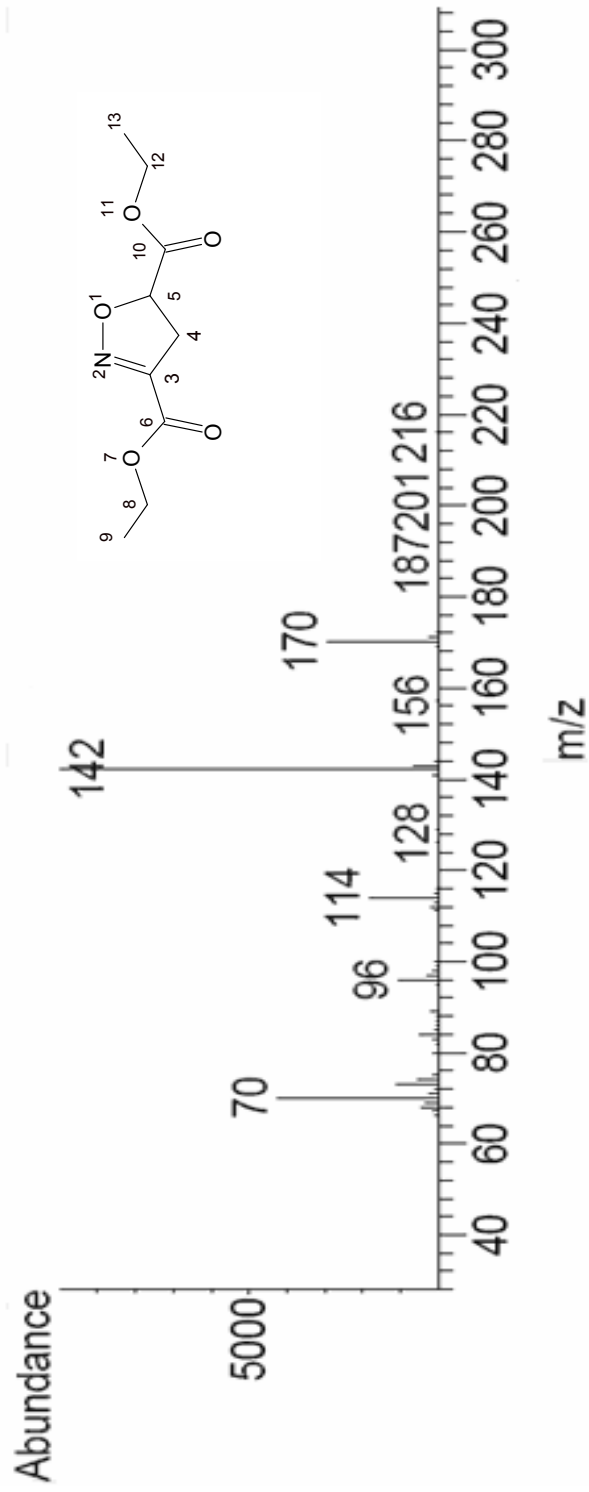


FIG 6.10 Espectro de massas do composto I-2a

6.3 ESPECTROS DO COMPOSTO 3-ETOXICARBONIL-5-METIL-5-METOXICARBONIL-4,5-DIIDRO-ISOXAZOL (I-3a)

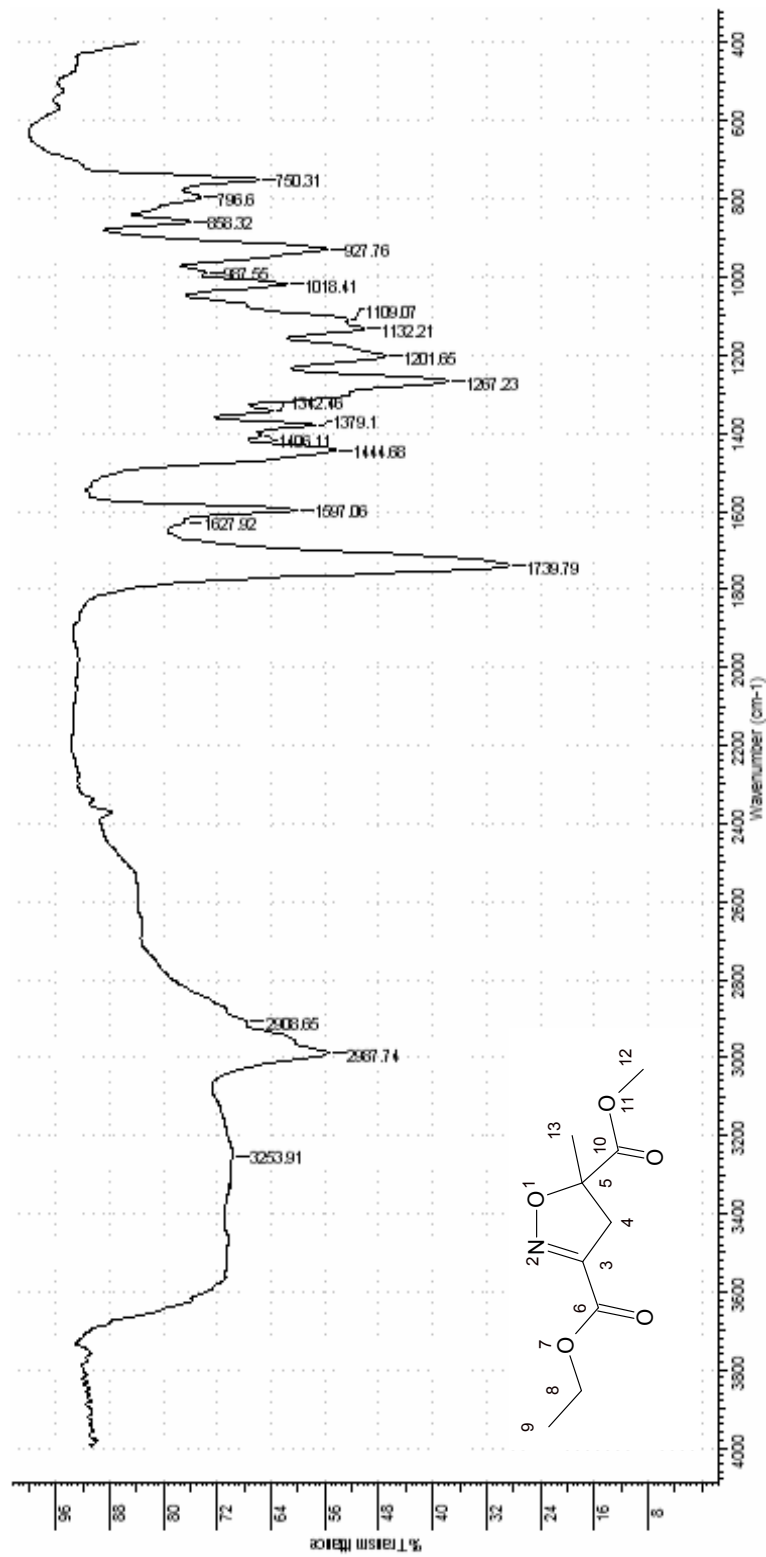


FIG 6.11 Espectro de infravermelho do composto I-3a

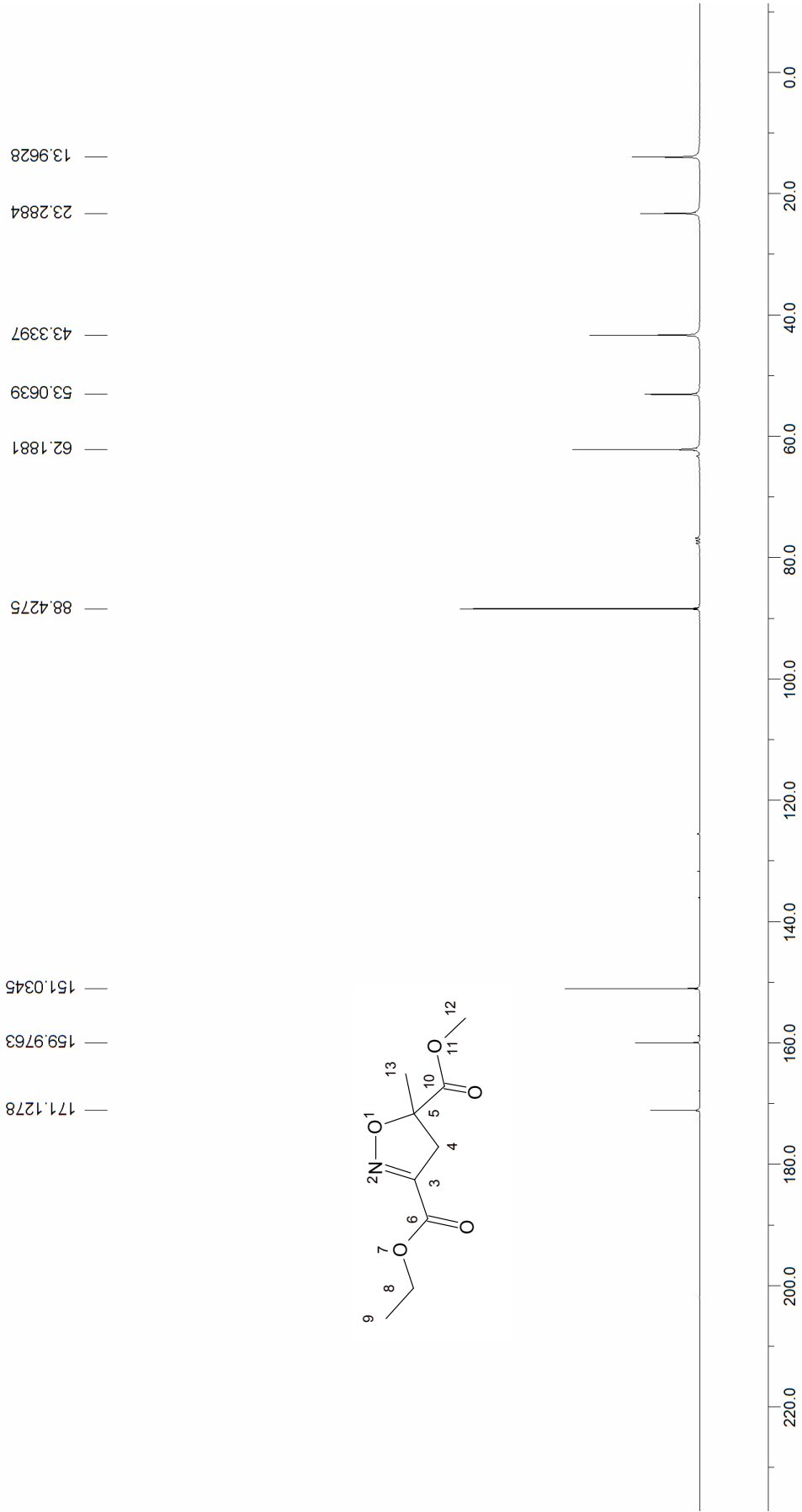


FIG 6.12 Espectro de RMN ^{13}C do composto I-3a

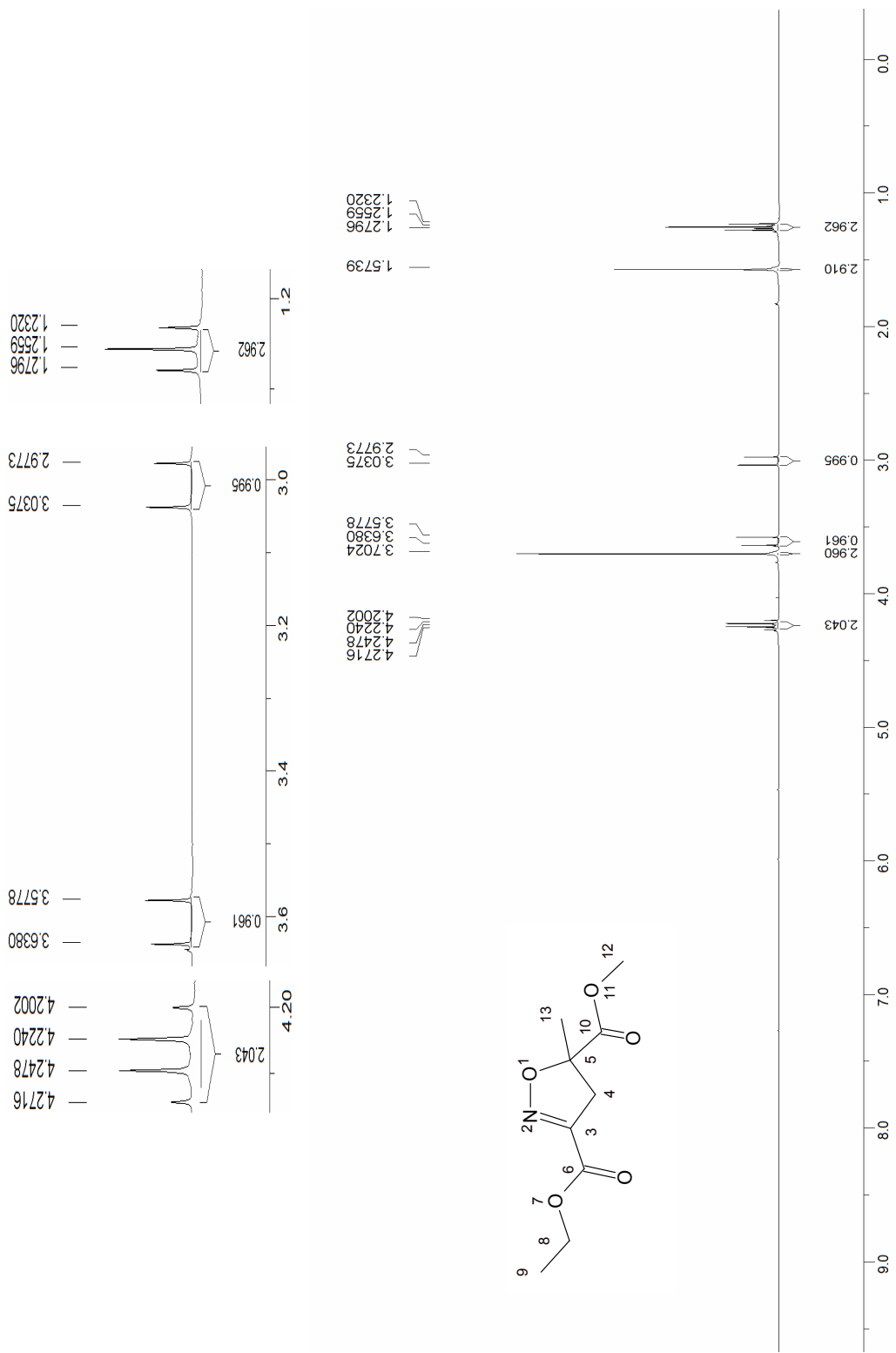


FIG 6.13 Espectro de RMN ^1H do composto I-3a

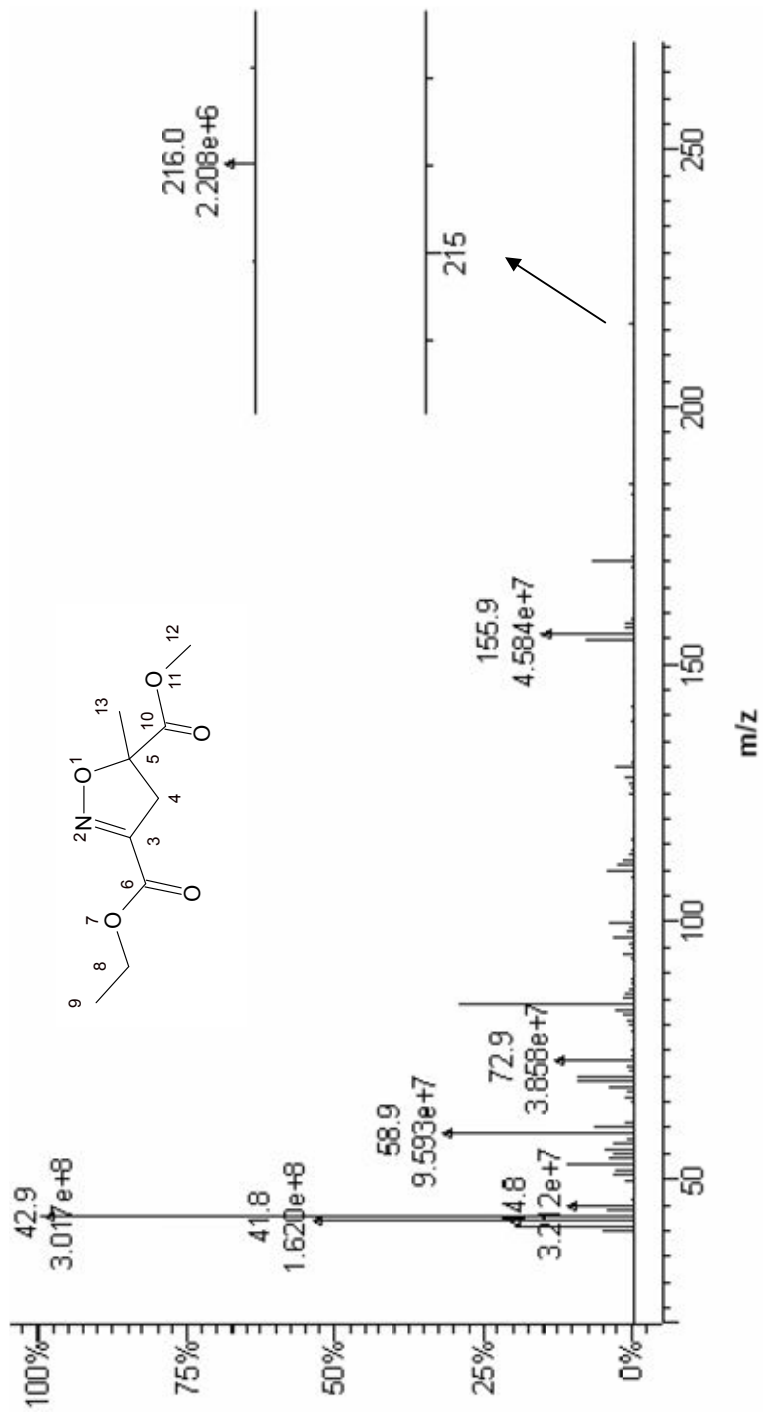


FIG 6.14 Espectro de massas do composto I-3a

6.4 ESPECTROS DO COMPOSTO 3-ETOXICARBONIL-5-BROMOMETIL-4,5-DIIDRO-ISOXAZOL (I-4a)

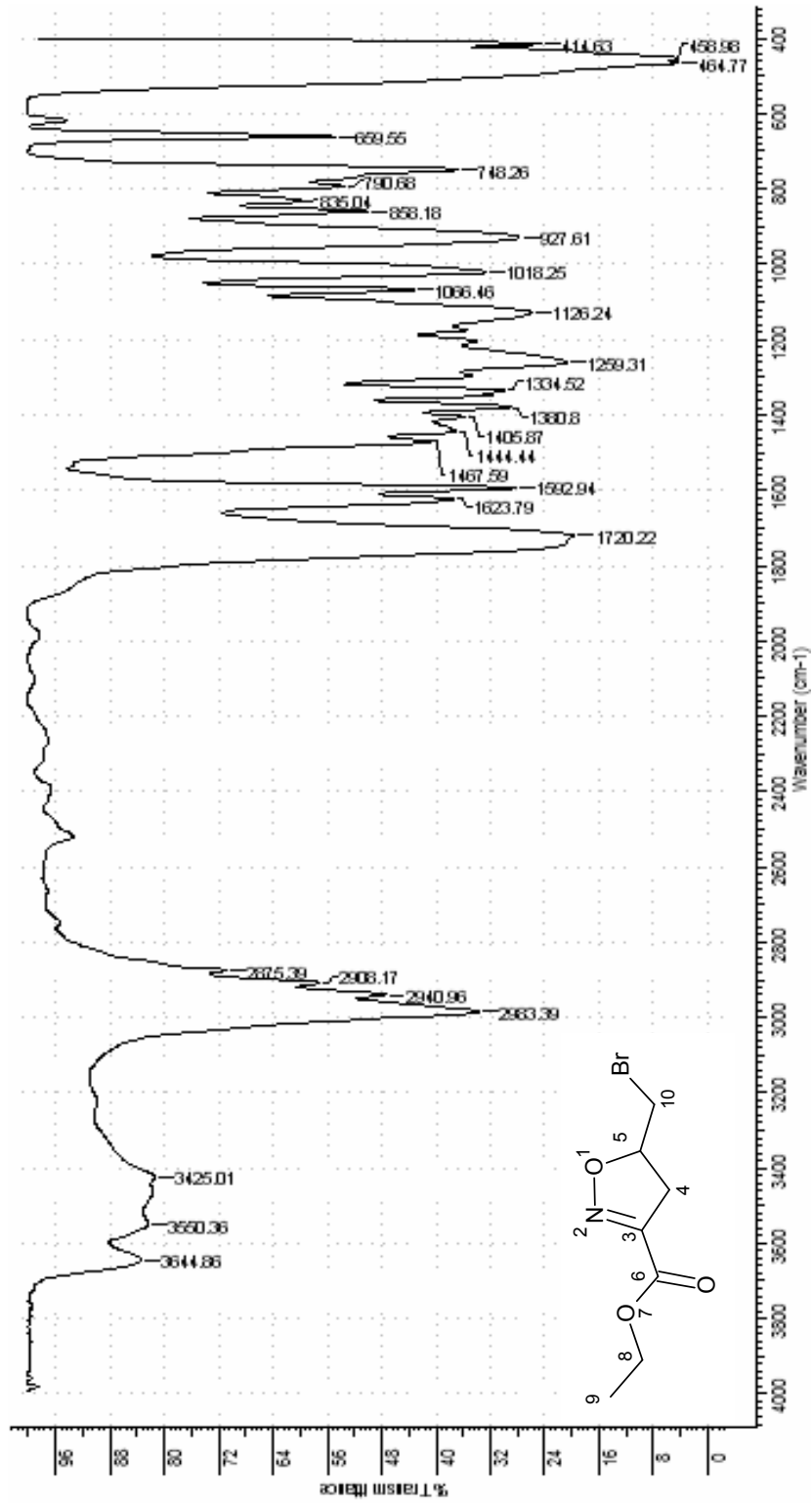


FIG 6.15 Espectro de infravermelho do composto I-4a

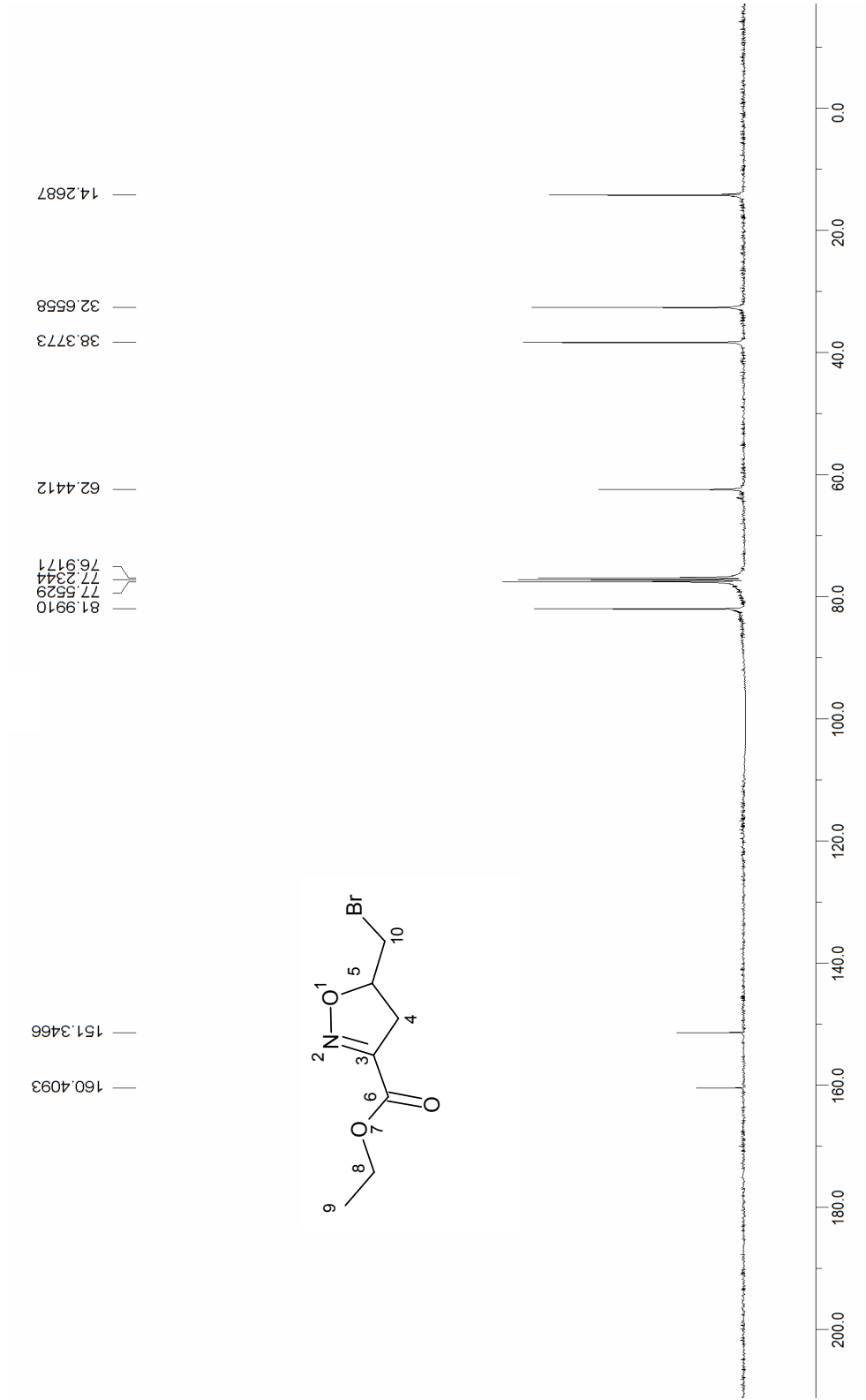


FIG 6.16 Espectro de RMN ^{13}C do composto I-4a

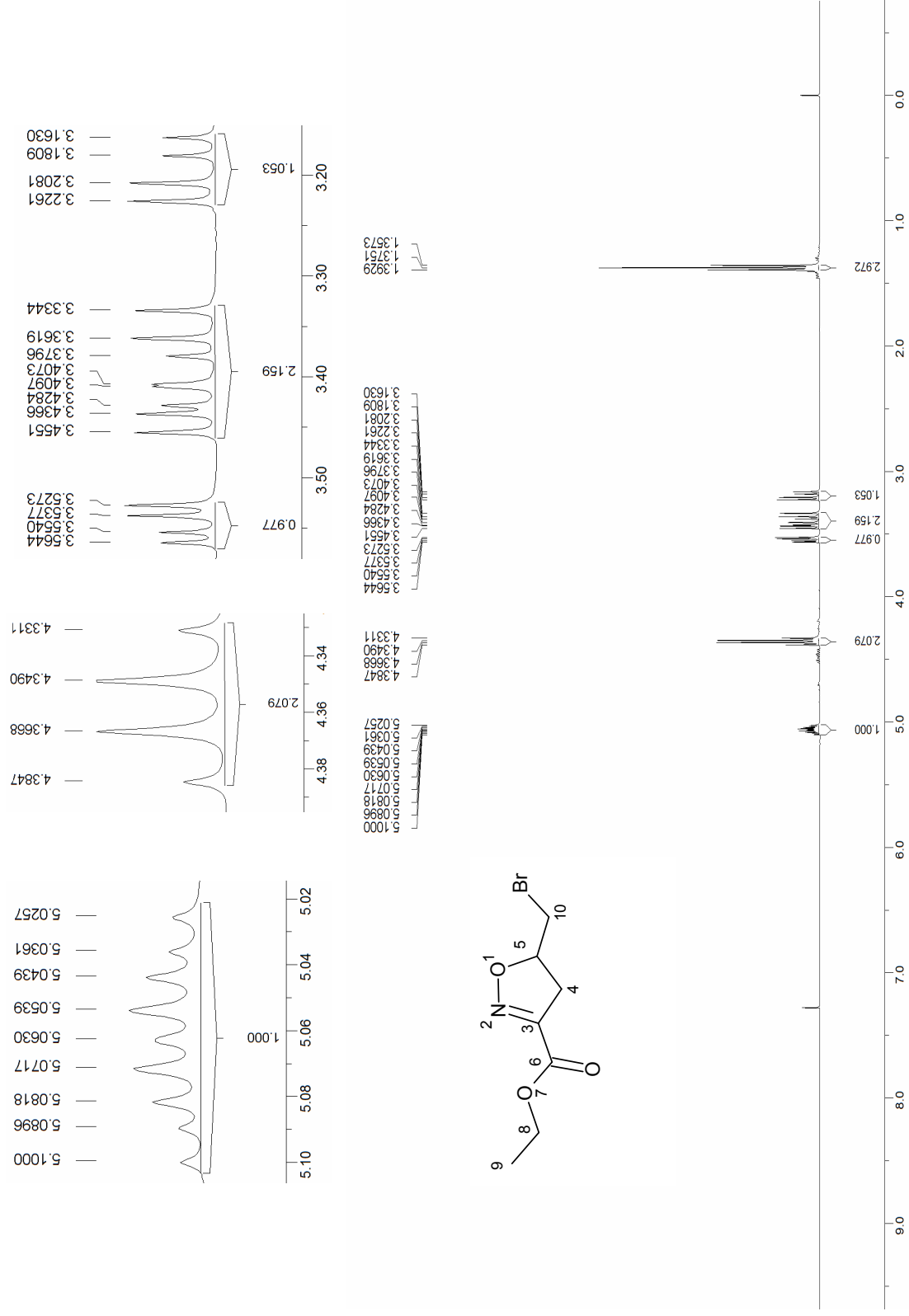


FIG 6.17 Espectro de RMN ¹H do composto I-4a

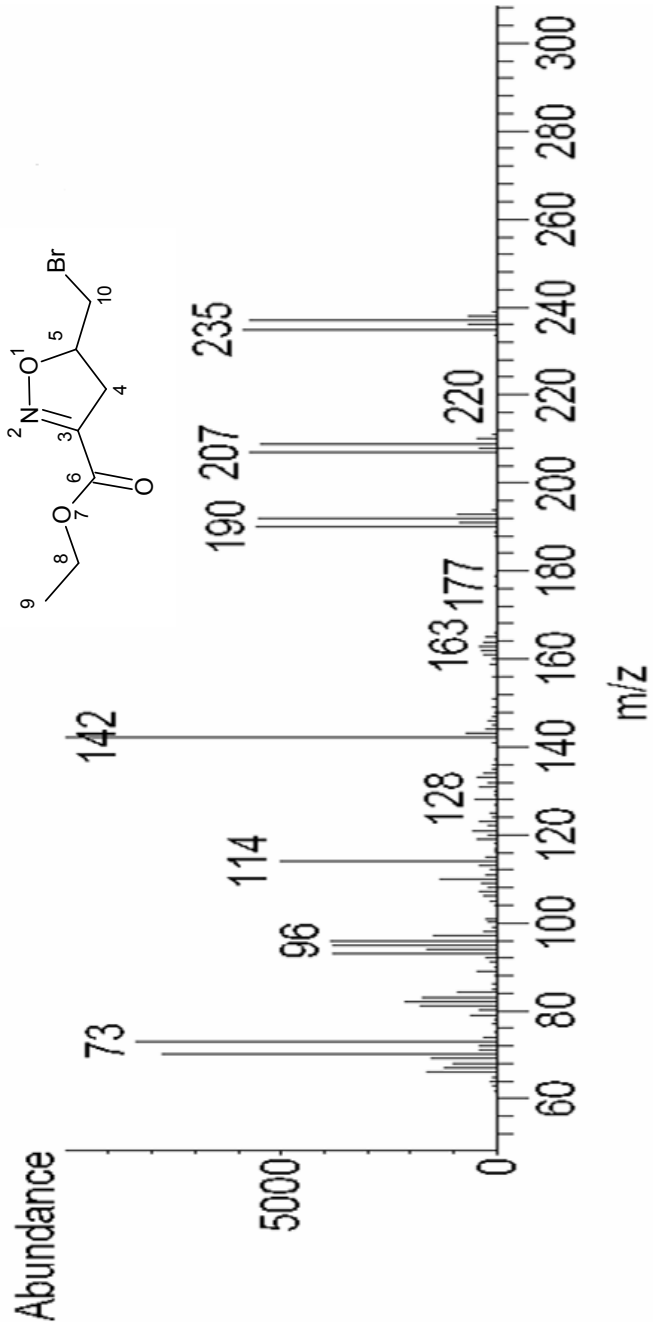


FIG 6.18 Espectro de massas do composto I-4a

6.5 ESPECTROS DO COMPOSTO 3-ETOXICARBONIL-5-CIANO-4,5-DIIDRO-ISOXAZOL (I-5a)

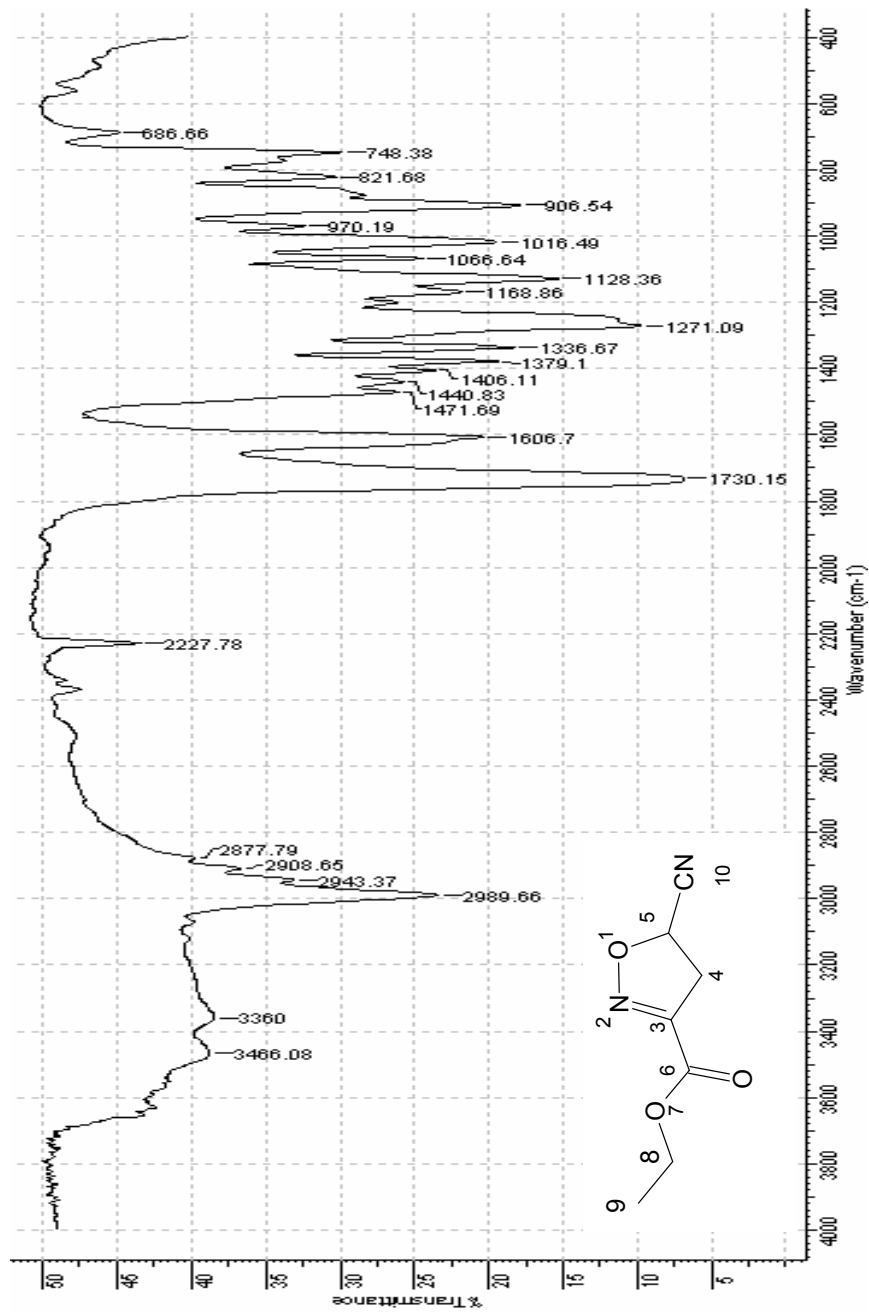


FIG 6.19 Espectro de infravermelho do composto I-5a

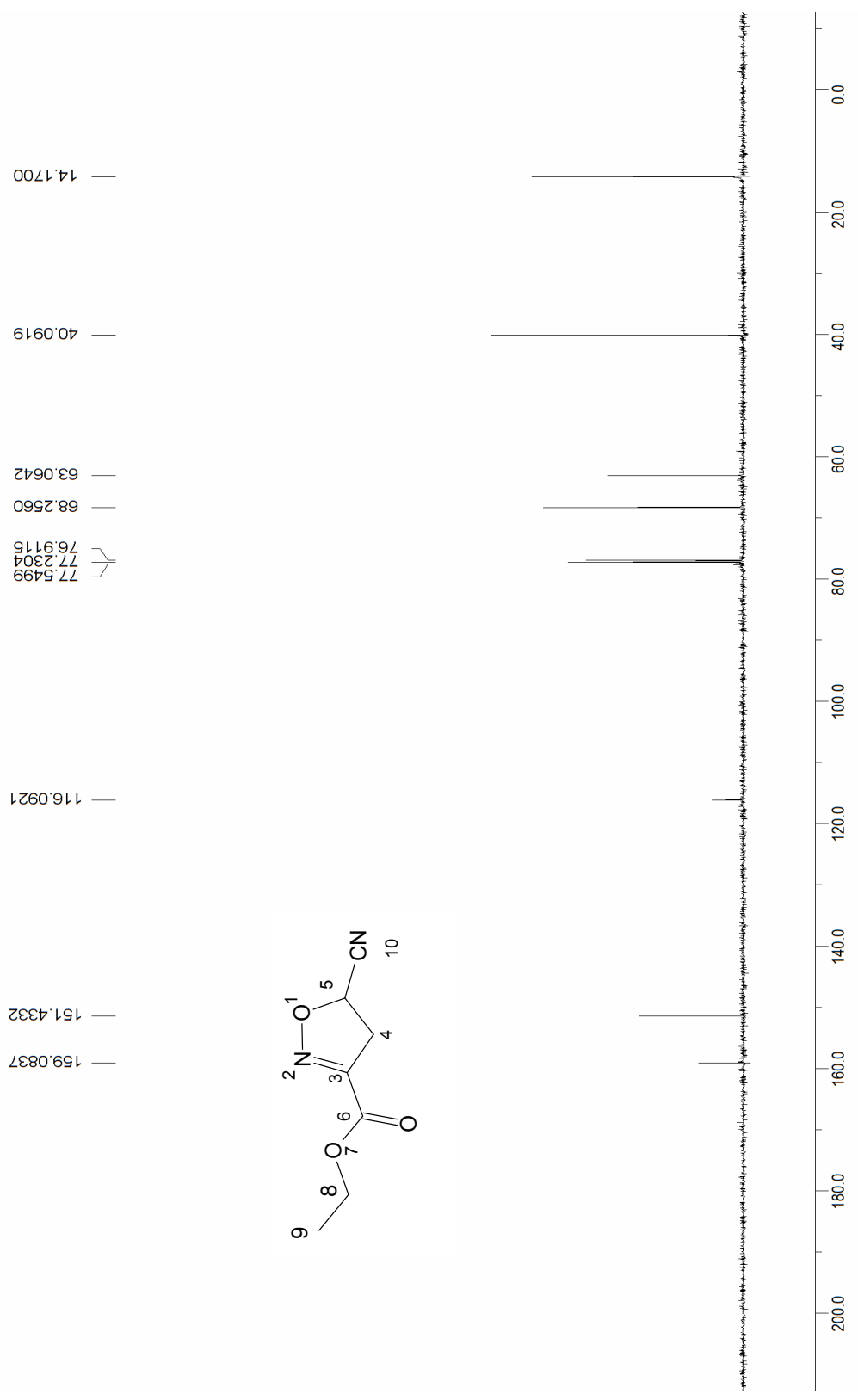


FIG 6.20 Espectro de RMN ^{13}C do composto I-5a

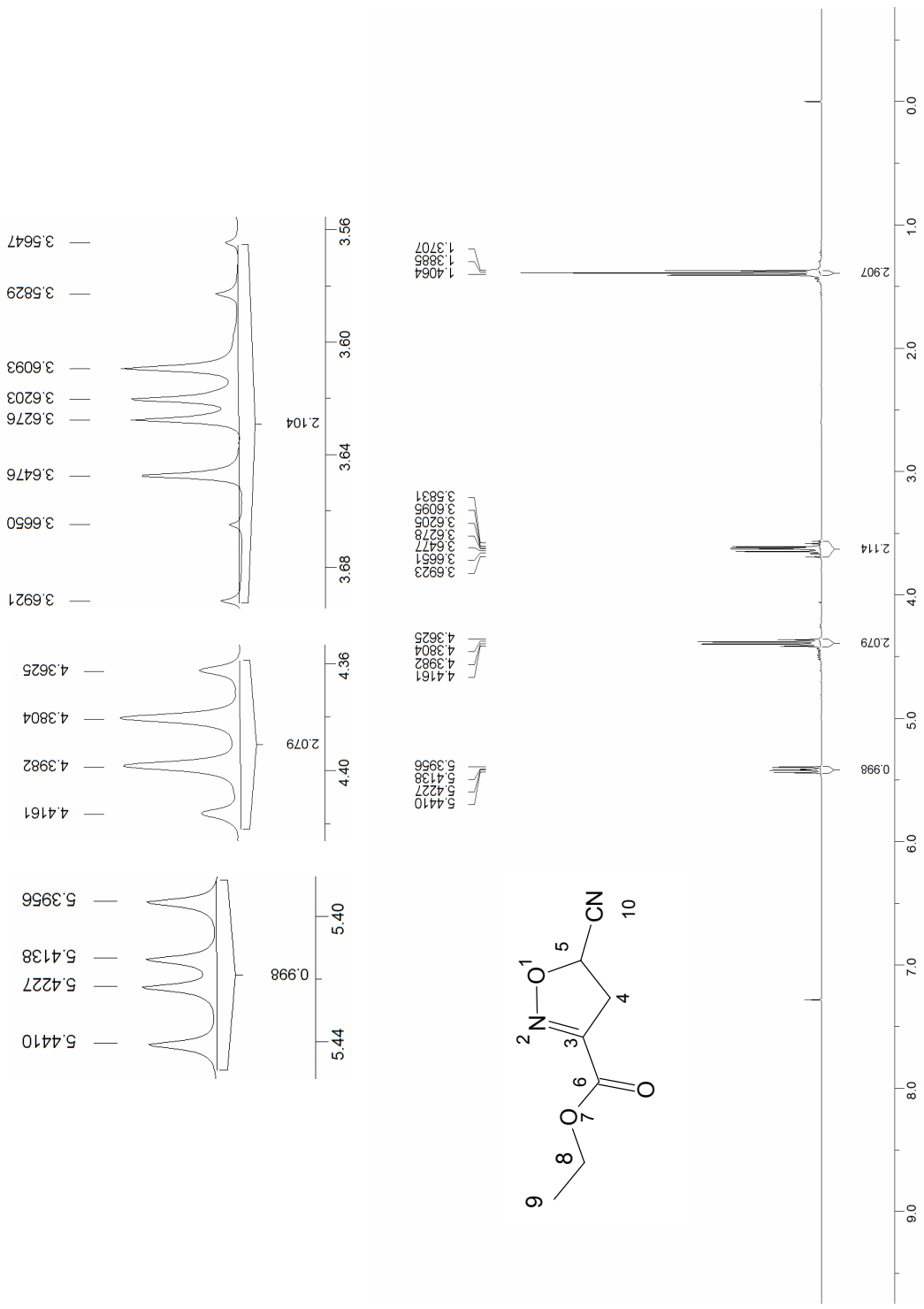


FIG 6.21 Espectro de RMN ¹H do composto I-5a

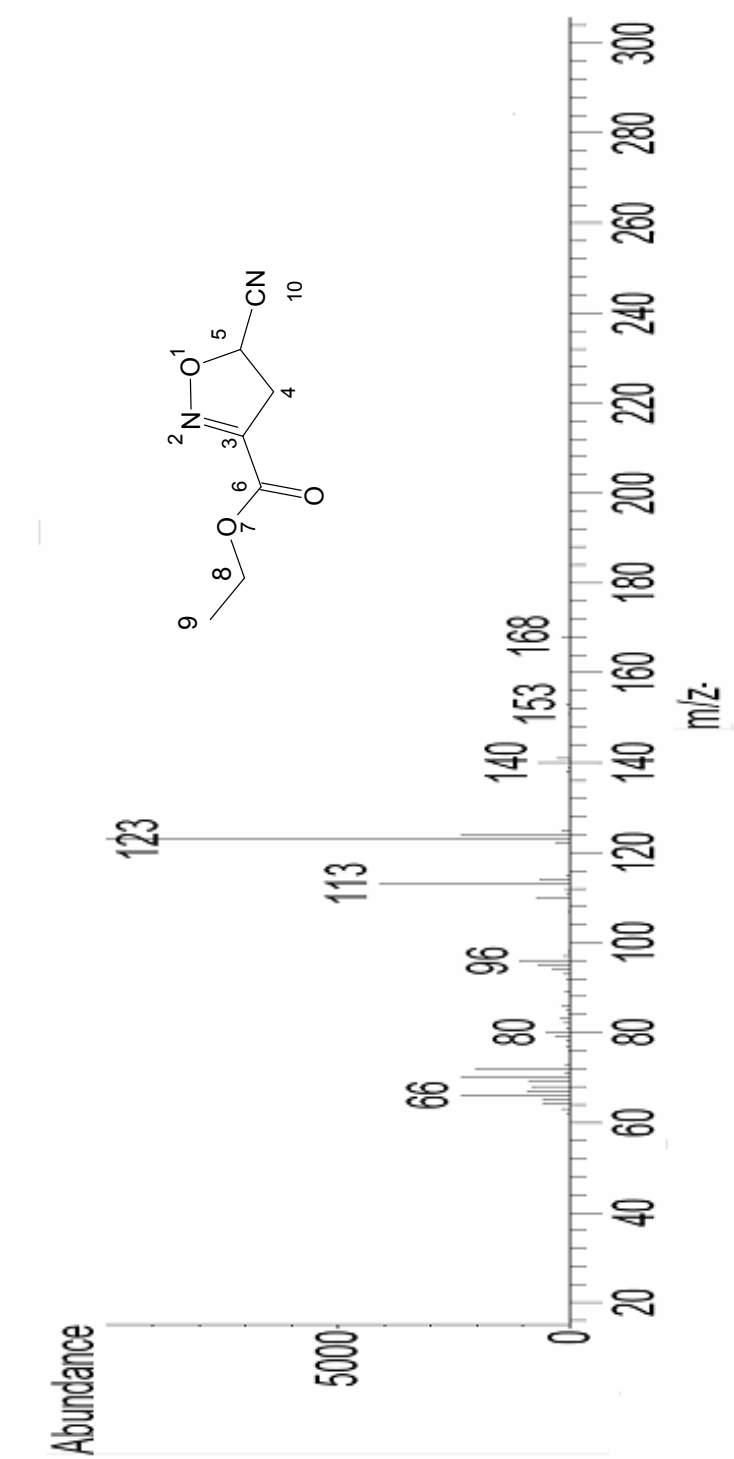


FIG 6.22 Espectro de massas do composto 1-5a

6.6 ESPECTROS DO COMPOSTO 3-ETOXICARBONIL-5-HIDROXIMETIL-4,5-DIIDRO-ISOXAZOL (I-6a)

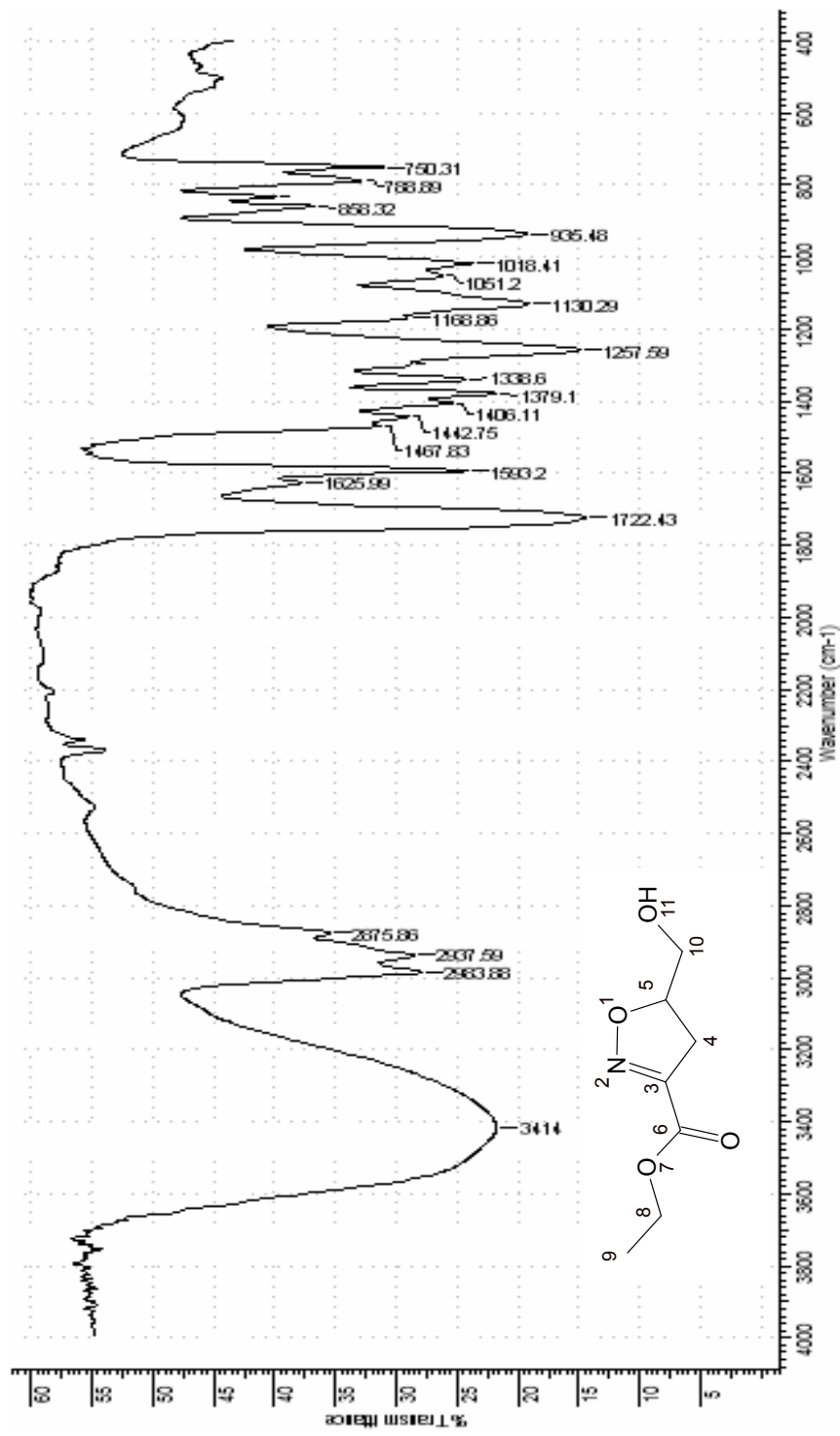


FIG 6.23 Espectro de infravermelho do composto I-6a

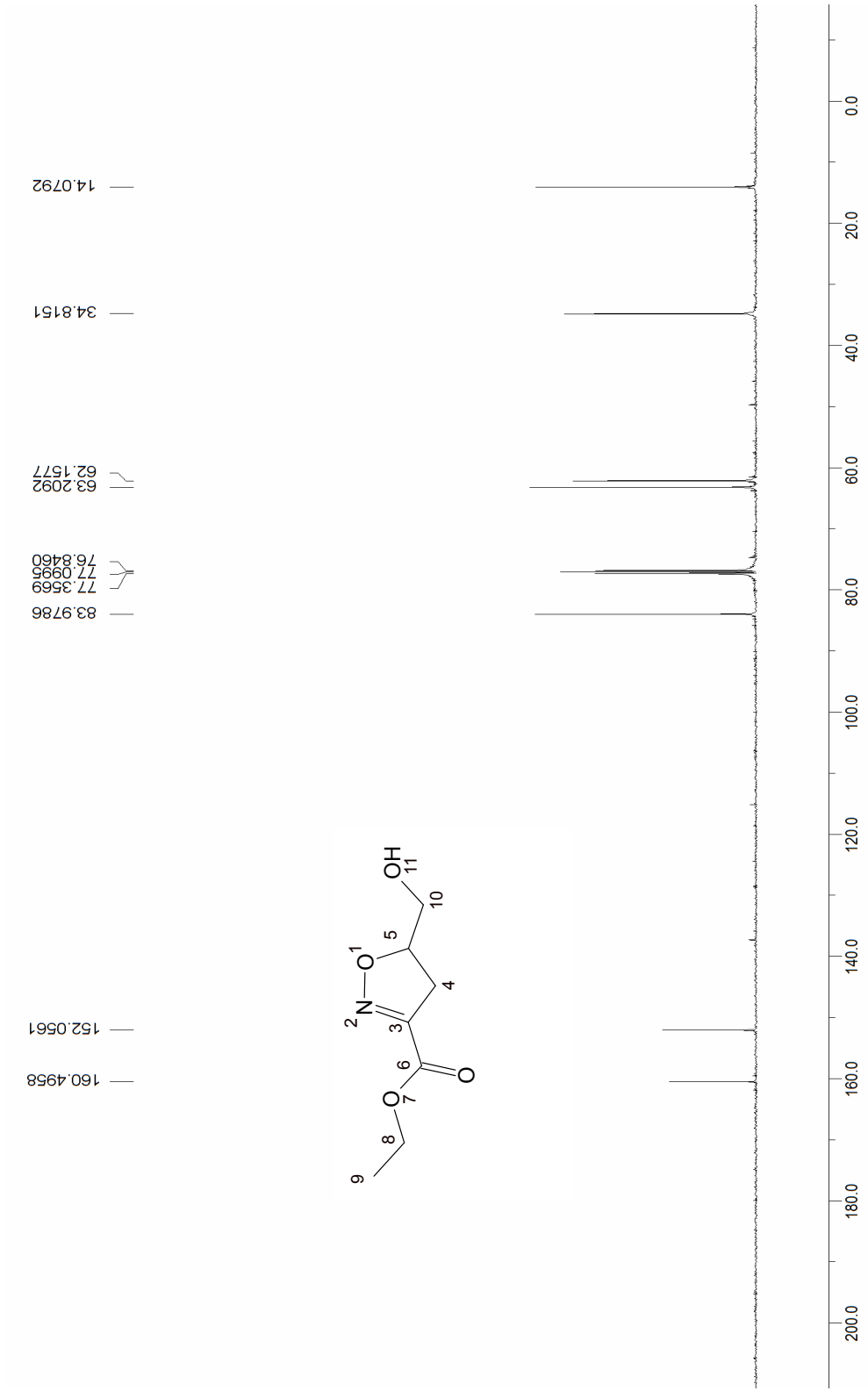


FIG 6.24 Espectro de RMN ^{13}C do composto I-6a

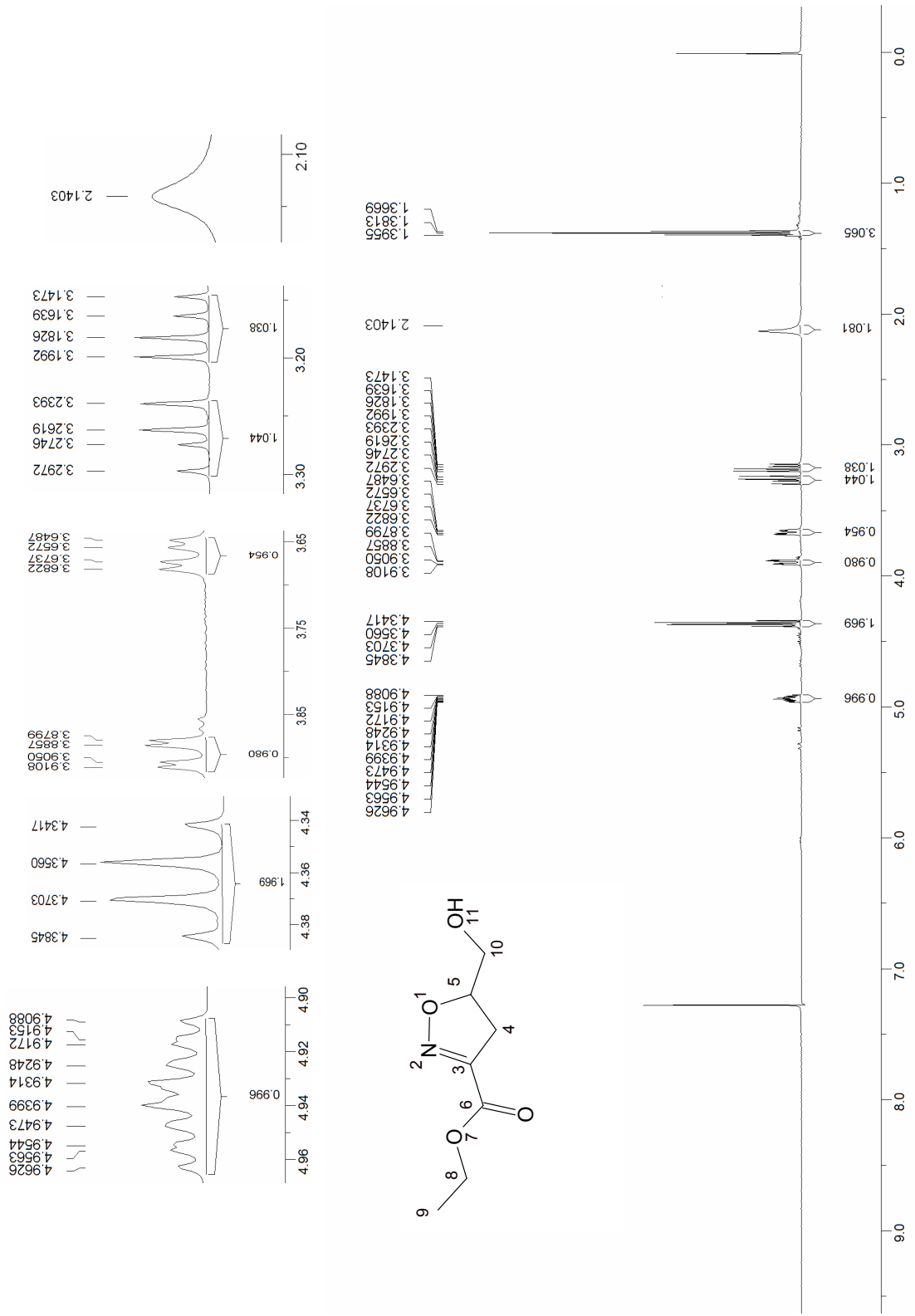


FIG 6.25 Espectro de RMN ¹H do composto I-6a

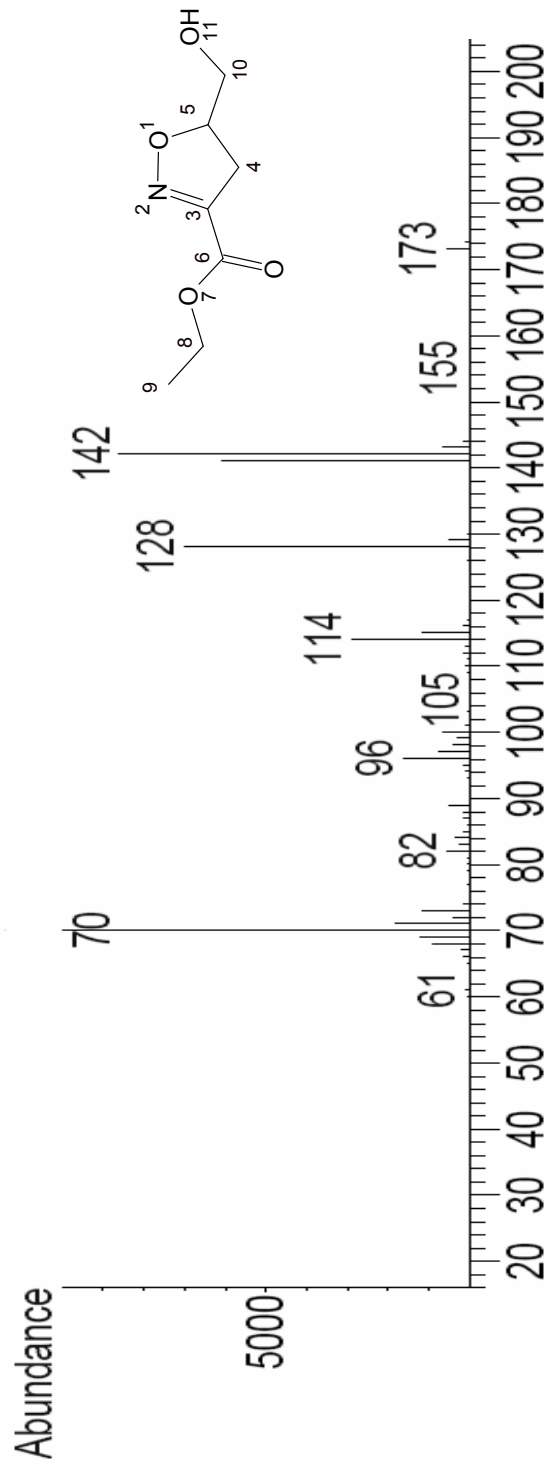


FIG 6.26 Espectro de massas do composto I-6a

6.7 ESPECTROS DO COMPOSTO 5-FENIL-3-DICARBOHIDRAZIDA-4,5-DIIDRO-ISOXAZOL (II-1b)

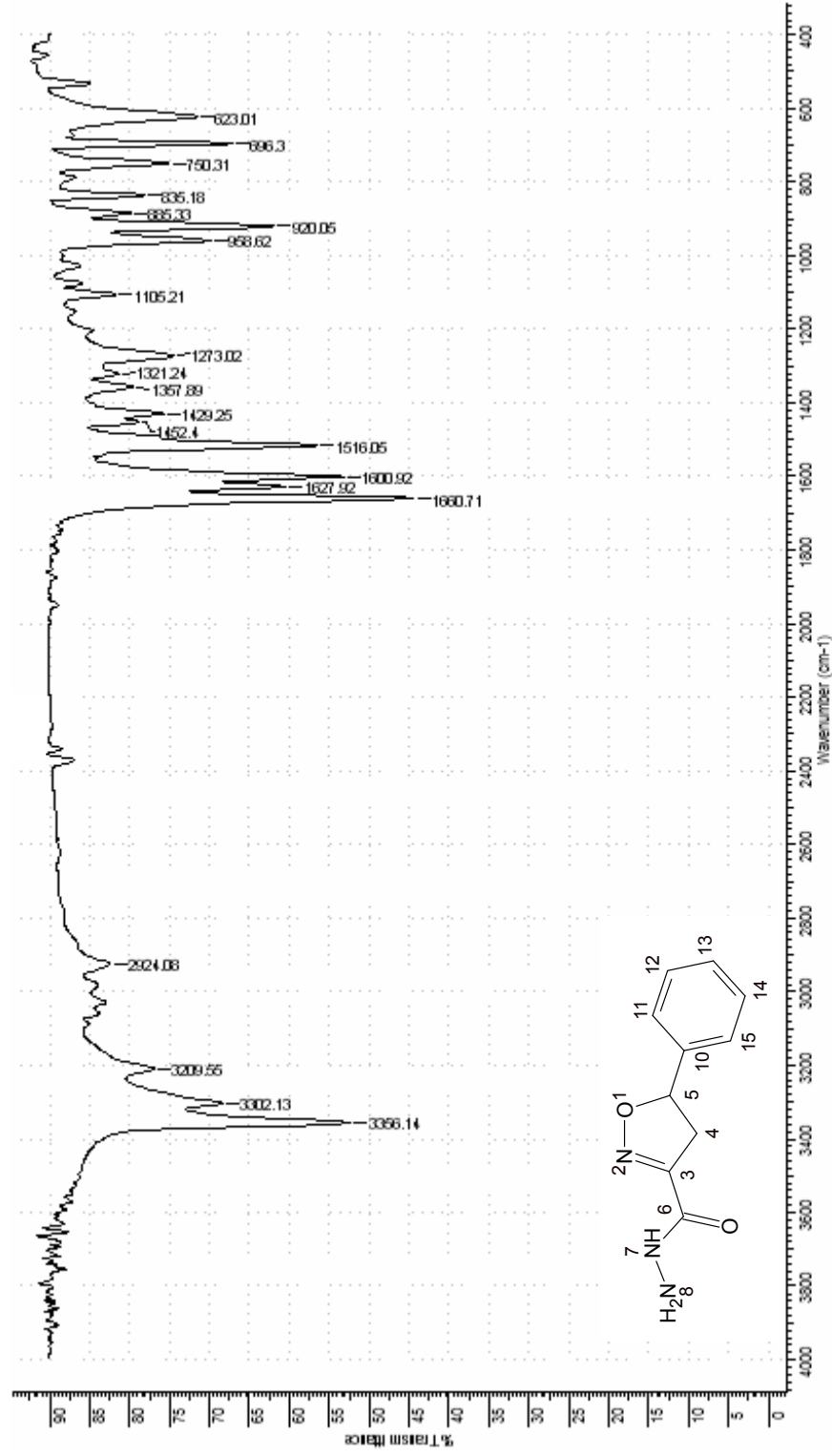


FIG 6.27 Espectro de infravermelho do composto II-1b

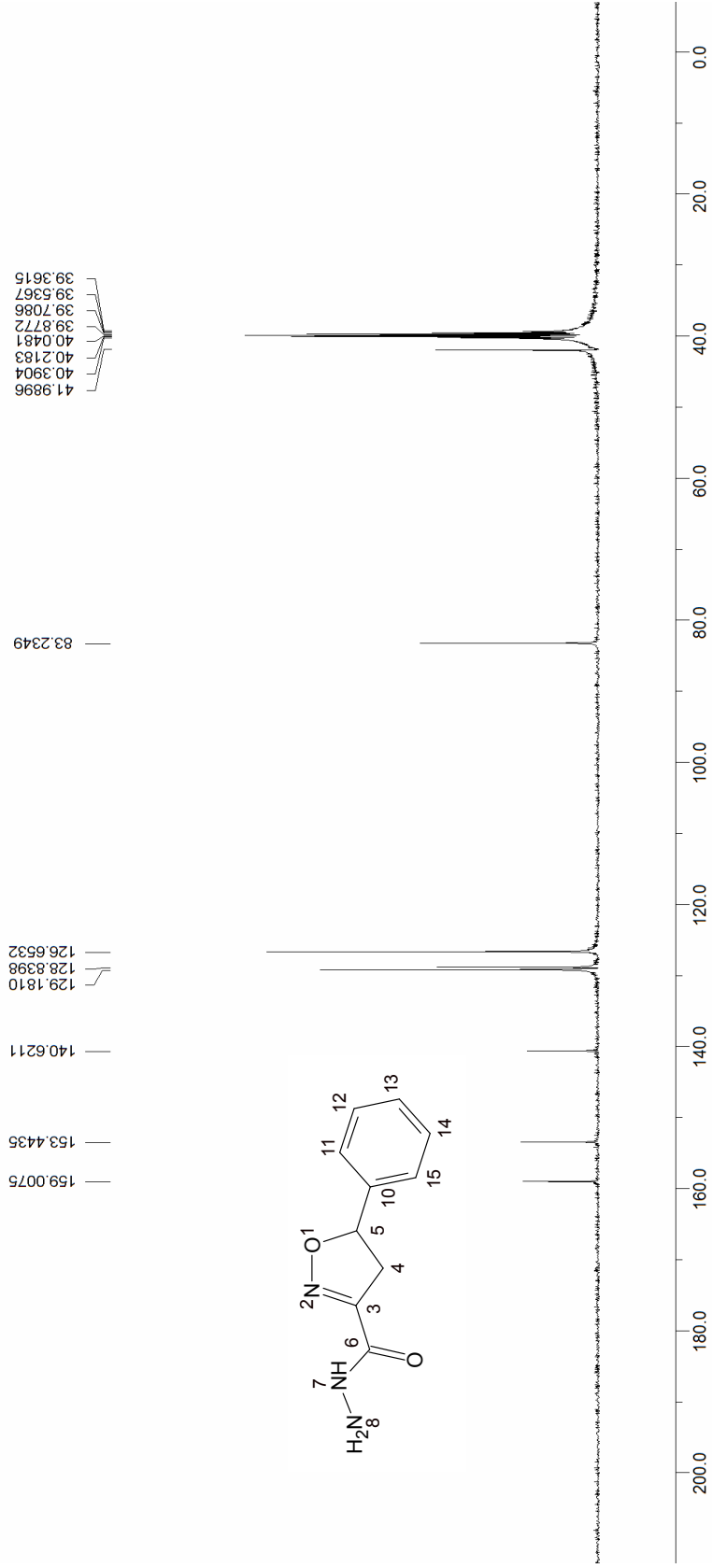


FIG 6.28 Espectro de RMN ^{13}C do composto II-1b

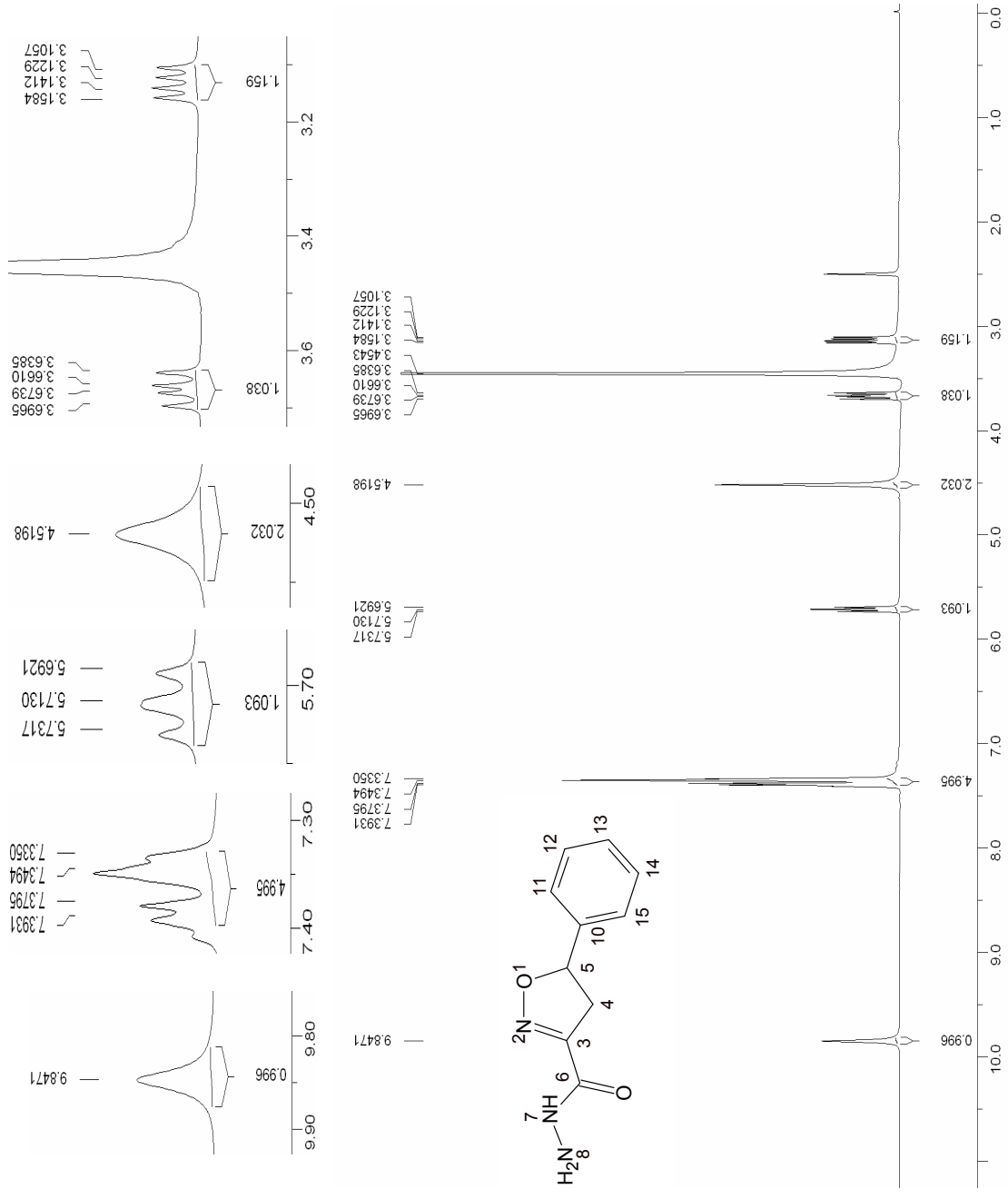


FIG 6.29 Espectro de RMN ¹H do composto II-1b

6.8 ESPECTROS DO COMPOSTO 3,5-DICARBOHIDRAZIDA-4,5-DIIDRO-ISOXAZOL (II-2b)

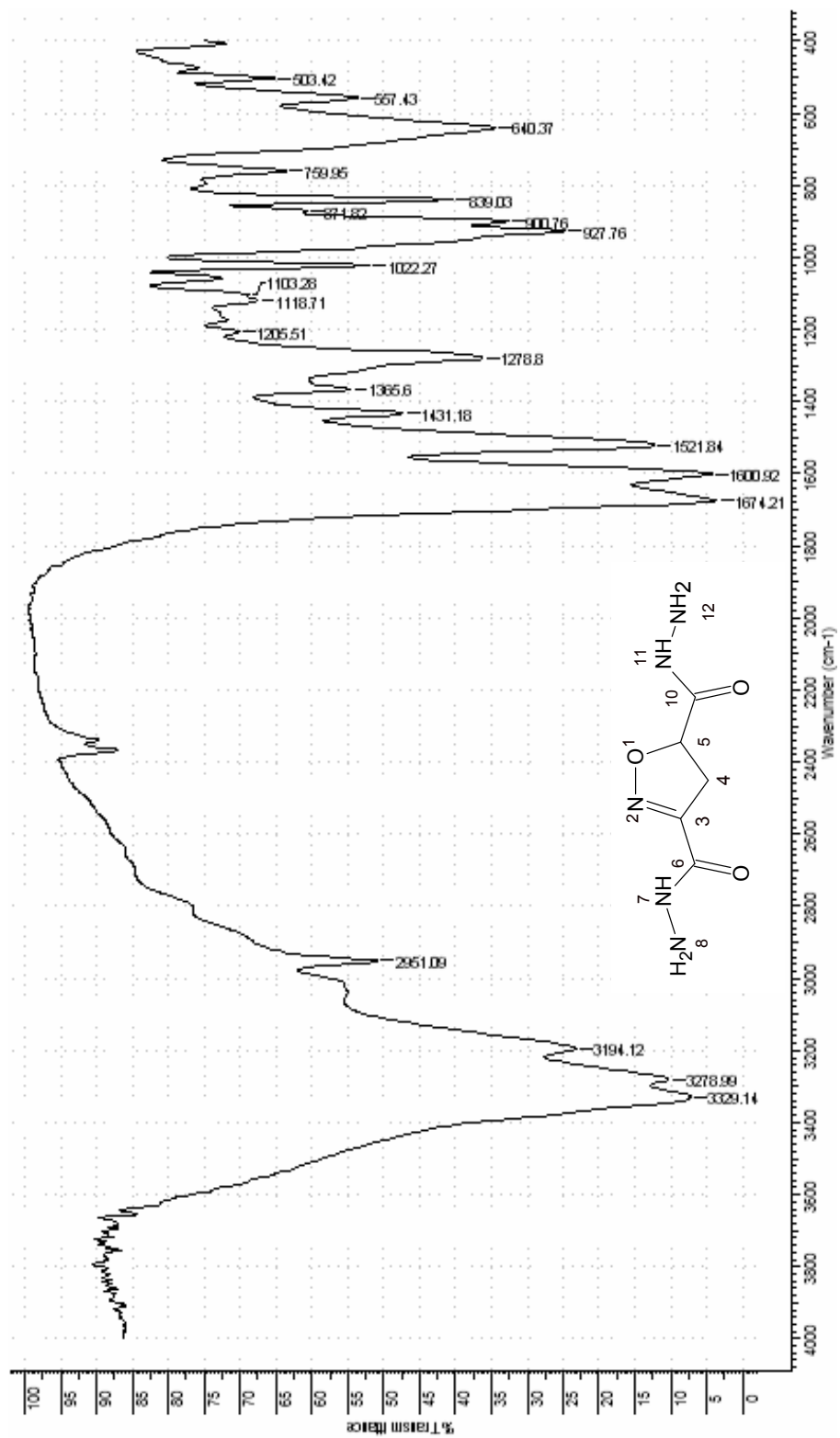


FIG 6.30 Espectro de infravermelho do composto II-2b

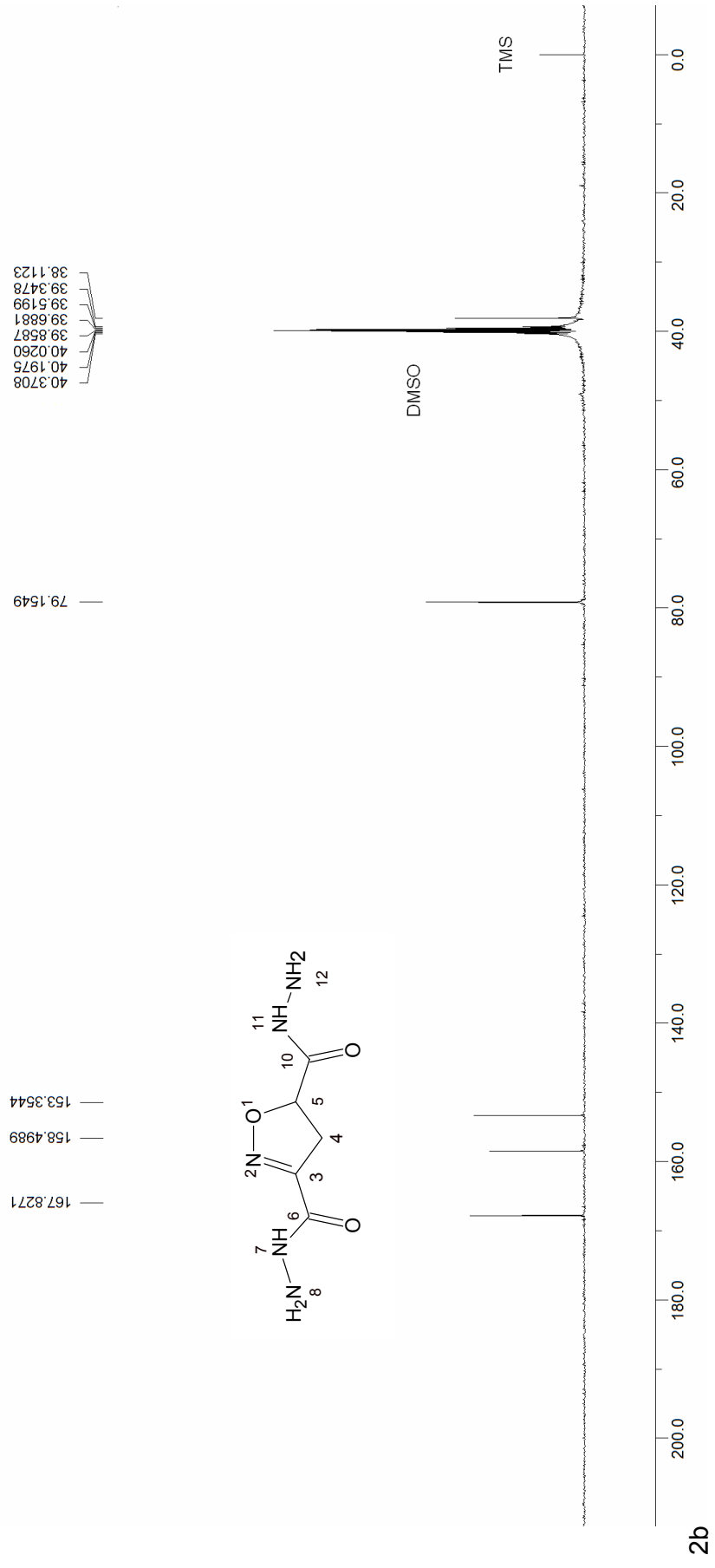


FIG 6.31 Espectro de RMN ^{13}C do composto II-2b

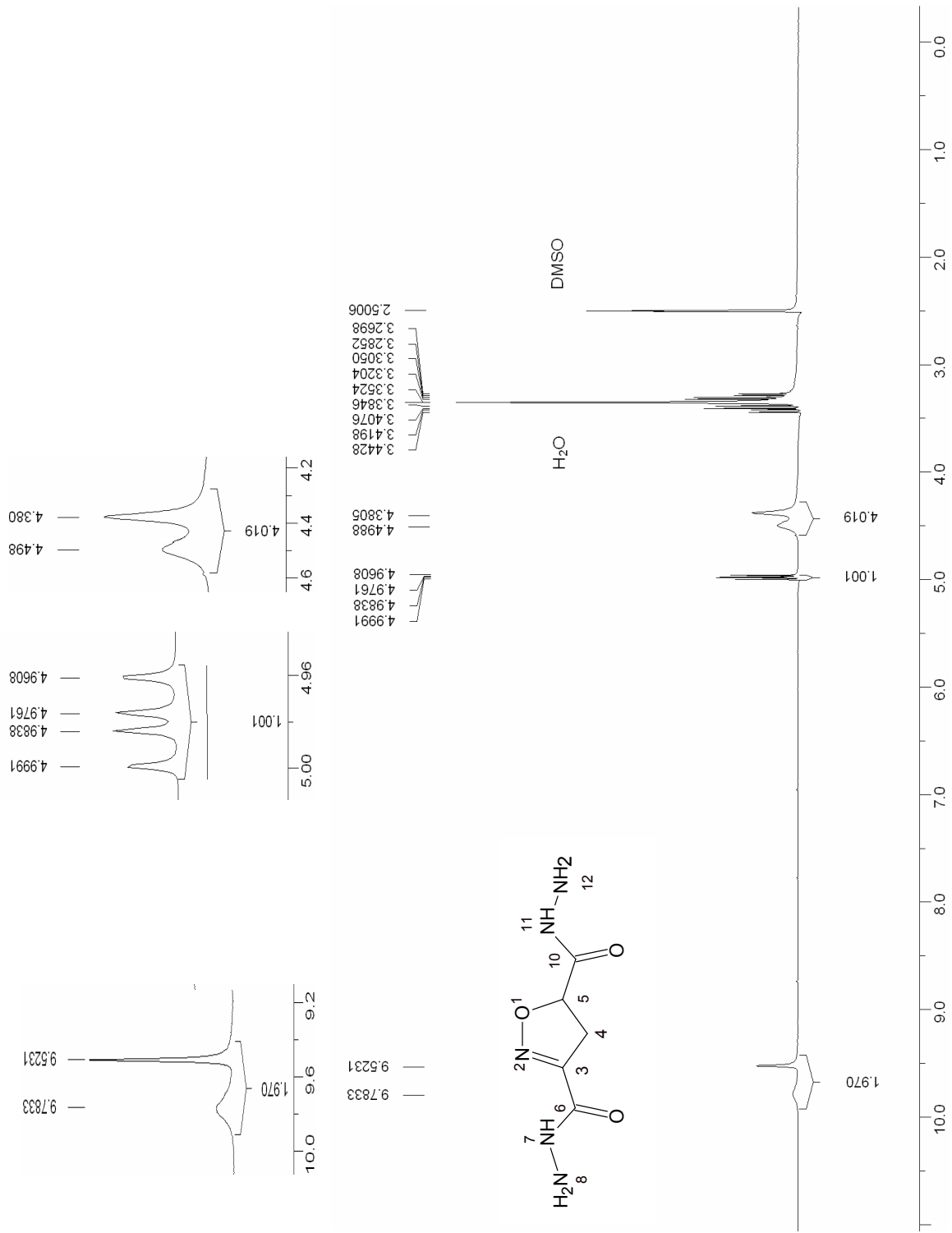


FIG 6.32 Espectro de RMN ¹H do composto II-2b

6.9 ESPECTROS DO COMPOSTO 5-FENIL-3-CARBÓXI-4,5-DIIDRO-ISOXAZOL (II-1c)

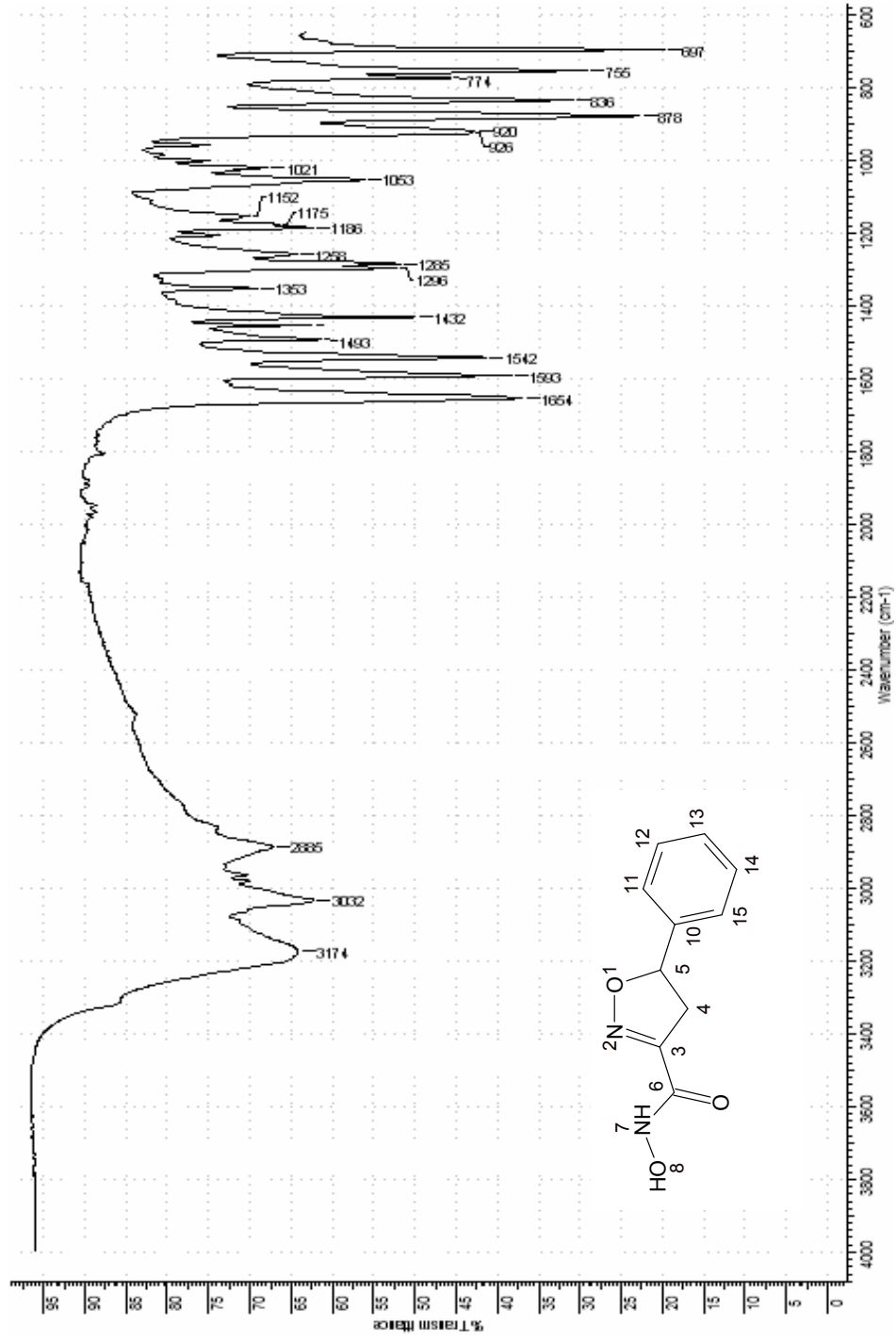


FIG 6.33 Espectro de infravermelho do composto II-1c

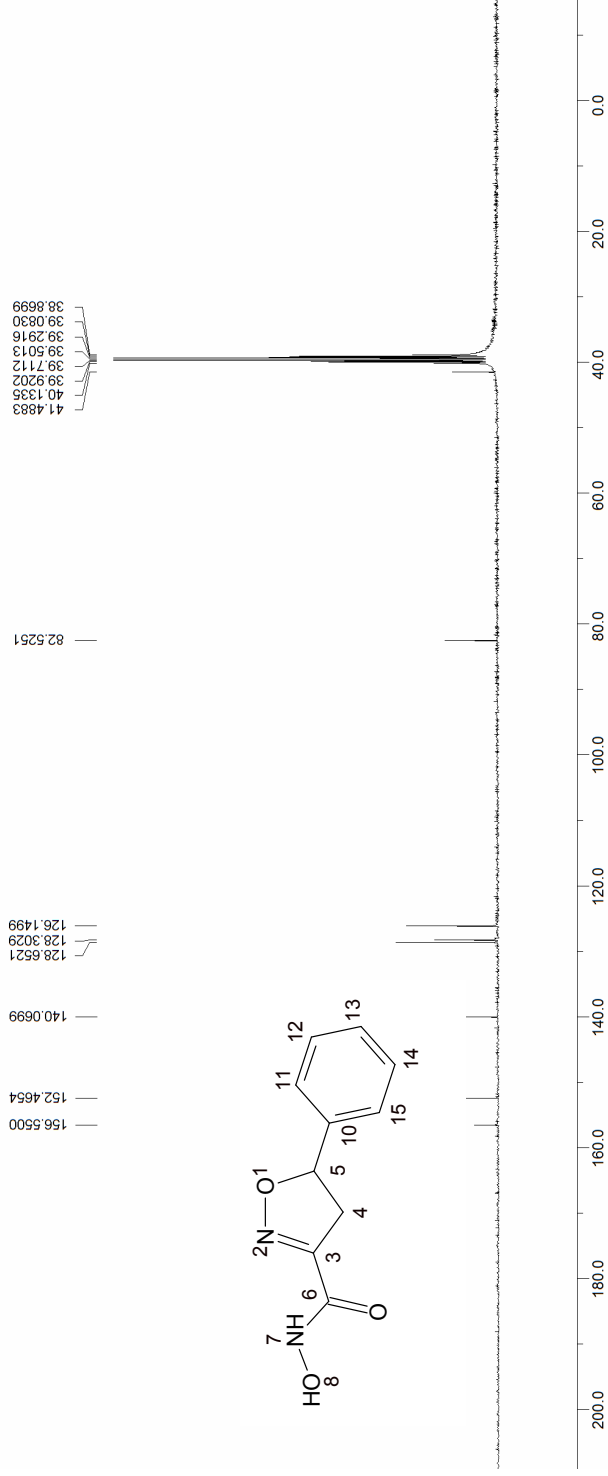


FIG 6.34 Espectro de RMN ^{13}C do composto II-1c

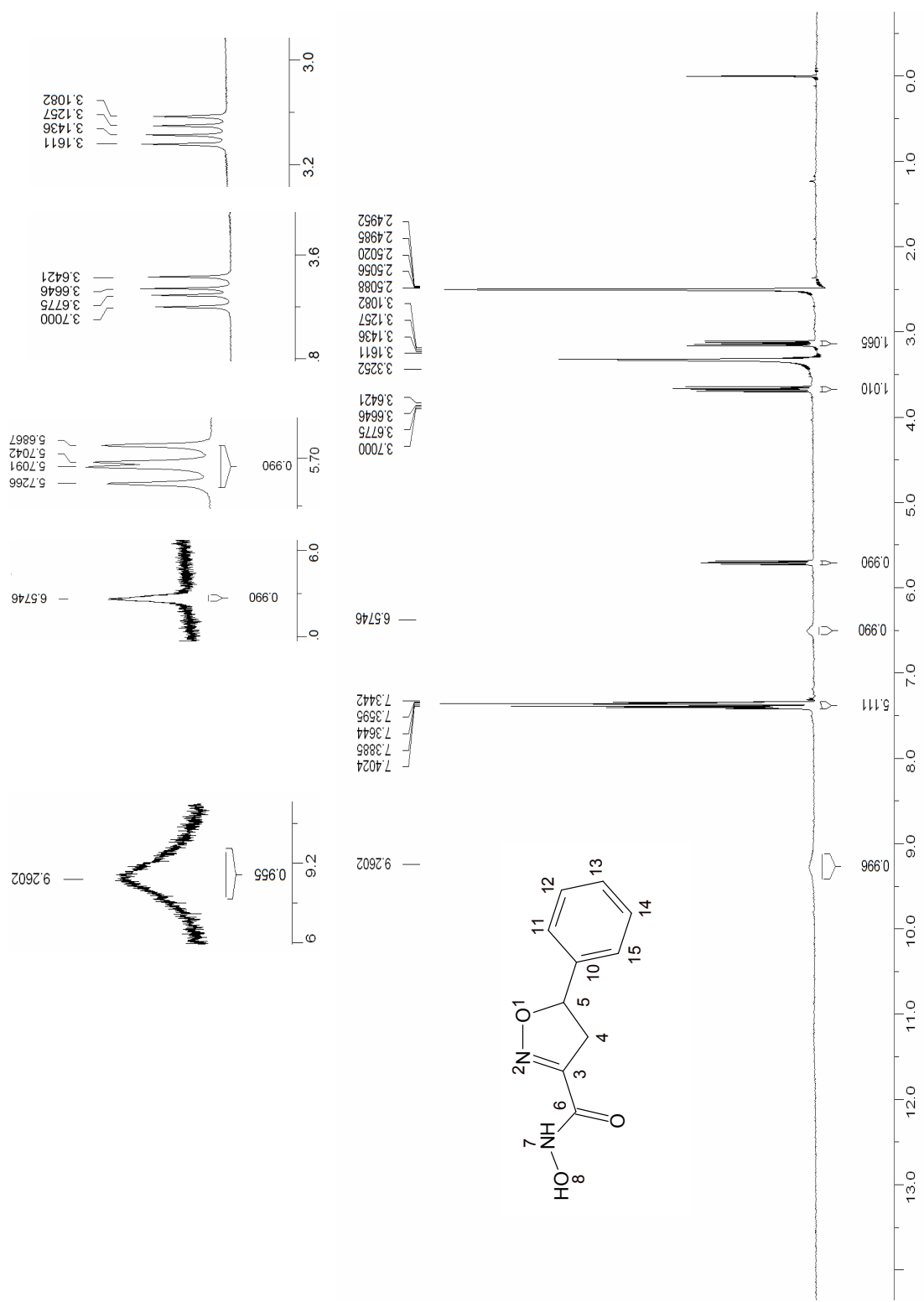


FIG 6.35 Espectro de RMN ^1H do composto II-1c

6.10 ESPECTROS DO ÁCIDO 3,5-CARBÓXI-HIDROXÂMICO-4,5-DIIDRO-ISOXAZOL (II-2c)

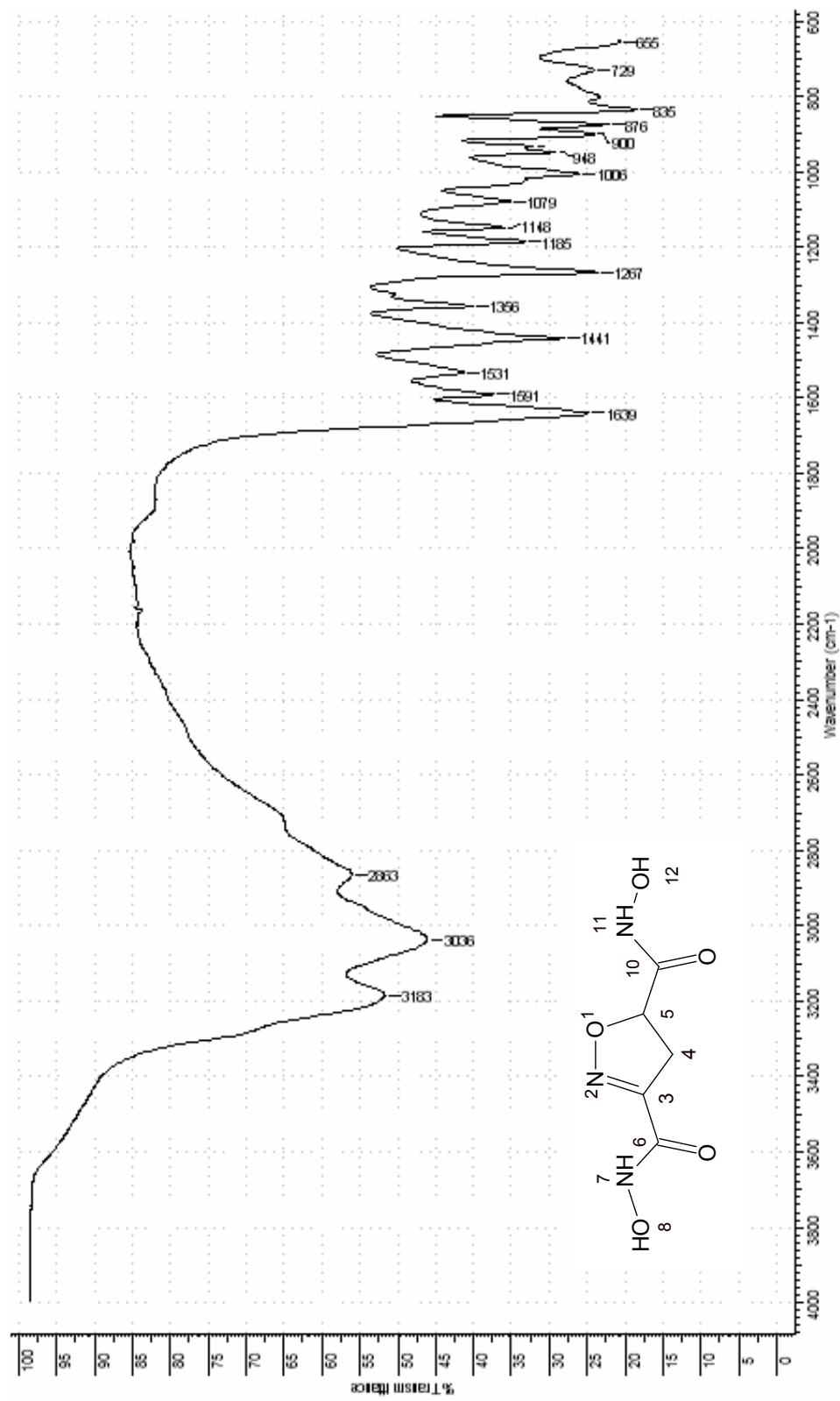


FIG 6.36 Espectro de infravermelho do composto II-2c

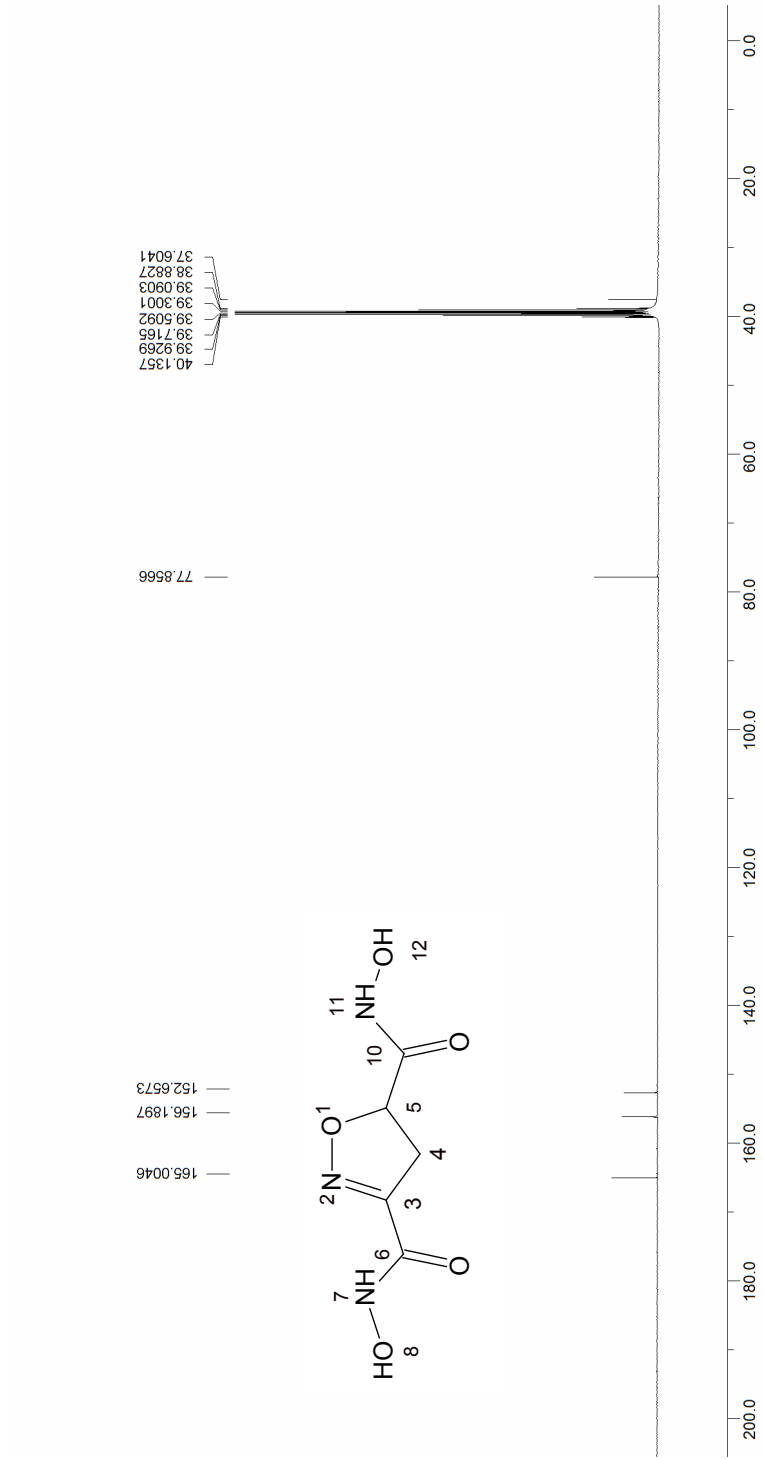


FIG 6.37 Espectro de RMN ^{13}C do composto II-2c

25 °C → 55 °C

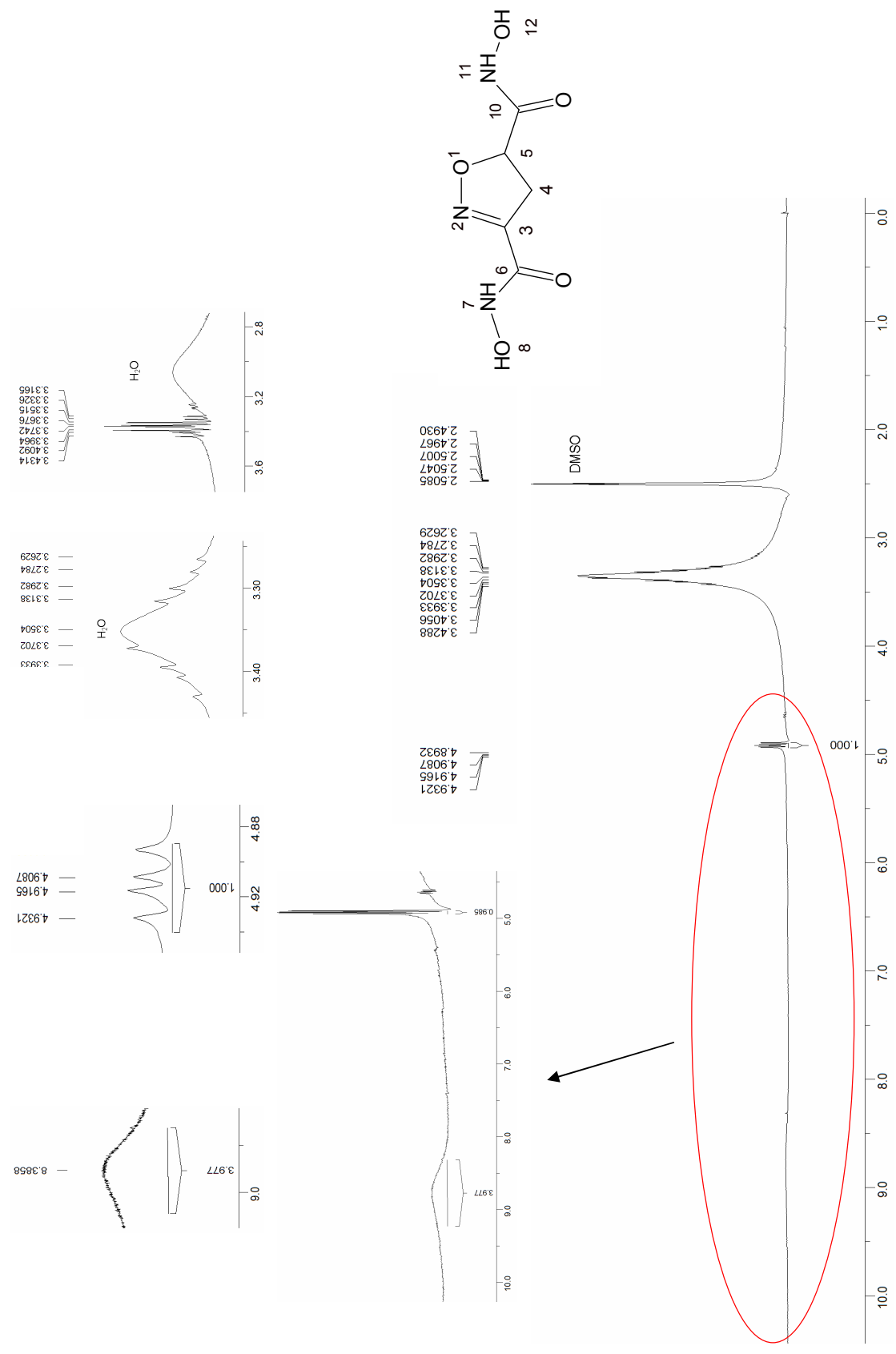


FIG 6.38 Espectro de RMN ¹H do composto II-2c

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](#)