

Rafael da Rosa

**Síntese e avaliação antitripanossomatídeos de derivados
isoxazóis 3,5-dissubstituídos**

Dissertação submetida ao Programa de pós-graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Farmácia.

Orientadora: Profa. Dra. Lílian Sibelle Campos Bernardes.

Coorientador: Prof. Dr. Eloir Paulo Schenkel.

Florianópolis
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

da Rosa, Rafael

Síntese e avaliação antitripanossomatídeos de derivados
isoxazóis 3,5-dissubstituídos / Rafael da Rosa ;
orientadora, Lillian Sibelle Campos Bernardes ;
coorientador, Eloir Paulo Schenkel. - Florianópolis, SC,
2016.

136 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós
Graduação em Farmácia.

Inclui referências

1. Farmácia. 2. química medicinal. 3. doença de chagas.
4. leishmaniose. 5. síntese orgânica. I. Campos Bernardes,
Lillian Sibelle. II. Schenkel, Eloir Paulo. III.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós
Graduação em Farmácia. IV. Título.

A folha de aprovação assinada pode ser encontrada na versão física desta dissertação

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Adelino e Elenir, e minhas tias Terezinha e Magrid. Há sete anos, quando ninguém acreditava nos meus sonhos, foram eles que me apoiaram e ajudaram a trilhar o caminho que me trouxe até aqui.

À minha orientadora, amiga e “mãe científica” Lílian, pelo apoio, conversas, confiança e por ter aceitado me guiar.

Ao meu co-orientador, Prof. Eloir Schenkel, pela ajuda e os ensinamentos.

Às minhas irmãs de laboratório Lara, Maria Izabel e Ana Luísa, que ofereceram toda a ajuda que precisei durante o período em que desenvolvi esse trabalho, e mesmo antes dele.

À equipe do Laboratório de Química Farmacêutica: Alice, Stella, Santiago, Marina, Lisandra, Fernanda, Cíntia, Prof.^a Miriam. Pela ajuda e (muitos) momentos de descontração!

Ao Prof. Mario Steindel e à Milene Höehr de Moraes, pela realização dos ensaios biológicos descritos neste trabalho e por terem aberto as portas do Laboratório de Protozoologia para que eu pudesse acompanhá-los no processo.

Ao Prof. André Tempone Cardoso pela realização de parte dos ensaios biológicos descritos aqui.

Às amigas do GEPRONAS, Ana Cláudia, Dani, Gabriele, Tamires e Vanessa. E às minhas amigas Aline, Andrea, Gabriela e Haíra.

Aos técnicos Vinícius Palaretti, Luiz Otávio Zamoner e José Carlos Tomaz (FCFRP/USP) e ao Louis Sandjo Pergaud (CIF/UFSC) pelas análises de ressonância magnética nuclear e massas, que foram essenciais para a condução desse trabalho.

Ao PGFAR/UFSC e à CAPES pelo auxílio concedido e pela bolsa de estudos.

Obrigado!

Talent is cheaper than table salt. What separates the talented individual from the successful one is a lot of hard work.

(Stephen King, 1996)

RESUMO

DA ROSA, R. **Síntese e avaliação antitripanossomatídeos de derivados isoxazóis 3,5-dissubstituídos**, 2016. 136 p. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.

Os fármacos utilizados atualmente no tratamento da doença de Chagas e leishmaniose possuem desvantagens relacionadas com sua eficácia, além de toxicidade o que leva a altos índices de abandono de tratamento. Apesar de estas doenças afetarem milhões de pessoas vivendo, principalmente, em países em desenvolvimento, ainda há poucas perspectivas no desenvolvimento de novas terapias. Com base no conceito de desenvolvimento de fármacos a partir de produtos naturais, duas lignanas (grandisina e veraguensina) relatadas com atividade antiparasitária promissora foram selecionadas como base para o desenvolvimento de novas moléculas potencialmente bioativas. Aplicando o bioisosterismo e outras estratégias de modificação molecular, vinte e seis derivados isoxazóis 3,5-dissubstituídos foram sintetizados através da cicloadição 1,3-dipolar entre óxidos de nitrila e alcinos catalisada por cobre e suas atividades contra *T. cruzi* e *L. amazonensis* foram avaliadas. Ao final, com o auxílio de um estudo preliminar de relação estrutura-atividade, seis compostos foram ativos na forma amastigota de *T. cruzi* com valores de IC_{50} entre 1,13 e 90,39 μ M. Entre estes, um dos compostos também foi ativo em *L. amazonensis* (composto 67) com valor de IC_{50} de 5,08 μ M. Os compostos que apresentaram $IC_{50} < 10 \mu$ M foram testados quanto ao potencial de inibição da enzima Tripanotiona redutase, no entanto, nenhuma atividade foi identificada.

Palavras-chave: doença de Chagas, leishmaniose, química medicinal, isoxazóis, bioisosterismo.

ABSTRACT

DA ROSA, R. **Synthesis and anti-trypanosomatid evaluation of 3,5-disubstituted isoxazoles derivatives**, 2016. 136 p. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.

The medicines currently used to treat Chagas disease and leishmaniasis have drawbacks related to efficacy and toxicity leading to high levels of treatment abandonment. Although these diseases affect millions of people worldwide, especially in developing countries, the perspectives of development of new therapies are still low. The concept of developing *hit* compounds based on natural products led us to propose derivatives of two lignans (grandisina and veraguensina) already described with promising anti-parasitary activity. Applying bioisosterism and other molecular modification strategies, twenty six 3,5-disubstituted isoxazole derivatives were synthesized using copper catalyzed 1,3-dipolar cycloaddition between a nitrile oxide and an alkyne, and their activity against *T. cruzi* and *L. amazonensis* was assessed. Further, after a preliminary structure-activity relationship study was conducted, six compounds active against amastigotes of *T. cruzi* with IC_{50} values ranging from 1.13 μ M to 90.39 μ M. Among them, one isoxazole was also active against amastigotes of *L. amazonensis* (compound 67), with an IC_{50} value of 5.08 μ M. Moreover, the action of compounds with $IC_{50} < 10$ μ M were evaluated on trypanothione reductase, however, none of them showed inhibition of this particular target.

Key-words: Chagas disease, leishmaniasis, medicinal chemistry, isoxazoles, bioisosterism.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. FÁRMACOS UTILIZADOS NO TRATAMENTO DA DOENÇA DE CHAGAS	3
FIGURA 2. FÁRMACOS PARA TRATAMENTO DAS LEISHMANIOSES	4
FIGURA 3. EXEMPLOS DE PRODUTOS NATURAIS COM ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA.	6
FIGURA 4. LIGNANAS COM ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA EM TRIPOMASTIGOTAS DE <i>T. CRUZI</i> E PROMASTIGOTAS DE <i>L. DONOVANI</i>	6
FIGURA 5. ALGUNS DOS ANÁLOGOS DAS LIGNANAS GRANDISINA E VERAGUENSINA DESCRITOS NA LITERATURA E SUAS IC ₅₀ EM TRIPOMASTIGOTA DE <i>T. CRUZI</i>	7
FIGURA 6. EXEMPLO DE SUBSTITUIÇÃO BIOISOTÉRMICA	8
FIGURA 7. ALGUNS DOS ANÉIS HETEROCÍCLICOS RELEVANTES PARA A QUÍMICA MEDICINAL	9
FIGURA 8. REPRESENTAÇÃO DE UMA CICLOADIÇÃO 1,3-DIPOLAR	11
FIGURA 9. ESQUEMA DE SÍNTESE DO ANEL ISOXAZOL COM FORMAÇÃO DOS DOIS RÉGIO-ISÔMEROS	11
FIGURA 10. PROPOSTA DE DERIVADOS	13
FIGURA 11. OXIDAÇÃO DA TRIPANOTIONA COM POSTERIOR REDUÇÃO PELA TRIPANOTIONA REDUTASE	14
FIGURA 12. ESPECTRO DE ¹ H RMN DO COMPOSTO 40 , 5-HIDROXIMETIL-3-(4-METOXIFENIL)-ISOXAZOL (CDCl ₃ , 400 MHz)	46
FIGURA 13. ESPECTRO DE ¹³ C RMN DO COMPOSTO 40 , 5-HIDROXIMETIL-3-(4-METOXIFENIL)-ISOXAZOL (CDCl ₃ , 400 MHz)	47
FIGURA 14. ESPECTRO DE MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO DO COMPOSTO 40 , 5-HIDROXIMETIL-3-(4-METOXIFENIL)-ISOXAZOL (HRMS ESI-TOF, METANOL)	48
FIGURA 15. NOMENCLATURA ADOTADA PARA OS ANÉIS AROMÁTICOS	51
FIGURA 16. DIFERENÇAS NA CONFORMAÇÃO ENTRE OS COMPOSTOS 50 (A) E 47 (B)	52
FIGURA 17. ESPECTRO DE MASSAS DA SOLUÇÃO ESTOQUE DO COMPOSTO 56 (HRMS ESI-TOF, METANOL)	53
FIGURA 18. COMPARAÇÃO ENTRE A DISPONIBILIDADE DO PAR DE ELÉTRONS DOS COMPOSTOS 51 , 62 E 63	55
FIGURA 19. INFLUÊNCIA DO LOGP NA ATIVIDADE LEISHMANICIDA	58
FIGURA 20. TRÊS DOS ANÁLOGOS DAS LIGNANAS NATURAIS, COM POTENTE ATIVIDADE BIOLÓGICA	59

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. DOENÇAS TROPICAIS NEGLIGENCIADAS (OMS) E SEUS AGENTES ETIOLÓGICOS	1
TABELA 2. RENDIMENTO DO COMPOSTO 34 APÓS SÍNTESE PELAS METODOLOGIAS (A) E (B)	38
TABELA 3. RENDIMENTO DO COMPOSTO 34 APÓS SÍNTESE EM MICRO-ONDAS, EM DIFERENTES TEMPOS	39
TABELA 4. ESTRUTURA E RENDIMENTO DAS OXIMAS 35-39	41
TABELA 5. DERIVADOS ISOXAZÓIS SINTETIZADOS E OS SEUS RENDIMENTOS	43
TABELA 6. COMPOSTOS DERIVADOS SINTETIZADOS	45
TABELA 7. INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO EM T. CRUZI	50
TABELA 8. COMPOSTOS 62-67 E SUA AVALIAÇÃO TRIPANOCIDA	54
TABELA 9. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA	56

LISTA DE ESQUEMAS

ESQUEMA 1. ESQUEMA DE SÍNTESE DOS DERIVADOS ISOXAZÓIS A PARTIR DE ALDEÍDOS E HIDROXILAMINA	37
ESQUEMA 2. MECANISMO DE SÍNTESE DAS OXIMAS A PARTIR DE ALDEÍDOS	40
ESQUEMA 3. MECANISMO DE FORMAÇÃO DO ÓXIDO DE NITRILA A PARTIR DE OXIMAS, PASSANDO PELO INTERMEDIÁRIO CLORETO DE IMIDOÍLA	41
ESQUEMA 4. CLIVAGEM DE 59 CATALISADA PELA β -GALACTOSIDADE	49

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1. ESPECTROS DE ^1H E ^{13}C NMR DO COMPOSTO 34 (CD_3OD , 300/75 MHz)	73
ANEXO 2. ESPECTROS DE ^1H E ^{13}C NMR DO COMPOSTO 40 (CDCl_3 , 400/100 MHz)	74
ANEXO 3. ESPECTROS DE ^1H E ^{13}C NMR DO COMPOSTO 41 (CD_3OD , 400/100 MHz)	75
ANEXO 4. ESPECTROS DE ^1H E ^{13}C NMR DO COMPOSTO 42 (CDCl_3 , 300/75 MHz)	76
ANEXO 5. ESPECTROS DE ^1H E ^{13}C NMR DO COMPOSTO 43 (CDCl_3 , 300/75 MHz)	77
ANEXO 6. ESPECTROS DE ^1H E ^{13}C NMR DO COMPOSTO 44 (CDCl_3 , 300/75 MHz)	78
ANEXO 7. ESPECTROS DE ^1H E ^{13}C NMR DO COMPOSTO 45 (CDCl_3 , 400/100 MHz)	79
ANEXO 8. ESPECTROS DE ^1H E ^{13}C NMR DO COMPOSTO 46 (CDCl_3 , 300/75 MHz)	80
ANEXO 9. ESPECTROS DE ^1H E ^{13}C NMR DO COMPOSTO 47 (CDCl_3 , 400/100 MHz)	81
ANEXO 10. ESPECTROS DE ^1H E ^{13}C NMR DO COMPOSTO 48 (CDCl_3 , 400/100 MHz)	82
ANEXO 11. ESPECTROS DE ^1H E ^{13}C NMR DO COMPOSTO 49 (CDCl_3 , 400/100 MHz)	83
ANEXO 12. ESPECTROS DE ^1H E ^{13}C NMR DO COMPOSTO 50 (CDCl_3 , 400/100 MHz)	84
ANEXO 13. ESPECTROS DE ^1H E ^{13}C NMR DO COMPOSTO 51 (CDCl_3 , 400/100 MHz)	85
ANEXO 14. ESPECTROS DE ^1H E ^{13}C NMR DO COMPOSTO 52 (CDCl_3 , 400/100 MHz)	86
ANEXO 15. ESPECTROS DE ^1H E ^{13}C NMR DO COMPOSTO 53 (CD_3OD , 400/100 MHz)	87
ANEXO 16. ESPECTROS DE ^1H E ^{13}C NMR DO COMPOSTO 54 (CD_3OD , 400/100 MHz)	88
ANEXO 17. ESPECTROS DE ^1H E ^{13}C NMR DO COMPOSTO 56 (CDCl_3 , 400/75 MHz)	89
ANEXO 18. ESPECTROS DE ^1H E ^{13}C NMR DO COMPOSTO 55 (CDCl_3 , 400/100 MHz)	90
ANEXO 19. ESPECTROS DE ^1H E HSQC NMR DO COMPOSTO 62 (CDCl_3 , 300/75 MHz)	91

ANEXO 20. ESPECTRO DE HMBC NMR DO COMPOSTO 62 (CDCl₃, 300/75 MHz)	92
ANEXO 21. ESPECTROS DE ¹H E ¹³C NMR DO COMPOSTO 63 (CDCl₃, 300/75 MHz)	93
ANEXO 22. ESPECTRO DE HMBC NMR DO COMPOSTO 63 (CDCl₃, 300/75 MHz)	94
ANEXO 23. ESPECTROS DE ¹H E ¹³C NMR DO COMPOSTO 64 (CDCl₃, 300/75 MHz)	95
ANEXO 24. ESPECTROS DE ¹H E ¹³C NMR DO COMPOSTO 65 (CDCl₃, 300/75 MHz)	96
ANEXO 25. ESPECTROS DE ¹H E ¹³C NMR DO COMPOSTO 66 (CDCl₃, 300/75 MHz)	97
ANEXO 26. ESPECTROS DE ¹H E ¹³C NMR DO COMPOSTO 67 (CDCl₃, 300/75 MHz)	98

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AB: Anfotericina B
AcOEt: Acetato de etila
Bnz: Benznidazol
CC₅₀: Concentração citotóxica a 50% das células
CCD: Cromatografia em camada delgada
CDCl₃: Clorofórmio deuterado
CD₃OD: Metanol deuterado
-CH₃: Grupamento metila
δ: Deslocamento químico em partes por milhão em relação ao trimetilsilano (TMS= 0 ppm)
d: Duplete
DABCO:1,4-diazabícclo[2.2.2]octano
DCM: Diclorometano
DMF: Dimetilformamida
DMSO: Dimetil sulfóxido
DTNB: Ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzóico)
EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-cético
ESI-TOF: Eletrospray-tempo de vôo
FM: Fórmula molecular
GR: Glutaciona redutase
Hex: Hexano
HEPES: Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina-etano-sulfônico
HRMS: Espectrometria de massas de alta resolução
Hz: Hertz
%IC: Porcentagem de inibição de crescimento
IC₅₀: Concentração inibitória para 50% da população estudada
IS: Índice de seletividade
IV: Infravermelho
J: Constante de acoplamento
logP: Coeficiente de partição octanol/água
m: Multiplete
m/z: Massa/carga
MeOH: Metanol
MW: Reator micro-ondas
NCS: N-clorosuccinimida
NADPH: Nicotinamida adenina di-nucleotídeo fosfato
-NH₂: Grupamento amina
-OAc: Grupamento acetila
-OCH₂O-: Grupamento metilendioxi

OMS: Organização Mundial da Saúde

PBS: Tampão fosfato-salino

P.F: Ponto de fusão

P.M: Peso molecular

R.F.: Índice de retenção

RPMI: meio de cultura celular Roswell Park Memorial Institute

^{13}C NMR/RMN: Ressonância magnética nuclear de carbono

^1H NMR/RMN: Ressonância magnética nuclear de hidrogênio

s: simpleto

SBF: Soro bovino fetal

SDS: dodecilsulfato de sódio

sl: simpleto largo

t: tripleto

t.a. temperatura ambiente

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. DOENÇA DE CHAGAS	2
1.2. LEISHMANIOSE	3
1.3. DESENVOLVIMENTO DE NOVAS TERAPIAS: O PAPEL DOS PRODUTOS NATURAIS	4
1.4. O BIOISOSTERISMO COMO ESTRATÉGIA DE MODIFICAÇÃO MOLECULAR	8
1.5. DO PLANEJAMENTO À SÍNTESE DE HETEROCICLOS	10
1.6. BIOISÓSTEROS DA GRANDISINA E VERAGUENSINA: UM POTENCIAL A SER EXPLORADO	12
2. OBJETIVOS	15
2.1. GERAL	15
2.2. ESPECÍFICOS	15
3. MATERIAIS E METODOLOGIAS	17
3.1. MATERIAL	17
3.2. METODOLOGIAS	17
3.2.1. SÍNTESE DE ALDOXIMAS	17
3.2.2. SÍNTESE DE ISOXAZÓIS 3,5-DISSUBSTITUÍDOS	20
3.2.3. AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO DE AMASTIGOTAS DE <i>L. amazonensis</i> E <i>T. cruzi</i> .	34
3.2.4. AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO DE TRIPOMASTIGOTAS DE <i>T. cruzi</i>	35
3.2.5. AVALIAÇÃO DE CITO TOXICIDADE	35
3.2.6. AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DA ENZIMA TRIPANOTIONA REDUTASE	36
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1. SÍNTESE DOS DERIVADOS ISOXAZÓIS	37
4.2. AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DOS DERIVADOS ISOXAZÓIS	48
4.3. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE TRIPANOCIDA	49
4.4. OBTENÇÃO DE NOVOS DERIVADOS ISOXAZÓIS COM BASE NOS RESULTADOS DE ATIVIDADE TRIPANOCIDA	53
4.5. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA	56

4.6.	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INIBITÓRIA DA TRIPANOTIONA REDUTASE	58
5.	<u>PERSPECTIVAS</u>	<u>59</u>
6.	<u>CONCLUSÕES</u>	<u>61</u>
7.	<u>REFERÊNCIAS</u>	<u>63</u>
8.	<u>ANEXOS</u>	<u>73</u>

INTRODUÇÃO

1. Introdução

As doenças tropicais negligenciadas representam um grave problema de saúde pública e como são endêmicas em 149 países afetam mais de 1 bilhão de pessoas ao redor do globo. A Organização Mundial da Saúde (OMS) lista 17 doenças como sendo negligenciadas (Tabela 1) e estas são prevalentes principalmente entre a população de baixa renda que vive em países em desenvolvimento na zona tropical e subtropical (WHO, 2015).

Tabela 1. Doenças tropicais negligenciadas (OMS) e seus agentes etiológicos

Doença	Agente etiológico
Dengue e chikungunya	<i>Dengue virus e Chikungunya virus</i>
Doença de Chagas	<i>Trypanosoma cruzi</i>
Doença do sono	<i>Trypanosoma brucei spp.</i>
Dracunculíase	<i>Dracunculus medinensis</i>
Equinococose	<i>Echinococcus sp.</i>
Esquistossomose	<i>Schistosoma sp.</i>
Filariose linfática	<i>Wuchereria bancrofti, Brugia malayi, Brugia timori.</i>
Hanseníase	<i>Mycobacterium leprae</i>
Helmintíases	<i>Ascaris lumbricoides, Trichuris trichiura, Necator americanus, Ancylostoma duodenale</i>
Infecções por trematodas	<i>Clonorchis spp., Opisthorchis spp., Fasciola spp., Paragonimus spp.</i>
Leishmaniose	<i>Leishmania sp.</i>
Oncocercose	<i>Onchocerca volvulus</i>
Raiva	<i>Rabies virus</i>
Teníase/cisticercose	<i>Taenia solium</i>
Tracoma	<i>Chlamydia trachomatis</i>
Treponematose endêmica	<i>Treponema pallidum spp.</i>
Úlcera de Buruli	<i>Mycobacterium ulcerans</i>

Em 2012, a Declaração de Londres, assinada por representantes de 13 indústrias farmacêuticas, organizações não-governamentais e OMS definiu metas e garantiu investimentos para auxiliar no controle

destas doenças. No entanto, até o momento, estas metas ainda não foram alcançadas (HOTEZ et al., 2014; WHO, 2012).

No Brasil, no período de 2000-2011, foram registradas 76.847 mortes causadas por doenças tropicais negligenciadas. Dados epidemiológicos mostram que estas mortes incidiram principalmente na população negra, adulta, do sexo masculino vivendo na região centro-oeste do país. Entre as doenças negligenciadas endêmicas no país, destacam-se a doença de Chagas (58.928 mortes), esquistossomose (6.319 mortes) e leishmanioses (3.466 mortes), que juntas são responsáveis por cerca de 89% das mortes (HOTEZ; FUJIWARA, 2014; MARTINS-MELO et al., 2016).

Os parasitas causadores da doença de Chagas e da leishmaniose pertencem à família Trypanosomatidae e compartilham características morfológicas e biológicas, fazendo com que a fisiopatologia destas doenças seja, até certo ponto, semelhante (DE MORAIS et al., 2015; STUART et al., 2008).

1.1. Doença de Chagas

A doença de Chagas, descrita pela primeira vez em 1909, é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*. O parasita utiliza insetos pertencentes à subfamília Triatominae (como o *Triatoma infestans*) como vetor para infectar os humanos, desenvolvendo o seu ciclo de vida doméstico (ARGOLO et al., 2008; MONCAYO; SILVEIRA, 2009; STANAWAY; ROTH, 2015).

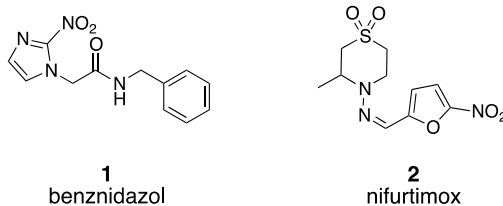
As formas evolutivas do parasita são: epimastigota, tripomastigota metacíclica, amastigota e tripomastigota sanguínea (ARGOLO et al., 2008). A forma epimastigota é encontrada unicamente no intestino médio do vetor, se diferenciando a tripomastigota metacíclica no intestino posterior e sendo eliminada junto com suas fezes, levando à infecção dos mamíferos. A forma tripomastigota metacíclica, ao infectar as células do hospedeiro, diferencia-se na forma amastigota, que pode se multiplicar rapidamente. As novas células amastigotas, por sua vez, diferenciam-se em tripomastigotas sanguíneas levando ao rompimento da célula hospedeira, permitindo-as infectar novas células e recomeçar o ciclo de vida. Quando o vetor alimenta-se do sangue de um mamífero infectado, a forma tripomastigota sanguínea é a responsável por sua infecção (CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2015a).

O desenvolvimento clínico da doença de Chagas pode ser dividido em fase aguda, indeterminada e fase crônica. A fase aguda

ocorre logo após a infecção e é caracterizada por parasitemia elevada e pela presença de sintomas inespecíficos como febre, mal-estar, aumento do baço e inflamação no local da picada. Já a fase indeterminada precede a fase crônica, no entanto, há ausência de anomalias em certos órgãos, que são características da fase crônica da doença. Esta pode manifestar-se anos depois da infecção e suas consequências são graves devido à multiplicação do parasita nos músculos cardíacos e em outros órgãos essenciais, como o fígado (LEPESHEVA, 2013).

Existem apenas dois fármacos disponíveis para o tratamento da doença de Chagas: o benznidazol e o nifurtimox (figura 1), sendo que apenas o primeiro é utilizado no Brasil. O tratamento tanto com o benznidazol como com o nifurtimox é longo (60-90 dias) e efeitos colaterais consideráveis são relatados, o que pode comprometer a adesão ao tratamento. Outra grande desvantagem é que estes fármacos são eficientes apenas no tratamento da fase aguda da doença, deixando os pacientes que se encontram na fase crônica carentes de uma terapia eficaz (BERMUDEZ et al., 2016; GRAEBIN et al., 2009; URBINA, 2010).

Figura 1. Fármacos utilizados no tratamento da doença de Chagas



1.2. Leishmaniose

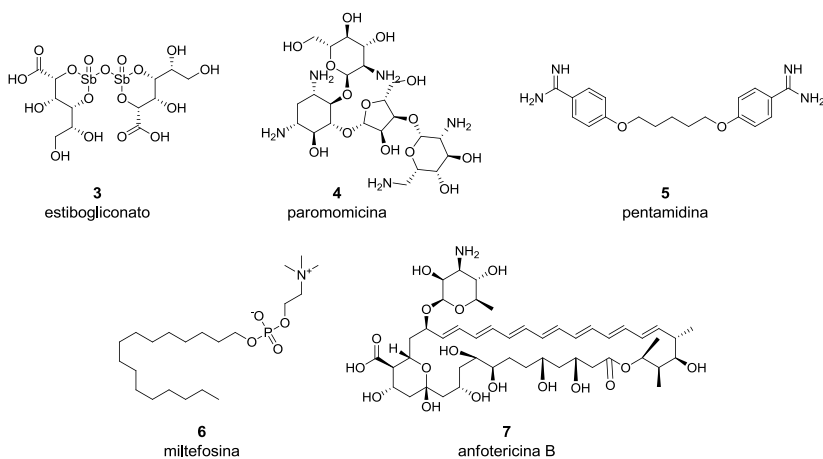
A leishmaniose é causada por diferentes espécies pertencentes ao gênero *Leishmania*. Os parasitas são transmitidos aos mamíferos pelas picadas de mosquitos pertencentes à subfamília Phlebotominae (como o *Lutzomyia sp.*) e podem causar três tipos de doença: leishmaniose visceral, leishmaniose mucosa e leishmaniose cutânea, dependendo de onde as úlceras características da doença encontram-se (AKHOUNDI et al., 2016; HANDLER et al., 2015).

De forma semelhante ao *T. cruzi*, as formas evolutivas do parasita são classificadas em promastigota e amastigota. A forma promastigota é

encontrada no mosquito vetor, enquanto a forma amastigota é a responsável pela doença em mamíferos (CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2015b).

Farmacologicamente, a leishmaniose pode ser tratada utilizando cinco diferentes fármacos: estibogliconato, paromomicina, pentamidina, miltefosina e anfotericina B. A escolha do tratamento depende do tipo da doença, parasita causador e do hospedeiro. A associação destes com outros fármacos também é comum, o que pode aumentar a ocorrência de efeitos colaterais associados ao tratamento (NO, 2016).

Figura 2. Fármacos para tratamento das leishmanioses



1.3. Desenvolvimento de novas terapias: o papel dos produtos naturais

Diversas estratégias vêm sendo utilizadas para o controle da doença de Chagas e leishmaniose, entre elas, o controle de vetores, a varredura em bancos de sangue para evitar a transmissão por transfusão sanguínea e o cuidado de pacientes já acometidos pelas doenças. Apesar de simples, a falta de infraestrutura e pessoal especializado acaba limitando o sucesso destas estratégias.

Outro fator que limita o controle destas doenças em países em desenvolvimento é o alto custo do tratamento medicamentoso. (NO, 2016). No entanto, dados da OMS mostram que atualmente o acesso ao tratamento nestes países vem aumentando e é financiada principalmente por fundações não governamentais (WHO, 2015).

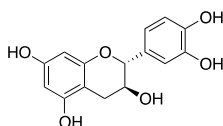
Nos últimos anos, alguns ensaios clínicos avaliando a eficácia de novos medicamentos para doença de Chagas e leishmaniose foram realizados e não obtiveram sucesso (CHATELAIN, 2015; DI PROCOLO; JOMMI, 2014; SATTERFIELD; DAWES; MILLIGAN, 2016). Pesquisas visando o reposicionamento de fármacos também ganharam força, no entanto, ainda poucos resultados concretos foram alcançados (ANDREWS; FISHER; SKINNER-ADAMS, 2014; KLUG; GELB; POLLASTRI, 2016). Dessa forma, o desenvolvimento de novos medicamentos mais eficazes do que os atualmente disponíveis é necessário, mas acaba sendo prejudicado pelo baixo investimento por parte de indústrias farmacêuticas (CHATELAIN; IOSET, 2011; KLUG; GELB; POLLASTRI, 2016).

De forma geral, o mercado farmacêutico movimentava muito dinheiro anualmente. Em 2015, apenas nos Estados Unidos, mais de US\$ 425 bi foram gastos em medicamentos e este número tem aumentado ao longo dos anos (MULLARD, 2016). O processo de desenvolvimento de um novo medicamento é longo, oneroso e, após a seleção da doença alvo de estudo, se inicia com a busca de uma molécula que apresente a atividade biológica de interesse (*hit*) (PATRICK, 2013).

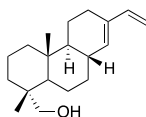
Entre as fontes de moléculas bioativas estão bancos de dados de instituições científicas, indústrias e banco de dados virtuais; no entanto a busca baseada em produtos naturais merece destaque (CRAGG; NEWMAN, 2013; GANESAN, 2008; HARVEY; EDRADA-EBEL; QUINN, 2015). Dos novos fármacos aprovados pelo FDA entre 1981 e 2014, cerca de 47% tem alguma característica química derivada de um produto obtido de fontes naturais e 4% são produtos naturais (NEWMAN; CRAGG, 2016).

O prêmio Nobel de medicina e fisiologia de 2015 foi destinado a dois grupos de pesquisadores que descobriram e desenvolveram a partir de produtos naturais novos medicamentos para doenças negligenciadas. A atribuição do prêmio Nobel a esses pesquisadores ressalta a relevância dos produtos naturais para esta área (MCKERROW, 2015). Centenas de produtos naturais já foram testados quanto as suas propriedades tripanocida ou leishmanicida e alguns apresentaram resultados promissores em diferentes fases evolutivas dos parasitas. Os alcaloides constituem o maior grupo de metabólitos secundários avaliados, mas a atividade biológica de flavonoides, terpenos, lignanas e outros também já foi relatada (figura 3) (IZUMI et al., 2011; SINGH et al., 2014).

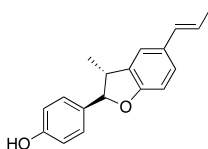
Figura 3. Exemplos de produtos naturais com atividade antiparasitária.



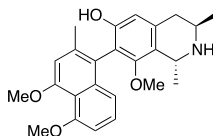
8
catequina (flavonoide)
IC₅₀: 0,000067 μM (TC_{Epi})



9
6b-OH-cassan-13,15-diene (terpeno)
IC₅₀: 25,9 μM (TC_{Ama})



10
conocarpan (lignana)
IC₅₀: 30,0 μM (TC_{Epi})

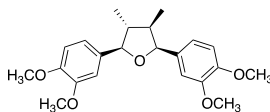


11
korupensamina A (alcaloide)
IC₅₀: 35,6 μM (TC_{Ama})

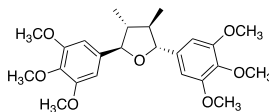
TC_{Ama}: amastigotas de *T. cruzi*; TC_{Epi}: epimastigotas de *T. cruzi*

Entre as lignanas, destacam-se as lignanas tetrahydrofurânicas veraguensina e grandisina (figura 4), isoladas de *Virola surinamensis* and *Piper solmsianum*. Para elas, a atividade inibitória do crescimento de tripomastigotas de *T. cruzi* foi descrita por diferentes grupos de pesquisa, porém, até o momento apenas a veraguensina foi avaliada em *Leishmania sp.*, apresentando atividade contra a forma promastigota (LOPES et al., 1998; MARTINS et al., 2003; SILVA FILHO et al., 2008).

Figura 4. Lignanas com atividade antiparasitária em tripomastigotas de *T. cruzi* e promastigotas de *L. donovani*



12
veraguensina
IC₅₀: 2,3 μM (TC_{Tripo})
IC₅₀: 48,3 μM (LD_{Pro})

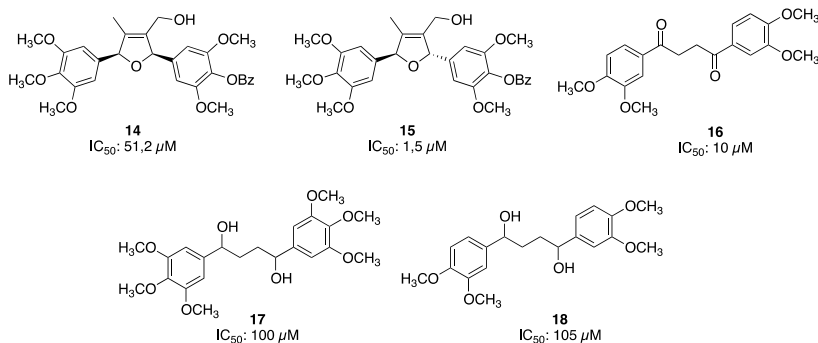


13
grandisina
IC₅₀: 3,7 μM (TC_{Tripo})

Apesar de muitos metabólitos secundários de origem natural terem apresentado bons resultados em ensaios de atividade antiparasitária, também existem desvantagens associadas a eles. O processo de extração, purificação e identificação pode ser longo, e não é incomum que apenas pequenas quantidades de cada produto sejam isoladas (KINGSTON, 2011). Em alguns casos a síntese orgânica pode ser uma alternativa para contornar esses problemas, mas, muitas vezes, a síntese total é inviável.

Estratégias de modificação molecular, como a semissíntese e a simplificação estrutural, vem sendo aplicadas com sucesso em produtos naturais com o objetivo de obter novos derivados (SZYCHOWSKI; TRUCHON; BENNANI, 2014). As lignanas **12** e **13**, citadas anteriormente, já foram alvo de estudos de derivatização, dando origem a análogos com diferentes estruturas químicas (figura 5) (BERNARDES et al., 2006; NIHEI, 2004).

Figura 5. Alguns dos análogos das lignanas grandisina e veraguensina descritos na literatura e suas IC_{50} em tripomastigota de *T. cruzi*



As propriedades físicas e biológicas de um composto químico estão diretamente ligadas à estrutura. Assim, estes novos derivados podem ser planejados de forma a ter propriedades físico-químicas otimizadas, um melhor perfil de ação, ou então redução de toxicidade (SCHAEFFER, 2008). Quando um número elevado de derivados é sintetizado, também pode-se conduzir um estudo de relação estrutura-atividade, relacionando diretamente as características químicas do

composto com a potência apresentada em ensaios de atividade biológica. (WERMUTH, 2008).

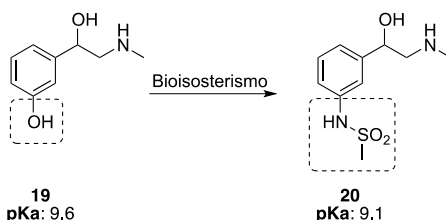
1.4. O bioisosterismo como estratégia de modificação molecular

Bioisósteros são grupamentos ou moléculas que possuem características físicas e químicas semelhantes e, assim, levam a efeitos biológicos similares. Geralmente, o bioisosterismo é empregado quando se busca aprimorar propriedades moleculares que podem resultar em melhores perfis farmacocinéticos, aumento de potência, eficácia e seletividade de ação (MEANWELL, 2011; ROFFEY, 1997).

Os bioisósteros podem ser classificados em clássicos, quando os átomos ou grupos funcionais em questão possuem o mesmo número de elétrons de valência, e não clássicos. A classificação de bioisosterismo não clássico é mais abrangente e focada na similaridade biológica. Dessa forma, dois grupos funcionais podem ser considerados bioisósteros entre si sem necessariamente possuírem todos os aspectos eletrônicos, estéricos e topológicos semelhantes (CIAPETTI; GIETHLEN, 2008).

Na figura 6, a substituição do grupamento fenólico por uma metilsulfonamida é um exemplo de bioisosterismo não clássico. Em ambos os compostos, um átomo doador de ligação de hidrogênio e um aceptor de ligação de hidrogênio estão presentes, mas, o pKa dos grupos funcionais é diferente. Esta diferença no pKa promove mudanças no grau de ionização da molécula em diferentes pHs, favorecendo a solubilidade em meio aquoso neste caso (CIAPETTI; GIETHLEN, 2008).

Figura 6. Exemplo de substituição bioisotérica



Quando aplicado aos produtos naturais, o bioisosterismo pode ser considerado uma estratégia “não conservadora” de explorar o potencial

biológico do composto, uma vez que a estrutura química dos derivados pode diferir substancialmente da estrutura química original.

Uma análise da frequência e tipo dos anéis presentes na estrutura química de fármacos mostrou que mais de 70% deles são heterocíclicos (TAYLOR; MACCOSS; LAWSON, 2014). Anéis heterocíclicos são aqueles que possuem pelo menos um átomo diferente de carbono em sua estrutura e são consideradas estruturas privilegiadas na química medicinal (figura 7), visto que estão presentes em diversas moléculas com notável atividade biológica (BROUGHTON; WATSON, 2004; WELSCH; SNYDER; STOCKWELL, 2010).

A pesquisa entre derivados heterocíclicos ocupa lugar de destaque, na busca de agentes antitripanossomatídeos. Compostos sintéticos contendo anéis furânicos, benzofurânicos, triazólicos, tiazolidínicos, entre outros, já foram descritos com atividade que pode chegar na casa dos nanomolar. Entre os compostos oriundos de fontes naturais, a diversidade estrutural é ainda maior. (KRYSHCHYSHYN et al., 2014)

Figura 7. Alguns dos anéis heterocíclicos relevantes para a química medicinal



Derivados sintéticos planejados com base no bioisosterismo de anéis também já foram descritos na literatura (DE ANDRADE et al., 2015; OLIVEIRA FILHO et al., 2015). De Andrade et al. (2015) sintetizou uma série de bioisosteros do benzimidazol, substituindo o anel imidazólico presente na estrutura original por anéis 1,2,3-triazólicos 1,4 ou 1,5-dissubstituídos, e obteve compostos com IC₅₀ semelhantes ou menores que o da molécula original. Já Oliveira Filho (2015), demonstrou como substituições bioisostéricas puderam auxiliar na redução da toxicidade e aumento da atividade de compostos contra *T. cruzi*.

1.5. Do planejamento à síntese de heterociclos

O planejamento sintético é uma importante etapa que precede a síntese orgânica em si. Aspectos relevantes como regioseletividade, estereoseletividade e ortogonalidade precisam ser considerados de modo a prevenir problemas na rota sintética que podem custar tempo e dinheiro.

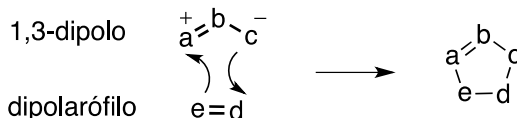
Nos últimos anos, com o advento da química verde, aspectos não relacionados diretamente com o mecanismo reacional também ganharam destaque durante o planejamento sintético. O uso de solventes de fácil descarte, catalisadores e o uso de reagentes não tóxicos estão listados entre os 12 princípios da química verde e são vistos como essenciais para a sustentabilidade (ANASTAS; WARNER, 1998; DUNN, 2012; SHELDON, 2012).

A eficiência energética é outro ponto relevante, visto que reações rápidas, sem uso de refluxo e realizadas à pressão atmosférica são preferíveis. Neste contexto, o uso de radiação micro-ondas durante a obtenção de compostos químicos é vantajoso, uma vez que este tipo de radiação é conhecida por acelerar o andamento das reações, impactando diretamente na velocidade do desenvolvimento de novas moléculas bioativas (COLLINS; LEADBEATER, 2007; COLOMBO; PERETTO, 2008; KAPPE C O; DALLINGER D, 2006).

O aumento da velocidade das reações ocasionado pela radiação micro-ondas é atribuído a dois efeitos: polarização dipolar e condutividade. O aquecimento devido à polarização dipolar ocorre quando os dipolos se alinham com o campo elétrico das ondas, que muda frequentemente. Essa mudança faz com que as moléculas percam energia na forma de calor devido às colisões intermoleculares. Já o fenômeno de condutividade, aplica-se às reações contendo íons, que se movem em velocidade maior sob influência do campo elétrico externo aumentando, assim, a velocidade de colisão e consequentemente convertendo energia cinética em calor (HAYES, 2002; LIDSTRÖM et al., 2001).

Do ponto de vista mecanístico, existem diferentes formas de sintetizar compostos heterocíclicos. A reação de cicloadição 1,3-dipolar é uma reação pericíclica, concertada, para a síntese de heterociclos de 5 membros (figura 8). Esta reação ocorre entre 1,3-dipolos e dipolarófilos, que dependendo da sua natureza química levam à formação de um anel em específico. O 1,3-dipolo é uma molécula que possui propriedades tanto eletrofílicas como nucleofílicas nas posições 1 e 3, já o dipolarófilo geralmente é um alceno ou alcino (HUISGEN, 1961, 1963).

Figura 8. Representação de uma cicloadição 1,3-dipolar

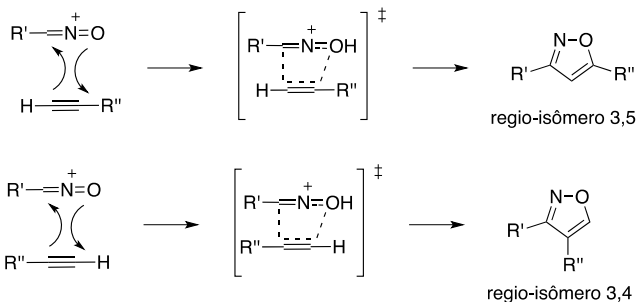


As reações de cicloadição 1,3-dipolar também são conhecidas como cicloadição (2+3) ou cicloadição [$\pi 4_s + \pi 2_s$]. O primeiro nome se refere ao fato de que 2 (dipolarófilo) + 3 (dipolo) átomos estão envolvidos na formação do anel, enquanto o segundo representa o número de elétrons π envolvidos no mecanismo além do fato da adição ser estereoeservativa (suprafacial, s) (SMITH, 2013).

Entre os heterociclos que podem ser sintetizados via cicloadição 1,3-dipolar está o anel isoxazol. O isoxazol é um anel aromático que contém um átomo de oxigênio e um átomo de nitrogênio como heteroátomos. Na literatura, estão descritos compostos isoxazólicos com as mais diversas atividades biológicas, como anti-inflamatória, antiparasitária e antimicrobiana (JAEGER; COLINAS, 2002; PATRICK et al., 2007; RAJANARENDAR et al., 2015; YERMOLINA et al., 2011).

Os isoxazóis são sintetizados utilizando óxidos de nitrila como 1,3-dipolos e alcinos como dipolarófilos. Dependendo da estrutura química, os óxidos de nitrila dimerizam rapidamente dando origem a furoxanos (1,2,5-oxadiazole 2-óxido) e, por esse motivo, são gerados *in situ* a partir de compostos funcionalizados com o grupo nitro ou cloretos de imidoíla (GIACOMELLI; DE LUCA; PORCHEDDU, 2003; GROUNDWATER, 2000; GRUNDMANN; DEAN, 1965). Quando alcinos terminais são utilizados na síntese, o ataque ao carbono eletrofílico do óxido de nitrila pode se dar por ambas as faces, levando à formação do regio-isômero 3,4-dissubstituído e 3,5-dissubstituído (figura 9) (HANSEN; WU; FOKIN, 2005). No entanto, devido a diferenças eletrônicas entre a posição 4 e 5 do anel, os isômeros podem ser facilmente identificados através de ^1H RMN, permitindo a obtenção do composto com o padrão de substituição desejado.

Figura 9. Esquema de síntese do anel isoxazol com formação dos dois regio-isômeros



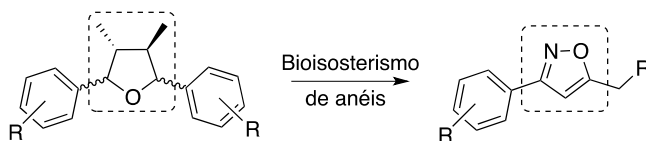
Em 2002, Rostovtsev e Sharpless demonstraram que a reação de cicloadição entre alcinos e azidas orgânicas poderia levar seletivamente à obtenção de regio-isômeros 1,4-dissubstituídos. Essa seletividade pode ser obtida graças a catalise por cobre (I), em que o catalisador é obtido *in situ* através de sais de cobre (II) e um agente redutor. Na época, era proposto que o mecanismo de catálise envolvia a formação de um intermediário acetileno de cobre, em que o hidrogênio terminal do alcino seria substituído por um ligante de cobre; favorecendo a interação seletiva desta posição com a posição 1 do dipolarófilo (ROSTOVTSEV et al., 2002). Em 2005, o grupo comprovou que o mesmo tipo de catálise poderia ser aplicado à síntese de isoxazóis, levando à obtenção exclusiva do isômero 3,5-dissubstituído. A realização de cálculos de teoria do funcional da densidade permitiu provar o mecanismo de reação proposto inicialmente, fazendo com que a cicloadição 1,3-dipolar catalisada por cobre ganhasse destaque no mundo científico (HIMO et al., 2005).

1.6. Bioisósteros da grandisina e veraguensina: um potencial a ser explorado

Considerando o exposto, a obtenção de compostos derivados das lignanas naturais grandisina e veraguensina é relevante para o estudo do impacto que estas modificações possam causar nas propriedades tripanocida e leishmanicida. O bioisosterismo é uma estratégia de modificação molecular amplamente utilizada para a obtenção de compostos químicos com estruturas e propriedades químicas diversas. No entanto, como a etapa de desenvolvimento de moléculas bioativas podem envolver a síntese de dezenas de derivados, é interessante que estes sejam obtidos por uma metodologia eficiente, a partir de materiais de partida simples e com rendimentos satisfatórios.

Assim, se propõe a síntese de derivados em que o anel tetrahidrofurano central das lignanas naturais seja substituído pelo anel isoxazol, de forma a propor uma substituição bioisostérica (figura 10). Uma das principais vantagens do anel isoxazol em detrimento do anel tetrahidrofurano é a maior hidrossolubilidade. Adicionalmente, a eliminação de quatro centros estereogênicos presentes nos compostos naturais facilita a obtenção dos derivados de interesse de forma simples, em rendimentos satisfatórios.

Figura 10. Proposta de derivados



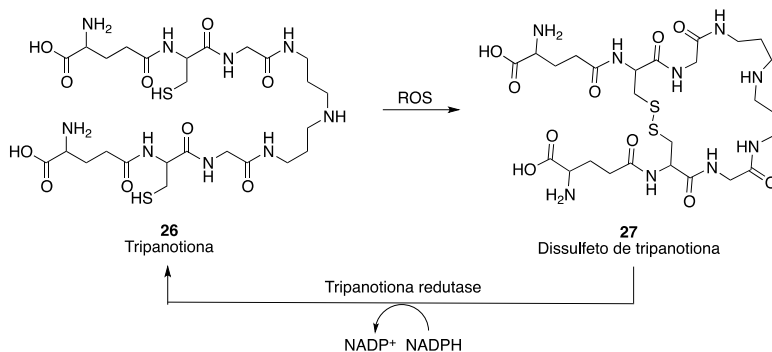
A aplicação de outras estratégias de modificação molecular, como substituição dos grupos substituintes anelares e simplificação molecular, pela remoção de um dos anéis aromáticos presente nos compostos naturais também é válida. Assim, após a avaliação da inibição de crescimento de *T. cruzi* e *Leishmania sp.* causada pelos compostos, um estudo de relação estrutura-atividade poderá sugerir quais modificações químicas foram importantes para a manutenção da atividade biológica.

Por outro lado, um estudo recente mostrou que cerca de 70% dos fármacos aprovados pelo FDA na última década possuem um alvo molecular específico para sua ação (EDER; SEDRANI; WIESMANN, 2014). Diferentes alvos são validados para o desenvolvimento de fármacos antitripanossomatídeos, entre eles, destaca-se a enzima tripanotona redutase (KHAN, 2007).

A tripanotona é uma molécula que exerce papel análogo em tripanossomatídeos ao da glutatona em humanos. O metabolismo aeróbico leva à geração de espécies reativas de oxigênio que podem impactar na saúde celular quando há uma disfunção das defesas antioxidantes. A tripanotona é responsável pela detoxificação destas espécies reativas de oxigênio sendo, então, oxidada ao dissulfeto de tripanotona. O dissulfeto de tripanotona, por sua vez, é reduzido novamente à tripanotona por ação da tripanotona redutase evitando a depleção celular deste metabólito (Figura 11) (KRAUTH-SIEGEL;

COMINI, 2008; MANTA et al., 2013; OLIN-SANDOVAL; MORENO-SÁNCHEZ; SAAVEDRA, 2010).

Figura 11. Oxidação da tripanotona com posterior redução pela tripanotona redutase



Tendo em vista que a tripanotona e a glutatona possuem diferenças estruturais, é possível planejar o desenvolvimento de inibidores que ajam seletivamente na enzima parasitária sem causar danos oxidativo às células do hospedeiro (BOND et al., 1999; LEROUX; KRAUTH-SIEGEL, 2015).

Desta forma, os derivados isoxazóis 3,5-dissubstituídos obtidos que tenham apresentado uma promissora atividade inibindo o crescimento parasitário, serão avaliados quanto à atividade inibitória da enzima tripanotona redutase em um estudo preliminar de mecanismo de ação. Com o resultado de ambos os estudos biológicos combinados, poderemos buscar informações relevantes que auxiliarão no planejamento de novos compostos que atinjam maior eficiência e seletividade de ação.

OBJETIVOS

2. Objetivos

2.1. Geral

Síntese de compostos análogos estruturalmente às lignanas grandisina e veraguensina, com potencial atividade antitripanossomatídeos.

2.2. Específicos

- Obter derivados isoxazóis 3,5-dissubstituídos contendo diferentes padrões de substituição aromática e alifática, visto que o anel isoxazol é um bioisómero do anel tetrahydrofurano das lignanas naturais;
- Avaliar as atividades tripanocida e leishmanicida dos compostos sintetizados;
- Avaliar a atividade inibitória frente à enzima tripanotiona redutase dos compostos com atividade antiparasitária promissora;
- Realizar um estudo de relação estrutura-atividade o qual poderá auxiliar no planejamento e síntese de novos compostos com atividade melhorada.

Obs: As atividades biológicas serão realizadas através da parceria com o Laboratório de Protozoologia (MIP/UFSC) e o Instituto Adolfo Lutz.

MATERIAIS E MÉTODOS

3. Materiais e Metodologias

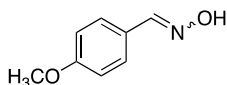
3.1. Material

- Os pontos de fusão foram aferidos em um equipamento MICROQUÍMICA MQAFP-301, com visor digital;
- Os espectros de ^1H RMN, ^{13}C RMN e bidimensionais foram adquiridos em espectrômetros Nuclear Bruker Advance DPX 400 MHz e Varian Oxford AS-400 na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP/USP); e em um espectrômetro Bruker Fourier 300 MHz no Departamento de Ciências Farmacêuticas da UFSC.
- Os espectros de massas foram obtidos em um espectrômetro ESI-TOF Bruker micrOTOF Q II na FCFRP/USP e em um espectrômetro Waters Xevo G2-S QTOF no CIF/UFSC.
- As reações realizadas sob irradiação micro-ondas foram conduzidas em um reator Discovery - CEM Explorer com sistemas de controle de pressão, resfriamento e adição de gases.
- As análises cromatográficas em camada delgada foram realizadas em folhas de sílica G60 gel SILICYCLE® com indicador de fluorescência F-254 e as purificações por cromatografia em coluna foram feitas utilizando sílica gel com tamanhos de partícula 40-63 e 63-200 μm (Sigma Aldrich).

3.2. Metodologias

3.2.1. Síntese de aldoximas (HAJIPOUR; RAFIEE; RUOHO, 2010)

(E),(Z)-4-metoxibenzaldeído oxima (35)

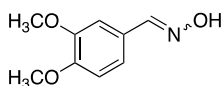


Uma mistura contendo 4-metoxibenzaldeído (500 mg, 4.71 mmol), cloridrato de hidroxilamina (650 mg, 9.42 mmol) e DABCO (528 mg, 4.71 mmol) foi adicionada a um tubo de micro-ondas e irradiada por 1 minuto (70 °C, 300 W). Ao final do tempo reacional, 10 mL de HCl 0,1 M foram adicionados e a reação foi extraída com CH_2Cl_2 , seca sobre Na_2SO_4 anidro e rotaevaporada. O produto foi obtido

como uma mistura dos isômeros (*E*) e (*Z*), na forma de um sólido branco, com rendimento combinado de 95%.

F.M.: C₈H₉NO₂. **P.M.:** 151,16 g mol⁻¹. **P.F.:** 62,2-63,5 °C. **¹H NMR (300 MHz, CDCl₃):** δ = 9,10 (sl, 1H); 8,12 (s, 1H); 7,52 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H); 6,90 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H); 3,82 (s, 3H). **¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃):** δ = 161,1; 150,0; 128,6; 124,6; 114,3; 55,4.

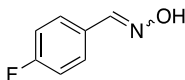
(*E*),(*Z*)-3,4-dimetoxibenzaldeído oxima (36)



O método de preparo foi o mesmo utilizado para a síntese do composto **35**. O produto foi obtido como uma mistura dos isômeros (*E*) e (*Z*), na forma de um sólido branco, com rendimento combinado de 87%.

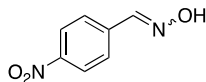
F.M.: C₉H₁₁NO₃. **P.M.:** 181,19 g mol⁻¹. **P.F.:** 90,1-91,0 °C. **¹H NMR (300 MHz, CDCl₃):** δ = 8,62 (sl, 1H); 8,07 (s, 1H); 7,32 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H); 7,19 (dd, *J* = 2.0 Hz, *J* = 8.3 Hz, 1H); 6,84 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H); 3,92 (s, 3H); 3,91 (s, 3H). **¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃):** δ = 150,8; 150,2; 149,2; 124,8; 121,7; 110,8; 108,0; 55,9 (x2).

(*E*),(*Z*)-4-fluorbenzalaldeído oxima (37)



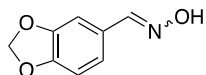
O método de preparo foi o mesmo utilizado para a síntese do composto **35**. O produto foi obtido como uma mistura dos isômeros (*E*) e (*Z*), na forma de um sólido branco, com rendimento combinado de 91%.

F.M.: C₇H₆FNO. **P.M.:** 139,13 g mol⁻¹. **P.F.:** 86,0-87,3 °C. **¹H NMR (300 MHz, CDCl₃):** δ = 8,58 (sl, 1H); 8,14 (s, 1H); 7,57 (dd, *J* = 5,35 Hz; *J* = 8,85 Hz; 2H); 7,08 (t, *J* = 8,85 Hz; 2H). **¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃):** δ = 165,4; 149,3; 128,9; 128,8; 128,0; 116,1; 115,8.

(E),(Z)-4-nitrobenzaldeído oxima (38)

O método de preparo foi o mesmo utilizado para a síntese do composto **35**. O produto foi obtido como uma mistura dos isômeros (*E*) e (*Z*), na forma de um sólido branco, com rendimento combinado de 90%.

F.M.: C₇H₆N₂O₃. **P.M.:** 166,13 g mol⁻¹. **P.F.:** 127,6-128,8 °C. **¹H NMR (300 MHz, CDCl₃):** δ = 8,25 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H); 8,21 (s, 1H); 8,05 (s, 1H); 7,75 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H). **¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃):** δ = 148,5; 148,4; 138,2; 127,7; 124,1.

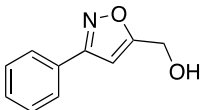
(E),(Z)-1,3-benzodioxole-5-aldoxime (39)

O método de preparo foi o mesmo utilizado para a síntese do composto **35**. O produto foi obtido como uma mistura dos isômeros (*E*) e (*Z*), na forma de um sólido branco, com rendimento combinado de 96%.

F.M.: C₈H₇NO₃. **P.M.:** 165,15 g mol⁻¹. **P.F.:** 109,4-111,6 °C. **¹H NMR (300 MHz, CDCl₃):** δ = 8,53 (s, 1H); 8,06 (s, 1H); 7,17 (d, *J* = 1,6 Hz, 1H); 6,96 (dd, *J* = 8,0 Hz, *J* = 1,6 Hz, 1H); 6,81 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H); 5,99 (s, 2H). **¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃):** δ = 150,1; 149,5; 148,4; 126,4; 123,1; 108,5; 105,8; 101,6.

3.2.2 Síntese de isoxazóis 3,5-dissubstituídos

3-fenil-5-hidroximetil-isoxazol (34)



Metodologia 1 (micro-ondas)

A uma solução de benzaldeído oxima (50 mg, 0.41 mmol) em DMF (0.3 mL) em um tubo de micro-ondas, adicionou-se N-cloro succinimida (57 mg, 0.43 mmol) lentamente para evitar superaquecimento. O tubo foi selado e submetido à irradiação micro-ondas (30 °C, 150 W) por 1 minuto, quando a análise cromatográfica mostrou o consumo completo do material de partida. Em seguida, álcool propargílico (25 µL, 0.43 mmol), sulfato de cobre (II) (3 mg, 2 mol%), ascorbato de sódio (12 mg, 10 mol%), bicarbonato de sódio (138 mg, 1.64 mmol) e 0.3 mL de água foram adicionados ao tubo e este foi novamente irradiado por 10 minutos (30 °C, 150 W). Ao final, a reação foi diluída com 15 mL de solução saturada de NaCl, extraída com AcOEt (3 × 10 mL), seca sobre Na₂SO₄ anidro e em evaporador rotatório. O extrato reacional bruto foi purificado por cromatografia em coluna utilizando sílica flash como fase estacionária e hexano:acetato de etila (6:4) como fase móvel, levando ao isolamento de (3-fenilisoxazol-5-il)metanol como um sólido branco com rendimento de 77%.

F.M.: C₁₀H₉NO₂. **P.F.:** 48,8-49,5 °C. **¹H NMR (300 MHz, Metanol-d₄):** δ = 7,78-7,85 (m, 2H, Ar); 7,43-7,50 (m, 3H, Ar); 6,76 (s, 1H, isoxazole); 4,71 (s, 2H, CH₂). **¹³C NMR (75 MHz, Metanol-d₄):** δ = 171,7; 162,5; 130,1; 128,9; 128,8; 126,8; 100,0; 56,7. **HRMS (ESI-TOF) m/z:** [M + H]⁺ Calcd for C₁₀H₁₀NO₂ 176,0712; Encontrada 176,0699.

Metodologia 2 (HIMO et al., 2005)

Inicialmente, N-cloro succinimida (57 mg, 0.43 mmol) foi adicionada lentamente à uma solução de benzaldeído oxima (50 mg, 0.41 mmol) em DMF (1 mL) e a reação agitada até que o material de partida não fosse mais visualizado por análise cromatográfica. Então, a reação foi diluída com solução saturada de NaCl (15 mL), extraída com

éter etílico (3 × 15 mL), seca sobre Na₂SO₄ anidro, seca sob pressão reduzida e utilizada diretamente na próxima etapa da reação.

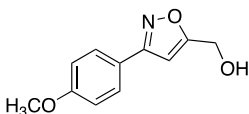
A seguir, álcool propargílico (25 µL, 0.43 mmol), sulfato de cobre (II) (3 mg, 2 mol%), ascorbato de sódio (12 mg, 10 mol%), bicarbonato de sódio (138 mg, 1.64 mmol) e 4 mL de H₂O:*t*-BuOH foram adicionados ao produto obtido na primeira etapa e a reação agitada por 4 horas em temperatura ambiente. Ao final, a reação foi diluída com 15 mL de solução saturada de NaCl, extraída com AcOEt (3 × 10 mL), seca sobre Na₂SO₄ anidro, e seca em evaporador rotatório. O extrato reacional bruto foi purificado por cromatografia em coluna utilizando sílica flash como fase estacionária e hexano:acetato de etila (6:4) como fase móvel, levando ao isolamento de (3-fenilisoxazol-5-il)metanol como um sólido branco com rendimento de 72%.

F.M.: C₁₀H₉NO₂. **P.F.:** 48,8-49,5 °C. **¹H NMR (300 MHz, Metanol-d₄):** δ = 7,78-7,85 (m, 2H, Ar); 7,43-7,50 (m, 3H, Ar); 6,76 (s, 1H, isoxazole); 4,71 (s, 2H, CH₂). **¹³C NMR (75 MHz, Metanol-d₄):** δ = 171,7; 162,5; 130,1; 128,9; 128,8; 126,8; 100,0; 56,7. **HRMS (ESI-TOF) m/z:** [M + H]⁺ Calcd for C₁₀H₁₀NO₂ 176,0712; Encontrada 176,0699.

Metodologia 3 (HANSEN; WU; FOKIN, 2005)

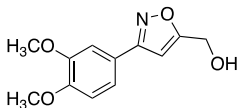
Benzaldeído, cloridrato de hidroxilamina, cloramina T, álcool propargílico, sulfato de cobre (II) e fios de cobre foram adicionado a um balão reacional contendo 4 mL de H₂O:*t*-BuOH. Após 4 horas de reação em temperatura ambiente, a reação foi diluída com 15 mL de solução saturada de NaCl, extraída com AcOEt (3 × 10 mL), seca sobre Na₂SO₄ anidro, e revaporada sob pressão reduzida. O extrato reacional bruto foi purificado por cromatografia em coluna utilizando sílica flash como fase estacionária e hexano:acetato de etila (6:4) como fase móvel, levando ao isolamento de (3-fenilisoxazol-5-il)metanol como um sólido branco com rendimento de 37%.

F.M.: C₁₀H₉NO₂. **P.F.:** 48,8-49,5 °C. **¹H NMR (300 MHz, Metanol-d₄):** δ = 7,78-7,85 (m, 2H, Ar); 7,43-7,50 (m, 3H, Ar); 6,76 (s, 1H, isoxazole); 4,71 (s, 2H, CH₂). **¹³C NMR (75 MHz, Metanol-d₄):** δ = 171,7; 162,5; 130,1; 128,9; 128,8; 126,8; 100,0; 56,7. **HRMS (ESI-TOF) m/z:** [M + H]⁺ Calcd for C₁₀H₁₀NO₂ 176,0712; Encontrada 176,0699.

5-hidroximetil-3-(4-metoxifenil)-isoxazol (40)

O composto foi sintetizado conforme a metodologia 1, com rendimento de ; e também conforme a metodologia 2, com rendimento de.

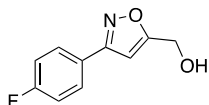
F.M.: C₁₁H₁₁NO₃. **P.M.:** 205,21 g mol⁻¹. **P.F.:** 90,1-92,0 °C. **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃):** δ = 7,74 (d, *J* = 9.1 Hz, 2H, Ar); 6,98 (d, *J* = 9.1 Hz, 2H, Ar); 6,52 (s, 1H, isoxazole); 4,82 (s, 2H, CH₂); 3,86 (s, 3H, OCH₃). **¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃):** δ = 171,4; 162,1; 161,0; 128,2; 121,3; 114,3; 99,8; 56,7; 55,4. **HRMS (ESI-TOF) m/z:** [M + H]⁺ Calcd for C₁₁H₁₂NO₃ 206,0817; Encontrada 206,0815.

5-hidroximetil-3-(3,4-dimetoxifenil)-isoxazol (41)

O composto foi sintetizado conforme a metodologia 1, com rendimento de 55% (0,018 g, 0,076 mmol); e também conforme a metodologia 2, com rendimento de 50% (0,016 g, 0,086 mmol).

F.M.: C₁₂H₁₃NO₄. **P.M.:** 235,24 g mol⁻¹. **¹H NMR (400 MHz, Metanol-d₄):** δ = 7,42 (d, *J* = 2,0 Hz, 1H, Ar); 7,39 (dd, *J* = 2,0 Hz, *J* = 8,3 Hz, 1H, Ar); 7,04 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H, Ar); 6,73 (t, *J* = 0,8 Hz, 1H, isoxazole); 4,70 (d, *J* = 0,8 Hz, 2H, CH₂); 3,89 (s, 3H, OCH₃); 3,88 (s, 3H, OCH₃). **¹³C NMR (100 MHz, Metanol-d₄):** δ = 174,4, 163,6, 152,3, 150,9, 122,9, 121,3, 112,9, 110,9, 100,8, 56,5 (x2), 56,4. **HRMS (ESI-TOF) m/z:** [M + H]⁺ Calcd for C₁₂H₁₄NO₄ 236,0923; Encontrada 236,0922.

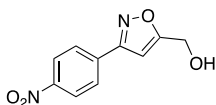
3-(4-fluorfenil)-5-hidroximetil-isoxazol (42)



O composto foi sintetizado conforme a metodologia 1, com rendimento de 38% (0,013 g, 0,068 mmol); e também conforme a metodologia 2, com rendimento de 47% (0,016 g, 0,084 mmol).

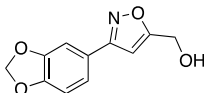
F.M.: C₁₀H₈FNO₂. **P.M.:** 193,17 g mol⁻¹. **P.F.:** 78,8-81,8 °C. **¹H NMR (300 MHz, CDCl₃):** δ = 7,79 (dd, *J* = 5,3 Hz, *J* = 8,6 Hz, 2H, Ar); 7,15 (t, *J* = 8,6 Hz, 2H, Ar); 6,54 (s, 1H, isoxazole); 4,83 (s, 2H, CH₂). **¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃):** δ = 171,9; 163,8 (d, ¹*J*_{CF} = 249 Hz); 161,6; 128,7 (d, ³*J*_{CF} = 8 Hz); 125,0; 116,1 (d, ²*J*_{CF} = 22 Hz); 99,9; 56,6. **HRMS (ESI-TOF) m/z:** [M + H]⁺ Calcd for C₁₀H₉FNO₂ 194.0617; Encontrada 194.0600.

5-hidroximetil-3-(4-nitrofenil)-isoxazol (43)



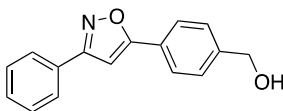
O composto foi sintetizado conforme a metodologia 1, com rendimento de 32% (0,011 g, 0,048 mmol); e também conforme a metodologia 2, com rendimento de 36% (0,012 g, 0,054 mmol).

F.M.: C₁₀H₈N₂O₄. **P.M.:** 220,18 g mol⁻¹. **P.F.:** 156,0-157,5 °C. **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃):** δ = 8,00 (d, *J* = 9,0 Hz, 2H, Ar); 8,33 (d, *J* = 9,0 Hz, 2H, Ar); 6,67 (s, 1H, isoxazole); 4,88 (s, 2H, CH₂). **¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃):** δ = 172,9; 160,7; 148,7; 134,9; 127,7; 124,3; 100,1; 56,6. **HRMS (ESI-TOF) m/z:** [M + H]⁺ Calcd for C₁₀H₉N₂O₄ 221,0562; Encontrada 221,0555.

3-(3,4-benzodioxol)-5-hidroxitetil-isoxazol (44)

O composto foi sintetizado conforme a metodologia 1, com rendimento de 56% (0,019 g, 0,085 mmol); e também conforme a metodologia 2, com rendimento de 63% (0,020 g, 0,086 mmol).

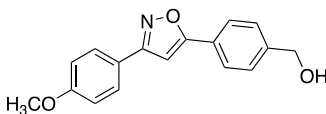
F.M.: C₁₁H₉NO₄. **P.M.:** 219,19 g mol⁻¹. **P.F.:** 76,0-77,7 °C. **¹H NMR (300 MHz, CDCl₃):** δ = 7,28 (d, *J* = 1,6 Hz, 1H, Ar), 7,24 (dd, *J* = 8,0 Hz, *J* = 1,6 Hz, 1H, Ar); 6,86 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H, Ar); 6,47 (s, 1H, isoxazole); 6,01 (s, 2H, OCH₂O); 4,78 (s, 2H, CH₂). **¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃):** δ = 171,8; 162,1; 149,2; 148,2; 122,7; 121,2; 108,6; 106,9; 101,5; 99,9; 56,5. **HRMS (ESI-TOF) m/z:** [M + H]⁺ Calcd for C₁₁H₁₀NO₄ 220,0610; Encontrada 220,0598.

3-fenil-5-(4-hidroxitetilfenil)-isoxazol (45)

O composto foi sintetizado conforme a metodologia 1, com rendimento de 52% (0,027 g, 0,11 mmol); e também conforme a metodologia 2, com rendimento de 47% (0,024 g, 0,097 mmol).

F.M.: C₁₆H₁₃NO₂. **P.M.:** 251,28 g mol⁻¹. **P.F.:** 168,8-169,3 °C. **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃):** δ = 7,83-7,89 (m, 4H, Ar); 7,45-7,52 (m, 5H, Ar); 6,84 (s, 1H, isoxazole); 4,78 (s, 2H, CH₂). **¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃):** δ = 170,1; 163,0; 143,1; 130,0; 129,1; 128,9; 127,4; 126,8; 126,7; 126,0; 97,5; 64,8. **HRMS (ESI-TOF) m/z:** [M + H]⁺ Calcd for C₁₆H₁₄NO₂ 252,1025; Encontrada 252,0987.

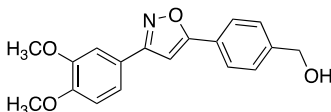
5-(4-hidroximetilfenil)-3-(4-metoxifenil)-isoxazol (46)



O composto foi sintetizado conforme a metodologia 1, com rendimento de 52% (0,024 g, 0,086 mmol); e também conforme a metodologia 2, com rendimento de 45% (0,021 g, 0,074 mmol).

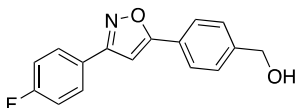
F.M.: C₁₇H₁₅NO₃. **P.M.:** 281,31 g mol⁻¹. **P.F.:** 157,0-157,9 °C. **¹H NMR (300 MHz, CDCl₃):** δ = 7,82 (d, *J* = 6,6 Hz, 2H, Ar); 7,80 (d, *J* = 6,6 Hz, 2H, Ar); 7,49 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H, Ar); 7,00 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H, Ar); 6,78 (s, 1H, isoxazole); 4,78 (s, 2H, CH₂); 3,87 (s, 3H, OCH₃). **¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃):** δ = 169,9; 162,6; 161,0; 143,0; 128,2; 127,3; 126,8; 126,0; 121,6; 114,3; 97,2; 64,8; 55,4. **HRMS (ESI-TOF) m/z:** [M + H]⁺ Calcd for C₁₇H₁₆NO₃ 282,1130; Found 282,1139.

5-(4-hidroximetilfenil)-3-(3,4-dimetoxifenil)-isoxazol (47)



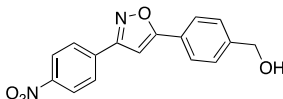
O composto foi sintetizado conforme a metodologia 1, com rendimento de 50% (0,021 g, 0,069 mmol); e também conforme a metodologia 2, com rendimento de 51% (0,022 g, 0,070 mmol).

F.M.: C₁₈H₁₇NO₄. **P.M.:** 311,33 g mol⁻¹. **P.F.:** 142,6-145,5 °C. **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃):** δ = 7,83 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H, Ar); 7,48 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H, Ar); 7,47 (d, *J* = 2,0 Hz, 1H, Ar); 7,36 (dd, *J* = 2,0 Hz, *J* = 8,4 Hz, 1H, Ar); 6,95 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H, Ar); 6,79 (s, 1H, isoxazole); 4,77 (s, 2H, CH₂); 3,98 (s, 3H, OCH₃); 3,95 (s, 3H, OCH₃). **¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃):** δ = 170,0; 162,7; 150,6; 149,3; 143,1; 127,3; 126,7; 126,0; 121,8; 119,9; 111,0; 109,3; 97,3; 64,8; 56,0 (x2). **HRMS (ESI-TOF) m/z:** [M + H]⁺ Calcd for C₁₈H₁₈NO₄ 312,1236; Encontrada 312,1236.

3-(4-fluorfenil)-5-(4-hidroximetilfenil)-isoxazol (48)

O composto foi sintetizado conforme a metodologia 1, com rendimento de 40% (0,019 g, 0,072 mmol); e também conforme a metodologia 2, com rendimento de 42% (0,021 g, 0,075 mmol).

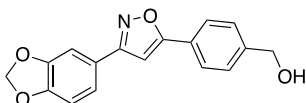
F.M.: C₁₆H₁₂FNO₂. **P.M.:** 269,27 g mol⁻¹. **P.F.:** 179,0-179,6 °C. **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃):** δ = 7,82-7,89 (m, 4H, Ar); 7,51 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H, Ar); 7,18 (t, *J* = 8,6 Hz, 2H, Ar); 6,80 (s, 1H, isoxazole); 4,79 (s, 2H, CH₂). **¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃):** δ = 170,4; 162,1; 143,2; 128,7 (d, ³*J*_{CF} = 8 Hz); 127,4; 126,1; 116,1 (d, ²*J*_{CF} = 22 Hz); 97,3; 64,8. **HRMS (ESI-TOF) m/z:** [M + H]⁺ Calcd for C₁₆H₁₃FNO₂ 270,0930; Encontrada 270,0922.

5-(4-hidroximetilfenil)-3-(4-nitrofenil)-isoxazol (49)

O composto foi sintetizado conforme a metodologia 1, com rendimento de 20% (0,009 g, 0,030 mmol); e também conforme a metodologia 2, com rendimento de 22% (0,010 g, 0,033 mmol).

F.M.: C₁₆H₁₂N₂O₄. **P.M.:** 296,28 g mol⁻¹. **P.F.:** 189,3-191,2 °C. **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃):** δ = 8,28 (d, *J* = 9,0 Hz, 2H, Ar); 7,99 (d, *J* = 9,0 Hz, 2H, Ar); 7,77 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H, Ar); 7,45 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H, Ar); 6,89 (s, 1H, isoxazole); 4,65 (s, 2H, CH₂). **¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃):** δ = 171,5; 161,4; 148,8; 144,3; 135,3; 127,8; 127,5; 126,1; 125,9; 124,4; 97,6; 64,0. **HRMS (ESI-TOF) m/z:** [M + H]⁺ Calcd for C₁₆H₁₃N₂O₄ 297,0875; Encontrada 297,0900.

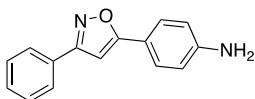
3-(3,4-benzodioxol)-5-(4-hidroxitilfenil)-isoxazol (50)



O composto foi sintetizado conforme a metodologia 1, com rendimento de 22% (0,010 g, 0,033 mmol); e também conforme a metodologia 2, com rendimento de 18% (0,008 g, 0,027 mmol).

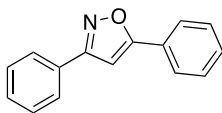
F.M.: $C_{17}H_{13}NO_4$. **P.M.:** 295,29 g mol⁻¹. **P.F.:** 180,1-181,7 °C. **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃):** δ = 7,83 (d, J = 8,5 Hz, 2H, Ar); 7,50 (d, J = 8,5 Hz, 2H, Ar); 7,39 (d, J = 1,8 Hz, 1H, Ar); 7,34 (dd, J = 1,8 Hz, J = 8,1 Hz, 1H, Ar); 6,91 (d, J = 8,1, 1H, Ar); 6,75 (s, 1H, isoxazol); 6,04 (s, 2H, OCH₂O); 4,78 (s, 2H, CH₂). **¹³C NMR (100 MHz, Metanol-d₄):** δ = 171,5; 164,1; 150,8; 149,7; 145,4; 128,4; 127,5; 126,8; 124,0; 122,4; 109,6; 107,6; 102,9; 98,6; 64,6. **HRMS (ESI-TOF) m/z:** [M + H]⁺ Calcd for C₁₇H₁₄NO₄ 296,0923; Encontrada 296,0891.

5-(4-aminofenil)-3-fenil-isoxazol (51)

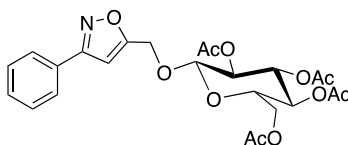


O composto foi sintetizado conforme a metodologia 1, com rendimento de 50% (0,0024 g, 0,010 mmol); e também conforme a metodologia 2, com rendimento de 49% (0,0023 g, 0,010 mmol).

F.M.: $C_{15}H_{12}N_2O$. **P.M.:** 236,27 g mol⁻¹. **P.F.:** 130,6-132,4 °C. **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃):** δ = 7,80-7,87 (m, 2H, Ar); 7,65 (d, J = 8,7 Hz, 2H, Ar); 7,74-7,50 (m, 3H, Ar); 6,75 (d, J = 8,7 Hz, 2H, Ar); 6,64 (s, 1H, Isoxazole); 3,95 (sl, 2H, NH₂). **¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃):** δ = 170,9; 162,8; 148,3; 129,8; 129,4; 128,9; 127,4; 126,8; 117,9; 114,9; 95,1. **HRMS (ESI-TOF) m/z:** [M + H]⁺ Calcd for C₁₅H₁₃N₂O 237,1028; Encontrada 237,0993.

3,5-difenil-isoxazol (52)

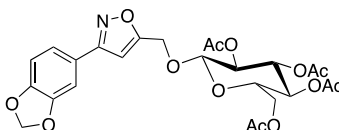
O composto foi sintetizado conforme a metodologia 2, com rendimento de 42% (0,019 g, 0,087 mmol). **F.M.:** C₁₅H₁₁NO. **P.M.:** 221,25 g mol⁻¹. **P.F.:** 141,2-143,8 °C. **¹H NMR (300 MHz, CDCl₃):** δ = 7,83-7,89 (m, 4H); 7,47-7,51 (m, 6H); 6,84 (s, 1H). **¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃):** δ = 170,3; 162,9; 130,2; 130,0; 129,0; 128,9; 127,4; 126,8; 125,8; 97,4. **HRMS (ESI-TOF) m/z:** [M+H]⁺ Calcd for C₁₅H₁₂NO 222,0913; Encontrada 222,0912.

5-[(2,3,4,6-tetraacetil-α-D-glicopiranosil-1-il)metil]-3-fenilisoxazol (53)

O composto foi sintetizado conforme a metodologia 1, com rendimento de 54% (0.056 g, 0.11 mmol); e também conforme a metodologia 2, com rendimento de 40% (0.041 g, 0.082 mmol).

F.M.: C₂₄H₂₇NO₁₁. **P.M.:** 505,47 g mol⁻¹. **P.F.:** 111,1-113,6 °C. **¹H NMR (400 MHz, Metanol-d₄):** δ = 7,81-7,86 (m, 2H, Ar); 7,46-7,51 (m, 3H, Ar); 6,85 (s, 1H, Isoxazole); 5,28 (t, *J* = 9,6 Hz, 1H, H3[′]); 5,05 (t, *J* = 9,6 Hz, 1H, H4[′]); 4,95 (t, *J* = 8,4 Hz, 1H, H2[′]); 4,94 (d, *J* = 13,9 Hz, 1H, CH); 4,87 (d, *J* = 13,9 Hz, 1H, CH); 4,86 (t, *J* = 8,4 Hz, 1H, H1[′]); 4,29 (dd, *J* = 4,6 Hz, *J* = 12,4 Hz, 1H, H6[′]); 4,16 (dd, *J* = 2,5 Hz, *J* = 12,4 Hz, 1H, H6[′]); 3,92 (m, 1H, H5[′]); 2,04 (s, 3H, CH₃); 2,01 (s, 3H, CH₃); 2,00 (s, 3H, CH₃); 1,96 (s, 3H, CH₃). **¹³C NMR (100 MHz, Metanol-d₄):** δ = 171,1; 170,5; 170,0; 169,3; 162,7; 130,1; 128,9; 128,8; 126,6; 101,7; 100,1; 73,0; 71,8; 71,5; 68,4; 61,7; 61,5; 19,2. **HRMS (ESI-TOF) m/z:** [M+H]⁺ Calcd for C₂₄H₂₈NO₁₁ 506,1618; Encontrada 506,1655.

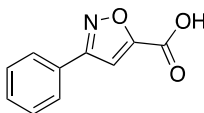
5-[(2,3,4,6-tetraacetil- α -D-glicopiranosil-1-il)metil]-3-(3,4-benzodioxol)-isoxazol (54)



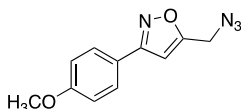
O composto foi sintetizado conforme a metodologia 1, com rendimento de 48% (0,040 g, 0,072 mmol); e também conforme a metodologia 2, com rendimento de 46% (0,038 g, 0,069 mmol).

F.M.: $C_{25}H_{27}NO_{13}$. **P.M.:** 549,48 $g\ mol^{-1}$. **P.F.:** 110,4-112,0 $^{\circ}C$. **1H NMR (400 MHz, Metanol- d_4):** δ = 7,37-7,31 (m, 2H, Ar); 6,93 (d, J = 8,3 Hz, 1H, Ar); 6,77 (s, 1H, Isoxazole); 6,03 (s, 2H, OCH_2O); 5,28 (t, J = 9,3 Hz, 1H, H_3'); 5,05 (t, J = 9,3 Hz, 1H, H_4'); 4,94 (t, J = 9,1 Hz, 1H, H_2'); 4,93 (t, J = 13,4 Hz, 1H, CH); 4,84 (d, J = 9,1 Hz, 1H, H_1'); 4,83 (d, J = 13,4 Hz, 1H, CH); 4,29 (dd, J = 4,6 Hz, J = 12,4 Hz, 1H, H_6'); 4,16 (dd, J = 2,3 Hz, J = 12,4 Hz, 1H, H_6'); 3,92 (m, 1H, H_5'); 2,05 (s, 3H, CH_3); 2,01 (s, 3H, CH_3); 2,00 (s, 3H, CH_3); 1,96 (s, 3H, CH_3). **^{13}C NMR (100 MHz, Metanol- d_4):** δ = 172,4; 171,2; 171,6; 171,3; 170,3; 163,5; 150,9; 149,8; 123,9; 122,4; 109,7; 107,6; 103,0; 102,9; 101,3; 74,1; 73,0; 72,7; 69,7; 63,0; 62,7; 20,6 (x3); 20,5. **HRMS (ESI-TOF) m/z:** $[M + H]^+$ Calcd for $C_{25}H_{28}NO_{13}$ 550,1561; Encontrada 550,1522.

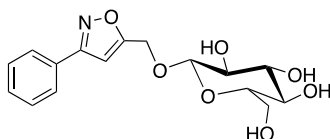
5-ácido carboxílico-3-fenilisoxazol- (55)



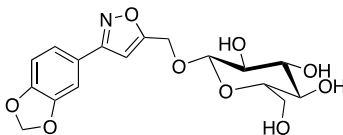
F.M.: $C_{10}H_7NO_3$. **P.M.:** 189,17 $g\ mol^{-1}$. **P.F.:** 155,0-157,4 $^{\circ}C$. **1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$):** δ = 7,78-7,90 (m, 2H, Ar); 7,45-7,55 (m, 3H, Ar); 7,25 (s, 1H, Isoxazol). **^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$):** δ = 166,9; 165,5; 162,3; 134,4; 133,0; 132,8; 131,9; 130,7; 111,3. **HRMS (ESI-TOF) m/z:** $[M - H]^-$ Calcd for $C_{10}H_6NO_3$ 188.0353; Encontrada 188.0321.

5-(azidometil)-3-(4-metoxifenil)-isoxazol (56)

F.M.: C₁₁H₁₀N₄O₂. **P.M.:** 230,22 g mol⁻¹. **P.F.:** 51,9-53,0 °C. **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃):** δ = 7,75 (d, *J*=9,0 Hz, 2H, Ar); 6,99 (d, *J*= 9,0 Hz, 2H, Ar); 6,55 (s, 1H, isoxazol); 4,50 (s, 2H, CH₂); 3,87 (s, 3H, OCH₃). **¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃):** δ = 166,7; 161,2; 128,2; 121,0; 114,4; 101,1; 55,4; 45,5. **HRMS (ESI-TOF) m/z:** [M + H]⁺ Calcd for C₁₁H₁₁N₄O₂ 231,0882; Encontrada 231,0872.

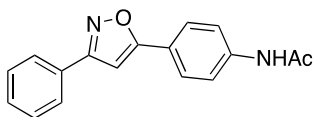
3-fenil-5-[(2,3,4,6-tetrahidroxil-α-D-glicopiranosil-1-il)metil]-isoxazol (57)

F.M.: C₁₆H₁₉NO₇. **P.M.:** 337,32 g mol⁻¹. **P.F.:** 149,0-152,0 °C. **HRMS (ESI-TOF) m/z:** [M + H]⁺ Calcd for C₁₆H₂₀NO₇ 338,1240; Encontrada 338,1232.

3-(3,4-benzodioxol)-5-[(2,3,4,6-tetrahidroxil-α-D-glicopiranosil-1-il)metil]-isoxazol (58)

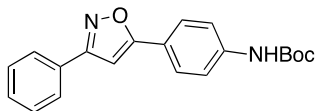
F.M.: C₁₇H₁₉NO₉. **P.M.:** 381,33 g mol⁻¹. **P.F.:** 186,3-188,5 °C. **HRMS (ESI-TOF) m/z:** [M+Na]⁺ Calcd for C₁₇H₁₉NO₉Na 404.0958; Encontrada 404.0958.

5-(4-acetamidofenil)-3-fenil-isoxazol (62)

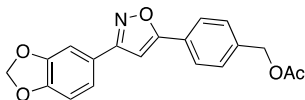


O composto foi sintetizado conforme a metodologia 2, com rendimento de 19% (0,011 g, 0,039 mmol). **F.M.:** C₁₇H₁₄N₂O₂. **P.M.:** 278,31 g mol⁻¹. **P.F.:** 179,0-182,0 °C. **¹H NMR (300 MHz, Metanol-d₄):** δ = 7,85-7,91 (m, 2H, Ar); 7,84 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H, Ar); 7,73 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H, Ar); 7,46-7,52 (m, 3H, Ar); 7,10 (s, 1H, isoxazol); 2,17 (s, 3H, CH₃). **¹³C NMR (75 MHz, Metanol-d₄):** δ = 170,4; 170,1; 163,0; 140,5; 129,9; 128,7; 126,3; 126,1; 122,6; 119,6; 96,7; 23,3. **HRMS (ESI-TOF) m/z:** [M + H]⁺ Calcd for C₁₇H₁₅N₂O₂ 279,1134; Encontrada 279,1139.

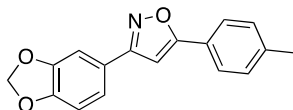
5-(4-tert-butilcarbamatofenil)-3-fenil-isoxazol (63)



O composto foi sintetizado conforme a metodologia 2, com rendimento de 48% (0,033 g, 0,099 mmol). **F.M.:** C₂₀H₂₀N₂O₃. **P.M.:** 336,38 g mol⁻¹. **P.F.:** 188,3-192,9 °C. **¹H NMR (300 MHz, Metanol-d₄):** δ = 7,84-7,90 (m, 2H, Ar); 7,77 (d, *J* = 8,9 Hz, 2H, Ar); 7,50 (d, *J* = 8,9 Hz, 2H, Ar); 7,45-7,50 (m, 3H, Ar); 6,76 (s, 1H, isoxazol); 6,65 (sl, 1H, NH); 1,54 (s, 9H, t-Bu). **¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃):** δ = 170,0; 162,6; 140,2; 130,2; 130,0; 128,9; 126,8; 122,5; 118,4; 96,6; 53,5; 28,3. **HRMS (ESI-TOF) m/z:** [M + H]⁺ Calcd for C₂₀H₂₁N₂O₃ 337,1552; Encontrada 337,1559.

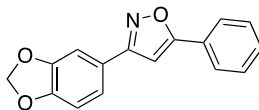
5-(4-acetoximetilfenil)-3-(3,4-benzodioxol)-isoxazol (64)

O composto foi sintetizado conforme a metodologia 2, com rendimento de 28% (0,014 g, 0,042 mmol). **F.M.:** C₁₉H₁₅NO₅. **P.M.:** 337,33 g mol⁻¹. **P.F.:** 165,2-166,8 °C. **¹H NMR (300 MHz, CDCl₃):** δ = 7,83 (d, *J* = 8,3 Hz, 2H, Ar); 7,48 (d, *J* = 8,3 Hz, 2H, Ar), 7,38 (d, *J* = 1,5 Hz, 1H, Ar); 7,35 (dd, *J* = 1,5 Hz, *J* = 8,1 Hz, 1H, Ar); 6,91 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H, Ar); 6,76 (s, 1H, isoxazol); 6,04 (s, 2H, OCH₂O); 2,14 (s, 3H, CH₃). **¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃):** δ = 170,8; 169,8; 162,6; 149,2; 148,3; 138,1; 128,7; 127,3; 126,0; 123,0; 121,2; 108,7; 107,0; 101,5; 97,6; 65,7; 21,0. **HRMS (ESI-TOF) m/z:** [M + H]⁺ Calcd for C₁₉H₁₆NO₅ 338,1028; Encontrada 338,1028.

3-(3,4-benzodioxol)-5-(4-metilfenil)-isoxazol (65)

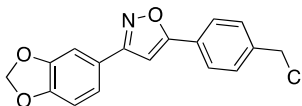
O composto foi sintetizado conforme a metodologia 2, com rendimento de 26% (0,011 g, 0,039 mmol). **F.M.:** C₁₇H₁₃NO₃. **P.M.:** 279,29 g mol⁻¹. **P.F.:** 141,9-144,9 °C. **¹H NMR (300 MHz, CDCl₃):** δ = 7,83 (dd, *J* = 1,9; 7,7 Hz, 2H, Ar); 7,52 – 7,44 (m, 2H, Ar); 7,39 (d, *J* = 1,70 Hz, 1H, Ar); 7,34 (dd, *J* = 1,7; 8,0 Hz, 1H, Ar); 6,90 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H, Ar); 6,75 (s, 1H, isoxazol); 6,04 (s, 2H, OCH₂O). **¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃):** δ = 170,2; 162,6; 149,1; 148,2; 130,2; 129,0; 125,8; 123,1; 121,2; 108,6; 107,0; 101,5; 97,3. **HRMS (ESI-TOF) m/z:** [M + H]⁺ Calcd for C₁₆H₁₂NO₃ 266,0817; Encontrada 266,0831.

3-(3,4-benzodioxol)-5-fenil-isoxazol (66)



O composto foi sintetizado conforme a metodologia 2, com rendimento de 29% (0,012 g, 0,044 mmol). **F.M.:** C₁₆H₁₁NO₃. **P.M.:** 265,26 g mol⁻¹. **P.F.:** 125,2-127,9 °C. **¹H NMR (300 MHz, CDCl₃):** δ = 7,83 (dd, *J* = 1,9; 7,7 Hz, 2H, Ar); 7,52 – 7,44 (m, 2H, Ar); 7,39 (d, *J* = 1,70 Hz, 1H, Ar); 7,34 (dd, *J* = 1,7, 8,0 Hz, 1H, Ar); 6,90 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H, Ar); 6,75 (s, 1H, isoxazol); 6,04 (s, 2H, OCH₂O). **¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃):** δ = 170,2; 162,6; 149,1; 148,2; 130,2; 129,0; 125,8; 123,1; 121,2; 108,6; 107,0; 101,5; 97,3. **HRMS (ESI-TOF) m/z:** [M + H]⁺ Calcd for C₁₆H₁₂NO₃ 266,0817; Encontrada 266,0831.

3-(3,4-benzodioxol)-5-(4-clorometilfenil)-isoxazol (67)



Uma solução do composto **50** em cloreto de tionila (100 µL) foi agitada sob atmosfera de nitrogênio por 1 hora, quando a análise cromatográfica indicou o consumo total do material de partida. Então, a reação foi resfriada em banho de gelo, diluída com água e extraída com CH₂Cl₂ (3 × 10 mL). As fases orgânicas foram combinadas, lavadas com brine e secas sob pressão reduzida, levando à obtenção do composto como um pó amarelo (30 mg, 94%). **F.M.:** C₁₇H₁₂ClNO₃. **P.M.:** 313,74 g mol⁻¹. **P.F.:** 162,1-163,2 °C. **¹H NMR (300 MHz, CDCl₃):** δ = 7,82 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H, Ar); 7,51 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H, Ar); 7,38 (d, *J* = 1,7 Hz, 1H, Ar); 7,34 (dd, *J* = 8,0 Hz, *J* = 1,7 Hz, 1H, Ar); 6,90 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H, Ar); 6,77 (s, 1H, isoxazol); 6,05 (s, 2H, OCH₂O); 4,64 (s, 2H, CH₂). **¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃):** δ = 169,6; 163,2; 149,2; 148,2; 139,4; 129,2; 127,4; 122,9; 121,2; 106,6; 101,5; 97,7; 46,6. **HRMS (ESI-TOF) m/z:** [M + H]⁺ Calcd for C₁₇H₁₃ClNO₃ 314,0584; Encontrada 314,0576.

3.2.3. Avaliação da inibição de crescimento de amastigotas de *L. amazonensis* e *T. cruzi*.

Este ensaio foi realizado em colaboração com o Laboratório de Protozoologia da Universidade Federal de Santa Catarina (MIP/CCB).

Células THP-1 (ATCC TIB202) foram cultivadas em meio RPMI-1640 sem vermelho de fenol (Sigma-Aldrich, CO. St. Louis, MO, USA) suplementado com 10% SBF (Life Technologies, USA), 12.5 mM de HEPES, penicilina (100 U/ml), estreptomicina (100 µg/ml) e Glutamax (2 mM) (37 °C, 5% CO₂).

Promastigotas de *L. amazonensis* MHOM/BR/77/LTB0016, expressando a enzima β-galactosidase, foram cultivadas em meio Schneider's (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) suplementado com 5% de SBF inativado com calor e 2% de urina humana (26 °C, 5% CO₂).

Tripomastigotas de *T. cruzi* Tulahuen obtidos através de células da linhagem L929, expressando β-galactosidase, foram cedidos pelo Laboratório de Parasitologia Celular e Molecular, Centro de Pesquisas René Rachou, FIOCRUZ, Belo Horizonte (BUCKNER et al., 1996).

Então, as células THP-1 foram cultivadas em placas de 96 poços (4.0 × 10⁴ células/poço) em meio RPMI-1640 suplementado e tratadas com 100 ng/ml de phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) por 72 h (37 °C, 5% CO₂) para que ocorresse diferenciação a macrófagos (SCHWENDE et al., 1996).

Promastigotas de *L. amazonensis* (4.0 × 10⁶ parasites/ml) obtidas ao quarto dia de cultura foram lavados com PBS (PBS, pH 7.4) e incubadas em RPMI-1640 suplementado com 10% de soro sanguíneo humano AB+ inativado por calor, por 1 h (34 °C) para que os parasitas fossem opsonizados. As células THP-1 foram, então, incubadas com os parasitas em uma proporção de 10:1 (parasitas:célula) por 3 h (34 °C, 5% CO₂) para *L. amazonensis* e em uma proporção de 3:1 (parasitas:células) overnight (37 °C, 5% CO₂) para *T. cruzi*. Então, os parasitas que se encontravam não aderidos foram removidos após lavagens consecutivas com PBS e as células infectadas foram encubadas com 180 µL de RPMI-1640 suplementado, por mais 24 horas (34 °C e 37 °C, 5% CO₂) para que ocorresse a evolução dos parasitas à forma amastigota intracelular.

As células infectadas foram tratadas com 20 µL dos compostos (diluídos em DMSO e, posteriormente, em RPMI-1640) em triplicata, seguido por encubação por 48 h (34 °C e 37 °C, 5% CO₂). Após esse período, as células foram cuidadosamente lavadas com PBS e encubadas

por 16 horas (34 °C, 5% CO₂) com 250 µl de chlorophenolred-β-d-galactopyranoside (Sigma–Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) (CPRG) a 100 µM e Nonidet P-40 (Amresco Inc, Solon, Ohio, USA) (NP-40) 0.1%. A densidade optica foi lida a 570/630 nm em um leitor de microplacas Infinite M200 TECAN, Austria. Anfotericina B (Bristol-Myers, Squibb) e benznidazol (Sigma Aldrich) foram utilizados como controles positivos e DMSO 1% como controle negativo. Compostos que levaram à inibição de crescimento superior a 50% tiveram suas IC₅₀ calculadas através de uma curva analítica obtida após a realização do teste com os compostos em diferentes diluições (0,78 µM – 100 µM).

3.2.4. Avaliação da inibição de crescimento de tripomastigotas de *T. cruzi*

Este ensaio foi realizado em colaboração com o Instituto Adolfo Lutz (SP).

Tripomastigotas obtidas a partir da cultura de células LLC-MK2 foram contadas em câmara de Neubauer e semeadas em placas de 96 poços (1.0 × 10⁶ parasitas/poço). Os compostos foram adicionados (na concentração final de 100 µM) e as placas incubadas por 24 h (37 °C, 5% CO₂). Benznidazol foi usado como controle positivo. A viabilidade celular foi medida através da conversão do MTT à formazan pelas mitocôndrias das células viáveis. O formazan foi dissolvido utilizando 10% de SDS por 18 h (80 µL/poço) a 24 °C conforme descrito na literatura (LANE et al., 1996). O número de tripomastigotas viáveis foi determinado indiretamente através da leitura da densidade ótica a 540 nm (TADA et al., 1986).

3.2.5. Avaliação de citotoxicidade

Este ensaio foi realizado em colaboração com o Laboratório de Protozoologia da Universidade Federal de Santa Catarina (MIP/CCB).

Células THP-1 foram cultivadas em placas de 96 poços (4.0 × 10⁶ células/poço), como descrito no item 3.2.3., tratadas com os compostos (diluídos em DMSO e, posteriormente, em RPMI-1640) em concentrações variando de 15,6 µM a 500 µM e encubadas 72 h (37 °C, 5% CO₂). A viabilidade celular foi avaliada através do ensaio do MTT, que consiste na medida colorimétrica da metabolização do MTT à formazan feita por células viáveis. DMSO 1% foi usado como controle negativo e a densidade ótica a 540 nm foi lida em um leitor de

microplacas Infinite M200 TECAN imediatamente após a dissolução dos cristais de formazan com DMSO(SIEUWERTS et al., 1995; VAN DE LOOSDRECHT et al., 1991).

3.2.6. Avaliação da inibição da enzima tripanotona redutase

Este ensaio foi realizado em colaboração com o Laboratório de Protozoologia da Universidade Federal de Santa Catarina (MIP/CCB).

Tripanotona redutase de *T. cruzi* (1 m-unidade), HEPES (40 mM, pH 7.5), NADPH (0.15 mM), DTNB (25 μ M) e EDTA (1 mM) foram encubados em placas de 96 poços por 5 minutos (27 °C) antes do substrato T(S)₂ (1 μ M) e dos compostos (diluídos em DMSO) serem adicionados em triplicata. Em seguida, a absorbância em 412 nm foi acompanhada por 30 minutos para determinar a atividade enzimática, comparando os compostos testados com DMSO 1% (controle negativo) e clomipramina (controle positivo). Os compostos que apresentaram atividade inibitória promissora foram testados quanto a inibição da GR, para aferir as respectivas seletividades.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

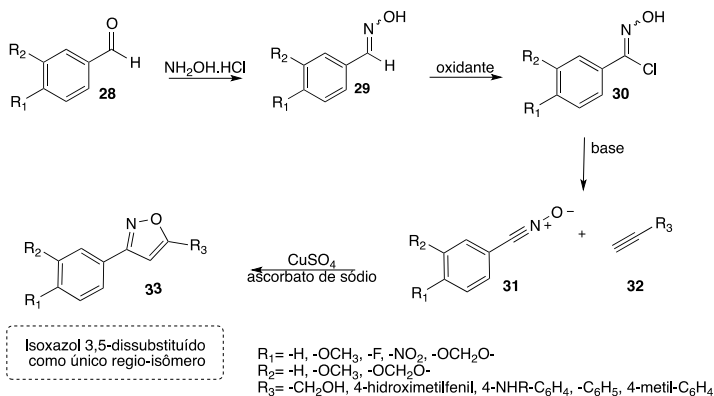
4. Resultados e Discussão

4.1. Síntese dos derivados isoxazóis

A síntese de derivados isoxazóis 3,5-dissubstituídos foi realizada através da cicloadição 1,3-dipolar entre óxidos de nitrila (composto **31**) e alcinos terminais (composto **32**). Os alcinos são comumente encontrados como blocos de construção e podem ser adquiridos comercialmente. No entanto, os óxidos de nitrila, por apresentarem instabilidade, precisam ser sintetizados no laboratório logo antes do seu uso.

A síntese dos óxidos de nitrila pode ser realizada através de intermediário funcionalizados com o grupo nitro, ou então, através de cloretos de imidoíla. Neste trabalho, devido a viabilidade sintética no laboratório, optou-se por utilizar cloretos de imidoíla como material de partida para a obtenção do 1,3-dipolo. Dessa forma, em tese, um aldeído obtido comercialmente (composto **28**) poderia reagir com cloridrato de hidroxilamina gerando uma oxima (composto **29**) a qual poderia reagir com um agente oxidante (como NCS, NaOCl ou cloramina T), levando a formação do cloreto de imidoíla (composto **30**). O cloreto de imidoíla, por sua vez, poderia reagir com uma base levando à obtenção do óxido de nitrila (composto **31**), que seria imediatamente utilizado na reação de cicloadição 1,3-dipolar.

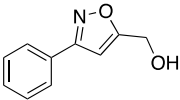
Esquema 1. Esquema de síntese dos derivados isoxazóis a partir de aldeídos e hidroxilamina



Baseado na metodologia descrita acima, a literatura traz dois importantes artigos com protocolos para a síntese dos derivados isoxazóis através da cicloadição 1,3-dipolar (HANSEN; WU; FOKIN, 2005; HIMO et al., 2005). Na primeira, descrita por Hansen (2005), o intermediário oxima **29** é gerado *in situ*, a partir de aldeídos comerciais **28**, com posterior formação do isoxazol (reação *one-pot*). Já na metodologia descrita por Himo (2005), o material de partida para a síntese são as oximas isoladas e a reação é conduzida em duas etapas: síntese do cloreto de imidoíla e cicloadição.

Inicialmente, o composto 3-fenil-5-hidroxi-1,2,4-isoxazol (**34**) foi sintetizado utilizando ambas as metodologias (tabela 2).

Tabela 2. Rendimento do composto **34** após síntese pelas metodologias (a) e (b)

		Metodologia	Tempo	Rendimento
34		(a) Hansen (2005)	4 h	37%
		(b) Himo (2005)	4 h	72%

Os resultados mostraram que com o mesmo tempo de reação, o rendimento do composto **34** obtido pela metodologia (b) foi superior ao rendimento obtido pela metodologia (a).

O fato da metodologia (a) ser realizada de forma *one-pot* pode ter contribuído para o baixo rendimento. Como todos os reagentes são adicionados ao balão reacional em uma única etapa, não é possível acompanhar detalhadamente o andamento da reação mesmo por análise cromatográfica em camada delgada, visto que o Rf dos materiais de partida é semelhante. Dessa forma, ao final do tempo reacional pode não ter ocorrido a conversão total do aldeído aos intermediários oxima, cloreto de imidoíla ou óxido de nitrila.

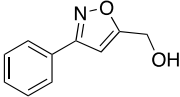
A metodologia (b), por ser realizada em duas etapas, permitiu acompanhar o andamento da reação de forma mais clara. Na primeira etapa, síntese do cloreto de imidoíla, a formação de um produto mais apolar que o material de partida foi observada já nos primeiros minutos de reação. Após a conversão total do material de partida ao cloreto de imidoíla, a reação foi interrompida e a segunda etapa foi iniciada com a adição dos outros reagentes. Novamente, em aproximadamente dez minutos, já foi possível observar por análise cromatográfica a formação

de um produto com polaridade maior que os materiais de partida que, quando isolado, foi caracterizado como 3-fenil-5-hidroximetil-isoxazol (composto **34**). Em ambas as metodologias são empregados catalisadores de cobre para a obtenção do derivado isoxazol, desta forma, o regio-isômero 3,5-dissubstituído foi obtido de forma seletiva, conforme desejado.

As reações de síntese orgânica sob irradiação micro-ondas vêm sendo utilizadas na última década devido, principalmente, à diminuição do tempo reacional em comparação às reações não irradiadas. Dessa forma, decidiu-se verificar o rendimento da cicloadição 1,3-dipolar para a obtenção de isoxazóis em reator micro-ondas adaptando a metodologia (b), de maior rendimento.

A conversão total da oxima a cloreto de imidoíla, no reator micro-ondas, ocorreu em 1 minuto (30 °C, 150 W) e, então, os outros reagentes foram adicionados diretamente ao tubo reacional e a reação irradiada por 1 minuto (30 °C, 150 W). Posteriormente, o composto **34** foi purificado por cromatografia em coluna com o rendimento de 37%. Visando determinar o melhor tempo reacional, a reação também foi realizada em diferentes tempos (tabela 3).

Tabela 3. Rendimento do composto **34** após síntese em micro-ondas, em diferentes tempos

		Tempo [*]	Rendimento
34		1+1 min	37%
		1+3 min	35%
		1+10 min	77%
		1+15 min	74%

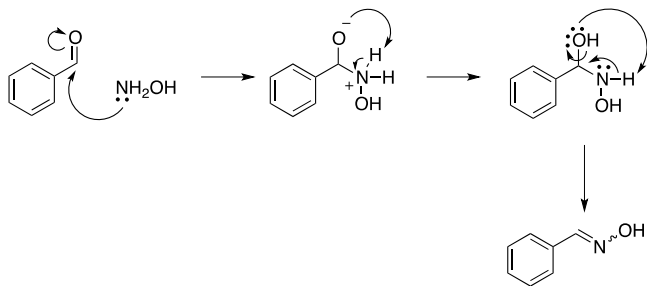
^{*} 1 minuto para síntese do cloreto de imidoíla, mais o tempo para a síntese do derivado isoxazol. Em todas as reações a temperatura e potência máxima da radiação foram mantidas em 30 °C e 150 W.

O rendimento foi crescente com o aumento do tempo reacional, sendo que o maior valor (77%) foi obtido com o tempo total de 11 minutos de irradiação.

Com o tempo reacional padronizado em 11 minutos, foi feito o planejamento para a síntese de novos derivados isoxazóis com maior variedade estrutural. Com exceção da benzaldeído oxima, utilizada para a síntese de **34**, as oximas **35-39** foram sintetizadas a partir de aldeídos comerciais, sob irradiação micro-ondas, seguindo um procedimento já descrito na literatura (HAJIPOUR; RAFIEE; RUOHO, 2010).

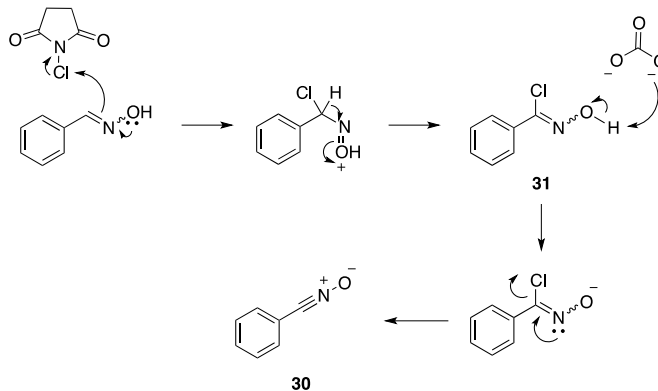
O mecanismo de formação das oximas dá-se pelo ataque nucleofílico da hidroxilamina ao aldeído de partida, conforme representado no esquema 2.

Esquema 2. Mecanismo de síntese das oximas a partir de aldeídos



Estes intermediários são obtidos em uma mistura dos isômeros (*E*) e (*Z*), sendo o isômero (*E*) majoritário em relação ao (*Z*). Devido a barreira energética, os isômeros não se encontram em equilíbrio e podem ser isolados. No entanto, como as oximas são convertidas a óxidos de nitrila na cicloadição e este possui geometria planar, a utilização da mistura dos isômeros (*E*) e (*Z*) em tese não influencia na estereoseletividade da reação (esquema 3).

Esquema 3. Mecanismo de formação do óxido de nitrila a partir de oximas, passando pelo intermediário cloreto de imidófla



A tabela 4 apresenta as oximas sintetizadas a partir dos respectivos aldeídos e o rendimento observado.

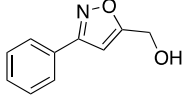
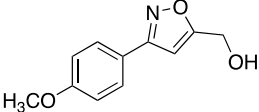
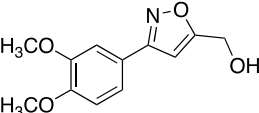
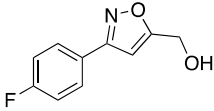
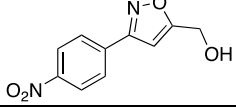
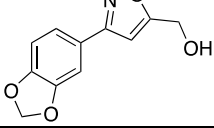
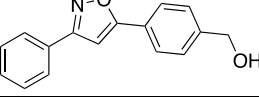
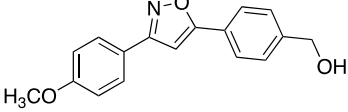
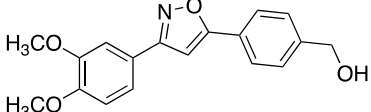
Tabela 4. Estrutura e rendimento das oximas 35-39

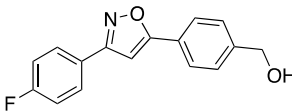
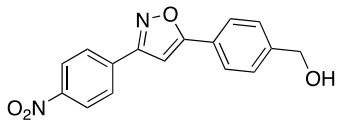
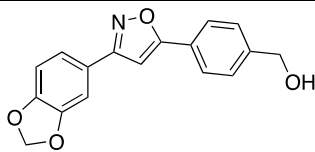
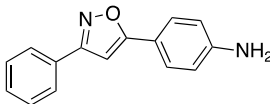
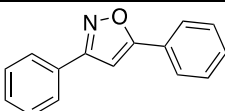
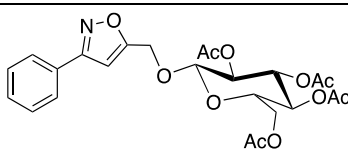
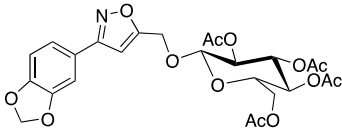
		Rendimento
35		95%
36		87%
37		91%
38		90%
39		96%

Após a obtenção e caracterização das oximas, estas foram empregadas na síntese dos derivados isoxazóis. Esses derivados foram sintetizados utilizando a metodologia (b), padronizada sob irradiação micro-ondas e paralelamente, também foram sintetizados utilizando a mesma metodologia, porém sem irradiação micro-ondas; de modo a comparar o rendimento obtido por ambos os métodos. O tempo reacional da metodologia sob irradiação micro-ondas foi padronizado em 11 minutos, enquanto o tempo de reação na metodologia tradicional foi dependente do aspecto da análise cromatográfica por CCD (média de 5 horas).

A tabela 5 apresenta a estrutura química dos isoxazóis sintetizados, assim como o tempo reacional e o rendimento obtido.

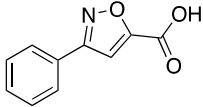
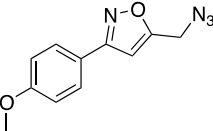
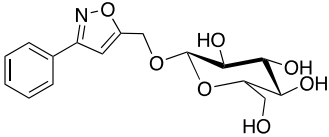
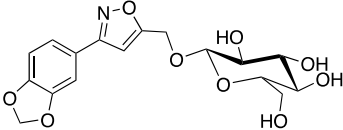
Tabela 5. Derivados isoxazóis sintetizados e os seus rendimentos

		Micro-ondas		Tradicional	
		T (min)	%	T (h)	%
34		11	77	4	72
40		11	56	5	52
41		11	55	6	50
42		11	38	5	47
43		11	42	5	36
44		11	56	5	67
45		11	52	5	47
46		11	52	5	45
47		11	50	5	51

		Micro-ondas		Tradicional	
		T (min)	%	T (h)	%
48		11	40	5:30	42
49		11	20	5:30	22
50		11	22	5:30	18
51		11	50	5	49
52		-	-	5	42
53		11	54	5	40
54		11	48	6	46

Visando aumentar a diversidade estrutural da série de análogos até então obtida, o composto **34** foi derivatizado dando origem ao composto **55**, através de oxidação com reagente de Jones; o composto **40** deu origem ao composto **56**, através de proteção seguida por reação com azida de sódio, sob irradiação micro-ondas; e os compostos **53** e **54** foram desprotegidos dando origem aos compostos **57** e **58**. A estrutura química dos derivados está apresentada na tabela 6.

Tabela 6. Compostos derivados sintetizados

		Rendimento %
55		82
56		90
57		94
58		84

De forma geral, todos os derivados foram obtidos com rendimentos semelhantes, tanto quando sintetizados sob irradiação micro-ondas como quando sintetizados pela metodologia tradicional. No entanto, a radiação de micro-ondas permitiu a diminuição no tempo reacional, o que possibilitou a síntese de novos derivados de forma mais rápida.

Quanto a estrutura química, os derivados isoxazóis sintetizados possuem: substituinte alifático na posição originalmente substituída por um anel aromático nas lignanas naturais (compostos **34**, **40-44**); grupos substituintes retiradores de elétrons (compostos **42-43**, **48-49**); derivados sem substituintes em um dos anéis aromáticos (compostos **34**, **45**, **51**, **52**, **53**, **55**, **57**); glicosídeos protegidos (compostos **53-54**) e não protegidos (compostos **57-58**), entre outros. Esta variedade química foi importante para avaliação da relação estrutura-atividade após a avaliação das atividades tripanocida e leishmanicida dos compostos.

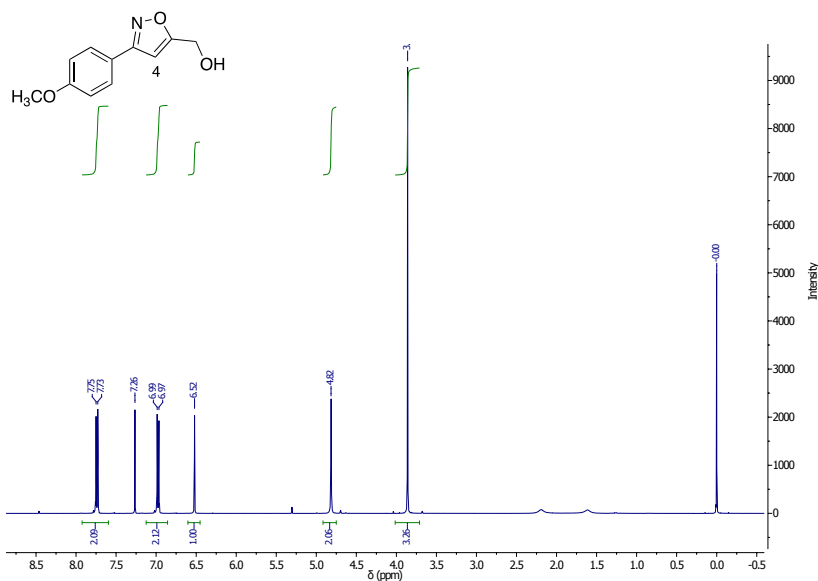
Após o isolamento dos derivados, as estruturas químicas foram confirmadas através de análises de ^1H RMN, ^{13}C RMN e espectrometria de massas. Quando necessário, análise de espectroscopia no

infravermelho também foi empregada. A elucidação estrutural será exemplificada, abaixo, através dos dados obtidos para o composto **40**.

No espectro de ^1H RMN (figura 12) é possível observar em $\delta=6,52$ um singlete integrando para 1 hidrogênio, referente ao hidrogênio presente na posição 4 do anel isoxazol. Devido a aspectos eletrônicos e de anisotropia magnética, esse hidrogênio do heterociclo encontra-se em campo mais desblindado do que um hidrogênio em posição equivalente em um anel saturado ou homocíclico se encontraria. Na região aromática do espectro, dois dupletos em $\delta=7,74$ e $\delta=6,98$, integrando para 2H cada, com $J= 9,1$ Hz, são referentes ao anel aromático 1,4-dissubstituído do composto. Outros dois simpletos, em $\delta=4,82$ (2H) e $\delta=3,86$ (3H) são visualizados no espectro e referem-se ao metileno e a metoxila presentes na estrutura química, respectivamente.

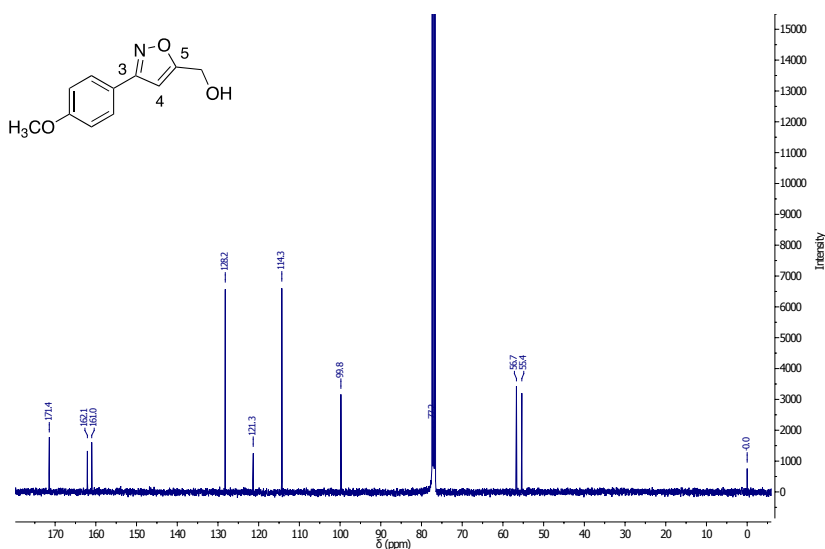
O sinal referente ao hidrogênio 4 do anel isoxazol foi visualizado entre $\delta=6,52$ e $\delta=7,25$ no espectro de ^1H RMN de todos os compostos sintetizados.

Figura 12. Espectro de ^1H RMN do composto **40**, 5-hidroximetil-3-(4-metoxifenil)-isoxazol (CDCl_3 , 400 MHz)



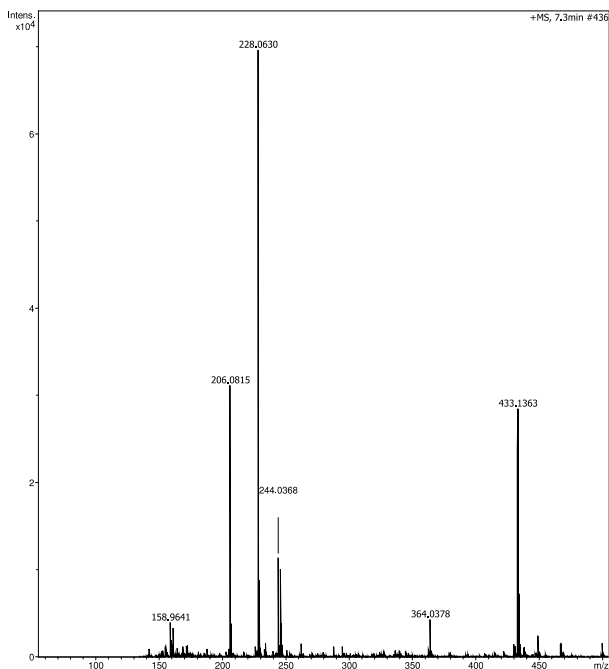
No espectro de ^{13}C RMN (figura 13) do composto **40**, destacam-se os sinais em 171,4; 162,1 e 99,8 ppm que se referem aos carbonos do anel isoxazol da molécula. Novamente, a localização dos sinais em campo desblindado justifica-se devido aos efeitos eletrônicos e de anisotropia magnética. O sinal ressonando em 171,4 pertence ao carbono 5 do anel isoxazol, e o fato de estar localizado ao lado de um átomo de oxigênio contribui para o seu deslocamento químico ser mais elevado que o do carbono 3 (162,1 ppm).

Figura 13. Espectro de ^{13}C RMN do composto **40**, 5-hidroximetil-3-(4-metoxifenil)-isoxazol (CDCl_3 , 400 MHz)



No espectro de massas de alta resolução (ESI-TOF) do composto (figura 14), foram observados picos intensos em m/z 206,0815 ($[\text{M}+\text{H}]^+$ calculado para $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{NO}_3 = 206,0812$); 228,0630 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$ calculado para $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{NO}_3\text{Na} = 228,0631$); 244,0368 ($[\text{M}+\text{K}]^+$ calculado para $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{NO}_3\text{K} = 244,0371$) e 433,1363 ($[\text{2M}+\text{Na}]^+$ calculado para $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_6\text{Na} = 433,1370$). Nas condições utilizadas na análise, o padrão de fragmentação da molécula não foi observado. No entanto, os dados obtidos em combinação com os espectros de RMN permitiu a confirmação da estrutura química com a fórmula $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{NO}_3$.

Figura 14. Espectro de massas de alta resolução do composto **40**, 5-hidroxiometil-3-(4-metoxifenil)-isoxazol (HRMS ESI-TOF, Metanol)



Os espectros obtidos para a elucidação estrutural dos demais compostos sintetizados são apresentados na seção de anexos.

4.2. Avaliação biológica dos derivados isoxazóis

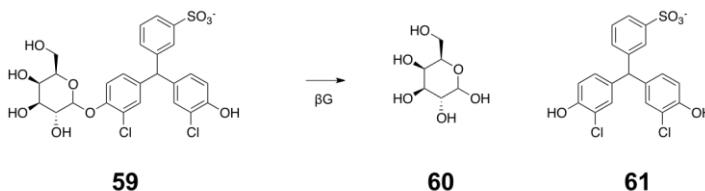
Uma vez sintetizados e caracterizados, os derivados **34** e **40-58** foram avaliados quanto a inibição de crescimento das formas tripomastigotas de *T. cruzi* e amastigotas intracelulares de *T. cruzi* e *L. amazonensis*. Enquanto a forma evolutiva tripomastigota é a forma infectante do parasita, os amastigotas intracelulares são as formas evolutivas predominantes quando as doenças se encontram na fase crônica. Considerando que atualmente não existem tratamentos eficazes para pacientes que se encontram na fase crônica da doença de Chagas e leishmaniose, é extremamente relevante a busca de uma nova entidade química que atue em amastigotas intracelulares.

O ensaio na forma tripomastigota foi realizado em parceria com o grupo do Dr. André Gustavo Tempone Cardoso no Instituto Adolfo Lutz, enquanto os ensaios na forma amastigota foram realizados no Laboratório de Protozoologia (MIP/UFSC) pela Dra. Milene Höehr de Moraes, sob supervisão do Prof. Dr. Mário Steindel. Devido à oportunidade de acompanhar os testes realizados no Laboratório de Protozoologia, a técnica de avaliação da inibição de crescimento parasitário padronizada pelo laboratório será discutida nesta dissertação.

As cepas Tulahuen de *T. cruzi* e MHOM/BR/77/LTB0016 de *L. amazonensis*, utilizadas nos ensaios, foram transfectadas com a enzima β -galactosidase de *Escherichia coli*, capaz de clivar galactosídeos, liberando galactose e a aglicona correspondente. Após incubação com os compostos por 48 horas, o meio de cultura é retirado, as células lavadas e incubadas novamente com o β -D-galactopiranosídeo do vermelho de clorofenol (composto **59**, CPRG) por 16 horas.

Na presença de parasitas viáveis, o CPRG é clivado pela β -galactosidase liberando galactose (composto **60**) e vermelho de clorofenol (composto **61**), que possui uma coloração vermelha e absorção em 570/630 nm (esquema 4). Dessa forma, a absorção nestes comprimentos de onda é proporcional à quantidade de parasitas viáveis no meio, permitindo o cálculo da porcentagem de inibição de crescimento causados pelos compostos, em comparação com o controle negativo e a curva analítica do método.

Esquema 4. Clivagem de **59** catalisada pela β -galactosidase



4.3. Avaliação da atividade tripanocida

Após os ensaios biológicos em *T. cruzi* constatou-se que nenhum dos compostos foi ativo na forma evolutiva tripomastigota, no entanto, resultados promissores foram constatados em amastigotas intracelulares.

Estes resultados estão apresentados na tabela 7. Os compostos que inibiram em mais de 50% o crescimento do parasita (%IC, a 100 μM) tiveram seus valores IC_{50} (concentração inibitória do crescimento de 50% dos parasitas) e CC_{50} (concentração inibitória do crescimento de 50% das células THP-1) determinados de forma a obter o índice de seletividade (IS).

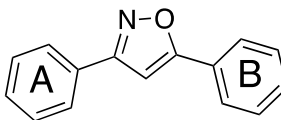
Tabela 7. Inibição de crescimento em *T. cruzi*

	Amastigotas de <i>T. cruzi</i>			
	%IC	IC_{50} (μM)	CC_{50} (μM)	IS
34	7,57 ($\pm 0,06$)	>100	ND	-
40	9,32 ($\pm 0,49$)	>100	ND	-
41	NA	ND	ND	-
42	8,27 ($\pm 0,54$)	>100	ND	-
43	12,17 ($\pm 0,86$)	>100	ND	-
44	1,95 ($\pm 0,06$)	>100	ND	-
45	7,01 ($\pm 1,62$)	>100	ND	-
46	5,77 ($\pm 0,06$)	>100	ND	-
47	14,15 ($\pm 1,02$)	>100	ND	-
48	10,57 ($\pm 1,41$)	>100	ND	-
49	15,86 ($\pm 1,49$)	>100	ND	-
50	65,04 ($\pm 4,55$)	5,26 ($\pm 0,96$)	70,18 ($\pm 14,94$)	13,3
51	72,97 ($\pm 2,58$)	90,39 ($\pm 14,49$)	407,2 ($\pm 88,2$)	4,5
52	29,40 ($\pm 2,21$)	>100	ND	-
53	1,16 ($\pm 1,00$)	>100	ND	-
54	3,15 ($\pm 1,13$)	>100	ND	-
56	60,35 ($\pm 4,64$)	NA	<15.6	-
55	NA	ND	ND	-
57	7,30 ($\pm 0,40$)	>100	ND	-
58	2,93 ($\pm 0,32$)	>100	ND	-
Bnz	85.94 (± 1.29)	10.18 (± 0.3)	> 500	> 49.1

Os resultados são expressos como média \pm DP de um ensaio em triplicata. %IC: porcentagem de inibição do crescimento parasitário; IC_{50} : concentração inibitória do crescimento de 50% dos parasitas; CC_{50} : concentração inibitória do crescimento de 50% das células THP-1; IS: índice de seletividade; NA: atividade não observada na concentração testada; ND: valor não determinado; Bnz: benznidazol.

As características químicas dos compostos serão discutidas se referindo aos anéis aromáticos como “anel A” e “anel B”, conforme indicado na figura 15.

Figura 15. Nomenclatura adotada para os anéis aromáticos



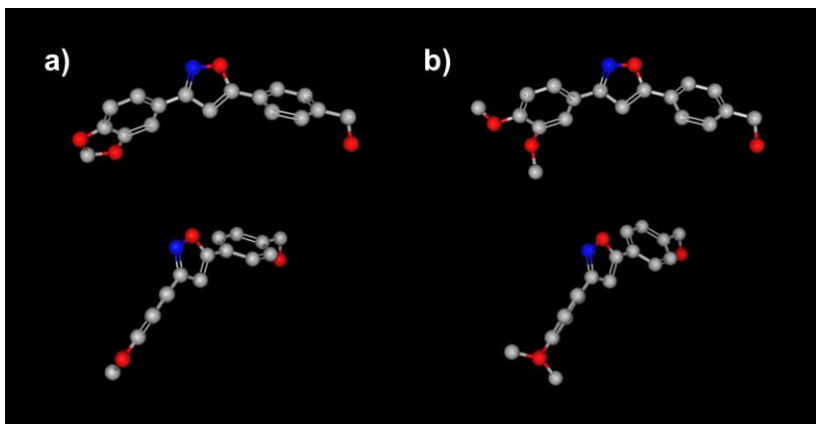
Observa-se que todos os compostos, com exceção dos compostos **41** e **56**, apresentaram alguma influência sobre o crescimento de *T. cruzi*. Na série que possui apenas o anel aromático A ligado ao anel isoxazol (compostos **34**, **40-44**), foi possível observar que a presença de substituintes na posição *-para* (compostos **40**, **42** e **43**) está associada a um aumento na inibição de crescimento em comparação ao composto sem nenhum substituinte (composto **34**). Entre estes, o composto substituído com o grupo nitro (composto **43**) foi o mais ativo. Já, quando os compostos desta série são substituídos na posição 3 e 4 do anel A, a atividade tripanocida é eliminada (composto **41**) ou então apresenta uma redução de aproximadamente 3 vezes (composto **44**).

Na série de compostos substituídos com os anéis aromáticos A e B (compostos **45-52**), com exceção do composto **46** que apresentou diminuição na atividade tripanocida quando substituído com o grupo metoxi (-OCH₃), a presença de substituintes no anel A contribuiu para o aumento da atividade biológica quando comparado com o composto sem nenhuma substituição no anel A (composto **45**). Também, os compostos **50** e **51** inibiram o crescimento do parasita em mais de 50%, apresentando valores de IC₅₀ de 5,26 e 90,39 μM, respectivamente. Os índices de seletividade calculados com base na citotoxicidade e atividade biológica também mostram que os compostos apresentam seletividade de ação para o parasita.

Quanto ao composto **50**, a presença do grupo metilenodioxí (-OCH₂O-) ligado nas posições 3 e 4 do anel aromático A parece exercer uma função importante na atividade biológica, pois ela diminui drasticamente quando essa porção da molécula é removida (composto **45**). É interessante notar que a substituição do grupamento metilenodioxí por duas metoxilas (composto **47**) também leva à redução da atividade biológica. Ambos os compostos **47** e **50** possuem área superficial e características químicas semelhantes, porém a avaliação das

estruturas tridimensionais revelou que a conformação mais estável das duas moléculas é levemente diferente. Esta diferença conformacional deve-se ao impedimento estérico causado pelas metilas dos grupos metoxi e possivelmente está relacionada com a redução da atividade biológica (figura 16).

Figura 16. Diferenças na conformação entre os compostos 50 (a) e 47 (b)



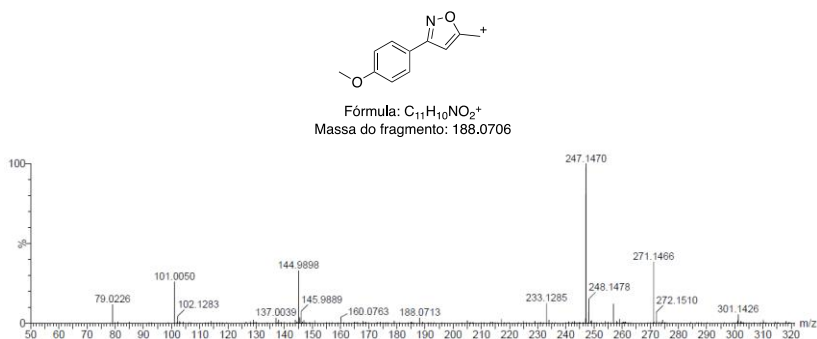
As conformações foram calculadas usando o software Marvin Suite (versão 16.4.25.0, 2016, <http://chemaxon.com/>).

Quanto ao composto **51**, o grupo amina ($-\text{NH}_2$) no anel aromático B parece ser importante para a atividade biológica. Ele trata-se de grupamento de caráter básico e pode agir como doador e acceptor de ligação de hidrogênio. Quando este grupamento é removido (composto **52**) ou substituído por outro grupo funcional com característica doadora e acceptora de ligação de hidrogênio ($-\text{CH}_2\text{OH}$, composto **45**), há diminuição da atividade biológica, sugerindo a importância da amina para a atividade.

Os compostos glicosídicos **53**, **54**, **57** e **58** não apresentaram uma atividade promissora na forma amastigota de *T. cruzi*, assim como o composto substituído com um ácido carboxílico (composto **55**). O composto **56**, substituído com um grupo funcional azida ($-\text{N}_3$), apresentou uma inibição de crescimento elevada na triagem de atividade biológica (60,35%), no entanto, quando o ensaio foi reproduzido para o cálculo do IC_{50} a atividade foi perdida. Uma análise por HRMS (figura

17) da solução estoque utilizada para o ensaio revelou um pico intenso em $m/z = 247,1470$ que pode ser decorrente da oxidação do composto **56** ($[M+O+H]^+$ calculado para $C_{11}H_{11}N_4O_3 = 247,0826$). Um sinal referente a molécula cationizada ($[M+H]^+$) não foi observado, no entanto a presença de um pico com $m/z 188,0713$, referente ao fragmento apresentado na figura 17, sugere que a oxidação tenha ocorrido na porção azida da molécula. Dessa forma, a instabilidade do composto quando em solução pode ter causado a perda da atividade biológica.

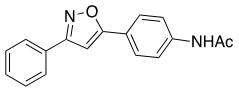
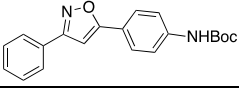
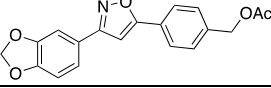
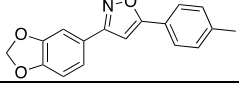
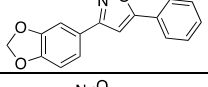
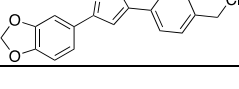
Figura 17. Espectro de massas da solução estoque do composto **56** (ESIMS, Metanol)



4.4. Obtenção de novos derivados isoxazóis com base nos resultados de atividade tripanocida

Considerando que os compostos **50** e **51** apresentaram os resultados de atividade mais promissores, estes foram selecionados como base para serem modificados quimicamente. Estas modificações visaram alterar características estruturais e químicas dos compostos, como a basicidade, e verificar como isto reflete em suas atividades biológicas. A síntese destes novos análogos foi realizada conforme a metodologia (b) descrita no início desta sessão; as estruturas químicas e os resultados da avaliação de atividade tripanocida em amastigotas intracelulares de *T. cruzi* estão apresentados na tabela 8, abaixo.

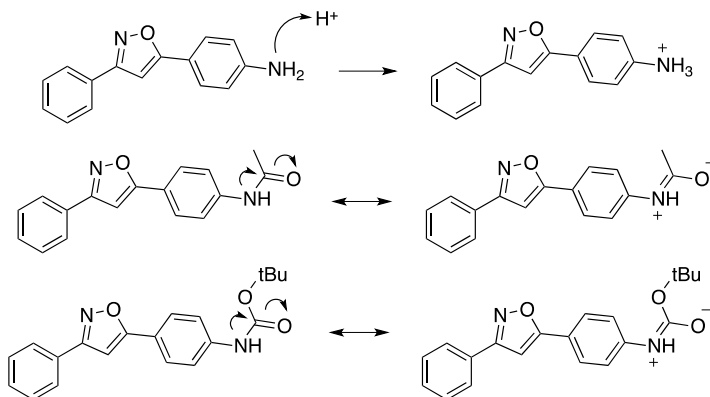
Tabela 8. Compostos 62-67 e sua avaliação tripanocida

		Rendimento %	Amastigotas de <i>T. cruzi</i>			
			%IC	IC ₅₀ (μM)	CC ₅₀ (μM)	IS
62		19	NA	ND	ND	-
63		48	NA	ND	ND	-
64		28	47,59 (±4,00)	23,21 (±3,19)	>500	>21,5
65		26	81,65 (±3,53)	1,74 (±0,41)	81,32 (±9,74)	46,7
66		29	64,77 (±3,54)	23,02 (±6,94)	>500	>21,7
67		94	95,75 (±0,31)	1,13 (±0,39)	181,8 (±25,9)	160,9
Bnz			85.94 (±1.29)	10.18 (±0.3)	> 500	> 49.1

Os resultados são expressos como média ± DP de dois ensaios independentes em triplicata. %IC: porcentagem de inibição do crescimento parasitário; IC₅₀: concentração inibitória do crescimento de 50% dos parasitas; CC₅₀: concentração inibitória do crescimento de 50% das células THP-1; IS: índice de seletividade; NA: atividade não observada na concentração testada; ND: valor não determinado; Bnz: benzimidazol.

Os compostos **62** e **63** são derivados diretos do composto **51** e não apresentaram nenhuma atividade inibitória do crescimento em *T. cruzi*. A acetilação (composto **62**) e adição do grupo funcional carbamato (composto **63**) levam a compostos que não apresentam mais caráter básico, visto que o par de elétrons livre do nitrogênio estará deslocalizado na carbonila resultando em híbridos de ressonância. Dessa forma, a captura de um próton para ionizar a molécula não é mais possível (figura 18).

Figura 18. Comparação entre a disponibilidade do par de elétrons dos compostos **51**, **62** e **63**



Já os compostos **64-67**, são derivados do composto **50**. A acetilação (composto **64**) ou remoção do grupo funcional metileno-hidroxí (composto **66**) foi acompanhada pela diminuição de cerca de quatro vezes na atividade biológica quando comparado com o composto **50**. A substituição do grupo metileno-hidroxí por uma metila (composto **65**) ou por um grupo cloro-metileno (composto **67**) foi responsável por um aumento de cinco vezes na atividade, quando comparado com o composto **50**. O índice de seletividade dos compostos **65** e **67** também é superior (6 a 12 vezes) ao do composto **50**, o que combinado com a IC_{50} representa uma evolução na eficácia dos compostos. É importante ressaltar que os compostos **50**, **65** e **67** apresentaram na avaliação *in vitro* atividade superior à do benznidazol, que é o fármaco atualmente utilizado no Brasil para o tratamento da doença de Chagas.

Propriedades físico-químicas dos compostos, como logP, pKa, área superficial e número de doadores e aceptores de ligação de hidrogênio foram calculadas de forma a auxiliar na relação entre estrutura química e atividade biológica. Ao comparar estes dados, observou-se que os compostos **50**, **65** e **67**, possuem uma área de superfície de Van der Waals semelhante. Os compostos **66** e **64**, por sua vez, possuem uma área de superfície menor e maior, respectivamente. Dessa forma, supõe-se que a atividade tripanocida destes compostos pode ser dependente de dois anéis aromáticos substituindo o anel isoxazol nas posições 3 e 5, além da área superficial das moléculas. A presença do anel metilenodioxí favorece a atividade biológica nestes compostos, visto que análogos sem este grupo não são ativos. Como os compostos são estruturalmente semelhantes, supõe-se que a sua atuação se dá por um mesmo mecanismo de ação em um determinado alvo molecular. Dessa forma, os compostos **50**, **65** e **67**, apresentam características químicas e uma área superficial adequada para interagir com este alvo, enquanto os compostos **66** e **64** não possuem tanta afinidade pelo mesmo.

4.5. Avaliação da atividade leishmanicida

As leishmanioses ocupam o terceiro lugar no ranking de mortes por doenças negligenciadas no Brasil. Um dos fatores que limita o controle destas doenças é a falta de tratamentos seguros e eficazes contra o parasita. Considerando a relevância da identificação de novas entidades químicas ativas contra *Leishmania sp.*, os compostos **34**, **40-58** e **62-67** também foram avaliados quanto a sua capacidade inibitória do crescimento de amastigotas intracelulares de *Leishmania amazonensis*. Os resultados estão apresentados na tabela 9, abaixo.

Tabela 9. Avaliação da atividade leishmanicida

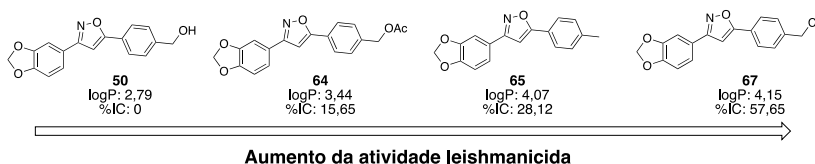
	Amastigotas de <i>L. amazonensis</i>			
	%IC	IC₅₀ (µM)	CC₅₀ (µM)	IS
34	NA	ND	ND	-
40	NA	ND	ND	-
41	NA	ND	ND	-
42	3,35 (±0,61)	> 100	ND	-
43	4,98 (±0,09)	> 100	ND	-
44	NA	ND	ND	-

	IC ₅₀ (μM)	CC ₅₀ (μM)	IS	%IC
45	NA	ND	ND	-
46	NA	ND	ND	-
47	NA	ND	ND	-
48	NA	ND	ND	-
49	NA	ND	ND	-
50	NA	ND	ND	-
51	NA	ND	ND	-
52	6,03 (±1,97)	>100	ND	-
53	2,06 (±0,02)	> 100	ND	-
54	2,05 (±1,09)	> 100	ND	-
55	NA	ND	ND	-
56	NA	ND	ND	-
57	4,57 (±0,18)	> 100	ND	-
58	3,82 (±0,51)	> 100	ND	-
62	NA	ND	ND	-
63	NA	ND	ND	-
64	15,65 (±8,29)	>100	ND	-
65	28,12 (±1,51)	>100	ND	-
66	NA	ND	ND	-
67	57,67 (±1,85)	5,08 (±1,31)	181,8 (±25,9)	35,8
AB	81,62 (±0,43)	ND	ND	ND

Os resultados são expressos como média ± DP de um ensaio em triplicata, exceto para o composto **67** o qual foi submetido a dois ensaios independentes em triplicata. %IC: porcentagem de inibição do crescimento parasitário; IC₅₀: concentração inibitória do crescimento de 50% dos parasitas; CC₅₀: concentração inibitória do crescimento de 50% das células THP-1; IS: índice de seletividade; NA: atividade não observada na concentração testada; ND: valor não determinado; Bnz: benznidazol.

Entre a série de compostos sintetizados, apenas os compostos **42**, **43**, **52**, **53**, **54**, **57** e **58**, **64**, **65** levaram a uma pequena porcentagem de inibição do crescimento parasitário, além do composto **67** que levou a uma porcentagem de inibição >50%. É interessante notar que a atividade entre os compostos derivados do composto **50** parece ser dependente dos seus valores de logP e da presença de substituição no anel aromático B (figura 19).

Figura 19. Influência do logP na atividade leishmanicida



O composto **50**, que deu origem a esta série, não possui atividade inibitória do crescimento de *L. amazonensis*, no entanto, os derivados **64**, **65** e **67** são mais ativos conforme o logP aumenta. O derivado **66** não apresenta atividade leishmanicida apesar de apresentar logP intermediário ao logP dos compostos **64** e **65** (logP= 3,66). Estruturalmente, este composto difere dos outros por não possuir uma substituição na posição *-para* do anel aromático B, o que pode sugerir que esta substituição exerce um papel importante para a atividade.

O valor de logP é diretamente proporcional à lipofilicidade dos compostos. Compostos lipofílicos podem cruzar barreiras biológicas de forma mais eficiente alcançando, então, os respectivos alvos moleculares para expressar a atividade biológica. A presença da substituição em *-para*, combinado com as outras características químicas dos compostos **64**, **65** e **67**, assim como com o logP pode representar uma combinação específica que proporciona atividade crescente aos derivados.

O composto **67** foi o composto que inibiu com maior intensidade o crescimento de *L. amazonensis*, apresentando o IC₅₀= 5,08 μM e IS= 35,8. O mesmo composto já havia sido identificado como o mais potente na avaliação tripanocida, demonstrando sua importância entre os compostos sintetizados e apresentados nesta dissertação.

4.6. Avaliação da atividade inibitória da tripanotiona redutase

A elucidação do mecanismo de ação de uma molécula bioativa é um dos passos após a identificação de uma atividade promissora. Diferentes alvos vêm sendo descritos como essenciais para os tripanossomatídeos, entre eles podemos destacar a cruzaina, algumas enzimas relacionadas à síntese do ergosterol, além de enzimas envolvidas no metabolismo da tripanotiona (FLOHÉ, 2012; LEPESHEVA, 2013; MARTINEZ-MAYORGA et al., 2015; NO, 2016; SKINNER-ADAMS et al., 2016).

Entre as enzimas relacionadas à tripanotona estão a glutationilpermidina sintetase (EC 6.3.1.8), tripanotona sintetase (EC 6.3.1.9) e tripanotona redutase (EC 1.8.1.12). A tripanotona redutase é a enzima responsável pela redução da tripanotona após esta ser utilizada no metabolismo aeróbico dos parasitas. Uma vez inibida, ocorre uma depleção intracelular deste metabólito e os parasitas tornam-se susceptíveis aos efeitos deletérios das espécies reativas de oxigênio (LEROUX; KRAUTH-SIEGEL, 2015; MANTA et al., 2013).

A tripanotona, encontrada nos parasitas, foi descrita inicialmente em 1985 como um análogo à glutatona encontrada nas células humanas (FAIRLAMB et al., 1985), no entanto o mecanismo de ação dependente de uma redutase própria foi descrito somente no ano seguinte (SHAMES et al., 1986). Em 2000, foi demonstrado que tripanossomatídeos *knock-out* para a tripanotona redutase são mais sensíveis ao stress oxidativo, além de apresentarem virulência reduzida (KRIEGER et al., 2000). Desde então, o interesse na busca de inibidores da tripanotona redutase vem crescendo e diferentes classes já foram descritas na literatura com atividade promissora (HOLLOWAY et al., 2009; KUMAR; ALI; BAWA, 2014; LO PRESTI et al., 2015; MARTYN et al., 2007; RIVAROLA; PAGLINI-OLIVA, 2002; WALTON et al., 2011).

Considerando a importância da tripanotona redutase como alvo molecular no desenvolvimento de uma nova terapia para tratamento da doença de Chagas e leishmaniose, os compostos mais promissores descritos neste trabalho ($IC_{50} < 10 \mu M$, compostos **50**, **65** e **67**) também foram avaliados quanto ao potencial inibitório da enzima. Entre os compostos, o composto **67** foi ativo tanto em *T. cruzi* quanto em *L. amazonensis*, o que pode sugerir que esta ação seja dependente de um alvo comum a ambos os parasitas, como a tripanotona redutase.

No entanto, no ensaio realizado, os compostos não inibiram a enzima ($IC_{50} > 100 \mu M$), indicando que a ação tripanocida e leishmanocida dos compostos não ocorre via inibição da tripanotona redutase. Neste sentido, outros testes serão necessários para determinar o tipo de morte parasitária causada pelos compostos, assim como as vias metabólicas que possam estar envolvidas nesta morte. Uma vez determinado o alvo molecular responsável pela ação dos compostos isoxazóis, novas moléculas poderão ser planejadas visando aumentar potência e seletividade de ação.

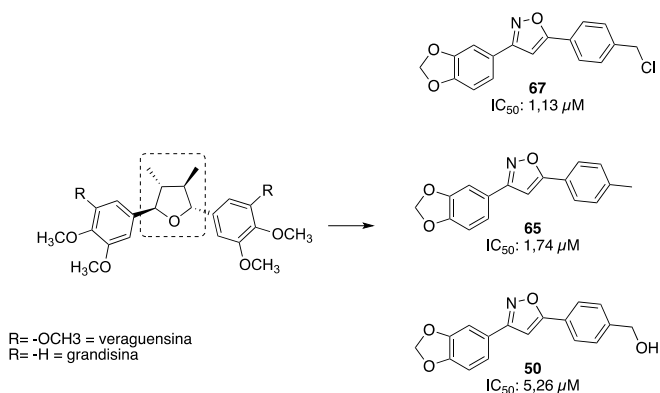
PERSPECTIVAS

5. Considerações finais e perspectivas

Moléculas bioativas oriundas de fontes naturais vem sendo usadas como protótipos para o desenvolvimento de novos compostos com características químicas e biológicas desejáveis. As lignanas, grandisina e veraguensina, possuem atividade antiparasitária já descrita e, aqui, propomos o bioisosterismo como uma estratégia de modificação química visando obter novas moléculas baseadas nestas estruturas.

O bioisosterismo de anéis é descrito na literatura como uma estratégia eficaz para a obtenção de novos compostos com estrutura química diversificada. A utilização do anel isoxazol como um bioisótero do anel tetrahydrofurano presente nas lignanas demonstrou ser uma estratégia viável, visto que entre os análogos propostos, 6 deles mostraram valor de $IC_{50} < 100 \mu M$. Destes análogos ativos, 3 apresentaram $IC_{50} < 10 \mu M$ sendo, assim, mais ativos *in vitro* contra a forma amastigota intracelular de *T. cruzi* que o fármaco de uso clínico, o benzonidazol.

Figura 20. Três dos análogos das lignanas naturais, com potente atividade biológica



A identificação de uma molécula (composto **67**) ativa tanto contra amastigotas de *T. cruzi* como de *L. amazonensis* é bastante interessante, visto que as doenças causadas por ambos parasitos possuem poucas opções de tratamento, especialmente para a forma crônica da doença de Chagas. Neste sentido, o composto **67** pode ser definido como um *hit*,

que poderá servir de base na busca de novas moléculas ativas contra estes tripanossomatídeos.

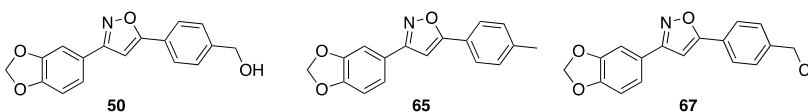
O índice de seletividade do composto **67** (IS= 34-161) também demonstra a baixa toxicidade *in vitro* para células não infectadas. A literatura traz diversos protocolos para o *screening* de moléculas bioativas contra *T. cruzi* e *Leishmania sp.*, e o alto índice de seletividade é um pré-requisito para que o composto possa ser encaminhado para as próximas etapas de desenvolvimento pré-clínico, como os testes de toxicidade *in vivo* (KATSUNO et al., 2015; NWAKA; HUDSON, 2006; NWAKA et al., 2009; ROMANHA et al., 2010).

Além disso, ainda é necessário investigar o mecanismo pelo qual os compostos isoxazóis levam à morte parasitária. A identificação de um alvo molecular, ou rota metabólica, responsável pela ação é importante do ponto de vista do planejamento racional de moléculas bioativas. Pois dessa forma, propriedades químicas e físico-químicas podem ser aprimoradas em novos derivados visando aumentar a potência e seletividade destas moléculas. Embora a avaliação da inibição de crescimento do parasito *in vitro* continua sendo uma etapa importante no desenvolvimento de novas moléculas é importante considerar que a identificação do alvo molecular é de importância central para o desenvolvimento racional de novos compostos tripanocidas e leishmanicidas.

CONCLUSÕES

6. Conclusões

- 26 compostos isoxazóis 3,5-dissubstituídos foram sintetizados com base na estrutura química das lignanas grandisina e veraguensina, com rendimentos variando entre 18% e 77%. 14 destes compostos estão sendo descritos na literatura pela primeira vez.
- A reação cicloadição 1,3-dipolar para a obtenção destes derivados pode ser adaptada num procedimento sob irradiação micro-ondas, levando à obtenção dos isoxazóis em 11 minutos diferente do método tradicional que levava em média 5 horas.
- Os compostos sintetizados foram avaliados quanto sua ação nas formas tripomastigotas e amastigotas de *T. cruzi* e amastigotas de *Leishmania amazonensis*. Ao final do trabalho, seis foram identificados como ativos em amastigotas de *T. cruzi* com $IC_{50} < 100 \mu M$, e um ativo em amastigotas *L. amazonensis* com $IC_{50} = 5,08 \mu M$.
- Aspectos básicos da relação-estrutura atividade dos compostos puderam ser discutidos, e novos derivados bioativos foram sintetizados. Incluindo análogos com atividade superior à do fármaco benznidazol em *T. cruzi* ($IC_{50} < 10 \mu M$, compostos **50**, **65** e **67**).



- O composto **67** apresentou atividade e seletividade de ação tanto em *T. cruzi* como em *L. amazonensis*, sendo o mais promissor da série.
- Nenhum dos compostos avaliados apresentou-se ativo contra as formas tripomastigotas de *T. cruzi*, assim como nenhum foi ativo como inibidor da enzima tripanotona redutase.

REFERÊNCIAS

7. Referências

AKHOUNDI, M. et al. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 3, p. e0004349, 2016.

ANASTAS, P. T.; WARNER, J. C. **Green Chemistry: Theory and Practice**. [s.l.] Oxford University Press, 1998.

ANDREWS, K. T.; FISHER, G.; SKINNER-ADAMS, T. S. Drug repurposing and human parasitic protozoan diseases. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 4, n. 2, p. 95–111, 2014.

ARGOLO, A. M. et al. **Doença de Chagas e seus principais vetores no Brasil**Instituto Oswaldo Cruz. [s.l.: s.n.].

BERMUDEZ, J. et al. Current drug therapy and pharmaceutical challenges for Chagas disease. **Acta Tropica**, v. 156, p. 1–16, 2016.

BERNARDES, L. S. C. et al. Synthesis and trypanocidal activity of 1,4-bis-(3,4,5-trimethoxy-phenyl)-1,4-butanediol and 1,4-bis-(3,4-dimethoxyphenyl)-1,4-butanediol. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 14, p. 7075–7082, 2006.

BOND, C. S. et al. Crystal structure of Trypanosoma cruzi trypanothione reductase in complex with trypanothione, and the structure-based discovery of new natural product inhibitors. **Structure**, v. 7, n. 1, p. 81–89, jan. 1999.

BROUGHTON, H. B.; WATSON, I. A. Selection of heterocycles for drug design. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 23, n. 1, p. 51–58, 2004.

BUCKNER, F. S. et al. Efficient Technique for Screening Drugs for Activity against Trypanosoma cruzi Using Parasites Expressing b-Galactosidase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, n. 11, p. 2592–2597, 1996.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **American Trypanosomiasis - Biology**. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>>. Acesso em: 4 maio. 2016a.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Leishmaniasis - Biology**. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>>. Acesso em: 4 maio. 2015b.

CHATELAIN, E. Chagas Disease Drug Discovery: Toward a New Era. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 20, n. 1, p. 22–35, 2015.

CHATELAIN, E.; IOSET, J. R. Drug discovery and development for neglected diseases: The DNDi model. **Drug Design, Development and Therapy**, p. 175–181, 2011.

CIAPETTI, P.; GIETHLEN, B. Chapter 15 - Molecular Variations Based on Isosteric Replacements A2 - Wermuth, Camille Georges BT - The Practice of Medicinal Chemistry (Third Edition). In: New York: Academic Press, 2008. p. 290–342.

COLLINS, J. M.; LEADBEATER, N. E. Microwave energy: a versatile tool for the biosciences. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 5, n. 8, p. 1141–1150, 2007.

COLOMBO, M.; PERETTO, I. Chemistry strategies in early drug discovery: an overview of recent trends. **Drug Discovery Today**, v. 13, n. 15-16, p. 677–84, ago. 2008.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural Products: A Continuing Source of Novel Drug Leads. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1830, n. 6, p. 3670–3695, 18 jun. 2013.

DE ANDRADE, P. et al. 1,2,3-Triazole-based analogue of benzimidazole displays remarkable activity against *Trypanosoma cruzi*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 23, n. 21, p. 6815–6826, 2015.

DE MORAIS, C. G. V. et al. The Dialogue of the Host-Parasite Relationship: *Leishmania* spp. and *Trypanosoma cruzi* Infection. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1–19, 2015.

DI PROCOLO, P.; JOMMI, C. Current Pipelines for Neglected Diseases. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 9, 2014.

DUNN, P. J. The importance of Green Chemistry in Process Research and Development. **Chemical Society Reviews**, v. 41, n. 4, p. 1452, 2012.

EDER, J.; SEDRANI, R.; WIESMANN, C. The discovery of first-in-class drugs: origins and evolution. **Nature Reviews. Drug discovery**, v. 13, n. 8, p. 577–587, 2014.

FAIRLAMB, A. et al. Trypanothione: a novel bis (glutathionyl) spermidine cofactor for glutathione reductase in trypanosomatids. **Science**, p. 1485–1487, 1985.

FLOHÉ, L. The trypanothione system and the opportunities it offers to create drugs for the neglected kinetoplast diseases. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 1, p. 294–301, 2012.

GANESAN, A. The impact of natural products upon modern drug discovery. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 12, n. 3, p. 306–317, 2008.

GIACOMELLI, G.; DE LUCA, L.; PORCHEDDU, A. A method for generating nitrile oxides from nitroalkanes: A microwave assisted route for isoxazoles. **Tetrahedron**, v. 59, p. 5437–5440, 2003.

GRAEBIN, C. S. et al. Antiprotozoal Agents: An Overview. **Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry**, v. 8, p. 345–366, 2009.

GROUNDWATER, P. W. Preparation and reactivity of some stable nitrile oxides and nitrones. **Arkivoc**, v. 2000, n. v, p. 684–697, 2000.

GRUNDMANN, C.; DEAN, M. Nitrile Oxides. V. Stable Aromatic Nitrile Oxides. **Stable Aromatic Nitrile Oxide**, v. 30, n. August, p. 2809–2812, 1965.

HAIPOUR, A. . R.; RAFIEE, F.; RUOHO, A. E. A rapid and convenient method for the synthesis of aldoximes under microwave irradiation using in situ generated ionic liquids. **Journal of the Iranian Chemical Society**, v. 7, n. 1, p. 114–118, 2010.

HANDLER, M. Z. et al. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: Clinical perspectives. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 73, n. 6, p. 897–908, 2015.

HANSEN, T. V; WU, P.; FOKIN, V. V. One-Pot Copper(I) -Catalyzed Synthesis of 3,5-Disubstituted Isoxazoles. **Journal of Organic Chemistry**, n. 1, p. 7761–7764, 2005.

HARVEY, A. L.; EDRADA-EBEL, R.; QUINN, R. J. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 14, n. 2, p. 111–129, 2015.

HAYES, B. L. **Microwave Synthesis: Chemistry at the speed of light**. Matthews, NC: CEM Publishing, 2002.

HIMO, F. et al. Copper(I)-catalyzed synthesis of azoles. DFT study predicts unprecedented reactivity and intermediates. **Journal of the American Chemical Society**, v. 127, n. 1, p. 210–216, 2005.

HOLLOWAY, G. A. et al. Trypanothione reductase high-throughput screening campaign identifies novel classes of inhibitors with antiparasitic activity. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 7, p. 2824–2833, 2009.

HOTEZ, P. J. et al. The Global Burden of Disease Study 2010: Interpretation and Implications for the Neglected Tropical Diseases. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 7, 2014.

HOTEZ, P. J.; FUJIWARA, R. T. Brazil's neglected tropical diseases: an overview and a report card. **Microbes and Infection**, v. 16, n. 8, p. 601–606, 2014.

HUISGEN, R. Centenary Lecture - 1,3-Dipolar Cycloadditions. **Proceedings of the Chemical Society of London**, p. 357–396, 1961.

HUISGEN, R. Kinetics and Mechanism of 1,3-Dipolar Cycloadditions. **Angewandte Chemie International Edition in English**, v. 2, n. 11, p. 633–645, 1963.

IZUMI, E. et al. Natural products and Chagas' disease: a review of plant compounds studied for activity against *Trypanosoma cruzi*. **Natural Product Reports**, v. 28, n. 4, p. 809–823, 2011.

JAEGER, V.; COLINAS, P. A. Synthetic Applications of 1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry Toward Heterocycles and Natural Products. In: PADWA, A.; PEARSON, H. (Eds.). **Chemistry of Heterocyclic Compounds**. Hoboken: Wiley, 2002. p. 361–472.

KAPPE C O; DALLINGER D. The impact of microwave synthesis on drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 5, n. 1, p. 51–63, 2006.

KATSUNO, K. et al. Hit and lead criteria in drug discovery for infectious diseases of the developing world. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 14, n. 11, p. 751–8, 2015.

KHAN, M. O. F. Trypanothione reductase: a viable chemotherapeutic target for antitrypanosomal and antileishmanial drug design. **Drug Target Insights**, v. 2, n. 1999, p. 129–146, 2007.

KINGSTON, D. G. I. Modern Natural Products Drug Discovery and its Relevance to Biodiversity Conservation. **Journal of Natural Products**, v. 74, n. 3, p. 496–511, 25 mar. 2011.

KLUG, D. M.; GELB, M. H.; POLLASTRI, M. P. Repurposing strategies for tropical disease drug discovery. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 26, n. 11, p. 2569–2576, 2016.

KRAUTH-SIEGEL, R. L.; COMINI, M. A. Redox control in trypanosomatids, parasitic protozoa with trypanothione-based thiol metabolism. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1780, p. 1236–1248, 2008.

KRIEGER, S. et al. Trypanosomes lacking trypanothione reductase are avirulent and show increased sensitivity to oxidative stress. **Molecular Microbiology**, v. 35, n. 3, p. 542–552, 2000.

KRYSHCHYSHYN, A. et al. Trends in research of antitrypanosomal agents among synthetic heterocycles. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 85, p. 51–64, 2014.

KUMAR, S.; ALI, M. R.; BAWA, S. Mini review on tricyclic compounds as an inhibitor of trypanothione reductase. **Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences**, India, 2014.

LANE, J. E. et al. In vitro trypanocidal activity of tetraethylthiuram disulfide and sodium diethylamine-N-carbodithioate on *Trypanosoma cruzi*. **American Journal of Tropical Medicine**, v. 55, n. 3, p. 263–6, 1996.

LEPESHEVA, G. I. Design or screening of drugs for the treatment of Chagas disease: what shows the most promise? **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 8, p. 1479–89, 2013.

LEROUX, A. E.; KRAUTH-SIEGEL, R. L. Thiol redox biology of trypanosomatids and potential targets for chemotherapy. **Molecular and**

Biochemical Parasitology, p. 1–8, 2015.

LIDSTRÖM, P. et al. Microwave assisted organic synthesis—a review. **Tetrahedron**, v. 57, n. 45, p. 9225–9283, 2001.

LO PRESTI, M. S. et al. Trypanothione reductase inhibitors: Overview of the action of thioridazine in different stages of Chagas disease. **Acta Tropica**, v. 145, p. 79–87, 2015.

LOPES, N. P. et al. Flavonoids and Lignans from *Virola surinamensis* Twigs and their in vitro Activity against *Trypanosoma cruzi*. **Planta Medica**, v. 64, n. 7, p. 667–669, 1998.

MANTA, B. et al. Trypanothione: A unique bis-glutathionyl derivative in trypanosomatids. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1830, n. 5, p. 3199–3216, 2013.

MARTINEZ-MAYORGA, K. et al. Cruzain inhibitors: efforts made, current leads and a structural outlook of new hits. **Drug Discovery Today**, v. 20, n. 7, p. 890–898, 2015.

MARTINS-MELO, F. R. et al. Mortality from neglected tropical diseases in Brazil, 2000 – 2011. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 94, n. October 2015, p. 103–110, 2016.

MARTINS, R. C. C. et al. Trypanocidal tetrahydrofuran lignans from inflorescences of *Piper solmsianum*. **Phytochemistry**, v. 64, n. 2, p. 667–670, 2003.

MARTYN, D. C. et al. High-throughput screening affords novel and selective trypanothione reductase inhibitors with anti-trypanosomal activity. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 17, p. 1280–1283, 2007.

MCKERROW, J. H. Recognition of the role of Natural Products as drugs to treat neglected tropical diseases by the 2015 Nobel prize in physiology or medicine. **Natural Product Reports**, v. 32, n. 12, p. 1610–1611, 2015.

MEANWELL, N. A. Synopsis of some recent tactical application of bioisosteres in drug design. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 54, n. 8, p. 2529–2591, 2011.

MONCAYO, Á.; SILVEIRA, A. C. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology,

surveillance and health policy. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. SUPPL. 1, p. 17–30, 2009.

MULLARD, A. US drug spending hits \$425 billion. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 15, n. 5, p. 299–299, 2016.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 3, p. 629–661, 2016.

NIHEI, K. Synthesis of trypanocidal tetrahydrofuran lignans. **Arkivoc**, v. 2004, n. vi, p. 112–126, 2004.

NO, J. H. Visceral leishmaniasis: Revisiting current treatments and approaches for future discoveries. **Acta Tropica**, v. 155, p. 113–123, 2016.

NWAKA, S. et al. Advancing drug innovation for neglected diseases - Criteria for lead progression. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 3, n. 8, 2009.

NWAKA, S.; HUDSON, A. Innovative lead discovery strategies for tropical diseases. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 5, n. October, p. 941–955, 2006.

OLIN-SANDOVAL, V.; MORENO-SÁNCHEZ, R.; SAAVEDRA, E. Targeting trypanothione metabolism in trypanosomatid human parasites. **Current Drug Targets**, v. 11, n. 1, p. 1614–1630, 2010.

OLIVEIRA FILHO, G. B. et al. Structural design, synthesis and pharmacological evaluation of 4-thiazolidinones against *Trypanosoma cruzi*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 23, n. 23, p. -, 2015.

PATRICK, D. A. et al. Synthesis and in vitro antiprotozoal activities of dicationic 3,5-diphenylisoxazoles. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 50, p. 2468–2485, 2007.

PATRICK, G. **An Introduction to Medicinal Chemistry**. 5. ed. [s.l.] Oxford University Press, 2013.

RAJANARENDAR, E. et al. Environmentally benign synthesis, molecular properties prediction and anti-inflammatory activity of novel isoxazolo[5,4-d]isoxazol-3-yl-aryl-methanones via vinylogous Henry nitroaldol adducts as synthons. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 25, n. 7, p.

1630–1634, 1 abr. 2015.

RIVAROLA, H. W.; PAGLINI-OLIVA, P. A. Trypanosoma cruzi trypanothione reductase inhibitors: phenothiazines and related compounds modify experimental Chagas' disease evolution. **Current Drug Targets. Cardiovascular & Haematological Disorders**, v. 2, n. 1, p. 43–52, jun. 2002.

ROFFEY, J. Bioisosteres in medicinal chemistry. **Maybridge MedChem**, v. 1, n. March, p. 23–44, 1997.

ROMANHA, A. J. et al. In vitro and in vivo experimental models for drug screening and development for Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 2, p. 233–238, 2010.

ROSTOVTSEV, V. V. et al. A stepwise huisgen cycloaddition process: Copper(I)-catalyzed regioselective “ligation” of azides and terminal alkynes. **Angewandte Chemie International Edition in English**, v. 41, n. 14, p. 2596–2599, 2002.

SATTERFIELD, B. A.; DAWES, B. E.; MILLIGAN, G. N. Status of vaccine research and development of vaccines for leishmaniasis. **Vaccine**, p. 10–13, 2016.

SCHAEFFER, L. Chapter 21 - The Role of Functional Groups in Drug–Receptor Interactions A2 - Wermuth, Camille Georges BT - The Practice of Medicinal Chemistry (Third Edition). In: New York: Academic Press, 2008. p. 464–480.

SCHWENDE, H. et al. Differences in the state of differentiation of THP-1 cells induced by phorbol ester and 1,25-dihydroxyvitamin D3. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 59, n. 4, p. 555–561, 1996.

SHAMES, S. L. et al. Purification and Characterization of Trypanothione Reductase from Crithidia fasciculata, a Newly Discovered Member of the Family of Disulfide-Containing Flavoprotein Reductases? **Biochemistry**, v. 25, p. 3519–3526, 1986.

SHELDON, R. A. Fundamentals of green chemistry: efficiency in reaction design. **Chemical Society Reviews**, v. 41, n. 4, p. 1437, 2012.

SIEUWERTS, A. M. et al. The MTT Tetrazolium Salt Assay Scrutinized: How to Use this Assay Reliably to Measure Metabolic Activity of Cell

Cultures in vitro for the Assessment of Growth Characteristics, IC50-Values and Cell Survival. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 33, n. 11, p. 813–824, 1995.

SILVA FILHO, A. A. DA et al. In vitro Antileishmanial and Antimalarial Activities of Tetrahydrofuran Lignans isolated from *Nectandra megapotamica* (Lauraceae) 1307. **Phytotherapy Research**, v. 22, n. April 2008, p. 1307–1310, 2008.

SINGH, N. et al. Natural product based leads to fight against leishmaniasis. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 22, n. 1, p. 18–45, 2014.

SKINNER-ADAMS, T. S. et al. Defining the targets of antiparasitic compounds. **Drug Discovery Today**, v. 21, n. 5, p. 725–739, 2016.

SMITH, M. B. **March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure**. [s.l.: s.n.].

STANAWAY, J. D.; ROTH, G. The Burden of Chagas Disease Estimates and Challenges. **Global Heart**, v. 10, n. 3, p. 139–144, 2015.

STUART, K. et al. Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n. 4, p. 1301–1310, 2008.

SZYCHOWSKI, J.; TRUCHON, J. F.; BENNANI, Y. L. Natural products in medicine: Transformational outcome of synthetic chemistry. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 57, n. 22, p. 9292–9308, 2014.

TADA, H. et al. An improved colorimetric assay for interleukin 2. **J Immunology Methods**, v. 93, n. 2, p. 157–165, 1986.

TAYLOR, R. D.; MACCOSS, M.; LAWSON, A. D. G. *Rings in Drugs*. 2014.

URBINA, J. A. Specific chemotherapy of Chagas disease: Relevance, current limitations and new approaches. **Acta Tropica**, v. 115, n. 1-2, p. 55–68, 2010.

VAN DE LOOSDRECHT, A. et al. Cell mediated cytotoxicity against U 937 cells by human monocytes and macrophages in a modified colorimetric MTT assay. A methodological study. **Journal of Immunology Methods**, v. 141, n. 1, p. 15–22, 1991.

WALTON, J. G. A et al. Synthesis and Evaluation of Indatraline-Based Inhibitors for Trypanothione Reductase. **ChemMedChem**, v. 6, p. 321–328, 2011.

WELSCH, M. E.; SNYDER, S. A; STOCKWELL, B. R. Privileged Scaffolds for Library Design and Drug Discovery. v. 14, n. 3, p. 347–361, 2010.

WERMUTH, C. G. Chapter 19 - Application Strategies for the Primary Structure–Activity Relationship Exploration BT - The Practice of Medicinal Chemistry (Third Edition). In: New York: Academic Press, 2008. p. 415–427.

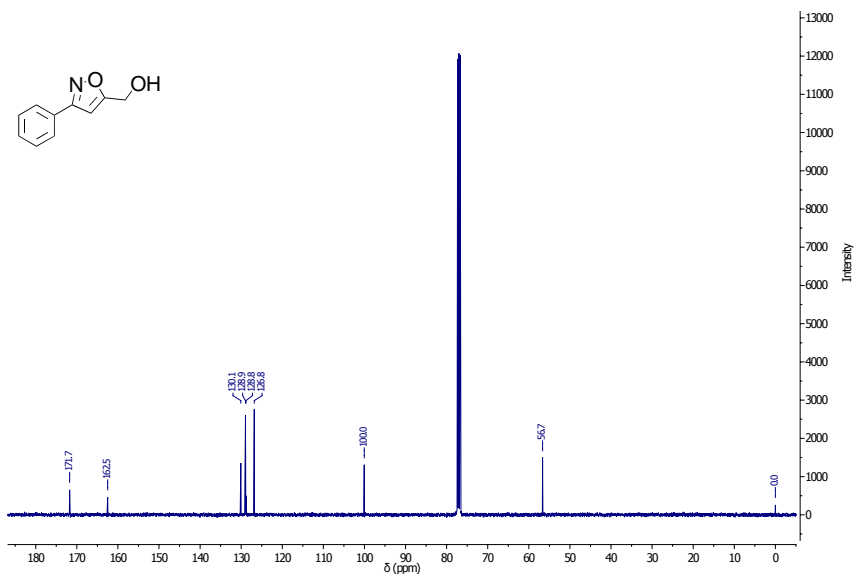
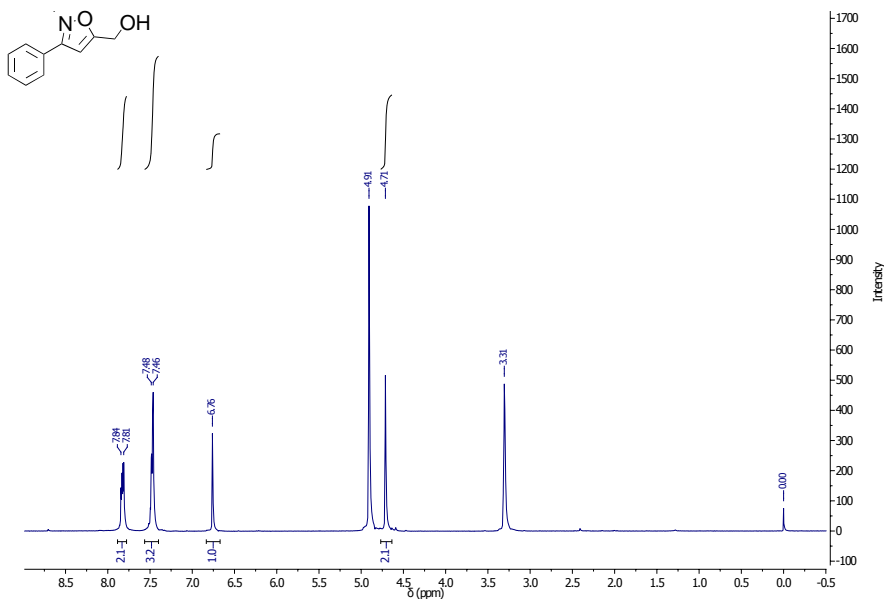
WHO. **London declaration on NTDs**. Disponível em: <<http://unitingtocombatntds.org/resource/london-declaration>>.

WHO. Investing to overcome the global impact of neglected tropical diseases: Third WHO report on neglected tropical diseases. 2015.

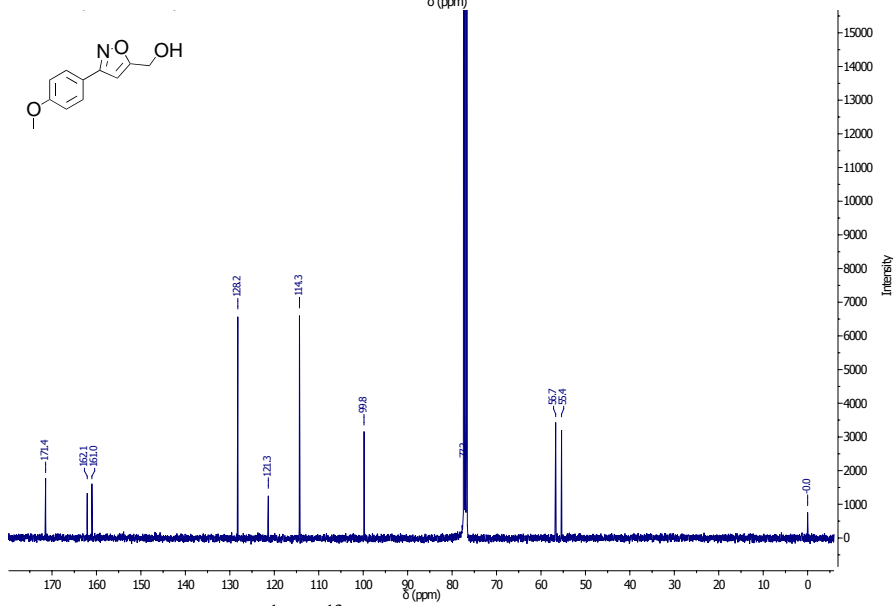
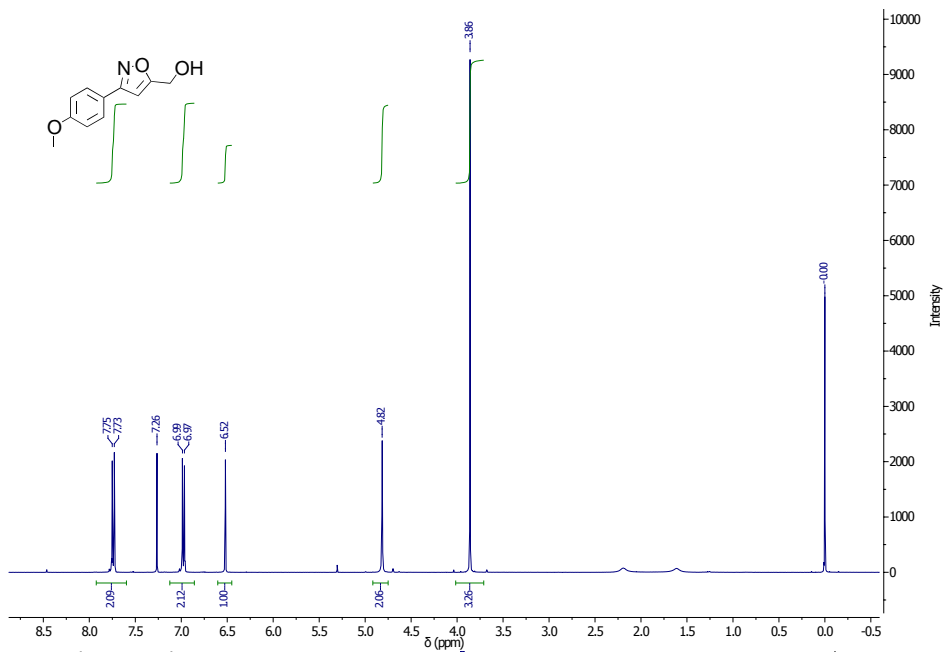
YERMOLINA, M. V et al. Discovery, Synthesis and Biological Evaluation of a Novel Group of Selective Inhibitors of Filoviral Entry. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 54, n. 3, p. 765–781, 2011.

ANEXOS

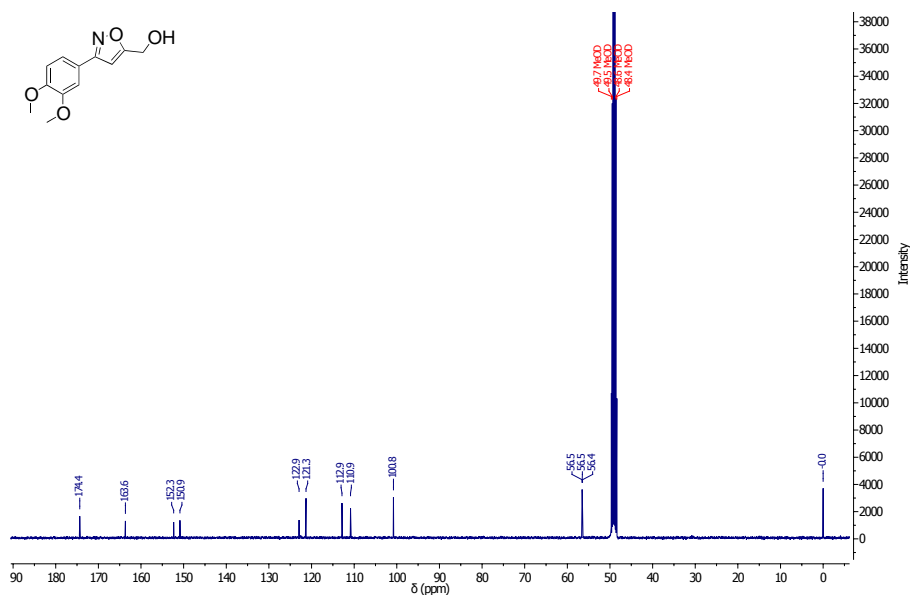
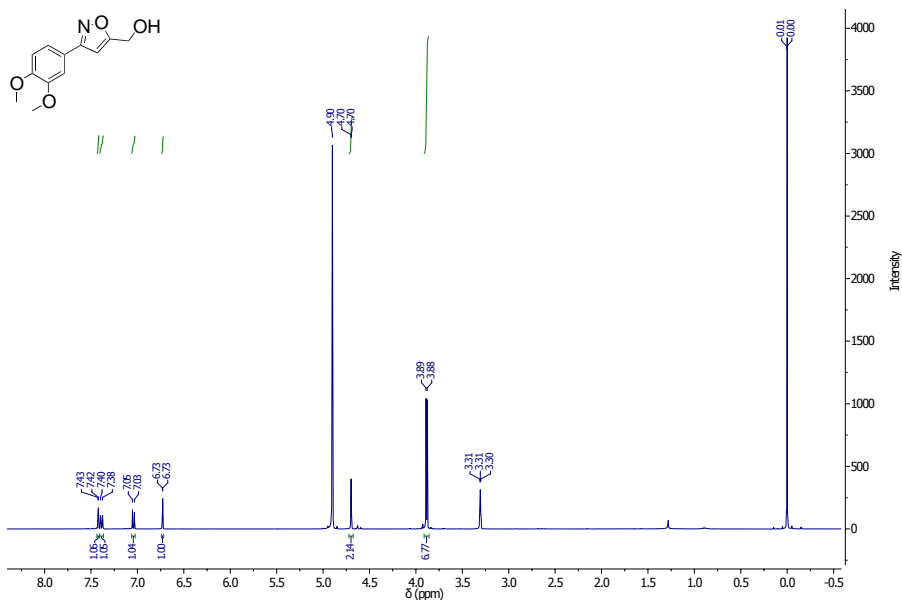
8. Anexos



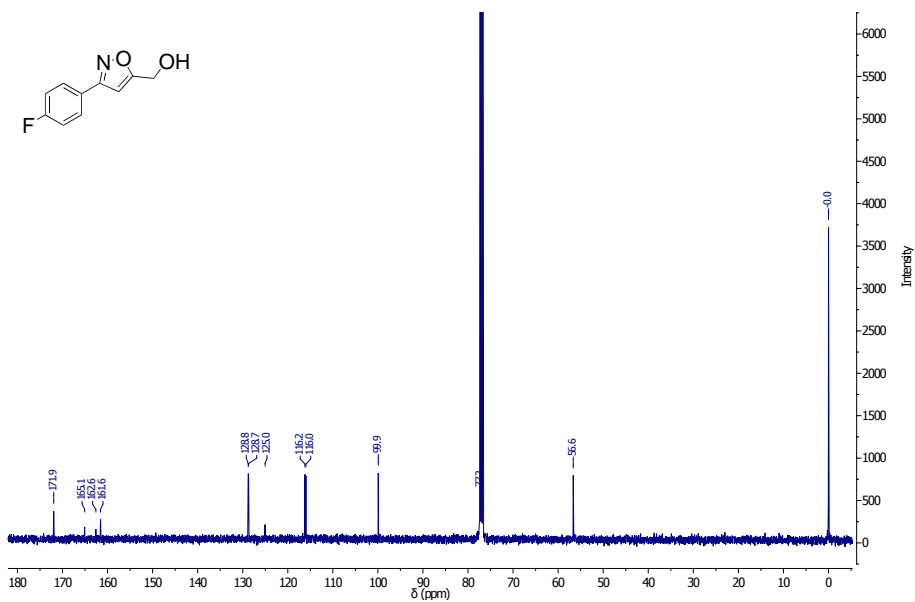
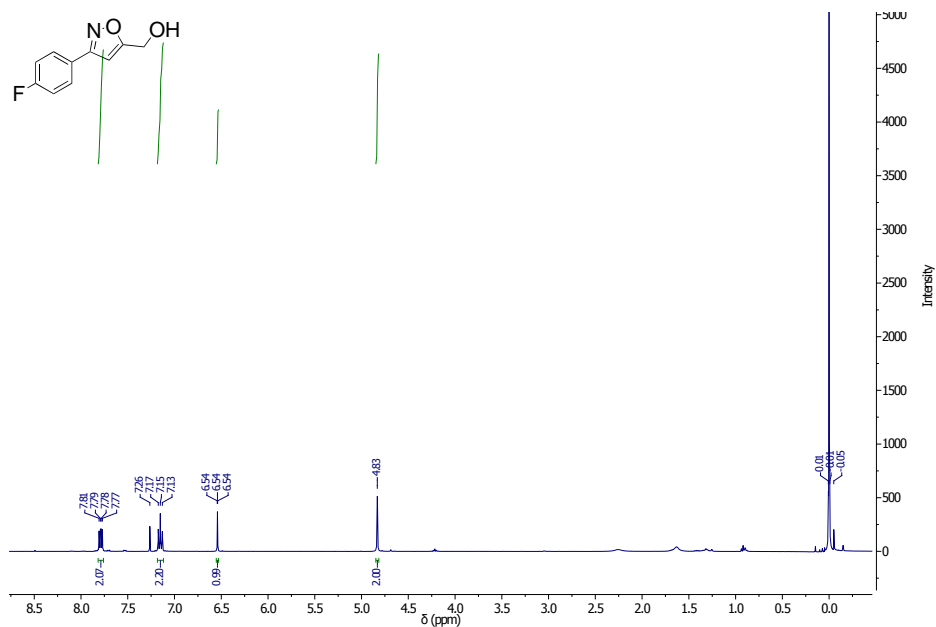
Anexo 1. Espectros de ^1H e ^{13}C NMR do composto **34** (CD₃OD, 300/75 MHz)



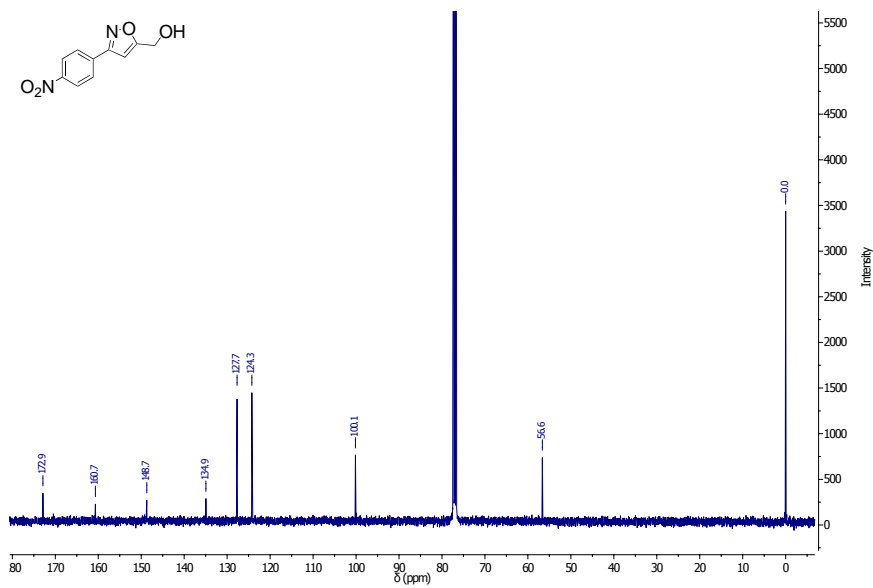
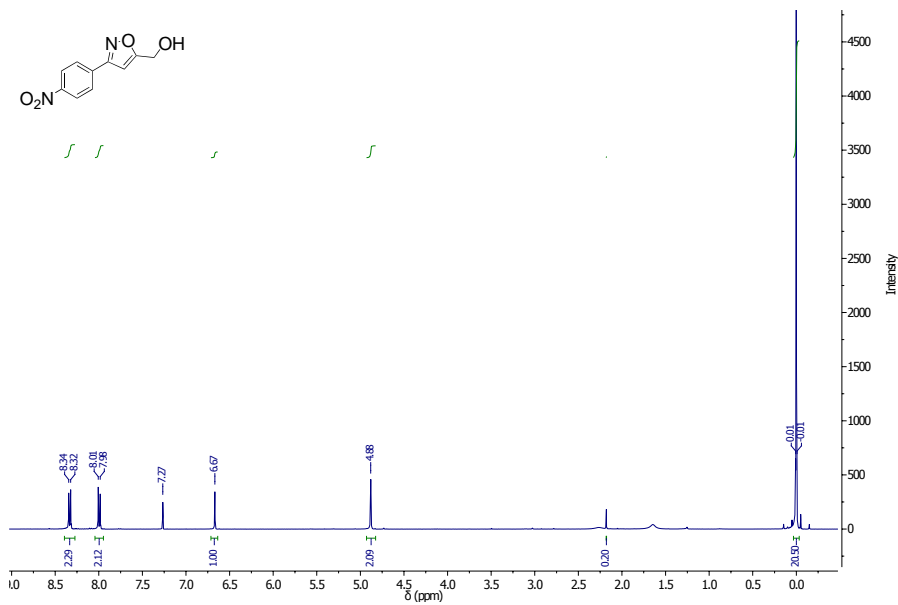
Anexo 2. Espectros de ¹H e ¹³C NMR do composto **40** (CDCl₃, 400/100 MHz)



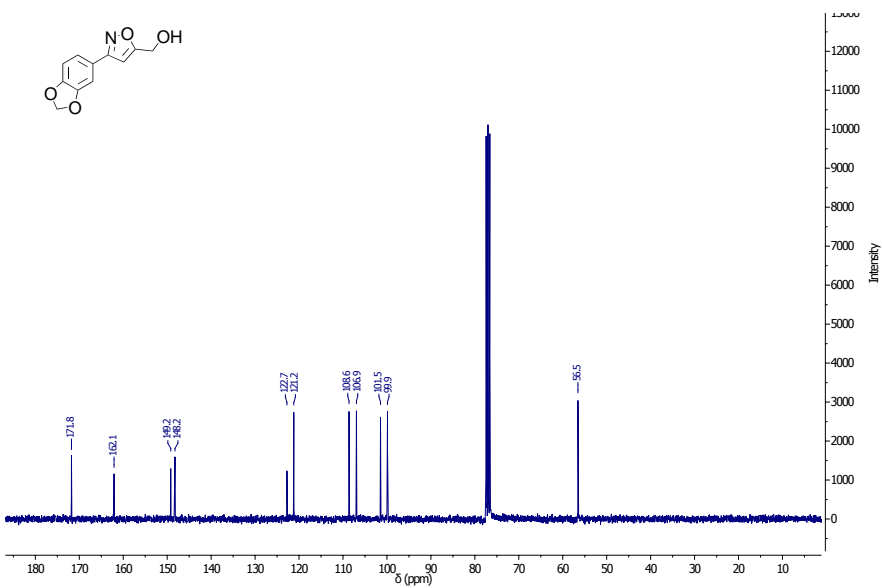
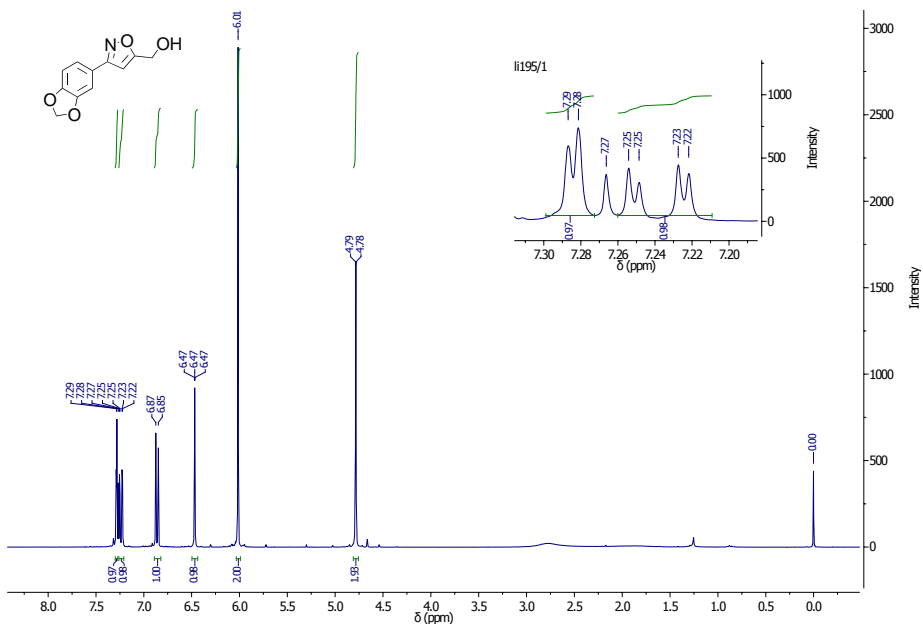
Anexo 3. Espectros de ¹H e ¹³C NMR do composto 41 (CD₃OD, 400/100 MHz)



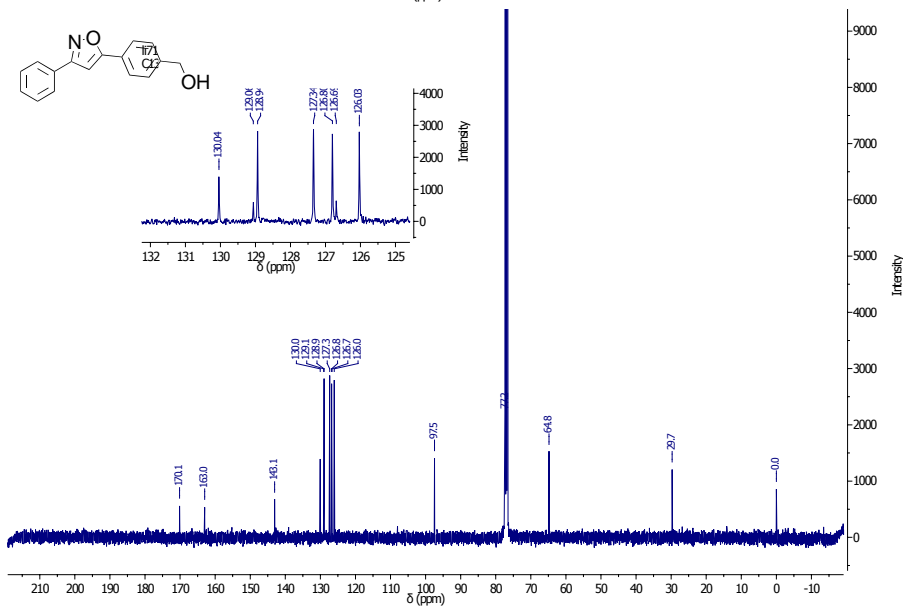
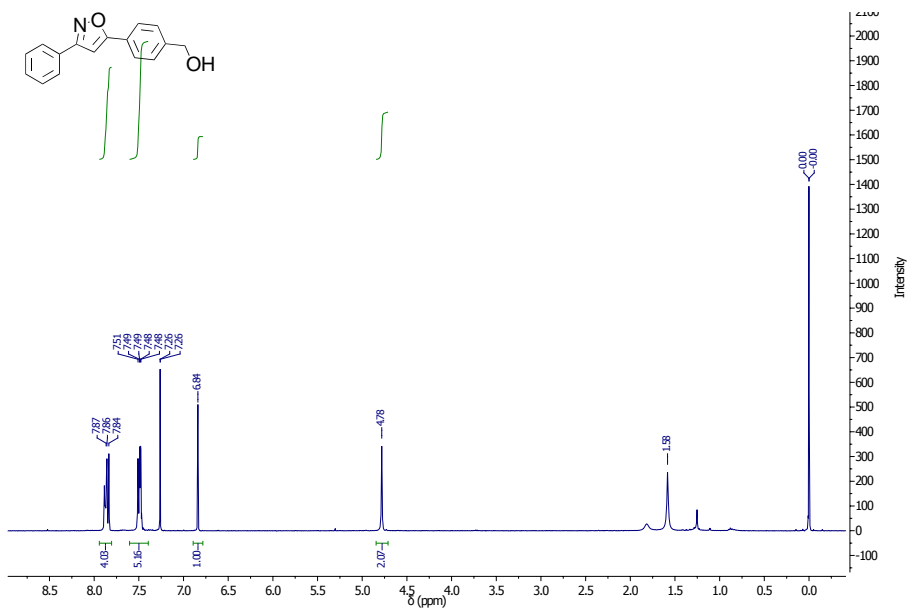
Anexo 4. Espectros de ¹H e ¹³C NMR do composto **42** (CDCl₃, 300/100 MHz)



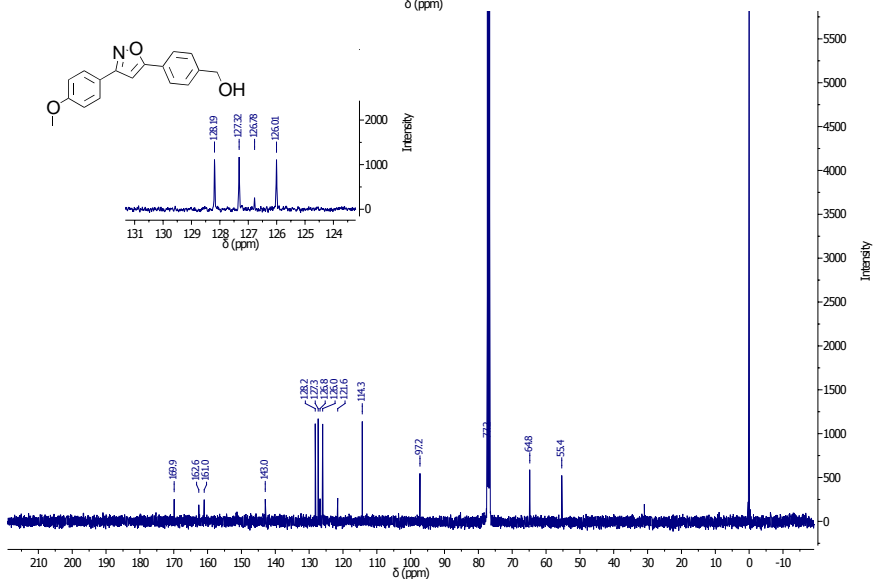
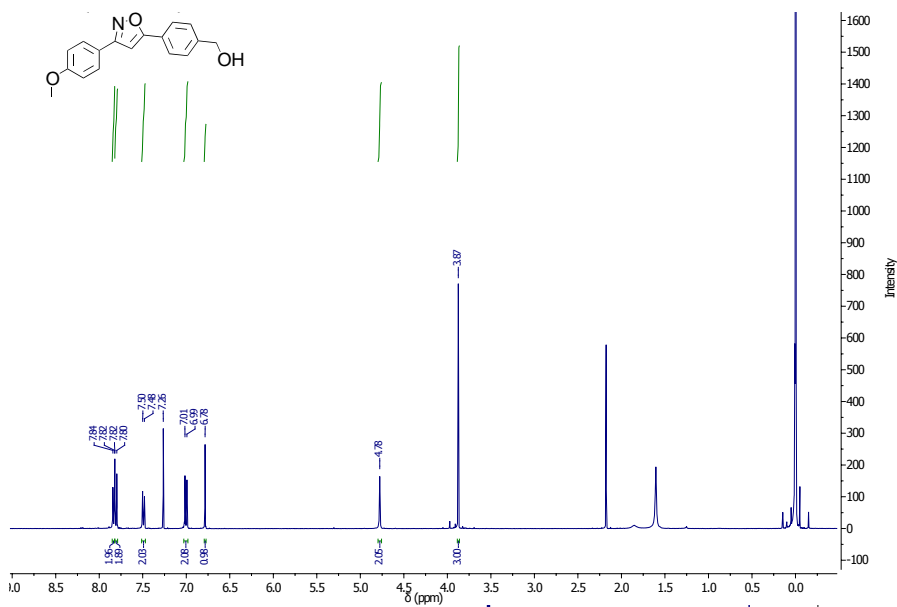
Anexo 5. Espectros de ^1H e ^{13}C NMR do composto **43** (CDCl₃, 300/75 MHz)



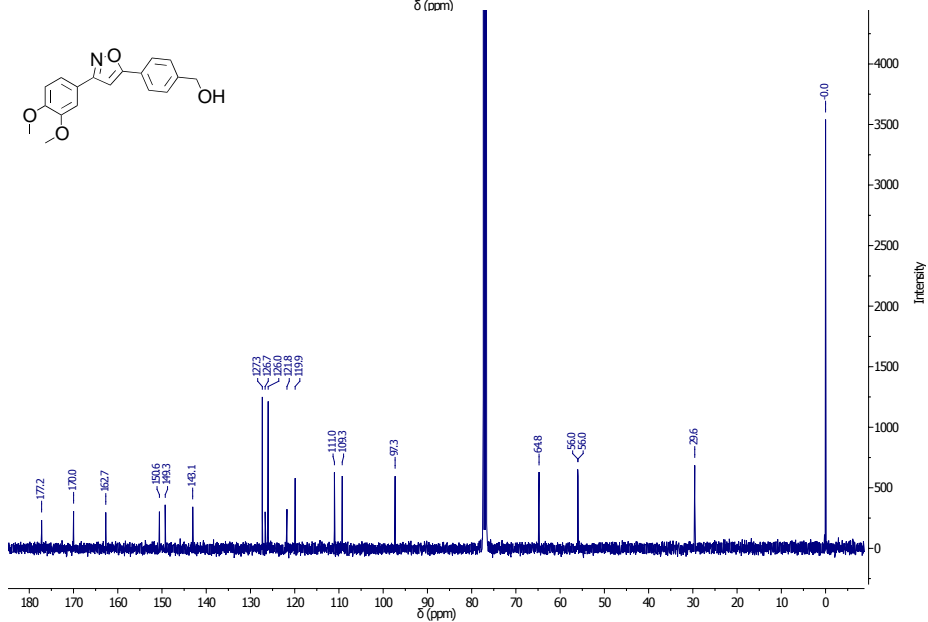
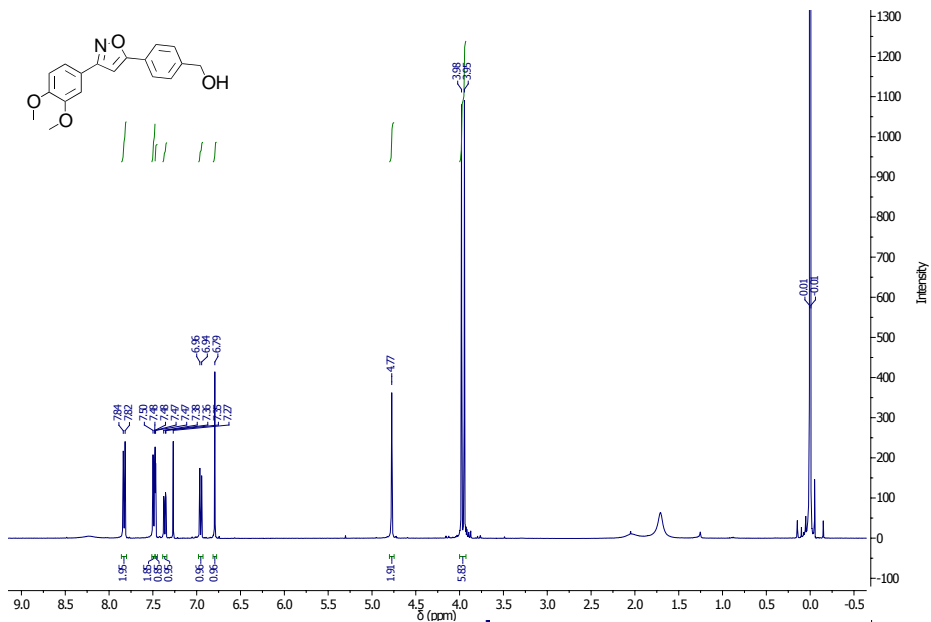
Anexo 6. Espectros de ^1H e ^{13}C NMR do composto **44** (CDCl_3 , 300/75 MHz)



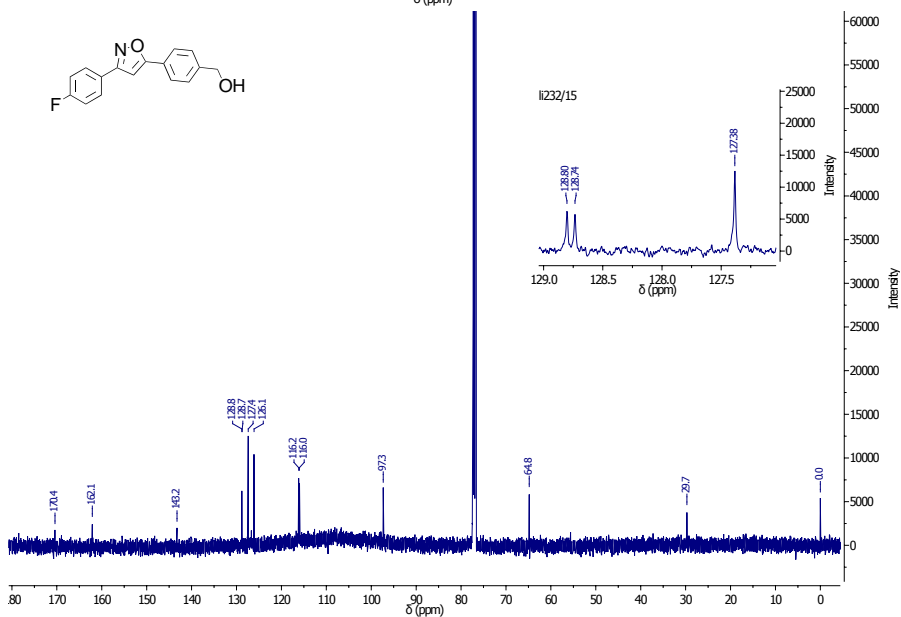
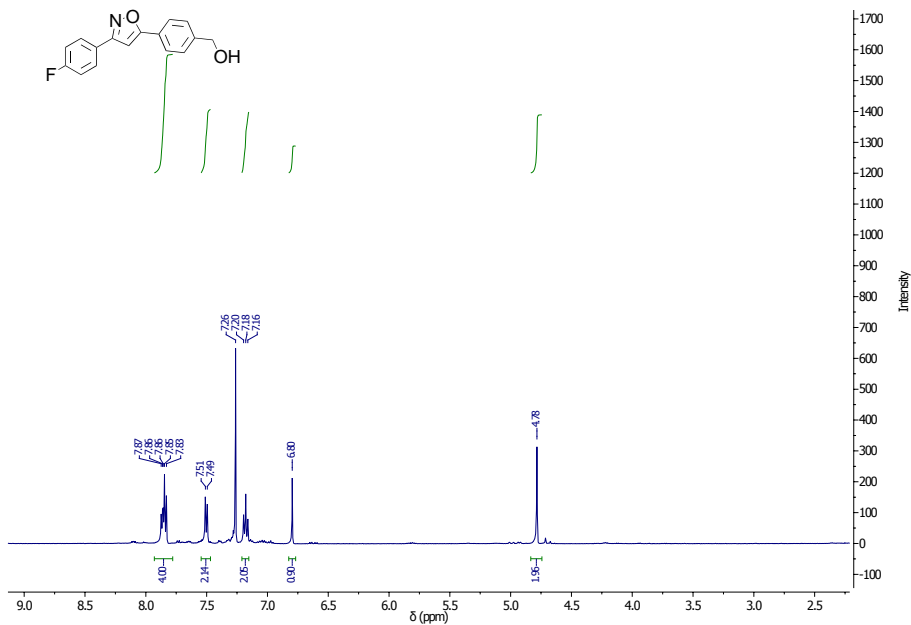
Anexo 7. Espectros de ¹H e ¹³C NMR do composto **45** (CDCl₃, 400/100 MHz)



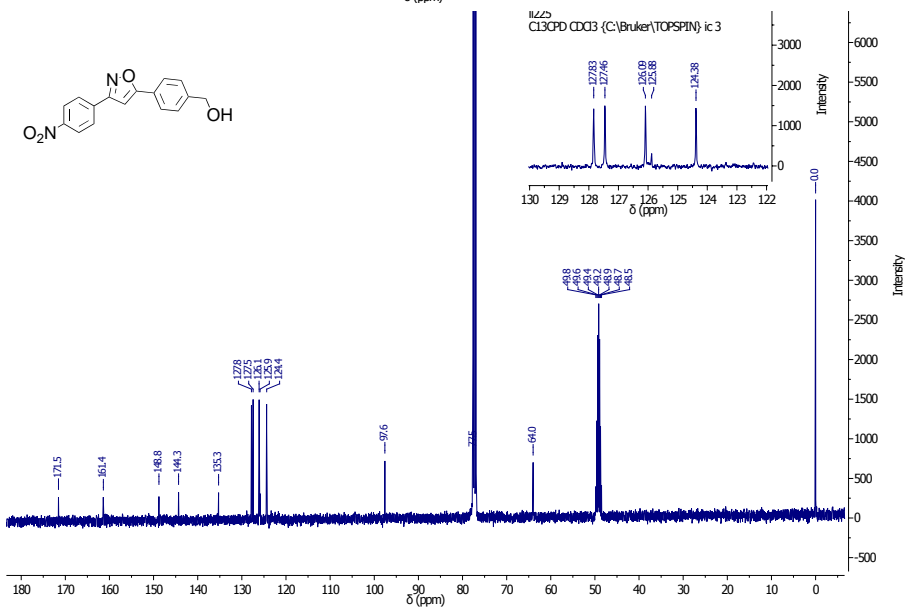
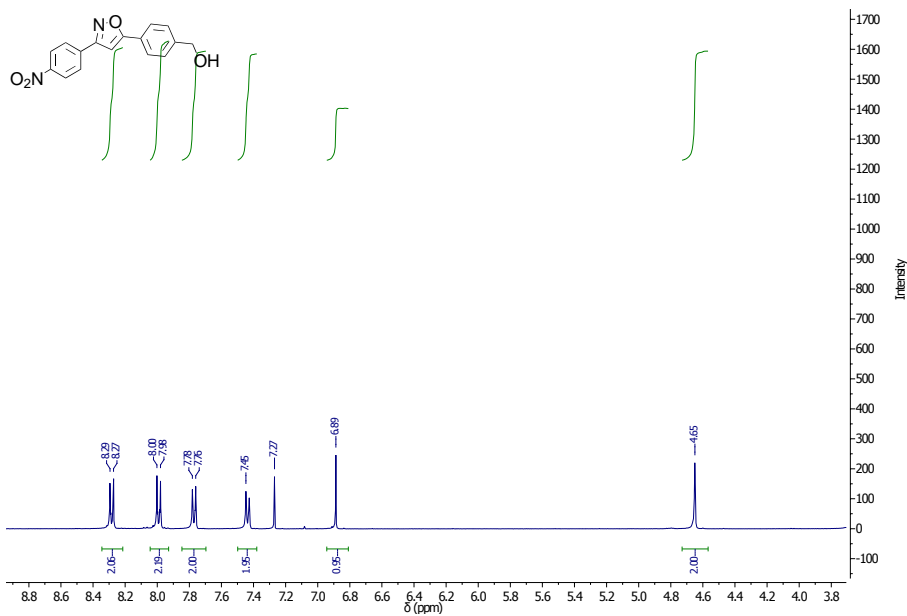
Anexo 8. Espectros de ^1H e ^{13}C NMR do composto **46** (CDCl_3 , 300/75 MHz)



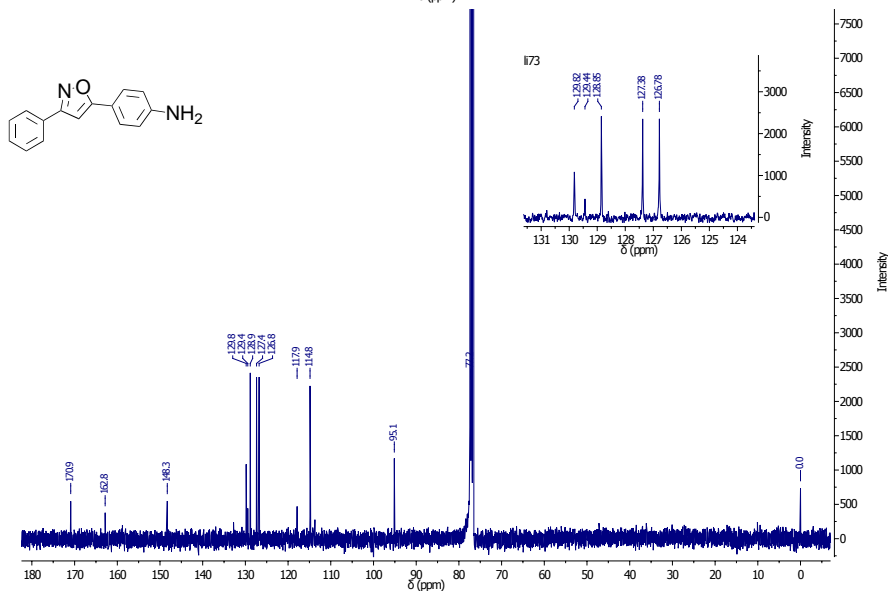
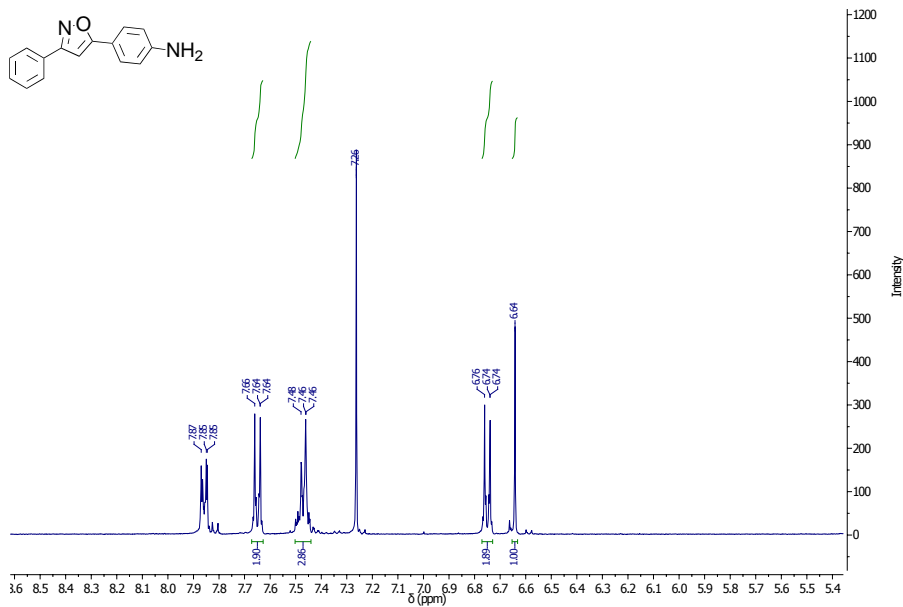
Anexo 9. Espectros de ¹H e ¹³C NMR do composto **47** (CDCl₃, 400/100 MHz)



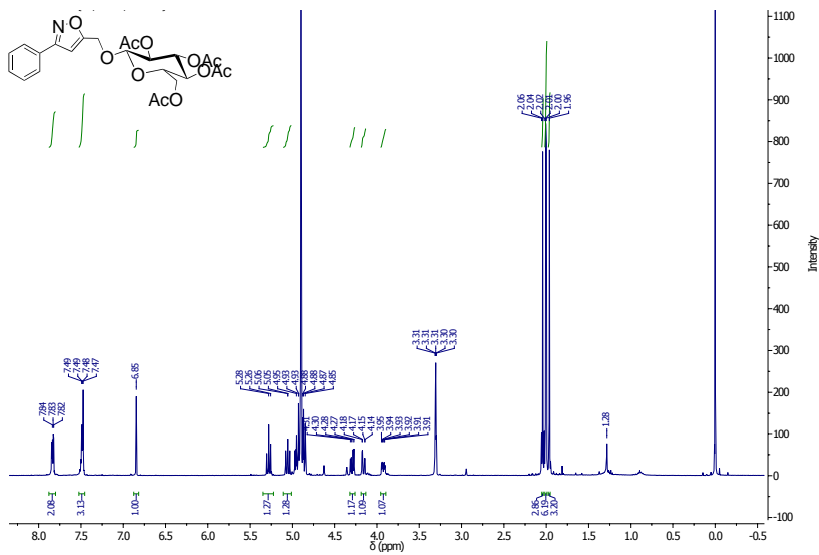
Anexo 10. Espectros de ¹H e ¹³C NMR do composto **48** (CDCl₃, 400/100 MHz)



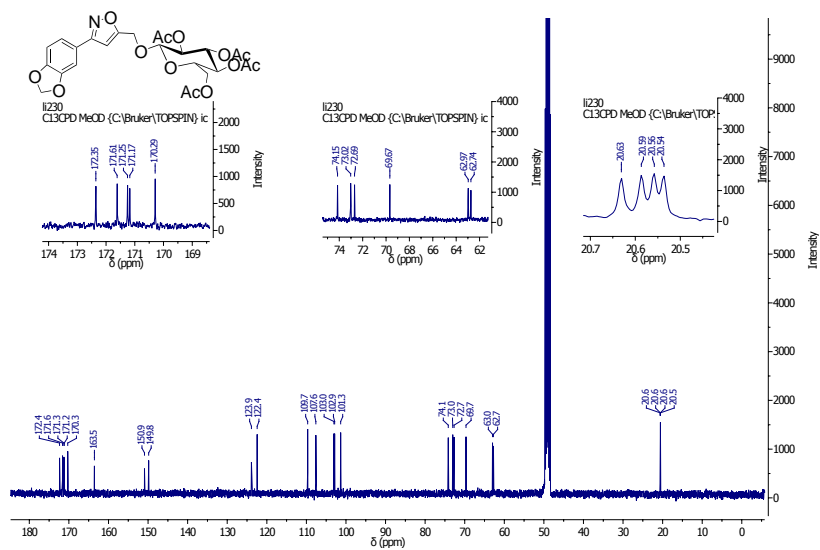
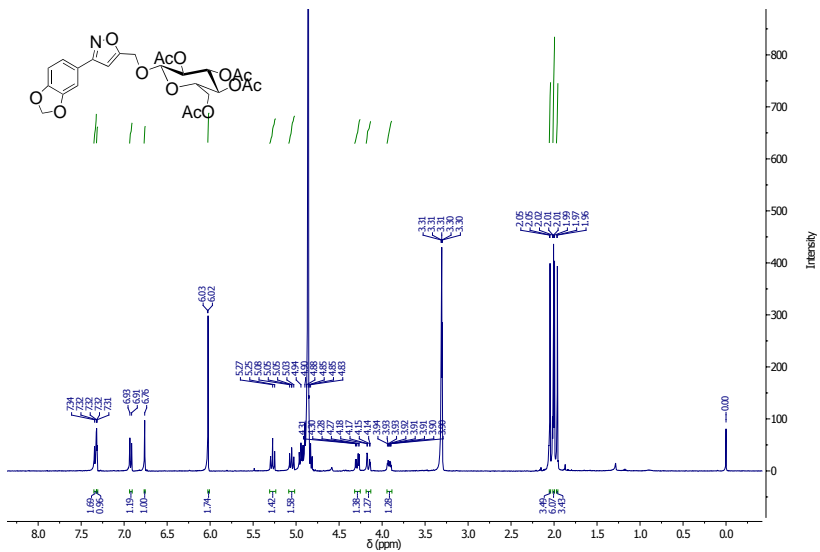
Anexo 11. Espectros de ^1H e ^{13}C NMR do composto **49** (CDCl_3 , 400/100 MHz)



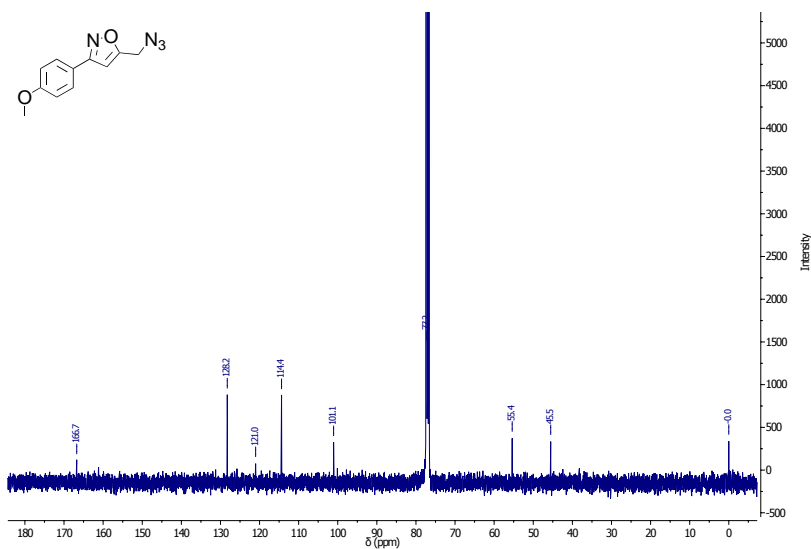
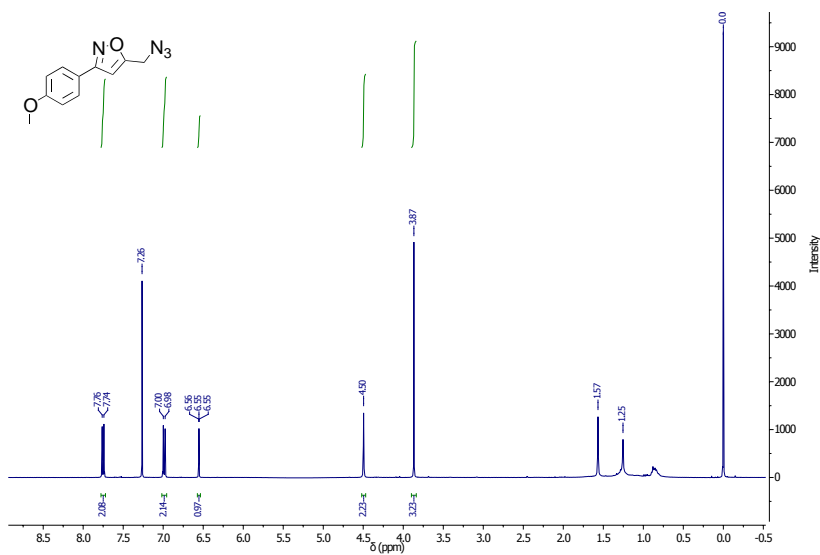
Anexo 13. Espectros de ^1H e ^{13}C NMR do composto **51** (CDCl₃, 400/100 MHz)



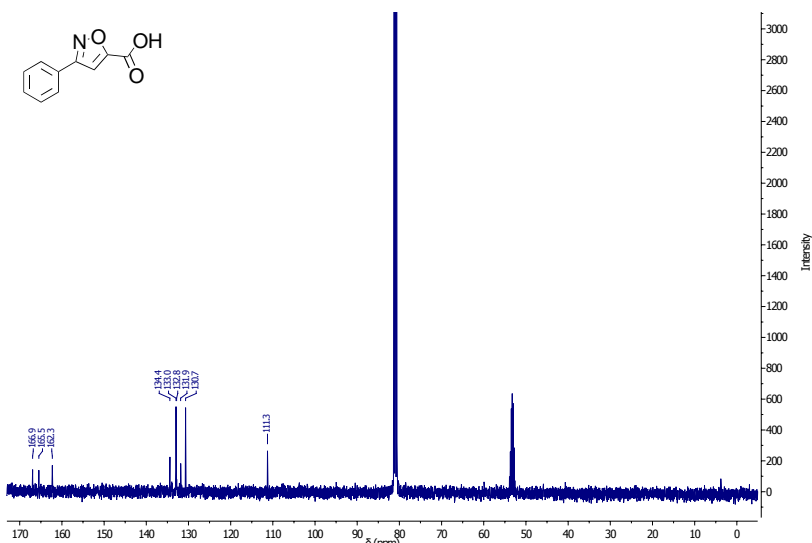
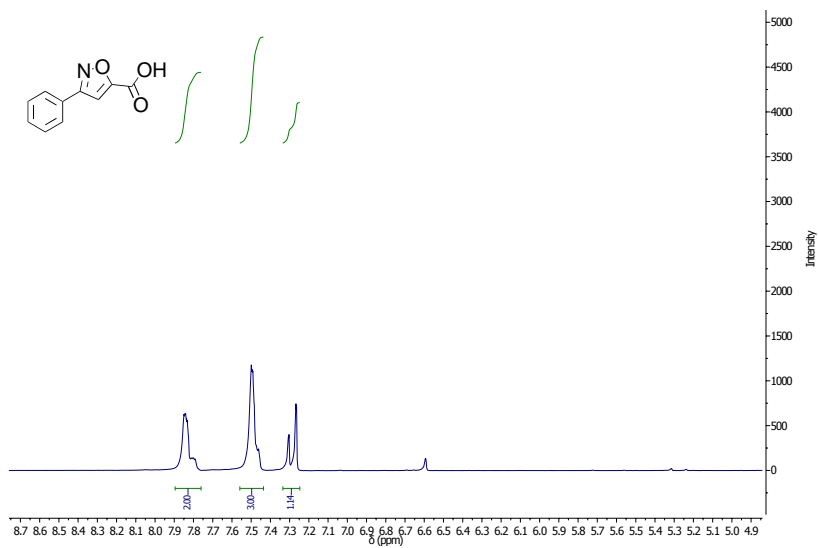
Anexo 15. Espectros de ^1H e ^{13}C NMR do composto **53** (CD_3OD , 400/100 MHz)



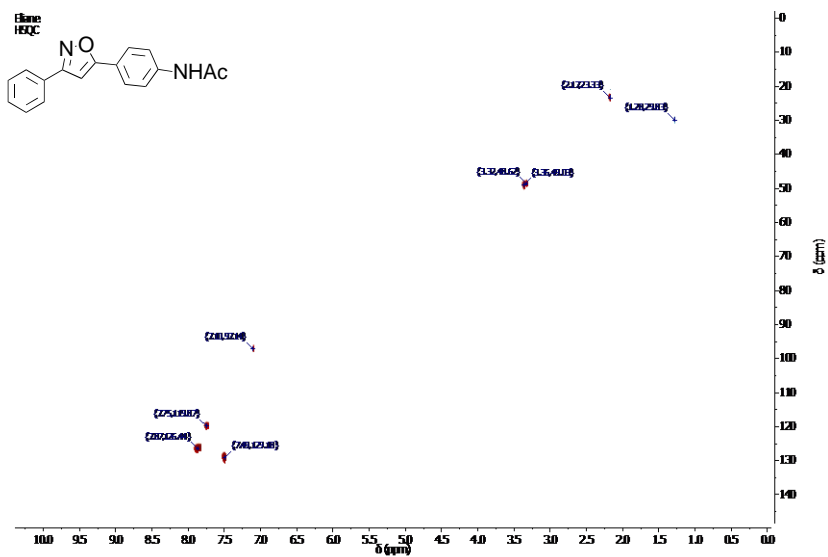
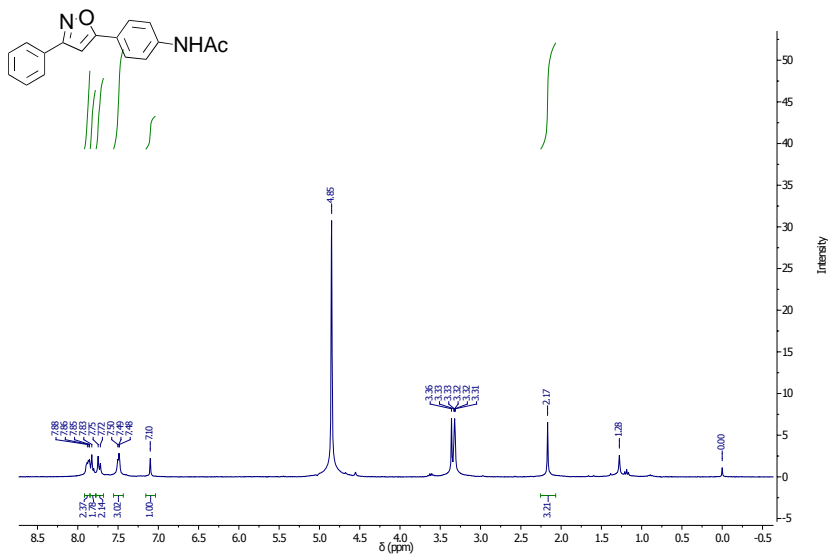
Anexo 16. Espectros de ¹H e ¹³C NMR do composto 54 (CD₃OD, 400/100 MHz)

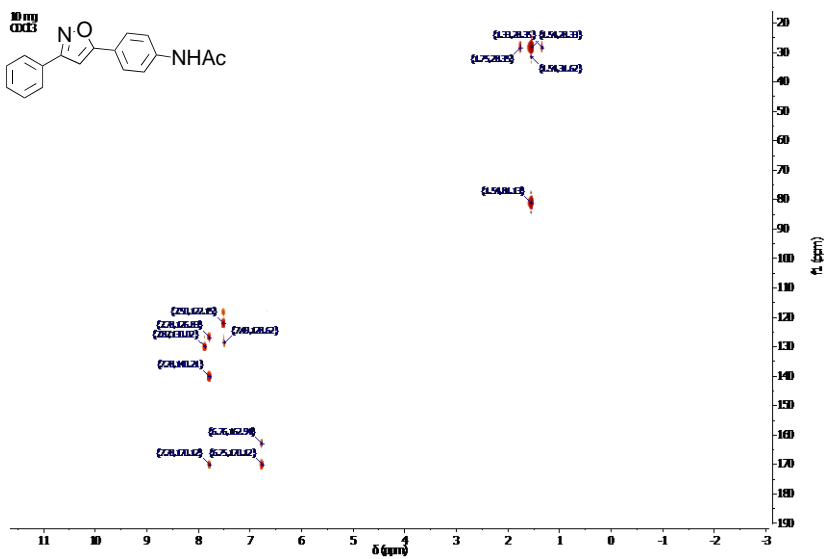


Anexo 17. Espectros de ¹H e ¹³C NMR do composto **56** (CDCl₃, 400/75 MHz)

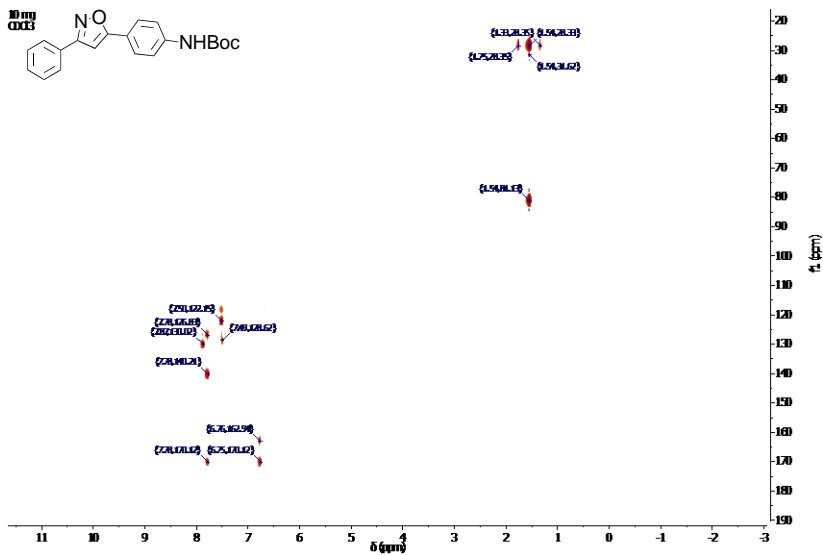


Anexo 18. Espectros de ^1H e ^{13}C NMR do composto **55** (CDCl_3 , 400/100 MHz)

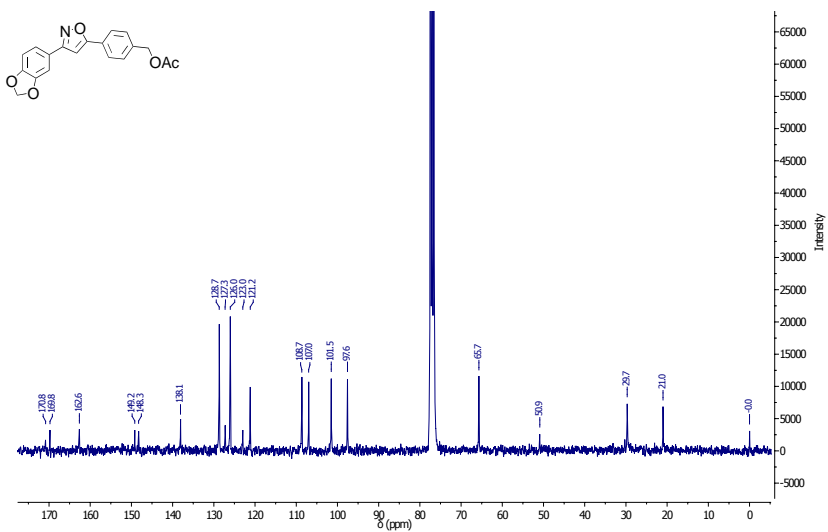
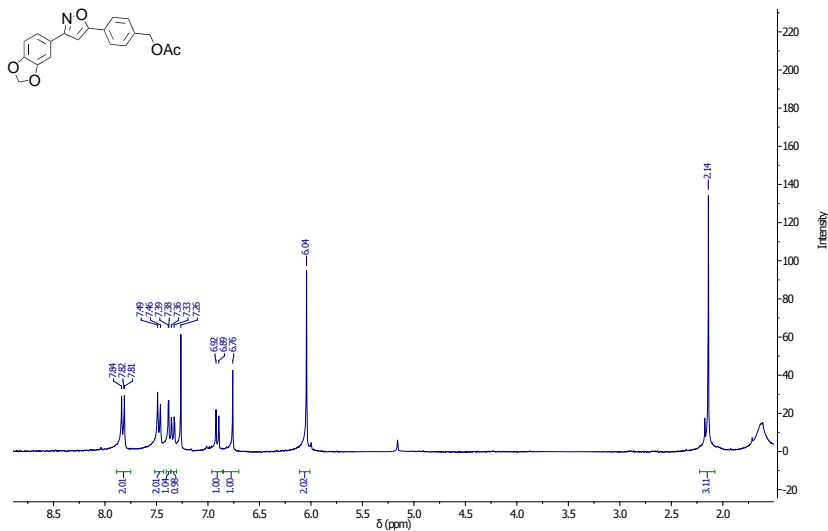




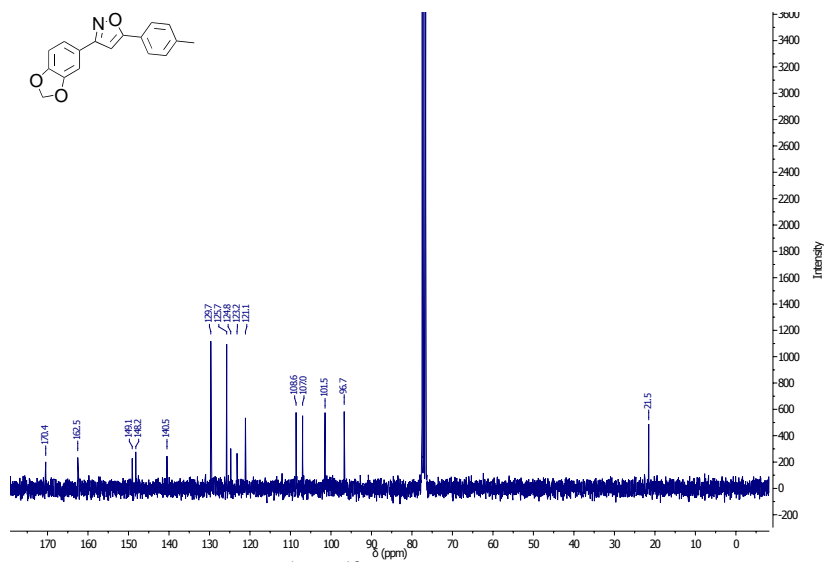
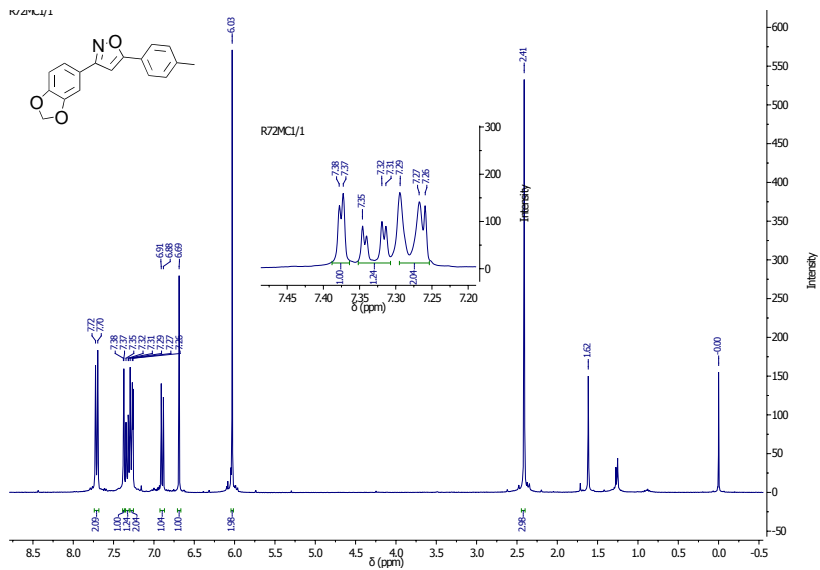
Anexo 20. Espectro de HMBC NMR do composto **62** (CDCl_3 , 300/75 MHz)



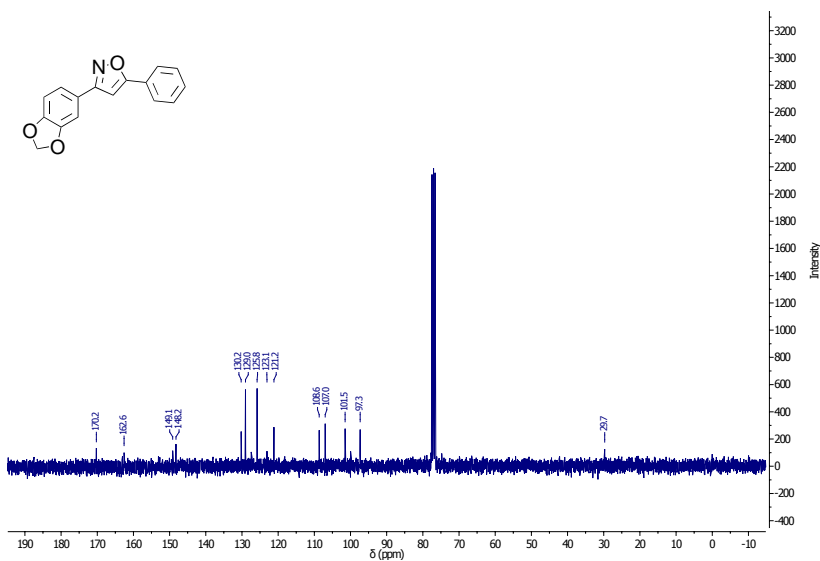
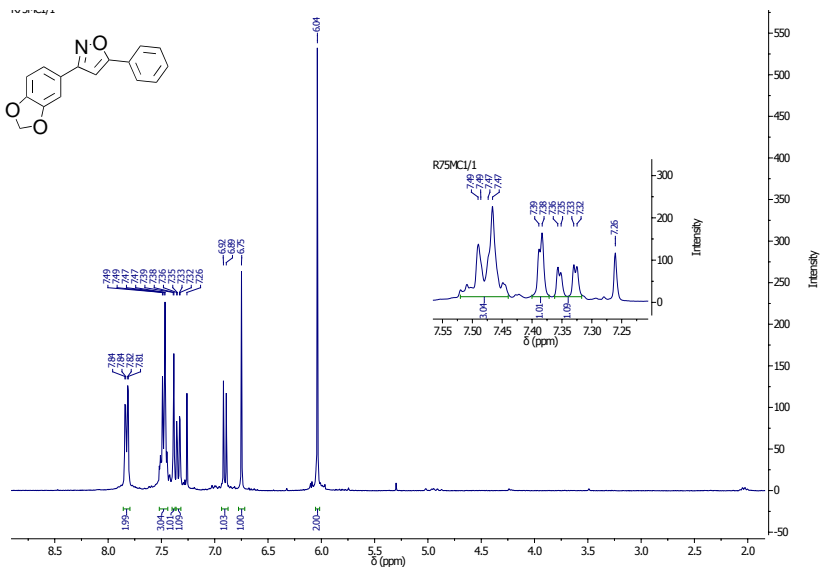
Anexo 22. Espectro de HMBC NMR do composto **63** (CDCl₃, 300/75 MHz)



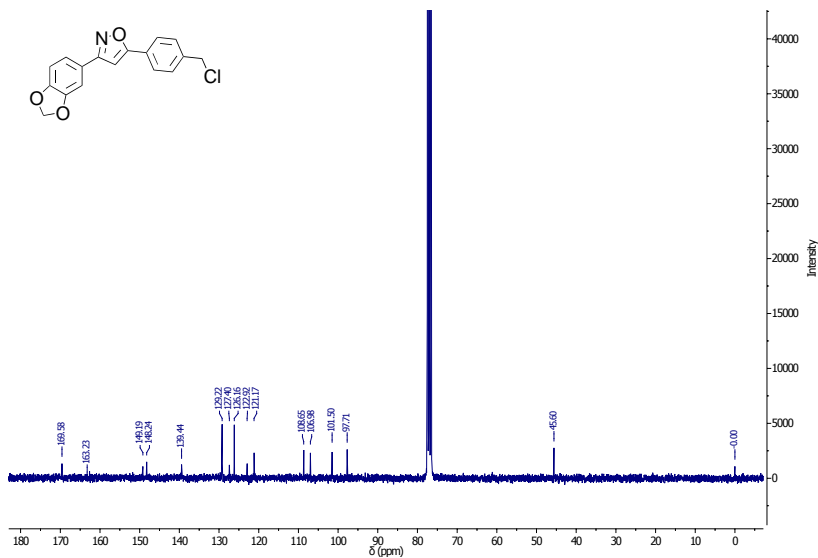
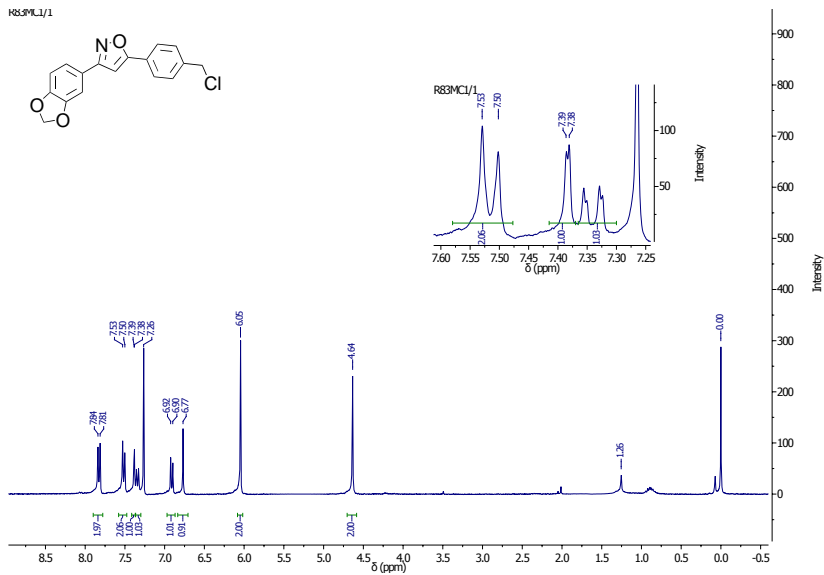
Anexo 23. Espectros de ¹H e ¹³C NMR do composto **64** (CDCl₃, 300/75 MHz)



Anexo 24. Espectros de ^1H e ^{13}C NMR do composto **65** (CDCl_3 , 300/75 MHz)



Anexo 25. Espectros de ¹H e ¹³C NMR do composto **66** (CDCl₃, 300/75 MHz)



Anexo 26. Espectros de ^1H e ^{13}C NMR do composto **67** (CDCl₃, 300/75 MHz)