

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

LARISSA INCERTI SANTOS DE CARVALHO

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DE DERIVADOS BENZOAZÓLICOS DO EUGENOL
COMO POTENCIAIS AGENTES ANTIFÚNGICOS**

Alfenas/MG

2015

LARISSA INCERTI SANTOS DE CARVALHO

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DE DERIVADOS BENZOAZÓLICOS DO EUGENOL
COMO POTENCIAIS AGENTES ANTIFÚNGICOS**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL-MG. Área de concentração: Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Diogo Teixeira Carvalho

Colaboradores: Prof^a. Amanda Latércia Tranches Dias, Prof. Luiz Felipe Leomil Coelho e Taciane Maíra Magalhães Hipólito.

Alfenas/MG

2015

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal de Alfenas

Carvalho, Larissa Incerti Santos de.

Síntese e avaliação de derivados benzoxazólicos do eugenol como potenciais agentes antifúngicos / Larissa Incerti Santos de Carvalho. -- Alfenas/MG, 2015.

116 f.

Orientador: Diogo Teixeira Carvalho.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Alfenas, 2015.

Bibliografia.

1. Anti-Infeciosos. 2. Eugenol. 3. Benzoxazóis. I. Carvalho, Diogo Teixeira. II. Título.

CDD 615.19

LARISSA INCERTI SANTOS DE CARVALHO

“SÍNTESE E AVALIAÇÃO DE DERIVADOS BENZOAZÓLICOS
DO EUGENOL COMO POTENCIAIS AGENTES ANTIFÚNGICOS”

A Banca examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas.

Aprovada em: 20/11/2015

Prof. Dr. Diogo Teixeira Carvalho
Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura: Diogo Teixeira Carvalho

Profa. Dra. Rozângela Magalhães Manfrini
Instituição: UFJF

Assinatura: Rozângela Magalhães Manfrini

Profa. Dra. Danielle Ferreira Dias
Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura: Danielle Dias

Dedico esse trabalho à minha família, que sempre me apoiou e me incentivou em todos os momentos. Ao meu noivo Alex, pela paciência, pelo companheirismo, pela cumplicidade e por me motivar a continuar mesmo nos momentos de dificuldades.

Em especial, ao meu amado filho Pedro Henrique, por ser o estímulo que me leva a buscar o meu melhor, que me ensinou que o amor não tem limites e que é a alegria da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao meu estimado orientador, Prof. Dr. Diogo Teixeira Carvalho, pelo incentivo, empenho e dedicação. Também pela competência com a qual conduziu esse trabalho, pela disponibilidade e auxílios prestados e, principalmente, pela paciência e compreensão diante das minhas dificuldades pessoais.

Ao meu filho Pedro Henrique, por ser a luz que guia meus passos, por sua capacidade de me alegrar com um simples sorriso mesmo nos meus piores momentos e por seu amor incondicional.

Ao meu querido noivo Alex, pelo amor, preocupação e paciência em tolerar a minha ausência.

À minha família, especialmente, aos meus pais, Guido e Luciene, pela educação, dedicação e por sempre apoiarem minhas decisões e fazerem o possível para que eu alcance minha felicidade.

À minha avó, Maria Aparecida, minha amiga de todas as horas, onde sempre encontro aconchego. À minha avó Belmira (em memória), que onde estiver com certeza está vibrando com a minha vitória.

Ao meu irmão Gabriel e às minhas irmãs, Isabela e Ana Carolina, pelos momentos de descontração, carinho e apoio em todas as minhas decisões.

À minha afilhada Helena, que veio encher ainda mais meu coração de amor e alegria. À minha sobrinha Maria Cecília, que apesar de mais distante nunca deixa meus pensamentos.

Às amigas de sempre, Jaqueline e Fernanda, que nunca deixam de se preocupar e comemoram comigo cada conquista.

À Taciane, grande amiga que fiz durante o mestrado e que, com seu jeito calmo e alegre, tornou meus dias de trabalho ainda mais felizes.

A todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a conclusão desse trabalho, em especial à Letícia, que tanto me auxiliou nos momentos finais, e ao Thiago, pela disponibilidade e paciência com as quais me ajudou a sanar muitas dúvidas.

À Dalila e ao Lucas, que me auxiliaram na parte sintética.

Aos professores Amanda Latércia Tranches Dias e Luiz Felipe Leomil Coelho, que realizaram os testes biológicos e também a técnica Kris Simone Tranches Dias e ao pós-doutorando Alexandre Bertoli Carvalho, que realizaram as análises de RMN e IV.

Aos colegas de laboratório Antônio, Carolina, Helloana e Luara por mostrarem-se sempre presentes e dispostos a ajudar em qualquer momento.

Ao grande e saudoso amigo Guilherme (em memória), que muitas vezes deixava seus afazeres para ajudar nos meus, pela preocupação, companheirismo e amizade.

À todos os funcionários da Universidade Federal de Alfenas, que estão sempre fazendo seu melhor e procurando ajudar os alunos.

À todas as pessoas que fizeram parte dessa jornada.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudo.

E, finalmente, a DEUS pela oportunidade que me foi dada em compartilhar tamanha experiência.

“O conhecimento torna a alma jovem e diminui a amargura da velhice. Colhe, pois, a sabedoria. Armazena suavidade para o amanhã.”
(Leonardo Da Vinci)

“Foi o tempo que dedicastes à tua rosa que a fez tão importante”
(O Pequeno Príncipe – Antoine de Saint-Exupéry)

RESUMO

A procura por novos agentes com ação antimicrobiana está se intensificando nos últimos anos, principalmente devido ao crescente aparecimento de linhagens de micro-organismos patogênicos resistentes aos fármacos disponíveis. Substâncias naturais, como o eugenol, presente nos óleos essenciais de várias plantas, e alguns compostos heterocíclicos, como os derivados benzoxazólicos, são conhecidos por apresentarem diversas propriedades biológicas, incluindo ação antimicrobiana. Buscando a obtenção de novos produtos ativos contra micro-organismos, em especial fungos, empregou-se a estratégia de hibridização molecular para preparar moléculas mistas contendo resíduos estruturais de eugenol e de núcleo benzoxazólico. As oito substâncias finais propostas foram obtidas com sucesso à partir da ciclo-oxidação de iminas ou ciclo-condensação de amidas, ambas derivadas de *o*-aminofenóis originados do eugenol ou de seu análogo, diidroeugenol. O método baseado na ciclo-condensação de amidas mostrou-se mais simples e eficiente. Os produtos tiveram sua identidade confirmada por meio de espectroscopia no infravermelho e de ressonância magnética nuclear. Esses produtos foram avaliados como antimicrobianos contra espécies patogênicas ou oportunistas de *Candida* (*C. albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*) e contra bactérias Gram positiva (*Staphylococcus aureus*) e Gram negativa (*Escherichia coli*). Nenhum derivado benzoxazólico apresentou atividade antibacteriana até $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Por outro lado, quatro benzoxazóis, 9c, 9d, 10a e 10b, apresentaram ação contra pelo menos uma espécie de *Candida*. O produto 10a foi o mais ativo contra *C. albicans* e *C. krusei* ($\text{CI}_{50} = 321 \mu\text{M}$) e o benzoxazol 10b exibiu maior potência contra *C. glabrata* ($\text{CI}_{50} = 332 \mu\text{M}$). As quatro substâncias ativas apresentaram valores de CI_{50} melhores que os descritos para o eugenol, o qual foi ativo apenas contra *C. krusei* ($\text{CI}_{50} = 610 \mu\text{M}$). Além desse perfil antifúngico, destaca-se que esses benzoxazóis foram menos citotóxicos que o eugenol frente às células sanguíneas mononucleares humanas. Mesmo esses benzoxazóis não tendo potência superior ao fármaco de referência empregado no ensaio biológico (fluconazol, $\text{CI}_{50} = 1,6$ a $104,3 \mu\text{M}$), representam moléculas inéditas passíveis de alteração estrutural para otimização de atividade.

Palavras-chave: Antimicrobianos. Eugenol. Benzoxazóis. Hibridização Molecular.

ABSTRACT

The search for new agents with antimicrobial activity is intensifying in recent years, mainly due to the increasing appearance of pathogenic micro-organisms strains resistant to available drugs. Natural substances such as eugenol, present in the essential oils of many plants, and some heterocyclic compounds such as benzoxazoles are known for their various biological properties, including antimicrobial activity. In order to obtain new active compounds against microorganisms, especially fungi, we applied the molecular hybridization strategy to prepare mixed molecules containing structural eugenol and benzoxazole cores. The final eight substances proposed have been successfully obtained from the oxidative cyclization of imines or cyclo-condensation of amides, both derived from *o*-aminophenols originated from eugenol or its analogue, diidroeugenol. The benzoxazoles obtained by amide intermediates was simpler and efficient. The products had their identities confirmed by infrared spectroscopy and nuclear magnetic resonance. These products were evaluated as antimicrobial agents against pathogenic or opportunistic species of *Candida* (*C. albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* and *C. tropicalis*) and against Gram positive bacteria (*Staphylococcus aureus*) and gram negative (*Escherichia coli*). None of the benzoxazoles showed antibacterial activity up to 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Moreover, four benzoxazoles, 9c, 9d, 10a and 10b, presented activity against at least one species of *Candida* sp. The product 10a was the most active against *C. albicans* and *C. krusei* ($\text{IC}_{50} = 321 \mu\text{M}$) and benzoxazole 10b exhibited higher potency against *C. glabrata* ($\text{IC}_{50} = 332 \mu\text{M}$). These four active substances showed better IC_{50} values than those for eugenol, which was only active against *C. krusei* ($\text{IC}_{50} = 610 \mu\text{M}$). In addition to this antifungal profile, it is noteworthy that these benzoxazoles were less cytotoxic than eugenol in human blood mononuclear cells assay. Although these derivatives have not shown greater potencies than that of the reference drug used in the test (fluconazole, $\text{IC}_{50} = 1.6$ to $104.3 \mu\text{M}$), they represent novel chemical entities capable of structural change for activity optimization.

Keywords: Antimicrobial. Eugenol. Benzoxazoles. Molecular hybridization.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estrutura química do eugenol (1).....	17
Figura 2 – Estrutura geral do núcleo benzoxazólico.....	21
Figura 3 – Métodos de obtenção de benzoxazois a partir de <i>o</i> -aminofenóis	22
Figura 4 – Exemplos de benzoxazois com atividade antimicrobiana	23
Figura 5 – Estruturas de algumas substâncias híbridas com propriedades	26
Figura 6 – Estruturas gerais dos derivados benzoxazólicos propostos	28
Figura 7 – Reação de nitração do eugenol (1) e do diidroeugenol (2).....	30
Figura 8 – Reação de redução dos compostos 3 e 4.....	31
Figura 9 – Reação para obtenção das iminas utilizando o método A	33
Figura 10 – Reação para obtenção de iminas utilizando o método B.....	34
Figura 11 – Reação de obtenção dos benzoxazois por ciclo-oxidação das iminas.....	35
Figura 12 – Reação de obtenção de amidas	36
Figura 13 – Obtenção dos benzoxazois por ciclização das amidas	41
Figura 14 – Rota sintética para obtenção das substâncias propostas.....	49
Figura 15 – Estruturas dos materiais de partida, intermediários e produtos finais.....	50
Figura 16 – Mecanismo provável da formação dos produtos 3 e 4.	51
Figura 17 – Espectro no IV da substância 3	52
Figura 18 – Espectro de RMN de ¹ H da substância 3 (CDCl ₃ , 300 MHz)	53
Figura 19 – Espectro de RMN de ¹³ C da substância 3 (CDCl ₃ , 75 MHz)	54
Figura 20 – Subespectro DEPT-135 da substância 3 (CDCl ₃ , 75 MHz)	54
Figura 21 – Espectro no IV da substância 4.	55
Figura 22 – Espectro de RMN de ¹ H da substância 4 (CDCl ₃ , 300 MHz)	56
Figura 23 – Espectro de RMN de ¹³ C da substância 4 (CDCl ₃ , 75 MHz).	57
Figura 24 – Subespectro DEPT-135 da substância 4 (CDCl ₃ , 75 MHz).	57
Figura 25 – Sequência de etapas envolvidas na redução com cloreto de estanho de substâncias aromáticas	58
Figura 26 – Espectro no IV da substância 5.	59
Figura 27 – Espectro de RMN de ¹ H da substância 5 (CDCl ₃ , 300 MHz).	60
Figura 28 – Espectro de RMN de ¹³ C da substância 5 (CDCl ₃ , 75 MHz).	61
Figura 29 – Subespectro DEPT-135 da substância 5 (CDCl ₃ , 75 MHz).	61
Figura 30 – Espectro no IV da substância 6.	62

Figura 31 – Espectro de RMN de ^1H da substância 6 (CDCl_3 , 300 MHz).	63
Figura 32 – Espectro de RMN de ^{13}C da substância 6 (CDCl_3 , 75 MHz).	64
Figura 33 – Subespectro DEPT-135 da substância 6 (CDCl_3 , 75 MHz).	64
Figura 34 – Mecanismo da reação das substância 5 e 6 com aldeídos, na presença de ácido.	66
Figura 35 – Mecanismo provável da reação de ciclo-oxidação dos produtos 7a-d e 8a-d	68
Figura 36 – Mecanismo da reação das substâncias 5 ou 6 e cloretos de acila, para obtenção de amidas.	69
Figura 37 – Mecanismo proposto de desacilação de éster na presença de bicarbonato de sódio, água e metanol.	70
Figura 38 – Espectro de RMN de ^1H da substância 11b (CDCl_3 , 300 MHz).....	71
Figura 39 – Espectro de RMN de ^{13}C da substância 11b (CDCl_3 , 75 MHz).....	72
Figura 40 – Subespectro DEPT-135 da substância 11b (CDCl_3 , 75 MHz).....	72
Figura 41 – Espectro de RMN de ^1H da substância 12c (CDCl_3 , 300 MHz).....	73
Figura 42 – Espectro de RMN de ^{13}C da substância 12c (CDCl_3 , 75 MHz).....	74
Figura 43 – Subespectro DEPT-135 da substância 12c (CDCl_3 , 75 MHz).....	74
Figura 44 – Mecanismo provável de obtenção dos derivados benzoxazólicos via amidas.	75
Figura 45 – Espectro no IV da substância 9b.	76
Figura 46 – Espectro de RMN de ^1H da substância 9b (CDCl_3 , 300 MHz).....	77
Figura 47 – Espectro de RMN de ^{13}C da substância 9b (CDCl_3 , 75 MHz).	78
Figura 48 – Subespectro DEPT-135 da substância 9b (CDCl_3 , 75 MHz).	78
Figura 49 – Espectro no IV da substância 10c.	79
Figura 50 – Espectro de RMN de ^1H da substância 10c (CDCl_3 , 300 MHz).....	80
Figura 51 – Espectro de RMN de ^{13}C da substância 10c (CDCl_3 , 75 MHz).....	81
Figura 52 – Subespectro DEPT-135 da substância 10c (CDCl_3 , 75 MHz).....	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Quantidades dos reagentes utilizados para as reações de nitração	30
Tabela 2 – Quantidades dos reagentes utilizados para as reações de nitro-redução.....	32
Tabela 3 – Quantidades dos reagentes utilizados para obtenção de iminas pelo método A.....	34
Tabela 4 – Quantidades dos reagentes utilizados para obtenção de iminas pelo método B.....	35
Tabela 5 – Quantidades dos reagentes utilizados para obtenção dos benzoxazois via iminas.....	36
Tabela 6 – Quantidades dos reagentes utilizados para obtenção das amidas.....	37
Tabela 7 – Quantidades dos reagentes utilizados para obtenção dos benzoxazois via amidas	41
Tabela 8 – Dados dos derivados benzoxazólicos obtidos	42
Tabela 9 – Resultados obtidos da avaliação da atividade antifúngica e de citotoxicidade sobre células sanguíneas	83

LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE A –	Espectro no IV da substância 9a	97
APÊNDICE B –	Espectro no IV da substância 9c	97
APÊNDICE C –	Espectro no IV da substância 9d	97
APÊNDICE D –	Espectro no IV da substância 10a	98
APÊNDICE E –	Espectro no IV da substância 10b	98
APÊNDICE F –	Espectro no IV da substância 10d	98
APÊNDICE G –	Espectro de RMN de ^1H da substância 9a (CDCl_3 , 300 MHz).....	99
APÊNDICE H –	Espectro de RMN de ^1H da substância 9c (CDCl_3 , 300 MHz).....	99
APÊNDICE I –	Espectro de RMN de ^1H da substância 9d (CDCl_3 , 300 MHz)	100
APÊNDICE J –	Espectro de RMN de ^1H da substância 10a (CDCl_3 , 300 MHz).....	100
APÊNDICE K –	Espectro de RMN de ^1H da substância 10b (CDCl_3 , 300 MHz)	101
APÊNDICE L –	Espectro de RMN de ^1H da substância 10d (CDCl_3 , 300 MHz)	101
APÊNDICE M –	Espectro de RMN de ^1H da substância 11a (CDCl_3 , 300 MHz).....	102
APÊNDICE N –	Espectro de RMN de ^1H da substância 11c (CDCl_3 , 300 MHz).....	102
APÊNDICE O –	Espectro de RMN de ^1H da substância 11d (CDCl_3 , 300 MHz)	103
APÊNDICE P –	Espectro de RMN de ^1H da substância 12a (CDCl_3 , 300 MHz).....	103
APÊNDICE Q –	Espectro de RMN de ^1H da substância 12b (CDCl_3 , 300 MHz)	104
APÊNDICE R –	Espectro de RMN de ^1H da substância 12d (CDCl_3 , 300 MHz)	104
APÊNDICE S –	Espectro de RMN de ^{13}C da substância 9a (CDCl_3 , 75 MHz)	105
APÊNDICE T –	Espectro de RMN de ^{13}C da substância 9c (CDCl_3 , 75 MHz)	105
APÊNDICE U –	Espectro de RMN de ^{13}C da substância 9d (CDCl_3 , 75 MHz)	106
APÊNDICE V –	Espectro de RMN de ^{13}C da substância 10a (CDCl_3 , 75 MHz)	106
APÊNDICE W –	Espectro de RMN de ^{13}C da substância 10b (CDCl_3 , 75 MHz)	107
APÊNDICE X –	Espectro de RMN de ^{13}C da substância 10d (CDCl_3 , 75 MHz)	107
APÊNDICE Y –	Espectro de RMN de ^{13}C da substância 11a (CDCl_3 , 75 MHz)	108
APÊNDICE Z –	Espectro de RMN de ^{13}C da substância 11c (CDCl_3 , 75 MHz)	108
APÊNDICE AA –	Espectro de RMN de ^{13}C da substância 11d (CDCl_3 , 75 MHz)	109
APÊNDICE BB –	Espectro de RMN de ^{13}C da substância 12a (CDCl_3 , 75 MHz)	109
APÊNDICE CC –	Espectro de RMN de ^{13}C da substância 12b (CDCl_3 , 75 MHz)	110
APÊNDICE DD –	Espectro de RMN de ^{13}C da substância 12d (CDCl_3 , 75 MHz)	110
APÊNDICE EE –	Subespectro DEPT-135 da substância 9c (CDCl_3 , 75 MHz)	111

APÊNDICE FF –	Subespectro DEPT-135 da substância 9d (CDCl ₃ , 75 MHz)	111
APÊNDICE GG –	Subespectro DEPT-135 da substância 10a (CDCl ₃ , 75 MHz).....	111
APÊNDICE HH –	Subespectro DEPT-135 da substância 10b (CDCl ₃ , 75 MHz)	112
APÊNDICE II –	Subespectro DEPT-135 da substância 10d (CDCl ₃ , 75 MHz)	113
APÊNDICE JJ –	Subespectro DEPT-135 da substância 11a (CDCl ₃ , 75 MHz).....	113
APÊNDICE KK –	Subespectro DEPT-135 da substância 11c (CDCl ₃ , 75 MHz).....	114
APÊNDICE LL –	Subespectro DEPT-135 da substância 11d (CDCl ₃ , 75 MHz)	114
APÊNDICE MM –	Subespectro DEPT-135 da substância 12a (CDCl ₃ , 75 MHz).....	115
APÊNDICE NN –	Subespectro DEPT-135 da substância 12b (CDCl ₃ , 75 MHz)	115
APÊNDICE OO –	Subespectro DEPT-135 da substância 12d (CDCl ₃ , 75 MHz)	116

LISTA DE ABREVIACÕES, SIGLAS E SÍMBOLOS

APTS	- Ácido <i>p</i> -toluenossulfônico
ATCC	- <i>American Type Culture Collection</i>
CC₅₀	- Concentração citotóxica para 50% das células
CCD	- Cromatografia em camada delgada
CCS	- Cromatografia em coluna de sílica
CDCl₃	- Clorofórmio deuterado
CI₅₀	- Concentração capaz de inibir 50% do crescimento microbiano
CI₉₀	- Concentração capaz de inibir 90% do crescimento microbiano
d	- Duplete
DEPT	- Intensificação sem distorção via transferência de polarização (<i>distortionless enhancement by polarization transfer</i>)
DMSO	- Dimetilsulfóxido
eq	- Equivalente
F.M.	- Fórmula molecular
Hz	- Hertz
IV	- Infravermelho
<i>J</i>	- Constante de acoplamento escalar
m	- Multiplete
MHz	- MegaHertz
M.M.	- Massa molar
nm	- Nanômetro
p/p	- Peso por peso
P.F.	- Ponto de fusão
ppm	- Partes por milhão
RMN	- Ressonância magnética nuclear
s	- Simpleto
t	- Triplete
t.a.	- Temperatura ambiente
v/v	- Volume por volume
δ	- Deslocamento químico (ppm)
$\bar{\nu}$	- Número de onda (cm ⁻¹)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	EUGENOL.....	17
1.2	BENZOXAZOIS E SEUS DERIVADOS	20
1.3	HIBRIDIZAÇÃO MOLECULAR	25
2	OBJETIVOS	28
3	PARTE EXPERIMENTAL	29
3.1	PROCEDIMENTOS GERAIS.....	29
3.2	MÉTODOS DE SÍNTESE.....	29
3.2.1	<i>Obtenção do 4-alil-2-metoxi-6-nitrofenol (3) e do 2-metoxi-4-propil-6-nitrofenol (4)</i>	30
3.2.2	<i>Obtenção do 4-alil-2-amino-6-metoxifenol, (5) e 2-amino-4-propil-6-metoxifenol (6)</i>	31
3.2.3	<i>Preparação das iminas (7a-d e 8a-d) - Método A</i>	33
3.2.4	<i>Preparação das iminas (7a-d e 8a-d) - Método B</i>	34
3.2.5	<i>Obtenção dos benzoxazois (9a-d e 10a-d) por ciclo-oxidação das iminas</i>	35
3.2.6	<i>Preparação das amidas (11a-d e 12a-d) à partir das substâncias 5 e 6</i>	36
3.2.7	<i>Obtenção dos benzoxazois (9a-d e 10a-d) por ciclização das amidas</i>	41
3.3	AVALIAÇÃO BIOLÓGICA.....	45
3.3.1	<i>Avaliação da atividade antifúngica</i>	46
3.3.2	<i>Avaliação da atividade antibacteriana</i>	46
3.3.3	<i>Avaliação da citotoxicidade frente à células sanguíneas monucleares periféricas humanas</i>	47
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
4.1	QUÍMICA.....	48
4.2	AVALIAÇÃO BIOLÓGICA.....	82
5	CONCLUSÕES	86
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87
	APÊNDICES	97

1 INTRODUÇÃO

O uso de espécies vegetais como estratégia terapêutica é praticado pela maioria da população dos países em desenvolvimento. Além disso, muitos medicamentos utilizados na medicina são provenientes de plantas, enquanto que outros fármacos são obtidos por semissíntese a partir de produtos vegetais ou por síntese baseada em moléculas vegetais precursoras. As plantas e os seus extratos têm sido utilizados durante muitos séculos no tratamento de diversas enfermidades, mas só nas últimas décadas os cientistas começaram a determinar se os recursos de origem vegetal tradicionais são realmente eficazes e o modo de ação daqueles que tiveram suas propriedades farmacológicas comprovadas (ANTHONY; FYFE; SMITH, 2005; FARAGO et al., 2004; PEREIRA, 2011).

O metabolismo secundário dessas plantas produz substâncias de baixo peso molecular conhecidas por apresentarem propriedades terapêuticas e, por isso, são fontes promissoras de novos fármacos. Nos vegetais, estas substâncias podem servir como mecanismo de defesa contra predadores e parasitas, como os micro-organismos, insetos e herbívoros, algumas conferem odor e outras são responsáveis pelo pigmento ou sabor da planta (PEREIRA, 2011).

Esses metabólitos são encontrados em óleos essenciais, os quais são formados por substâncias aromáticas voláteis, relacionadas às funções necessárias à sobrevivência vegetal, e são sintetizados em resposta à invasão microbiana e ao ataque de insetos e herbívoros. Podem ser extraídos de frutos, folhas, caule ou raízes, por trituração ou por destilação, e os seus componentes ativos podem ser isolados e caracterizados por cromatografia (ALMEIDA et al., 2012; LIMA et al., 2006; PEREIRA, 2011; ZORE et al., 2011).

Muitas atividades biológicas são atribuídas aos óleos essenciais e seus derivados. Suas aplicações como conservantes em alimentos ou antissépticos e desinfetantes são amplamente estudadas, pois exibem propriedades antibacterianas, antifúngicas, antivirais, antiparasitárias, inseticidas, além de outras, como anticancerígenas (ALMEIDA et al., 2012; PEREIRA, 2011; ZORE et al., 2011).

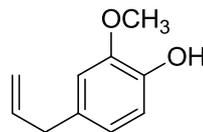
Várias plantas cultivadas no Brasil apresentam atividades biológicas conhecidas e produzem óleos essenciais que são muito estudados quanto suas propriedades antimicrobianas, sendo alvos de estudo na busca por novos fármacos capazes de inibir o crescimento de micro-organismos patogênicos.

1.1 EUGENOL

O cravo-da-índia, como é conhecido popularmente a espécie *Syzygium aromaticum* (também chamada de *Eugenia caryophyllata*), é originário da Índia, mas é cultivado em vários países tropicais, inclusive no Brasil. O cravo-da-índia é utilizado em culinária, devido ao seu marcante aroma e sabor, no processamento de alimentos e na produção de cosméticos (COSTA et al., 2011; DANIEL et al., 2009; KAMATOU; VERMAAK; VILJOEN, 2012).

O óleo essencial extraído do cravo-da-índia é um líquido amarelado obtido de botões florais secos por destilação a vapor e tem sido utilizado em odontologia como antisséptico e analgésico. É ativo contra bactérias associadas à cárie e à doença periodontal, além de eficaz contra muitas outras bactérias e fungos. Os principais componentes desse óleo são o eugenol (1), o acetato de eugenol e o β -cariofileno. O eugenol (4-alil-2-metoxifenol) (FIGURA 1) é o constituinte majoritário desse óleo e também dos óleos essenciais de *Ocimum sanctum*, *Ocimum gratissimum*, *Ocimum tenuiflorum*, *Cassia fistula*, *Zieria smitii* e *Pimenta racemosa*. É um fenilpropanóide do tipo alilfenol e seu aspecto é de um óleo amarelo claro com um odor característico de cravo e um sabor picante. É uma substância extremamente versátil, incorporada como ingrediente funcional em numerosos produtos, tendo aplicação nas indústrias farmacêutica, alimentícia, agrícola e cosmética (COSTA et al., 2011; DANIEL et al., 2009; KAMATOU; VERMAAK; VILJOEN, 2012; KAUFMAN, 2015).

Figura 1 – Estrutura química do eugenol (1)



1

Fonte: Do autor

O eugenol foi isolado pela primeira vez em 1929 e sua produção comercial teve início nos Estados Unidos em 1940. Pode ser produzido sinteticamente, no entanto é predominantemente extraído a partir de óleos essenciais (KAMATOU; VERMAAK; VILJOEN, 2012; ZENGIN, 2011).

Várias atividades biológicas do eugenol foram relatadas, incluindo atividades antifúngica (AHMAD et al., 2010a; AHMAD et al., 2010b; AHMAD et al., 2010c), antibacteriana (DEVI et al., 2010; DI PASQUA et al., 2006; OYEDEMI et al., 2009),

antiparasitária (ANTHONY; FYFE; SMITH, 2005; MACHADO et al., 2011; UEDA-NAKAMURA et al., 2011), analgésicas (GUENETTE et al., 2006), anti-inflamatórias (DANIEL et al., 2009), anticarcinogênica (MANIKANDAN et al., 2010) e antioxidante (OLIVEIRA et al., 2007), além de outras, como ação contra fitopatógenos (AMARAL; BARA, 2005; LIMA et al., 2006; VENTUROSU; BACCHI; GAVASSONI, 2011), inibição da produção de aflatoxina B1 (LIMA et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2007) e atividade antiviral (BENENCIA; COURRGES, 2000; TRAGOOLPUA; JATISATIENR, 2007).

O mecanismo de ação antimicrobiana do eugenol ainda não é exatamente conhecido. Vários estudos têm sido conduzidos com objetivo de esclarecê-lo, porém alguns resultados são contraditórios. Braga e colaboradores (2007) concluíram no seu trabalho que, em *C. albicans*, o eugenol afeta a regulação e função de enzimas importantes ligadas à membrana que catalisam a síntese de polissacarídeos da parede celular, perturbando o crescimento das células e a morfogênese do envelope.

Já Ahmad e colaboradores (2010a, 2010b), concluíram que o eugenol tem modo de ação similar ao fluconazol, inibindo a biossíntese do ergosterol. Observaram também que enquanto o fluconazol exibe ação fungistática, o eugenol exerce atividade fungicida contra várias espécies de *Candida* (*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. glabrata*), inclusive contra isolados resistentes ao fluconazol. Além disso, verificaram que o eugenol é significativamente menos citotóxico do que os antifúngicos disponíveis para uso clínico. Em outro estudo, sugeriram que o eugenol também pode exercer sua ação antifúngica através da inibição de bombas de efluxo (H^+ ATPase) da membrana celular fúngica, levando a acidificação intracelular e morte celular (AHMAD, 2010c).

Zore e colaboradores (2011) afirmaram que o eugenol paralisa células de *C. albicans* em diferentes fases do ciclo celular (G1, S, G2 e M), além de desestabilizar a membrana, levando à morte celular. Verificaram ainda que existe sinergismo entre eugenol e fluconazol e que provavelmente ocorre um aumento da entrada de fluconazol na célula devido à alteração na fluidez da membrana causada pelo eugenol.

Em estudo mais recente, realizado por Darvishi et al. (2013), os autores descreveram que a ação antifúngica do eugenol não está diretamente relacionada ao rompimento da membrana, como sugerido anteriormente. Relataram que o eugenol interfere com transportadores de aminoácidos aromáticos e com permeases na membrana citoplasmática das células de levedura, o que pode alterar a sua permeabilidade ou causar alterações conformacionais, e esses fatores levariam ao rompimento celular.

O eugenol também é ativo contra biofilmes pré-formados e age impedindo a formação de novos biofilmes de *C. albicans*, sugerindo sua eficácia contra os mecanismos adaptativos de resistência exibida por biofilmes dessa espécie contra anfotericina B e fluconazol (SAJJAD; KHAN; AHMAD, 2012).

Já em relação à atividade antibacteriana, estudos conduzidos por Gill e colaboradores (2006a) relataram que o eugenol é capaz de inibir a atividade de ATPases ligadas à membrana de *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes*, as quais estão envolvidas na geração de ATP e na regulação do pH celular. Foi observado ainda que, apesar de a inibição de ATPases causar redução da taxa de crescimento dos micro-organismos em concentrações subletais, prejudicando a sobrevivência da célula, o mecanismo principal de ação do eugenol é a ruptura da membrana citoplasmática (GILL; HOLLEY, 2006b). Essa ruptura foi confirmada também por outros autores como principal mecanismo de ação antibacteriana do eugenol contra *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli* (OYEDEMI, 2009) e *Salmonella typhi* (DEVI, 2010).

Em vista de ser um protótipo interessante para derivatizações, vários derivados de eugenol têm sido sintetizados e testados quanto suas propriedades biológicas. Estudos demonstraram que alguns desses derivados apresentam propriedades antioxidantes (HIDALGO et al., 2009), inibidora de lipoxigenases (SADEGHIAN et al., 2011), antibacterianas (ZHANG et al., 2011; ZENGIN, 2011) e antifúngicas (CARRASCO et al., 2012; ZHANG et al., 2011).

Em um estudo conduzido por Zhang e colaboradores (2011), foi sintetizado um α -glicopiranosídeo do eugenol, por meio de reação biocatalisada entre o eugenol e maltose. Foram avaliadas as atividades antibacterianas, antifúngicas, antioxidantes e antitumorais dessa nova substância e concluiu-se que a glicosilação potencializou tais propriedades nesse derivado em relação ao eugenol.

Carrasco e colaboradores (2012) também sintetizaram vários derivados do eugenol e avaliaram a influência de substituintes sobre a atividade antifúngica dessas substâncias contra várias espécies patogênicas. Os autores concluíram que a cadeia alílica desempenha um papel importante na ação antifúngica dessas substâncias e sua alteração causa diminuição ou perda total da atividade. Ao contrário, verificaram que a presença da hidroxila fenólica não é essencial para tal atividade. Também demonstraram que há um decréscimo na ação antifúngica quando o grupo metoxila é trocado por outros grupos. Avaliaram ainda, a influência da presença de grupos nitro em diferentes posições. Concluíram que quando esse grupo é inserido *orto* à hidroxila, percebe-se maior atividade antifúngica que quando outras

posições livres são substituídas. Por fim, observaram que di-nitração do anel leva a uma diminuição na atividade antifúngica. Nesse trabalho, não houve uma correlação clara entre concentração inibitória mínima e lipofilicidade para qualquer tipo de fungo avaliado.

Entretanto, em trabalho recente de nosso grupo, foi avaliada a atividade antifúngica de seis derivados β -piranosídicos do eugenol contra espécies de *Candida*. Observou-se que o derivado contendo um grupo 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- β -D-glicopiranosídeo apresentou atividade contra todas as espécies testadas, com ação 3,5 vezes maior que aquela demonstrada pelo fluconazol. Também verificaram que um epímero dessa substância (contendo um grupo 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- β -D-galactopiranosídeo) e seu análogo desacetilado foram menos ativos, sugerindo uma influência da lipofilicidade e da estereoquímica na ação dessas substâncias (SOUZA et al., 2014).

Souza e colaboradores (2015a, 2015b) relataram ainda glicosídeos triazólicos com atividades contra *Salmonella typhimurium* (49.73 e 68.53 μ M) e *Micrococcus luteus* (42.89 e 210.94 μ M) e um glicosídeo benzilidênico ativo contra *C. glabrata*, com CI_{50} de 18,1 μ M.

Em outro trabalho (ABRÃO et al., 2015), foram sintetizadas *N*-bases de Mannich do eugenol para avaliação como candidatos a antifúngicos e um dos derivados, um éster benzoico, mostrou atividade com CI_{50} de 1,23 μ M contra *C. glabrata* e 0,63 μ M contra *C. albicans* e *C. krusei*.

Como observado, vários estudos confirmam as propriedades antimicrobianas do eugenol e de seus derivados. Assim, essa substância pode ser utilizada como ponto de partida na síntese de novos candidatos a protótipos de fármacos com potencial ação contra micro-organismos patogênicos.

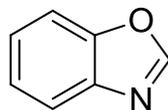
1.2 BENZOXAZOIS E SEUS DERIVADOS

Os compostos heterocíclicos, assim como os componentes dos óleos essenciais produzidos pelas plantas, desempenham um papel essencial nos sistemas vivos e são de grande importância biológica e industrial.

Os benzoxazois são compostos heterocíclicos utilizados como um material de partida para a síntese de substâncias bioativas, pois contêm sítios reativos que permitem funcionalizações diversas, tendo aplicação versátil no campo de produtos farmacêuticos. Esses heterociclos são formados por uma unidade fundamental advinda da fusão entre um

anel benzênico e um anel oxazólico, anel de cinco membros contendo um átomo de nitrogênio e um átomo de oxigênio (FIGURA 2).

Figura 2 – Estrutura geral do núcleo benzoxazólico



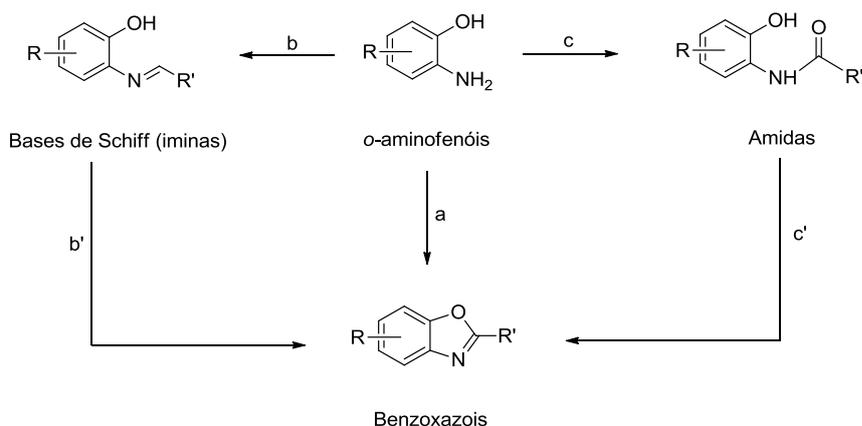
Fonte: Do autor

Os benzoxazóis podem ser sintetizados de diversas maneiras, sendo muito frequente a utilização de *o*-aminofenóis como materiais de partida. Assim, derivados benzoxazólicos podem ser obtidos diretamente por meio da condensação entre *o*-aminofenóis e ácidos carboxílicos, por meio de aquecimento de ambos na presença de diferentes agentes desidratantes, como ácido polifosfórico (HEIN; ALHEIM; LEAVITT, 1957; ERTAN, 2009), éster polifosfato (KANAOKA; HAMADA; YONEMITSU, 1970; HEGEDUS, 1982), ou ácido bórico (TERASHIMA; ISHII; KANAOKA, 1982) (FIGURA 3, etapa a).

Compostos contendo núcleo benzoxazólico também podem ser obtidos por meio de ciclização oxidativa de bases de Schiff – iminas que contém pelo menos um anel aromático (STEPHENS, 1949; YOSHIFUJI; NAGASE; INAMOTO, 1982), que por sua vez podem ser obtidas da reação entre um *o*-aminofenol e aldeído (LAYER, 1962; PATIL; ADIMURTHY, 2013) (FIGURA 3, etapas b e b').

Além de reagir com aldeídos (OSMAN; BASSIOUNI, 1962; SHIRAISHI; HAYAKAWA; SHIGEMOTO, 1983; MOGHADDAM, 2006), os *o*-aminofenóis podem reagir cloretos de acila (HOLAN; EVANS; LINTON, 1977), anidridos de ácido (THEILACKER, 1939; TRUJILLO-FERRARA, 2004) ou alcoóis primários (KONDO, 1991) para formar substâncias que apresentem um anel benzoxazólico. Tais reações também podem ser realizadas sob irradiação de micro-ondas (BOUGRIN; LOUPY; SOUFIAOUI, 1998; POTTORF, 2003), ou ainda podem ocorrer de forma direta ou necessitar de uma etapa adicional para obtenção dos benzoxazóis.

Os benzoxazóis podem também ser obtidos através da ciclização de amidas (FIGURA 3, etapa c'), previamente obtidas da reação entre *o*-aminofenol e cloreto de acila (SENER et al., 2000) (FIGURA 3, etapa c) por vários métodos, incluindo reação na presença de ácido polifosfórico (ZIEGLER; KAPPE; KOLLENZ, 1968) ou ácido *p*-toluenossulfônico (APTS) (DELUCA; KERWIN, 1997) sob aquecimento.

Figura 3 – Métodos de obtenção de benzoxazois a partir de *o*-aminofenóis

Fonte: Do autor.

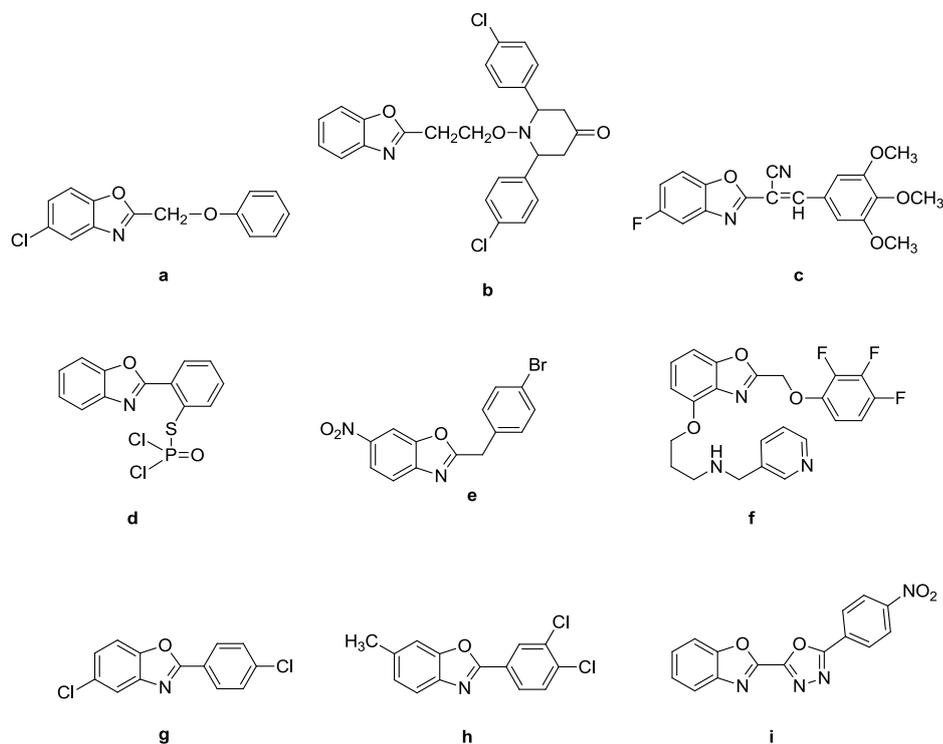
Novos métodos para obtenção de benzoxazois vêm sendo desenvolvidos e apresentam como um dos principais objetivos criar uma metodologia sustentável, com a utilização de solventes não nocivos ao ambiente. Podemos citar a obtenção de benzoxazois utilizando *o*-aminofenóis e aldeído em PEG400 sob aquecimento à 80-85°C. Além do uso de condições brandas de reação, é uma metodologia de fácil execução e apresenta rendimentos bons a excelente (KHUNT, 2014).

Outro método pouco agressivo ao ambiente foi descrito por Kumar e colaboradores (2013) e utiliza cloretos de acila e *o*-aminofenóis na presença de uma quantidade catalítica de bissulfato de sódio suportado em sílica sem solvente, por 12 h à 100°C. O procedimento é descrito como sendo simples e os produtos foram obtidos em bons rendimentos.

Derivados de benzoxazois têm sido estudados, através de diferentes abordagens sintéticas, devido às potenciais atividades biológicas apresentadas por essas substâncias. Entre as atividades terapêuticas atribuídas ao núcleo benzoxazólico estão as atividades antifúngicas e antibacterianas (ERTAN et al., 2009; KAPLANCIKLI et al., 2004; KIM et al., 2010; KUROYANAGI et al., 2010; RAMALINGAN et al., 2004; YILDIZ-OREN et al., 2004), anti-inflamatórias (SRIKANYH et al., 2010), anticancerígenas (JAUHARI et al., 2008) e inseticidas (SAMOTA; JHAJHARIA; SETH, 2009).

Tendo como foco o potencial antifúngico e antibacteriano dos benzoxazois, diversos pesquisadores relataram seus achados, em especial as atividades contra espécies de *Candida*. Na Figura 4, estão apresentadas as estruturas gerais de alguns desses produtos potencialmente ativos.

Figura 4 – Exemplos de benzoxazóis com atividade antimicrobiana



Fonte: Do autor.

Notas: a: YILDIZ-OREM et al., 2004; b: RAMALINGAN et al., 2004; c: JAUHARI et al., 2008; d: SAMOTA; JHAJHARIA; SETH, 2009; e: ERTAN et al., 2009; f: SHENG et al., 2010; g: PODUNAVAC-KUZMANOVICA et al., 2012; h: SHRIVASTAVA, 2012; i: VODELA, 2013.

A atividade antifúngica de derivados benzoxazólicos multissubstituídos (FIGURA 4, estrutura a) foi descrita por Yildiz-Oren e colaboradores (2004). Eles verificaram que a presença de grupos retiradores de elétrons no núcleo heterocíclico, como cloro e nitro, aumenta a atividade contra *Candida albicans*.

Sabe-se que o núcleo piperidínico apresenta propriedades biológicas interessantes, assim como o núcleo benzoxazólico. Por esse motivo, derivados benzoxazoliletóxipiperidonas (FIGURA 4, estrutura b) foram sintetizados por Ramalingan e colaboradores (2004) e suas atividades antibacterianas e fungicidas foram avaliadas. Observaram que as substâncias que continham átomos de cloro ou grupo metoxila apresentaram maior atividade antimicrobiana.

Ao avaliar alguns derivados benzoxazólicos 2-substituídos (FIGURA 4, estrutura c), Jauhari e colaboradores (2008) observaram que, de uma forma geral, átomos de cloro e grupo metoxila na posição 4 do anel aromático aumentam a atividade antifúngica. Também concluíram que a introdução de flúor ao invés do cloro na posição 5 do anel benzoxazólico melhora a atividade antifúngica contra *Aspergillus niger* e *Aspergillus flavus*.

Num estudo conduzido por Samota, Jhajharia e Seth (2009), foram avaliadas as atividades inseticidas e antifúngicas de organofosfatos derivados de benzoxazois 2-substituídos (FIGURA 4, estrutura d). Observaram um aumento em ambas as atividades e tal fato pode ser atribuído a maior lipofilicidade dessas substâncias em comparação a seus precursores.

Ertan e seus colaboradores (2009) sintetizaram derivados benzoxazólicos com substituintes fenila ou benzila (FIGURA 4, estrutura e) e avaliaram as atividades antibacterianas e antifúngicas dessas substâncias. Eles concluíram não haver diferenças significativas nas atividades entre os derivados quanto a conterem fenila ou benzila. Foi observado, ainda, que a presença de um átomo de halogênio nos derivados 2-fenil-benzoxazólicos potencializa a atividade contra bactérias e fungos. Provavelmente essas substâncias penetram nas células microbianas de maneira mais eficiente.

Sheng e colaboradores (2010) sintetizaram uma série de derivados benzoxazólicos e indólicos como análogos isostéricos de benzo-heterociclos inibidores de *N*-miristoiltransferase (NMT) (FIGURA 4, estrutura f). Os testes de atividade antifúngica indicaram que os derivados benzoxazólicos são muito mais potentes que os derivados indólicos. Para os derivados benzoxazólicos, as substituições no anel fenila foram importantes para a atividade antifúngica. Em geral, um grupo nitro na posição 3 do anel fenila diminuiu a atividade antifúngica, enquanto átomos de flúor adicionados a esse anel aumentaram a atividade, na maioria dos casos proporcionalmente ao número de átomos de flúor inseridos.

Podunavac-Kuzmanovića e colaboradores (2012) analisaram a relação entre lipofilicidade e atividade antifúngica de dezenove derivados benzoxazólicos (FIGURA 4, estrutura g) contra *Candida albicans* e concluíram que as substâncias com elevado log P são mais ativas, o que pode estar relacionado à ligação entre o fármaco e o receptor, pois a polaridade é um fator essencial nessa interação.

Shrivastava (2012) sintetizou derivados benzoxazólicos a partir da oxidação de bases de Schiff (FIGURA 4, estrutura h). O derivado que possuía uma metila exibiu melhor atividade contra *E. coli*; a substância que continha um átomo de cloro teve a ação mais pronunciada contra as bactérias Gram positivas *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas aeruginosa*; já o derivado que apresenta um grupo metoxila mostrou atividade moderada contra *P. aeruginosa*. Por outro lado, as substâncias contendo bromo e flúor foram menos ativas contra as bactérias testadas.

Vodela (2013) preparou uma série de benzoxazois (FIGURA 4, estrutura i) e os avaliou contra *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus albus*, *Streptococcus faecalis*,

Klebsiella pneumoniae, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella typhi* e contra fungos das espécies *Candida albicans* e *Aspergillus fumigatus*. Todas as substâncias apresentaram atividade, porém aquelas que continham como substituinte um grupo 4-nitrofenila foram mais ativas, exibindo uma atividade antimicrobiana muito próxima às observadas pelo fluconazol e pela amicacina, utilizados como substâncias de referência nos testes antifúngicos e antibacterianos, respectivamente. Os derivados contendo grupo fenila ou 4-clorofenila também exibiram boa atividade contra os micro-organismos testados.

Frente ao exposto, pode-se perceber que os derivados benzoxazólicos são heterociclos importantes na pesquisa e síntese de novos fármacos, especialmente na busca por novas substâncias com ação antifúngica.

1.3 HIBRIDIZAÇÃO MOLECULAR

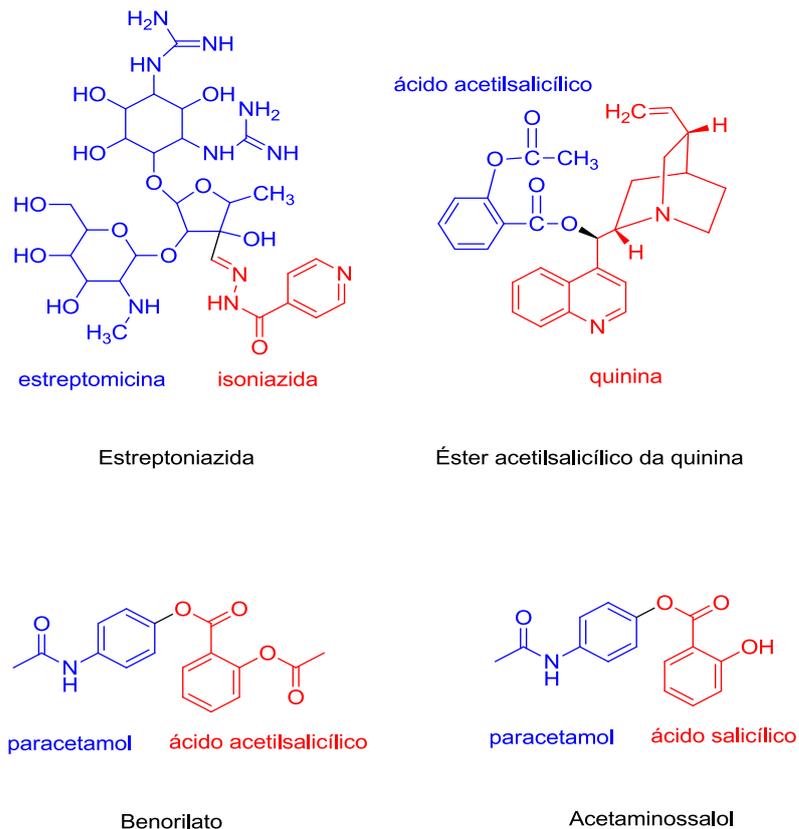
A hibridação molecular consiste no desenvolvimento racional de novas substâncias bioativas a partir da união de duas ou mais subunidades estruturais (moléculas ou grupos farmacofóricos) que apresentam atividades biológicas conhecidas. Essa forma de modificação molecular pode ser do tipo fármaco-fármaco, que se baseia na união de agentes farmacológicos distintos, ou do tipo farmacofórica, que parte da junção de grupos farmacofóricos diferentes. A hibridização molecular tem como objetivo a obtenção de substâncias que exibam melhores atividades farmacológicas, menor toxicidade e menos efeitos colaterais. (ARAÚJO, 2015; KAR, 2007; LAZAR, 2004; VIEGAS-JUNIOR et al, 2007).

As moléculas originais podem apresentar as mesmas ações biológicas, porém agindo em alvos distintos, fornecendo um híbrido com ação sinérgica; também podem exibir atividades diferentes, resultando em uma molécula com dupla ação sobre determinada patologia; pode-se ainda unir moléculas onde uma delas apresenta atividade biológica e a outra atua sobre determinado efeito adverso causado pela primeira, obtendo-se um híbrido chamado de modulador (ARAÚJO, 2015).

Como exemplos de moléculas potencialmente bioativas, obtidas por meio da estratégia de hibridização molecular, pode-se citar o agente antibacteriano estreptoniazida, resultante da união entre uma molécula de estreptomicina e uma molécula de isoniazida; o éster acetilsalicílico da quinina, substância com ação analgésica e antipirética, obtida da união entre

uma molécula de ácido acetilsalicílico e quinina (KAR, 2007); o fármaco benorilato, de ação anti-inflamatória, analgésica e antipirética, obtido mediante reação entre o paracetamol e cloreto do ácido acetilsalicílico; e ainda o acetaminossalol, híbrido proveniente da reação entre paracetamol e do ácido salicílico, com ação analgésica e antipirética (ARAÚJO, 2015). As estruturas dos produtos citados são exibidas na Figura 5.

Figura 5 – Estruturas de algumas substâncias híbridas com propriedades farmacêuticas



Fonte: Do autor

Vários estudos recentes também abordaram a síntese e avaliação da atividade antimicrobiana de substâncias híbridas obtidas pela união de duas subunidades biologicamente ativas. Em todos eles, pelo menos parte dos produtos sintetizados apresentaram ações mais potentes quando comparados às substâncias de partida (ADDLA et al., 2012; JARDOSH; PATEL, 2013; MISHRA et al., 2014).

Devido ao número cada vez menor de novos fármacos antimicrobianos aprovados e ao crescente surgimento de micro-organismos resistentes aos fármacos atualmente disponíveis, a hibridização molecular é uma ferramenta importante para síntese de novas substâncias bioativas, inclusive antifúngicas.

Sendo assim, essa estratégia pode ser usada para obtenção de moléculas híbridas de eugenol e outras substâncias que apresentem propriedades biológicas semelhantes a ele, como os derivados benzoxazólicos, a fim de se obter produtos com ação mais potente que seus precursores para uso no combate de infecções microbianas.

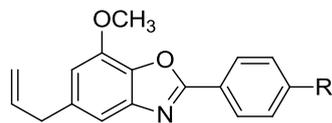
2 OBJETIVOS

O objetivo desse trabalho foi obter derivados benzoxazólicos do eugenol potencialmente antimicrobianos.

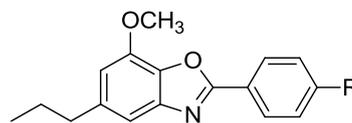
Os objetivos específicos foram:

- Sintetizar as séries de híbridos 9 e 10 (FIGURA 6), que contenham cadeias laterais alílica ou propílica, bem como substituintes aromáticos de propriedades eletrônicas diferentes, a fim de se avaliar sua influência nas atividades antimicrobianas;

Figura 6 – Estruturas gerais dos derivados benzoxazólicos propostos



Série 9



Série 10

Fonte: Do autor.

- Caracterizar os produtos finais obtidos por determinação de suas faixas de fusão e por espectroscopias no infravermelho (IV) e de ressonância magnética nuclear (RMN);
- Avaliar a atividade antifúngica dos produtos benzoxazólicos frente a espécies patogênicas ou oportunistas de *Candida* (*C. albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*);
- Avaliar a atividade antibacteriana dos produtos benzoxazólicos frente a espécie Gram positiva *Staphylococcus aureus* e Gram negativa *Escherichia coli*;
- Avaliar a citotoxicidade dos produtos frente a células sanguíneas monucleares humanas.

3 PARTE EXPERIMENTAL

As etapas de síntese, caracterização e avaliação biológica dos derivados benzoxazólicos propostos são descritas a seguir.

3.1 PROCEDIMENTOS GERAIS

As faixas de ponto de fusão foram determinadas em aparelho Buchi modelo 535.

As análises por espectrometria na região do infravermelho (IV) foram realizadas em espectrômetros Shimadzu-Affinity-1 ou Thermo Scientific Nicolet-iS50 e os valores dados em número de onda ($\bar{\nu}_{\text{máx}}$, cm^{-1}). As análises no IV foram realizadas no Núcleo de Controle de Qualidade ou no Laboratório de Análise Química de Fármacos, ambos da UNIFAL-MG.

As análises de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C foram realizadas no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear da UNIFAL-MG e obtidas em espectrômetro Bruker AC-300, empregando como padrão interno o tetrametilsilano. O solvente utilizado nas análises de RMN foi o clorofórmio deuterado (CDCl_3). Os valores de deslocamento químico (δ) foram descritos em ppm.

3.2 MÉTODOS DE SÍNTESE

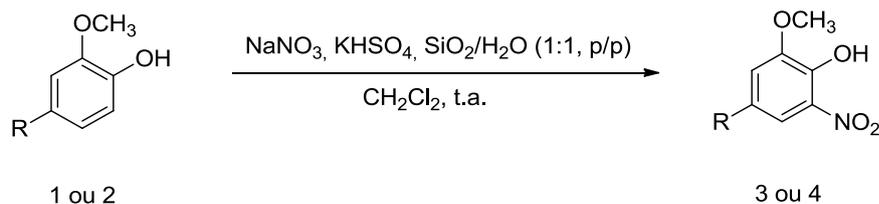
As substâncias propostas foram sintetizadas no Laboratório de Pesquisa em Química Farmacêutica (LQFar) da UNIFAL-MG. As etapas sintéticas foram executadas segundo técnicas clássicas de química orgânica ou por adaptação das mesmas.

A evolução das reações foi acompanhada por cromatografia em camada delgada (CCD), utilizando placas de sílica gel em suporte de alumínio com detector de fluorescência (Macherey-Nagel, DC-Fertigfolien ALUGRAM[®] Xtra Sil G/ UV₂₅₄). As purificações por cromatografia em coluna de sílica (CCS) foram realizadas com sílica gel 60, 70-230 mesh (Sorblin). Os eluentes empregados estão descritos em cada procedimento.

3.2.1 Obtenção do 4-alil-2-metoxi-6-nitrofenol (3) e do 2-metoxi-4-propil-6-nitrofenol (4)

O procedimento geral realizado para a reação de nitração (ZOLFIGOL; GHAEMI; MADRAKIAN, 2001) está ilustrado na Figura 7.

Figura 7 – Reação de nitração do eugenol (1) e do diidroeugenol (2)



Fonte: Do autor.

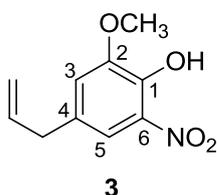
Notas: 1 e 3: R = CH₂-CH=CH₂; 2 e 4: R = CH₂-CH₂-CH₃.

Em um balão de fundo redondo de 250 mL foram adicionados, em 50 mL de diclorometano, eugenol (1) ou diidroeugenol (2) e quantidades equimolares de nitrato de sódio e bissulfato de potássio, além de sílica gel previamente hidratada com água destilada (TABELA 1). Deixou-se a mistura sob agitação magnética vigorosa, à temperatura ambiente, por 48 horas. O acompanhamento da reação foi realizado por CCD (clorofórmio/metanol, 9,5:0,5, v/v). Após o término da reação, a mistura reagente foi filtrada por gravidade em papel de filtro e o filtrado seco com sulfato de sódio anidro. Separou-se o sal por filtração simples e o filtrado foi concentrado em evaporador rotatório. O produto foi então purificado por CCS (hexano/ acetato de etila, 9:1, v/v) ou por extrações múltiplas com hexano.

Tabela 1 – Quantidades dos reagentes utilizados para as reações de nitração

Material de partida	NaNO ₃	KHSO ₄	SiO ₂ /H ₂ O
1 (5 mL; 32,53 mmol)	2,76 g (32,53 mmol)	4,43 g (32,53 mmol)	6,5 g/ 6,5 mL
2 (5 mL; 31,26 mmol)	2,65 g (31,26 mmol)	4,26 g (31,26 mmol)	6,3 g/ 6,3 mL

Fonte: Do autor.



4-alil-2-metoxi-6-nitrofenol

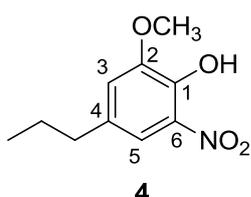
Óleo amarelo [2,48 g (11,87 mmol, 36,5 %)]

F.M.: C₁₀H₁₁O₄N **M.M.:** 209 g.mol⁻¹

IV (ν máx, cm⁻¹): 3520 (O-H), 1515, 1440 (NO₂), 1270 (C-O-C).

RMN de ^1H (δ ; CDCl_3 ; 300 MHz): 10,631 (s; 1H; O-H), 7,483 (d; 1H; $J = 1,8$ Hz; H5), 6,951 (d; 1H; $J = 1,8$ Hz; H3), 5,949-5,859 (m; 1H; $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2$), 5,143-5,072 (m; 2H; $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2$), 3,917 (s; 3H; OCH_3), 3,339 (d; 2H; $J = 6,6$ Hz; $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2$).

RMN de ^{13}C (δ ; CDCl_3 ; 75 MHz): 149,77 (C6), 144,79 (C1), 135,87 ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2$), 133,54 (C2), 131,17 (C4), 118,50 (C5), 117,08 ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2$), 114,98 (C3), 56,61 (OCH_3), 39,32 ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2$).



2-metoxi-6-nitro-4-propilfenol

Óleo amarelo escuro [4,10 g (18,96 mmol, 62 %)]

F.M.: $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{O}_4\text{N}$ **M.M.:** $211 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

IV ($\bar{\nu}$ máx, cm^{-1}): 3250 (O-H), 1541, 1448 (NO_2), 1260 (C-O-C).

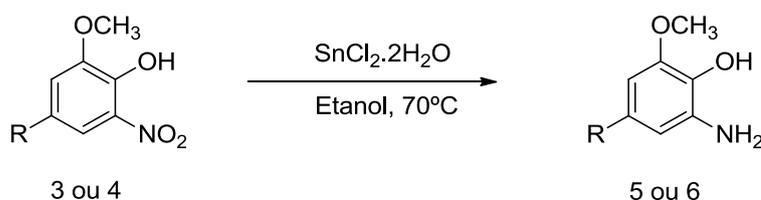
RMN de ^1H (δ ; CDCl_3 ; 300 MHz): 10,628 (s; 1H; O-H), 7,489 (d; 1H; $J = 1,8$ Hz; H5), 6,957 (d; 1H; $J = 1,8$ Hz; H3), 3,932 (s; 3H; OCH_3), 2,559 (t; 2H; $J = 7,2$ Hz; $\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}_2$), 1,701-1,577 (m; 2H; $\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}_2$), 0,945 (t; 3H; $J = 7,2$ Hz; $\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}_2$).

RMN de ^{13}C (δ ; CDCl_3 ; 75 MHz): 149,65 (C6), 144,52 (C1), 133,77 (C4), 133,56 (C2), 118,66 (C5), 114,79 (C3), 56,66 (OCH_3), 37,32 ($\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}_2$), 24,14 ($\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}_2$), 13,54 ($\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}_2$).

3.2.2 Obtenção do 4-alil-2-amino-6-metoxifenol, (5) e 2-amino-4-propil-6-metoxifenol (6)

O procedimento realizado para a reação de nitro-redução se baseou no trabalho realizado por Bellamy (1984) e está ilustrado na Figura 8.

Figura 8 – Reação de redução dos compostos 3 e 4.



Fonte: Do autor.

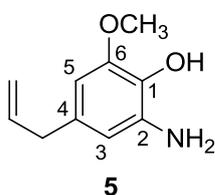
Notas: 3 e 5: $\text{R} = \text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$; 4 e 6: $\text{R} = \text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$.

Em um balão de fundo redondo de 250 mL foram adicionadas as substâncias 3 ou 4 (1 eq), cloreto de estanho II di-hidratado (5 eq) e 100 mL de etanol (TABELA 2). A mistura reagente foi aquecida a 70°C e agitada magneticamente até que, por CCD (clorofórmio/metanol, 9,5:0,5, v/v), foi constatado o fim da reação (cerca de 3 horas). Então, a mistura foi vertida em um béquer contendo água e gelo e o pH da mistura foi ajustado com solução aquosa de bicarbonato de sódio até aproximadamente 7. A mistura foi extraída com 10 porções de 20 mL de acetato de etila. Secou-se a fase orgânica com sulfato de sódio anidro, separou-se o sal por filtração simples e eliminou-se o solvente em evaporador rotatório, obtendo-se produto que foi empregado sem necessidade de purificação.

Tabela 2 - Quantidades dos reagentes utilizados para as reações de nitro-redução

Material de partida	SnCl ₂ .2H ₂ O
3 (2,48 g; 11,87 mmol)	13,41 g (59,33 mmol)
4 (4,10 g; 19,43 mmol)	21,97 g (97,15 mmol)

Fonte: Do autor.



4-alil-2-amino-6-metoxifenol

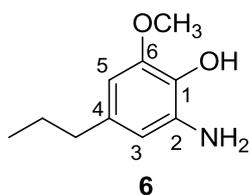
Sólido amarelo claro [1,30 g (7,26 mmol, 61,3 %)]

F.M.: C₁₀H₁₃O₂N **M.M.:** 179 g.mol⁻¹

IV ($\bar{\nu}$ máx, cm⁻¹): 3371, 3311 (NH₂), 3074 (O-H), 1606, 1456 (C=C), 1512 (N-H), 1230 (C-O-C).

RMN de ¹H (δ ; CDCl₃; 300 MHz): 6,249 (d; 1H; *J* = 1,8 Hz; H5), 6,194 (d; 1H; *J* = 1,8 Hz; H3), 6,000-5,865 (m; 1H; CH₂=CH-CH₂), 5,106-5,016 (m; 2H; CH₂=CH-CH₂), 3,836 (s; 3H; OCH₃), 3,240 (d; 2H; *J* = 6,9 Hz; CH₂=CH-CH₂).

RMN de ¹³C (δ ; CDCl₃; 75 MHz): 146,62 (C6), 137,86 (CH₂=CH-CH₂), 133,82 (C2), 131,65 (C4), 131,23 (C1), 115,32 (CH₂=CH-CH₂), 109,48 (C5), 101,95 (C3), 55,94 (OCH₃), 40,08 (CH₂=CH-CH₂).



2-amino-6-metoxi-4-propilfenol

Sólido amarelo [1,60 g (8,84 mmol, 45,5 %)]

F.M.: C₁₀H₁₅O₂N **M.M.:** 181 g.mol⁻¹

IV ($\bar{\nu}$ máx, cm⁻¹): 3370, 3307 (NH₂), 3012 (O-H), 1513 (N-H), 1212 (C-O-C);

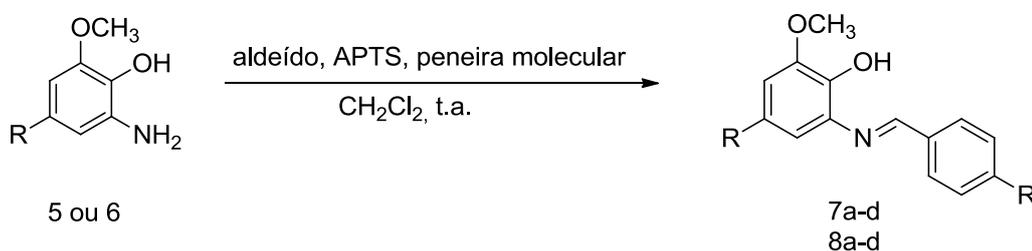
RMN de ^1H (δ ; CDCl_3 ; 300 MHz): 6,238 (d; 1H; $J = 1,8$ Hz; H5); 6,193 (d; 1H; $J = 1,8$ Hz; H3), 3,845 (s; 3H; OCH_3), 2,445 (t; 2H; $J = 7,2$ Hz; $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2$), 1,658-1,534 (m; 2H; $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2$), 0,934 (t; 3H; $J = 7,5$ Hz; $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2$).

RMN de ^{13}C (δ ; CDCl_3 ; 75 MHz): 146,46 (C6), 134,39 (C2), 133,74 (C4), 130,88 (C1), 109,31 (C5), 101,79 (C3), 55,92 (OCH_3), 37,99 ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2$), 24,74 ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2$), 13,82 ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2$).

3.2.3 Preparação das iminas (7a-d e 8a-d) - Método A

O primeiro método utilizado para obtenção das iminas foi adaptado de Andrade (2004), Benachenhou, Mesli e Guilard (2013) e Taguchi e Westheimer (1971). O procedimento realizado está ilustrado na Figura 9.

Figura 9 – Reação para obtenção das iminas utilizando o método A



Fonte: Do autor.

Notas: Série 7: $\text{R} = \text{CH}_2\text{-CH=CH}_2$; Série 8: $\text{R} = \text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$; 7a e 8a: $\text{R}' = \text{NO}_2$; 7b e 8b: $\text{R}' = \text{Cl}$; 7c e 8c: $\text{R}' = \text{OCH}_3$; 7d e 8d: $\text{R}' = \text{H}$.

Em um balão de fundo redondo de 25 mL foram adicionados os produtos 5 ou 6 (1 eq), o aldeído respectivo (1,2 eq), 10 mL de diclorometano, ácido *p*-toluenossulfônico (0,01 eq) e 1 g de peneira molecular 4 Å (TABELA 3). A mistura foi mantida sob agitação magnética a temperatura ambiente por 3 dias. O acompanhamento da reação foi realizado por CCD (hexano/acetato de etila, 7:3, v/v). Após o término da reação, adicionou-se metanol à mistura reagente em quantidade suficiente para solubilização e, em seguida, a mistura foi filtrada por gravidade em papel de filtro para separar a peneira molecular e o filtrado foi concentrado em evaporador rotatório. O material bruto obtido foi utilizado na etapa seguinte sem purificação.

Tabela 3 – Quantidades dos reagentes utilizados para obtenção de iminas pelo método A

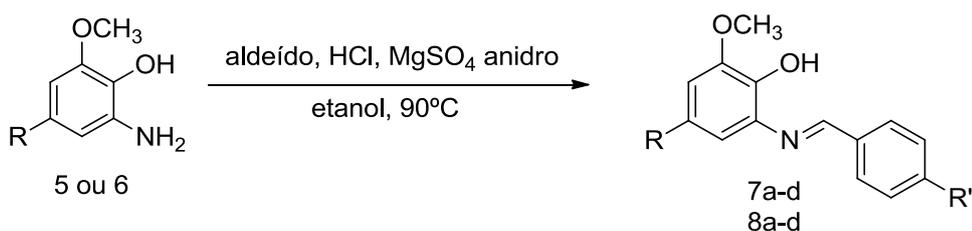
Material de partida (mg; mmol)	Aldeído (quantidade; mmol)	APTS (mg; mmol)
5 (100; 0,56)	4-nitrobenzaldeído (101,5 mg; 0,672)	1,3; 0,00672
5 (100; 0,56)	4-clorobenzaldeído (94,1 mg; 0,672)	1,3; 0,00672
5 (100; 0,56)	4-metoxibenzaldeído (82 µL; 0,672)	1,3; 0,00672
5 (100; 0,56)	benzaldeído (68 µL; 0,672)	1,3; 0,00672
6 (120; 0,66)	4-nitrobenzaldeído (119,6 mg; 0,792)	1,5; 0,00792
6 (120; 0,66)	4-clorobenzaldeído (111 mg; 0,792)	1,5; 0,00792
6 (120; 0,66)	4-metoxibenzaldeído (97 µL; 0,792)	1,5; 0,00792
6 (120; 0,66)	benzaldeído (80 µL; 0,792)	1,5; 0,00792

Fonte: Do autor.

3.2.4 Preparação das iminas (7a-d e 8a-d) - Método B

O segundo método utilizado para obtenção das iminas foi adaptado de Liu (1999) e Patil e Adimurthy (2013). O procedimento realizado está ilustrado na Figura 10.

Figura 10 – Reação para obtenção de iminas utilizando o método B



Fonte: Do autor.

Notas: Série 7: R = CH₂-CH=CH₂; Série 8: R = CH₂-CH₂-CH₃; 7a e 8a: R' = NO₂; 7b e 8b: R' = Cl; 7c e 8c: R' = OCH₃; 7d e 8d: R' = H.

Em um balão de fundo redondo de 10 mL foram adicionados o produto 5 ou 6 (1 eq), o aldeído (1 eq), 5 mL de etanol, 3 gotas de HCl e MgSO₄ anidro (5 eq) (TABELA 4). A mistura foi mantida sob agitação magnética em banho de glicerina à temperatura de 90°C, deixando o etanol evaporar, por 24 horas. O acompanhamento da reação foi realizado por CCD (hexano/acetato de etila, 7:3, v/v). Ao final da reação, adicionou-se NaHCO₃ à mistura reagente a fim de neutralizar o HCl utilizado como catalisador. Em seguida, a mistura foi

solubilizada em diclorometano e filtrada em sílica para retirada de substâncias inorgânicas e para reter impurezas mais polares. O filtrado foi concentrado em evaporador rotatório. O produto bruto obtido foi utilizado na etapa seguinte sem purificação, exceto os produtos de condensação do aminodiidroeugenol com o 4-nitrobenzaldeído e benzaldeído, os quais já foram obtidos como benzoxazois, conforme comentado na discussão.

Tabela 4 – Quantidades dos reagentes utilizados para obtenção de iminas pelo método B

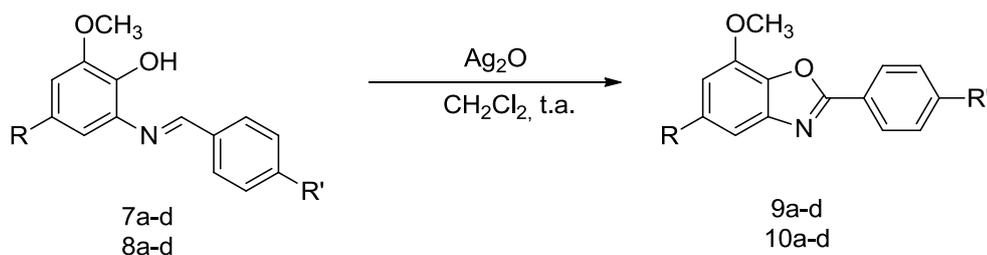
Material de partida (mg; mmol)	Aldeído (quantidade; mmol)	MgSO ₄ anidro (mg; mmol)
5 (200; 1,12)	4-nitrobenzaldeído (169 mg; 1,12)	674; 5,6
5 (200; 1,12)	4-clorobenzaldeído (157 mg; 1,12)	674; 5,6
5 (200; 1,12)	4-metoxibenzaldeído (136 µL; 1,12)	674; 5,6
5 (115; 0,64)	benzaldeído (65 µL; 0,64)	385; 3,2
6 (200; 1,10)	4-nitrobenzaldeído (166 mg; 1,10)	662; 5,5
6 (200; 1,10)	4-clorobenzaldeído (154 mg; 1,10)	662; 5,5
6 (200; 1,10)	4-metoxibenzaldeído (134 µL; 1,10)	662; 5,5
6 (200; 1,10)	benzaldeído (112 µL; 1,10)	662; 5,5

Fonte: Do autor.

3.2.5 Obtenção dos benzoxazois (9a-d e 10a-d) por ciclo-oxidação das iminas

Num primeiro momento, os benzoxazois foram obtidos por meio da ciclo-oxidação das iminas, baseando-se no método descrito por Yoshifuji, Nagase e Inamoto (1982). O procedimento geral está representado na Figura 11.

Figura 11 – Reação de obtenção dos benzoxazois por ciclo-oxidação das iminas



Fonte: Do autor.

Notas: Série 9: R = CH₂-CH=CH₂; Série 10: R = CH₂-CH₂-CH₃; 9a e 10a: R' = NO₂; 9b e 10b: R' = Cl; 9c e 10c: R' = OCH₃; 9d e 10d: R' = H.

Em um balão de 25 mL, foram adicionados a imina bruta, 15 mL de diclorometano e Ag_2O (1,3 eq) (TABELA 5). A mistura foi mantida sob agitação magnética à temperatura ambiente por 24 horas. O progresso da reação foi acompanhado por CCD (hexano/acetato de etila, 8:2, v/v). A mistura reacional foi filtrada em uma coluna curta de sílica gel e o solvente do filtrado foi eliminado em rotavapor. Em caso de necessidade, o produto final foi isolado por cromatografia em coluna (hexano/acetato de etila 9:1, v/v). Dados dos produtos obtidos estão mostrados na Tabela 8 (página 38).

Tabela 5 – Quantidades dos reagentes utilizados para obtenção dos benzoxazois via iminas.

Material de partida*(mg; mmol)	Ag_2O (mg; mmol)
7a (349; 1,12)	338; 1,46
7b (338; 1,12)	338; 1,46
7c (333; 1,12)	338; 1,46
7d (171; 0,64)	193; 0,83
8b (201; 0,66)	200; 0,86
8c (198; 0,66)	200; 0,86

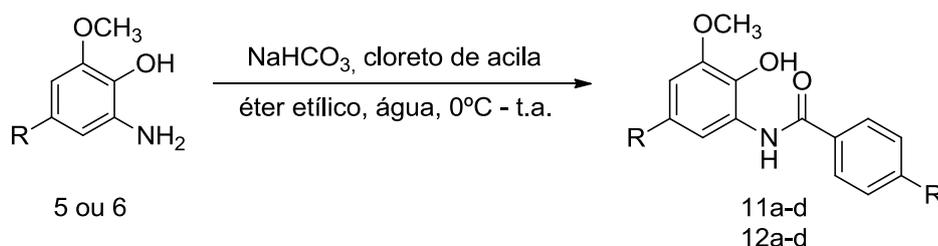
Fonte: Do autor.

Notas: * Massa de imina considerando-se 100% de rendimento na reação de sua obtenção.

3.2.6 Preparação das amidas (11a-d e 12a-d) à partir das substâncias 5 e 6.

As amidas foram sintetizadas a partir das substâncias 5 ou 6, conforme ilustrado na Figura 12 (SENER et al.,2000).

Figura 12 – Reação de obtenção de amidas



Fonte: Do autor.

Notas: Série 11: $\text{R} = \text{CH}_2\text{-CH}=\text{CH}_2$; Série 12: $\text{R} = \text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$; 11a e 12a: $\text{R}' = \text{NO}_2$; 11b e 12b: $\text{R}' = \text{Cl}$; 11c e 12c: $\text{R}' = \text{OCH}_3$; 11d e 12d: $\text{R}' = \text{H}$.

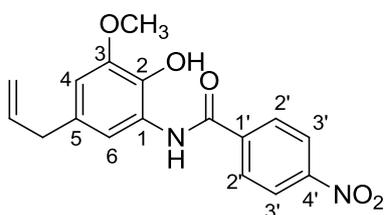
Em um balão de fundo redondo de 25 mL, foram adicionados a substância 5 ou 6 (1 eq), NaHCO₃ (1 eq), 5 mL de éter etílico e 5 mL de água. Essa mistura foi mantida sob agitação em banho de água/gelo. Solução do cloreto de acila respectivo (1 eq) em 5 mL de éter etílico foi adicionada gota a gota, durante meia hora, à mistura no balão (TABELA 6). Após adição de toda a solução de cloreto de ácido, a mistura foi mantida sob agitação à temperatura ambiente por até 2 horas. O progresso da reação foi acompanhado por CCD (hexano/acetato de etila, 7:3, v/v). Ao final das reações, o produto foi obtido via filtração simples (11a) ou extração do resíduo obtido pós evaporação do solvente com diclorometano.

Tabela 6 – Quantidades dos reagentes utilizados para obtenção das amidas

Material de partida (mg; mmol)	Cloreto de acila (quantidade; mmol)	NaHCO ₃ (mg; mmol)
5 (150; 0,84)	Cloreto de 4-nitrobenzoíla (156 mg; 0,84)	71; 0,84
5 (165; 0,92)	Cloreto de 4-clorobenzoíla (118 µL; 0,92)	77; 0,92
5 (170; 0,95)	Cloreto de 4-metoxibenzoíla (162 mg; 0,95)	80; 0,95
5 (165; 0,92)	Cloreto de benzoíla (107 µL; 0,92)	77; 0,92
6 (150; 0,83)	Cloreto de 4-nitrobenzoíla (154 mg; 0,83)	70; 0,83
6 (150; 0,83)	Cloreto de 4-clorobenzoíla (106 µL; 0,83)	70; 0,83
6 (150; 0,83)	Cloreto de 4-metoxibenzoíla (142 mg; 0,83)	70; 0,83
6 (150; 0,83)	Cloreto de benzoíla (96 µL; 0,83)	70; 0,83

Fonte: Do autor.

Nos casos em que se observou a formação de subproduto supostamente obtido por *O*-acilação, o produto bruto foi tratado por 24 horas à temperatura ambiente com solução de bicarbonato de sódio (1 eq em relação à amina de partida) em metanol e água (9:1, v/v). Detectada a hidrólise por meio de CCD (hexano/acetato de etila, 7:3, v/v), a água foi retirada com sulfato de sódio anidro, a mistura foi filtrada por gravidade em papel e o solvente eliminado em evaporador rotatório.



11a

N-(5-alil-2-hidroxi-3-metoxifenil)-4-nitrobenzamida

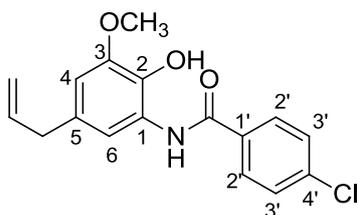
Sólido amarelo ouro [0,235 g (0,72 mmol, 85,5 %)]

F.M.: C₁₇H₁₆O₅N₂

M.M.: 328 g.mol⁻¹

RMN de ^1H (δ ; CDCl_3 ; 300 MHz): 8,387 (s; 1H; N-H), 8,328-8,284 (m; 2H; H3'), 8,064-8,020 (m; 2H; H2'), 7,765 (s; 1H, O-H), 6,552 (d; 1H; H6; $J = 1,8$ Hz), 6,028 (d; 1H; H4; $J = 1,8$ Hz), 6,000-5,888 (m; 1H; $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-$), 5,138-5,046 (m; 2H; $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2$), 3,891 (s; 3H; OCH_3), 3,346 (d; 2H; $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2$; $J = 6,9$ Hz).

RMN de ^{13}C (δ ; CDCl_3 ; 75 MHz): 163,26 ($\text{C}=\text{O}$), 149,66 ($\text{C4}'$), 146,43 (C3), 140,32 ($\text{C1}'$), 137,34 ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2$), 133,45 (C2), 132,20 (C5), 128,27 ($\text{C2}'$), 125,10 (C1), 123,93 ($\text{C3}'$), 115,90 ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2$), 113,24 (C6), 107,61 (C4), 56,12 (OCH_3), 40,19 ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2$).



11b

N-(5-alil-2-hidroxi-3-metoxifenil)-4-clorobenzamida

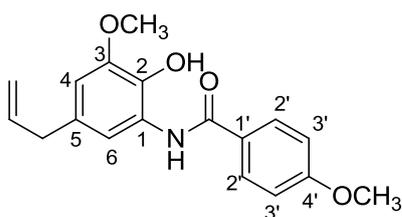
Sólido rosa claro [0,187 g (0,59 mmol, 63,8 %)]

F.M.: $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{O}_3\text{NCl}$

M.M.: $317,5 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

RMN de ^1H (δ ; CDCl_3 ; 300 MHz): 8,302 (s; 1H; N-H), 7,835 (d; 2H; H2'; $J = 8,1$ Hz); 7,720 (s; 1H; H6); 7,445 (d; 2H; H3'; $J = 8,1$ Hz), 6,533 (s; 1H; H4), 6,023-5,888 (m; 1H; $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-$), 5,125-5,046 (m; 2H; $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2$), 3,883 (s; 3H; OCH_3), 3,339 (d; 2H; $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2$; $J = 6,6$ Hz).

RMN de ^{13}C (δ ; CDCl_3 ; 75 MHz): 164,44 ($\text{C}=\text{O}$), 146,66 (C3), 138,13 ($\text{C4}'$), 137,47 ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2$), 133,55 (C2), 133,10 ($\text{C1}'$), 132,06 (C5), 128,99 ($\text{C2}'$), 128,54 ($\text{C3}'$), 125,55 (C1), 115,80 ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2$), 113,29 (C6), 107,32 (C4), 56,11 (OCH_3), 40,20 ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2$).



11c

N-(5-alil-2-hidroxi-3-metoxifenil)-4-metoxibenzamida

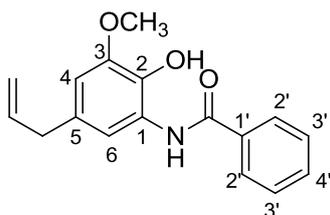
Sólido alaranjado [0,198 g (0,63 mmol, 66,7 %)]

F.M.: $\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{O}_4\text{N}$

M.M.: $313 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

RMN de ^1H (δ ; CDCl_3 ; 300 MHz): 7,898-7,849 (m; 2H; H2'), 7,653 (d; 1H; H6; $J = 1,8$ Hz), 6,998-6,949 (m; 2H; H3'), 6,527 (d; 1H; H4; $J = 1,8$ Hz), 6,000-5,892 (m; 1H; $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-$), 5,103-5,030 (m; 2H; $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2$), 3,890 (s; 3H; C3-OCH_3), 3,870 (s; 3H; $\text{C4}'\text{-OCH}_3$), 3,345 (d; 2H; $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2$; $J = 6,6$ Hz).

RMN de ^{13}C (δ ; CDCl_3 ; 75 MHz): 165,19 ($\text{C}=\text{O}$), 162,54 ($\text{C4}'$), 146,97 (C3), 137,57 ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2$), 133,76 (C2), 131,97 (C5), 129,03 ($\text{C2}'$), 126,84 (C1), 125,99 ($\text{C1}'$), 115,74 ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2$), 113,96 ($\text{C3}'$), 113,33 (C6), 107,16 (C4), 56,13 (C3-OCH_3), 55,45 ($\text{C4}'\text{-OCH}_3$), 40,22 ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2$).



11d

N-(5-allyl-2-hidroxi-3-metoxifenil)-benzamida

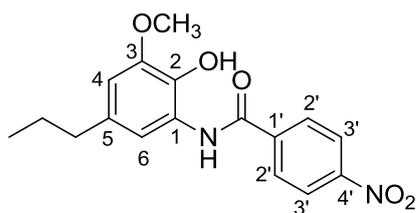
Semi-sólido castanho claro [0,104 g (0,37 mmol, 39,9 %)]

F.M.: C₁₇H₁₇O₃N

M.M.: 283 g.mol⁻¹

RMN de ¹H (δ; CDCl₃; 300 MHz): 8,338 (s; 1H; N-H), 7,919-7,887 (m; 2H; H₂'), 7,718 (d; 1H; H₆; *J* = 1,8 Hz); 7,549-7,478 (m; 3H, H₃' e H₄'), 6,534 (d; 1H; H₄; *J* = 1,8 Hz), 6,033-5,898 (m; 1H; CH₂=CH-CH₂-), 5,140-5,040 (m; 2H; CH₂=CH-CH₂), 3,885 (s; 3H; OCH₃), 3,346 (d; 2H; CH₂=CH-CH₂; *J* = 6,6 Hz).

RMN de ¹³C (δ; CDCl₃; 75 MHz): 165,61 (C=O), 146,81 (C₃), 137,53 (CH₂=CH-CH₂), 134,69 (C₁'), 133,68 (C₂), 131,99 (C₅), 131,85 (C₄'), 128,74 (C₃'), 127,11 (C₂'), 125,80 (C₁), 115,75 (CH₂=CH-CH₂), 113,32 (C₆), 107,26 (C₄), 56,11(OCH₃), 40,21(CH₂=CH-CH₂).



12a

N-(2-hidroxi-3-metoxi-5-propilfenil)-4-nitrobenzamida

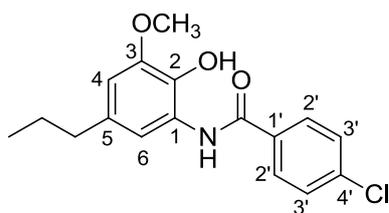
Sólido alaranjado [0,111 g (0,34 mmol, 40,7 %)]

F.M.: C₁₇H₁₈O₅N₂

M.M.: 330 g.mol⁻¹

RMN de ¹H (δ; CDCl₃; 300 MHz): 8,362-8,318 (m; 2H; H₃'), 8,084-8,039 (m; 2H; H₂'), 7,811 (s; 1H; H₆), 6,558 (d; 1H; H₄; *J* = 1,8 Hz), 5,830 (s; 1H; O-H), 3,910 (s; 3H; OCH₃), 2,565 (t; 2H; CH₃-CH₂-CH₂-; *J* = 7,2 Hz), 1,715-1,587 (m; 2H; CH₃-CH₂-CH₂-), 0,953 (t; 3H; CH₃-CH₂-CH₂-; *J* = 7,2 Hz).

RMN de ¹³C (δ; CDCl₃; 75 MHz): 163,16 (C=O), 149,71 (C₄'), 146,13 (C₃), 140,54 (C₁'), 134,96 (C₂), 132,95 (C₅), 128,27 (C₂'), 124,99 (C₁), 124,00 (C₃'), 112,93 (C₆), 107,47 (C₄), 56,13 (OCH₃), 38,16 (CH₃-CH₂-CH₂-), 24,82 (CH₃-CH₂-CH₂-), 13,78 (CH₃-CH₂-CH₂-)



12b

N-(2-hidroxi-3-metoxi-5-propilfenil)-4-clorobenzamida

Sólido bege [0,099 g (0,31 mmol, 37,4 %)]

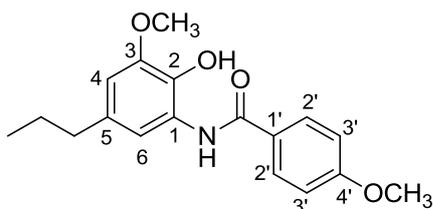
F.M.: C₁₇H₁₈O₃NCl

M.M.: 319,5 g.mol⁻¹

RMN de ¹H (δ; CDCl₃; 300 MHz): 8,252 (s; 1H; N-H), 7,868-7,823 (m; 2H; H₂'), 7,742 (d; 1H; H₆; *J* = 1,8 Hz), 7,484-7,438 (m; 2H; H₃'), 6,533 (d; 1H; H₄; *J* = 1,8 Hz), 5,986 (s; 1H;

O-H), 3,899 (s; 3H; OCH₃), 2,551 (t; 2H; CH₃-CH₂-CH₂-; $J = 7,5$ Hz), 1,707-1,578 (m; 2H; CH₃-CH₂-CH₂-), 0,945 (t; 3H; CH₃-CH₂-CH₂-; $J = 7,2$ Hz).

RMN de ¹³C (δ; CDCl₃; 75 MHz): 164,35 (C=O), 146,37 (C3), 138,11 (C4'), 134,81 (C2), 133,27 (C1), 133,09 (C5), 129,03 (C2'), 128,54 (C3'), 125,42 (C1), 113,01 (C6), 107,21 (C4), 56,12 (OCH₃), 38,14 (CH₃-CH₂-CH₂-), 24,82 (CH₃-CH₂-CH₂-), 13,79 (CH₃-CH₂-CH₂-)



12c

N-(2-hidroxi-3-metoxi-5-propilfenil)-4-metoxibenzamida

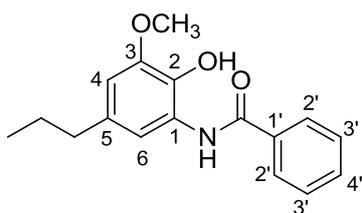
Sólido castanho escuro [0,248 g (0,79 mmol, 95,0 %)]

F.M.: C₁₈H₂₁O₄N

M.M.: 315 g.mol⁻¹

RMN de ¹H (δ; CDCl₃; 300 MHz): 8,236 (s; 1H; N-H), 7,900-7,851 (m; 2H; H2'), 7,635 (d; 1H; H6; $J = 1,5$ Hz), 6,995-6,947 (m; 2H; H3'), 6,518 (d; 1H; H4; $J = 1,8$ Hz), 3,899 (s; 3H; C3-OCH₃), 3,867 (s; 3H; C4'-OCH₃), 2,538 (t; 2H; CH₃-CH₂-CH₂-; $J = 7,5$ Hz), 1,699-1,576 (m; 2H; CH₃-CH₂-CH₂-), 0,940 (t; 3H; CH₃-CH₂-CH₂-; $J = 7,2$ Hz).

RMN de ¹³C (δ; CDCl₃; 75 MHz): 165,17 (C=O), 162,51 (C4'), 146,81 (C3), 134,66 (C2), 133,43 (C5), 129,02 (C2'), 126,91 (C1), 125,85 (C1'), 113,95 (C3'), 113,13 (C6), 107,15 (C4), 56,11 (C3-OCH₃), 55,44 (C4'-OCH₃), 38,09 (CH₃-CH₂-CH₂-), 24,79 (CH₃-CH₂-CH₂-), 13,79 (CH₃-CH₂-CH₂-)



12d

N-(2-hidroxi-3-metoxi-5-propilfenil)-benzamida

Óleo alaranjado [0,091 g (0,32 mmol, 38,6 %)]

F.M.: C₁₇H₁₉O₃N

M.M.: 285 g.mol⁻¹

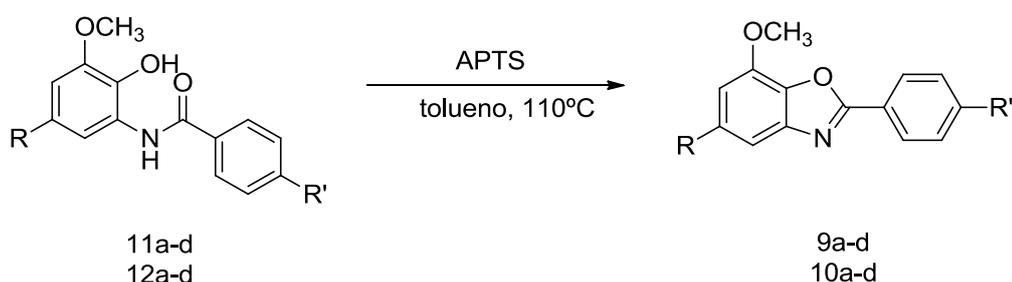
RMN de ¹H (δ; CDCl₃; 300 MHz): 8,310 (s; 1H; N-H), 7,921-7,893 (m; 2H; H2'), 7,720 (d; 1H; H6; $J = 1,5$ Hz), 7,554-7,488 (m; 2H; H3' e H4'), 6,533 (d; 1H; H4; $J = 1,8$ Hz), 6,174 (s; 1H; O-H), 3,898 (s; 3H; OCH₃), 2,553 (t; 2H; CH₃-CH₂-CH₂-; $J = 7,5$ Hz), 1,711-1,586 (m; 2H; CH₃-CH₂-CH₂-), 0,948 (t; 3H; CH₃-CH₂-CH₂-; $J = 7,2$ Hz).

RMN de ¹³C (δ; CDCl₃; 75 MHz): 165,55 (C=O), 146,59 (C3), 134,73 (C2), 133,64 (C1'), 133,22 (C5), 131,83 (C4'), 128,76 (C3'), 127,11 (C2'), 125,67 (C1), 113,08 (C6), 107,20 (C4), 56,11 (OCH₃), 38,12 (CH₃-CH₂-CH₂-), 24,81 (CH₃-CH₂-CH₂-), 13,80 (CH₃-CH₂-CH₂-)

3.2.7 Obtenção dos benzoxazóis (9a-d e 10a-d) por ciclização das amidas.

Em um segundo momento, os derivados benzoxazólicos foram obtidos por meio da ciclização de amidas. O procedimento, baseado no trabalho de Nakamura, Yasui e Ban (2013) está ilustrado na Figura 13.

Figura 13 – Obtenção dos benzoxazóis por ciclização das amidas



Fonte: Do autor

Notas: Série 9: R = CH₂-CH=CH₂; Série 10: R = CH₂-CH₂-CH₃; 9a e 10a: R' = NO₂; 9b e 10b: R' = Cl; 9c e 10c: R' = OCH₃; 9d e 10d: R' = H.

Em um balão de fundo redondo de 50 mL, foram adicionados 25 mL de tolueno, a amida respectiva (1 eq) e APTS (3 eq) (TABELA 7). A mistura foi mantida sob agitação magnética em banho de glicerina sob refluxo. O acompanhamento das reações foi realizado por CCD (hexano/ acetato de etila, 7:3, v/v).

Tabela 7 – Quantidades dos reagentes utilizados para obtenção dos benzoxazóis via amidas

Amida de partida (mg/ mmol)	APTS (mg/ mmol)
11a (100; 0,30)	174; 0,90
11b (187; 0,59)	337; 1,77
11c (178; 0,57)	325; 1,71
11d (104; 0,37)	209; 1,10
12a (96; 0,29)	165; 0,87
12b (85; 0,27)	152; 0,80
12c (240; 0,76)	436; 2,29
12d (76; 0,27)	152; 0,80

Fonte: Do autor

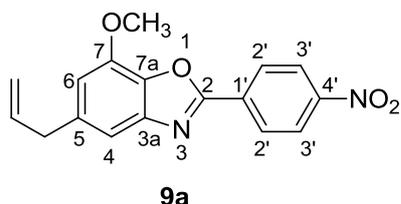
Ao final das reações, o tolueno foi eliminado em rotavapor e o produto obtido por filtração em sílica com diclorometano (9a, 9d, 10a, 10b, 10d) ou por CCS (hexano/ acetato de etila, 9:1, v/v) (9b, 9c, 10c). Dados dos produtos obtidos estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 – Dados dos derivados benzoxazólicos obtidos

Produto	Aspecto	F.M.	M.M. (g.mol ⁻¹)	P.F. (°C)	Rendimentos* (g; %)
9a	Sólido amarelo ouro	C ₁₇ H ₁₄ O ₄ N ₂	310,0	161,2-164,0	0,292; 84 / 0,090; 81
9b	Sólido bege	C ₁₇ H ₁₄ O ₂ NCl	299,5	103,8-105,5	0,060; 18 / 0,064; 23
9c	Sólido amarelo claro	C ₁₈ H ₁₇ O ₃ N	295,0	81,3-84,1	0,043; 13 / 0,045; 20
9d	Semi-sólido amarelo claro	C ₁₇ H ₁₅ O ₂ N	265,0	-	0,015; 9 / 0,089; 36
10a	Sólido amarelo ouro	C ₁₇ H ₁₆ O ₄ N ₂	312,0	136,5-140,0	0,020; 6 / 0,074; 33
10b	Sólido castanho claro	C ₁₇ H ₁₆ O ₂ NCl	301,5	81,5-84,5	0,015; 8 / 0,055; 26
10c	Sólido castanho escuro	C ₁₈ H ₁₉ O ₃ N	297,0	89,4-92,5	0,060; 30 / 0,075; 30
10d	Semi-sólido amarelo	C ₁₇ H ₁₇ O ₂ N	267,0	-	0,036; 12 / 0,049; 27

Fonte: Do autor

Notas: *Valores de rendimentos dos produtos obtidos à partir dos intermediários imínicos ou amídicos, respectivamente. Tais valores foram calculados considerando a quantidade das substâncias 5 ou 6 utilizadas.

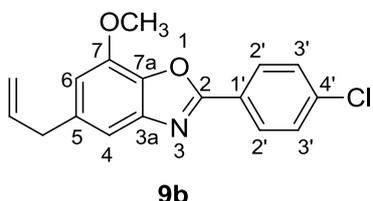


5-allyl-7-metoxi-2-(4-nitrofenil)benzo[d]oxazol

IV ($\bar{\nu}$ máx, cm⁻¹): 1618 (C=N), 1604, 1459 (C=C),
1518, 1342 (NO₂), 1319, 1202 (C-N), 1126 (C-O-C).

RMN de ¹H (δ ; CDCl₃; 300 MHz): 8,416-8,313 (m; 4H; H2' e H3'), 7,222 (s; 1H; H4), 6,755 (s; 1H; H6), 6,079-5,945 (m; 1H; CH₂=CH-CH₂), 5,171-5,110 (m; 2H; CH₂=CH-CH₂), 4,048 (s; 3H; OCH₃), 3,501 (d; 2H; J 6,6 Hz; CH₂=CH-CH₂).

RMN de ^{13}C (δ ; CDCl_3 ; 75 MHz): 160,61 (C2), 149,24 (C4'), 144,52 (C7), 143,66 (C3a), 138,92 (C5), 138,35 (C1'), 137,07 ($\text{CH}_2=\underline{\text{C}}\text{H}-\text{CH}_2$), 132,67 (C7a), 128,31 (C3'), 124,09 (C2'), 116,32 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2=\text{CH}-\text{CH}_2$), 112,32 (C4), 109,59 (C6), 56,30 ($\text{O}\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 40,49 ($\text{CH}_2=\text{CH}-\underline{\text{C}}\text{H}_2$).

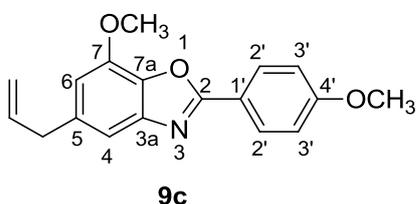


5-alil-2-(4-clorofenil)-7-metoxibenzo[d]oxazol

IV ($\bar{\nu}$ máx, cm^{-1}): 1624 (C=N), 1596, 1578, 1495 (C=C), 1317, 1199 (C-N), 1131 (C-O-C).

RMN de ^1H (δ ; CDCl_3 ; 300 MHz): 8,205-8,160 (m; 2H; H2'), 7,496-7,451 (m; 2H; H3'), 7,188 (d; 1H; J 1,2 Hz; H4), 6,708 (d; 1H; J 1,2 Hz; H6), 6,077-5,942 (m; 1H; $\text{CH}_2=\underline{\text{C}}\text{H}-\text{CH}_2$), 5,165-5,091 (m; 2H; $\underline{\text{C}}\text{H}_2=\text{CH}-\text{CH}_2$), 4,037 (s; 3H; $\text{O}\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 3,486 (d; 2H; J 6,6 Hz; $\text{CH}_2=\text{CH}-\underline{\text{C}}\text{H}_2$).

RMN de ^{13}C (δ ; CDCl_3 ; 75 MHz): 162,08 (C2), 144,37 (C7), 143,81 (C3a), 138,54 (C5), 137,77 (C4'), 137,62 (C7a), 137,28 ($\text{CH}_2=\underline{\text{C}}\text{H}-\text{CH}_2$), 129,17 (C3'), 128,84 (C2'), 125,60 (C1'), 116,11 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2=\text{CH}-\text{CH}_2$), 112,00 (C6), 108,94 (C4), 56,31 ($\text{O}\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 40,51 ($\text{CH}_2=\text{CH}-\underline{\text{C}}\text{H}_2$).

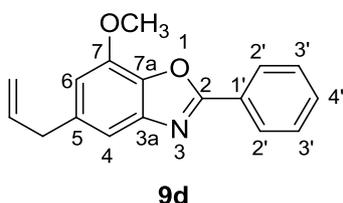


5-alil-7-metoxi-2-(4-metoxifenil)benzo[d]oxazol

IV ($\bar{\nu}$ máx, cm^{-1}): 1622 (C=N), 1603, 1582, 1492 (C=C), 1322, 1248 (C-N), 1131 (C-O-C).

RMN de ^1H (δ ; CDCl_3 ; 300 MHz): 8,220-8,171 (m; 2H; H2'), 7,168 (d; 1H; J 1,2 Hz; H4), 7,028-6,979 (m; 2H; H3'), 6,676 (d; 1H; J 1,2 Hz; H6), 6,078-5,944 (m; 1H; $\text{CH}_2=\underline{\text{C}}\text{H}-\text{CH}_2$), 5,161-5,078 (m; 2H; $\underline{\text{C}}\text{H}_2=\text{CH}-\text{CH}_2$), 4,040 (s; 3H; $\text{C}7-\text{O}\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 3,877 (s; 3H; $\text{C}4-\text{O}\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 3,479 (d; 2H; J 6,6 Hz; $\text{CH}_2=\text{CH}-\underline{\text{C}}\text{H}_2$).

RMN de ^{13}C (δ ; CDCl_3 ; 75 MHz): 163,22 (C2), 162,24 (C4'), 144,23 (C7), 144,08 (C3a), 137,43 ($\text{CH}_2=\underline{\text{C}}\text{H}-\text{CH}_2$), 137,38 (C5), 129,39 (C2'), 119,64 (C1'), 115,96 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2=\text{CH}-\text{CH}_2$), 114,25 (C3'), 111,73 (C6), 108,46 (C4), 56,33 ($\text{C}7-\text{O}\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 55,41 ($\text{C}4'-\text{O}\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 40,52 ($\text{CH}_2=\text{CH}-\underline{\text{C}}\text{H}_2$).

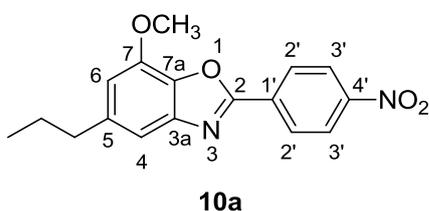


5-alil-7-metoxi-2-fenilbenzo[d]oxazol

IV ($\bar{\nu}$ máx, cm^{-1}): 1626 (C=N), 1603, 1585, 1449 (C=C), 1321, 1202 (C-N), 1132 (C-O-C).

RMN de ^1H (δ ; CDCl_3 ; 300 MHz): 8,284-8,252 (m; 2H; H_2'), 7,529-7,519 (m; 2H; H_3'), 7,506 (m; 1H; H_4'), 7,214 (d; 1H; J 1,5 Hz; H_4), 6,714 (d; 1H; J 1,5 Hz; H_6), 6,089-5,954 (m; 1H; $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2$), 5,174-5,092 (m; 2H; $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2$), 4,055 (s; 3H; OCH_3), 3,276 (d; 2H; J 6,6 Hz; $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2$).

RMN de ^{13}C (δ ; CDCl_3 ; 75 MHz): 144,37 (C2), 143,93 (C7), 137,58 (C3a), 137,37 ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2$), 131,41 (C4'), 128,82 (C3'), 127,63 (C2'), 127,10 (C5), 125,72 (C7a), 125,61 (C1'), 116,05 ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2$), 112,01 (C6), 108,86 (C4), 56,36 (OCH_3), 40,53 ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2$).

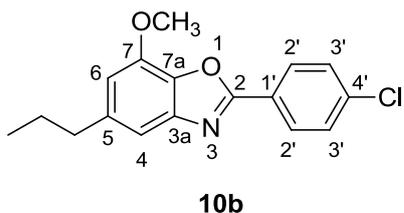


7-metoxi-2-(4-nitrofenil)-5-propilbenzo[d]oxazol

IV ($\bar{\nu}$ máx, cm^{-1}): 1625 (C=N), 1602 (C=C), 1518, 1339 (NO_2), 1309, 1200 (C-N), 1132 (C-O-C).

RMN de ^1H (δ ; CDCl_3 ; 300 MHz): 8,436-8,331 (m; 4H; H_2' e H_3'), 7,211 (s; 1H; H_4), 6,755 (s; 1H; H_6), 4,058 (s; 3H; OCH_3), 2,710 (t; 2H; J 7,5 Hz; $\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}_2$), 1,774-1,650 (m; 2H; $\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}_2$), 0,979 (t; 3H; J 7,5 Hz; $\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}_2$).

RMN de ^{13}C (δ ; CDCl_3 ; 75 MHz): 160,52 (C2), 149,24 (C4'), 144,37 (C7), 143,59 (C3a), 141,03 (C1'), 138,71 (C5), 132,79 (C7a), 128,30 (C3'), 124,11 (C2'), 112,03 (C6), 109,62 (C4), 56,30 (OCH_3), 38,45 ($\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}_2$), 24,86 ($\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}_2$), 13,72 ($\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}_2$).

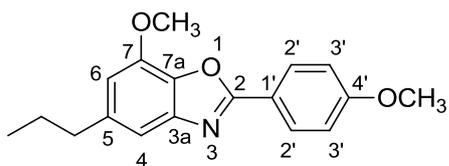


2-(4-clorofenil)-7-metoxi-5-propilbenzo[d]oxazol

IV ($\bar{\nu}$ máx, cm^{-1}): 1626 (C=N), 1596, 1577, 1493, 1456 (C=C), 1319, 1201 (C-N), 1132 (C-O-C).

RMN de ^1H (δ ; CDCl_3 ; 300 MHz): 8,212-8,167 (m; 2H; H_2'), 7,501-7,456 (m; 2H; H_3'), 7,172 (d; 1H; J 1,2 Hz; H_4), 6,705 (d; 1H; J 1,2 Hz; H_6), 4,046 (s; 3H; OCH_3), 2,692 (t; 2H; J 7,2 Hz; $\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}_2$), 1,762-1,638 (m; 2H; $\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}_2$), 0,970 (t; 3H; J 7,2 Hz; $\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}_2$).

RMN de ^{13}C (δ ; CDCl_3 ; 75 MHz): 161,98 (C2), 144,20 (C7), 143,68 (C3a), 140,48 (C5), 137,58 (C7a), 129,17 (C3'), 128,83 (C2'), 125,67 (C4'), 121,75 (C1'), 111,70 (C6), 108,98 (C4), 56,31 (OCH_3), 38,44 ($\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}_2$), 24,90 ($\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}_2$), 13,73 ($\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}_2$).



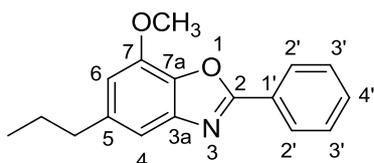
10c

7-metoxi-2-(4-metoxifenil)-5-propilbenzo[d]oxazol

IV ($\bar{\nu}$ máx, cm^{-1}): 1622 (C=N), 1605, 1583, 1496 (C=C), 1324, 1255 (C-N), 1132 (C-O-C).

RMN de ^1H (δ ; CDCl_3 ; **300 MHz**): 8,220-8,171 (m; 2H; H2'), 7,149 (d; 1H; J 1,2 Hz; H4), 7,026-6,917 (m; 2H; H3'), 6,668 (d; 1H; J 1,2 Hz; H6), 4,044 (s; 3H; C7-OCH₃), 3,875 (s, 3H; C4'-OCH₃), 2,681 (t; 2H; J 7,5 Hz; CH₃-CH₂-CH₂), 1,758-1,634 (m; 2H; CH₃-CH₂-CH₂), 0,967 (t; 3H; J 7,5 Hz; CH₃-CH₂-CH₂).

RMN de ^{13}C (δ ; CDCl_3 ; **75 MHz**): 163,09 (C2), 162,19 (C4'), 144,05 (C7), 143,97 (C3a), 140,06 (C5), 138,08 (C7a), 129,34 (C2'), 119,73 (C1'), 114,24 (C3'), 111,43 (C6), 108,48 (C4), 56,32 (C7-OCH₃), 55,40 (C4'-OCH₃), 38,44 (CH₃-CH₂-CH₂), 24,91 (CH₃-CH₂-CH₂), 13,73 (CH₃-CH₂-CH₂).



10d

7-metoxi-2-fenil-5-propilbenzo[d]oxazol

IV ($\bar{\nu}$ máx, cm^{-1}): 1623 (C=N), 1601, 1496, 1465 (C=C), 1309, 1199 (C-N), 1129 (C-O-C).

RMN de ^1H (δ ; CDCl_3 ; **300 MHz**): 8,294-8,241 (m; 2H; H2'), 7,533-7,482 (m; 3H; H3' e H4'), 7,192 (d; 1H; J 1,2 Hz; H4), 6,702 (d; 1H; J 1,2 Hz; H6), 4,056 (s; 3H; OCH₃), 2,695 (t; 2H; J 7,2 Hz; CH₃-CH₂-CH₂), 1,769-1,645 (m; 2H; CH₃-CH₂-CH₂), 0,976 (t; 3H; J 7,2 Hz; CH₃-CH₂-CH₂).

RMN de ^{13}C (δ ; CDCl_3 ; **75 MHz**): 162,94 (C2), 144,17 (C7), 143,80 (C3a), 140,24 (C5), 131,32 (C4'), 128,79 (C3'), 128,42 (C7a), 127,58 (C2'), 127,16 (C1'), 111,69 (C6), 108,87 (C4), 56,33 (OCH₃), 38,43 (CH₃-CH₂-CH₂), 24,90 (CH₃-CH₂-CH₂), 13,73 (CH₃-CH₂-CH₂).

3.3 AVALIAÇÃO BIOLÓGICA

Foram avaliadas as atividades antifúngicas e antibacterianas dos produtos, bem como sua citotoxicidade frente à células humanas saudáveis.

3.3.1 Avaliação da atividade antifúngica

As avaliações/determinações dos valores de concentrações inibitórias foram investigadas segundo a metodologia de microdiluição para leveduras conforme documento M27A3 (CLSI, 2008), com algumas modificações. O meio de cultura utilizado foi caldo Mueller Hinton e as substâncias foram testadas em 10 concentrações ($\mu\text{g/mL}$): 1000; 500; 250, 125, 100, 80, 40, 20, 10 e 5, por dissolução em dimetilsulfóxido (DMSO). Os ensaios foram realizados com fungos do gênero *Candida* (*C. albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*).

O meio de cultura caldo Mueller Hinton acrescido de DMSO nas mesmas concentrações finais propostas para os derivados foi utilizado como controle negativo. O fármaco padrão utilizado como controle positivo no teste foi o antifúngico fungistático fluconazol, nas concentrações de 64 a 0,03 $\mu\text{g/mL}$.

A avaliação foi feita em placas de microdiluição e o resultado analisado com leitor tipo ELISA. O ensaio foi feito em duplicata. Os valores de CI_{50} (menor concentração inibitória de 50% do crescimento microbiano) e CI_{100} (menor concentração inibitória de 100% do crescimento microbiano) foram determinados. Os ensaios foram realizados no Laboratório de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da UNIFAL-MG, com a supervisão da Prof^a. Dra. Amanda Latércia Tranches Dias.

3.3.2 Avaliação da atividade antibacteriana

As avaliações/determinações dos valores de concentrações inibitórias foram realizadas pelo teste de microdiluição segundo o protocolo M07-A9 (CLSI, 2012) para ensaios antibacterianos. O meio de cultura utilizado foi caldo Mueller Hinton e os produtos em teste foram preparados em 10 concentrações ($\mu\text{g/mL}$): 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,12, 1,56, 0,78, 0,39 e 0,19 por diluição em DMSO. Os ensaios foram realizados com cepas padrão *American Type Culture Collection* de bactérias Gram-negativa (*Escherichia coli* ATCC 25922) e Gram-positiva (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538).

Como controle negativo, usou-se meio de cultura caldo Mueller Hinton acrescido de DMSO nas mesmas concentrações finais propostas para os derivados. Empregou-se o fármaco cloranfenicol como controle positivo, nas mesmas concentrações dos produtos sintéticos.

Os ensaios foram feitos em triplicata e o crescimento das bactérias foi identificado por leitura espectrofotométrica a 530 nm, em leitor de microplacas, sendo determinadas as concentrações capazes de inibir 50% (CI₅₀) e 90% (CI₉₀) do crescimento microbiano. Essa avaliação foi realizada no laboratório de Bioprocessos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNIFAL-MG, pela doutoranda Taciane Maíra Magalhães Hipólito.

3.3.3 Avaliação da citotoxicidade frente à células sanguíneas mononucleares periféricas humanas

Os produtos sintetizados foram avaliados quanto à citotoxicidade frente a células sanguíneas mononucleares periféricas humanas. Foi utilizado o método do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) (DIAS et al., 2012). Volume de 90 µL de suspensão das células sanguíneas ($2,4 \times 10^6$ células/mL) foi distribuído em placas de microtitulação com 10 µL de cada produto avaliado, nas seguintes concentrações: 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,12, 1,56, 0,78 µg/mL e incubados a 37 °C em um incubador a 5% de CO₂ por 48 h. Em seguida, foram adicionados 10 µL do corante tetrazólico (5 mg/mL) e as células foram incubadas novamente por um período de 4 horas. Então, o meio foi cuidadosamente removido e adicionado a 100 µL de DMSO para solubilização dos cristais de formazana. As placas foram então agitadas por 5 min e as absorbâncias para cada amostra medidas em um leitor tipo ELISA a 560 nm.

A porcentagem de citotoxicidade foi calculada pela relação $[(A-B)/Ax100]$, onde A e B são os valores de absorbância do controle e das células tratadas, respectivamente. Os dados foram analisados usando regressão linear para gerar os valores de CC₅₀ (concentração citotóxica para 50%). Os índices de seletividade foram expressos como a razão CC₅₀/CI₅₀. Os ensaios de citotoxicidade foram feitos no Laboratório de Vacinas do Instituto de Ciências Biomédicas da UNIFAL-MG, pelo Prof. Dr. Luiz Felipe Leomil Coelho.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A pesquisa e o desenvolvimento de novos antimicrobianos constituem uma ferramenta importante para se garantir o tratamento de infecções por micro-organismos de linhagens resistentes. O método de modificação molecular de substâncias com atividade biológica já descrita é uma estratégia de química medicinal muito empregada, uma vez que gera análogos com maior probabilidade de serem ativos em comparação à síntese ao acaso.

Os produtos de origem vegetal oferecem uma alternativa promissora para o tratamento de doenças causadas por micro-organismos. Sabe-se que os produtos naturais têm sido constantemente avaliados e utilizados para o tratamento de infecções microbianas e numerosas substâncias provenientes de óleos essenciais, como o eugenol, são capazes de inibir o crescimento de vários micro-organismos patogênicos. Nesse contexto, a síntese de derivados do eugenol se justifica pela ampla variedade de propriedades farmacológicas que ele possui, destacando-o como um protótipo potencial.

Da mesma forma, compostos heterocíclicos, como os benzoxazóis e seus derivados, são alvos atraentes para a síntese de novos fármacos, uma vez que são passíveis de modificação estrutural e ainda apresentam diversas e importantes propriedades biológicas, incluindo atividade antimicrobiana.

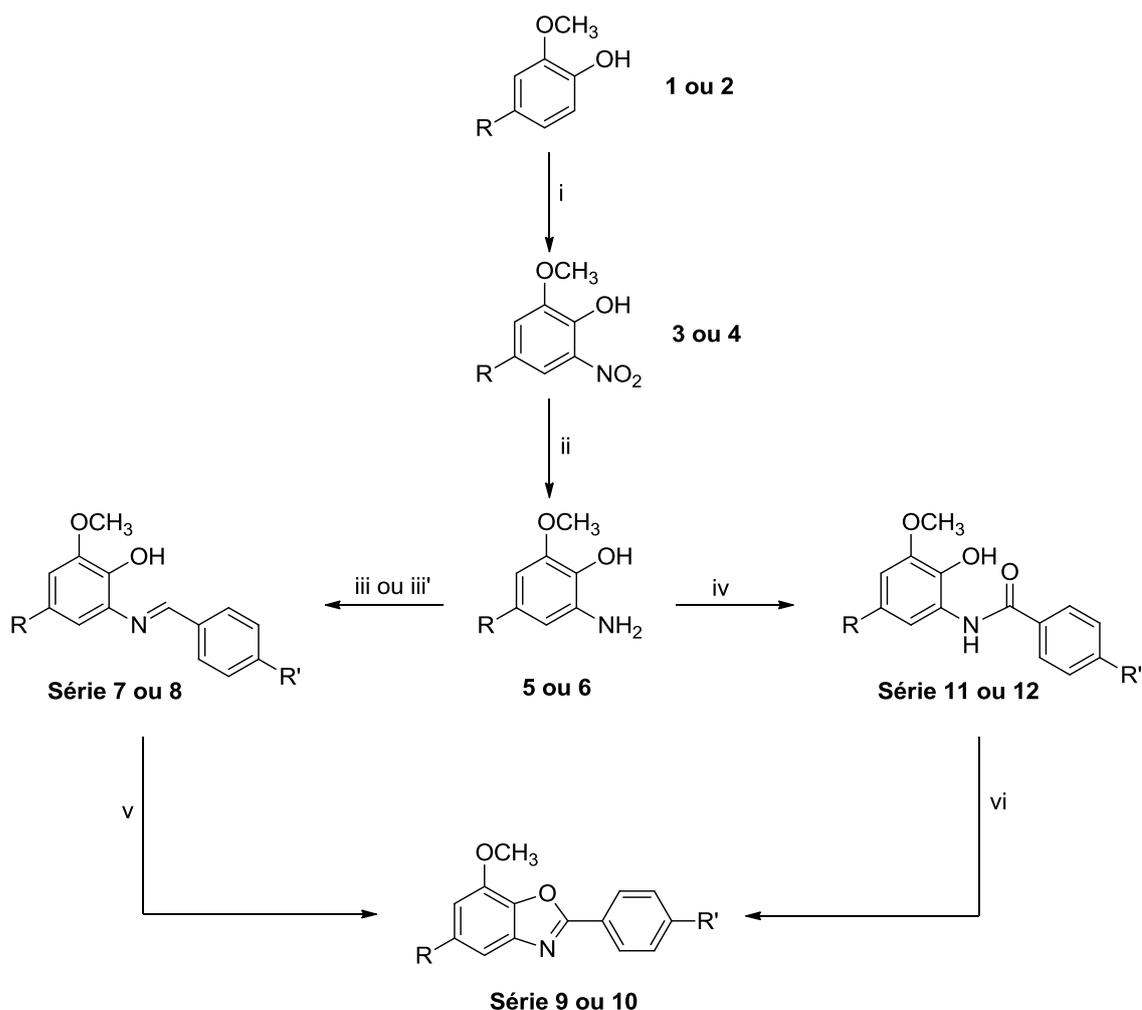
Durante as pesquisas de novos candidatos a fármacos, vários derivados do eugenol e de benzoxazóis foram obtidos, a partir de diferentes reações orgânicas, com intuito de potencializar uma ou mais das suas atividades biológicas. Entretanto, até o presente momento, não foram encontrados na literatura trabalhos envolvendo a síntese de derivados mistos entre benzoxazóis e eugenol.

Considerando as propriedades antimicrobianas apresentadas por ambas substâncias citadas, tais derivados foram sintetizados através de estratégia de hibridização molecular, reunindo características estruturais distintas em uma única molécula, com intuito de obter substâncias com maiores propriedades antimicrobianas que seus precursores.

4.1 QUÍMICA

A rota sintética desenvolvida para obtenção dos derivados benzoxazólicos propostos está representada na Figura 14. Além do eugenol (1), o diidroeugenol (2), derivado em que R é uma cadeia propílica em vez da cadeia alílica, também foi utilizado com material de partida, com o intuito de verificar a influência da cadeia lateral na atividade biológica.

Figura 14 – Rota sintética para obtenção das substâncias propostas

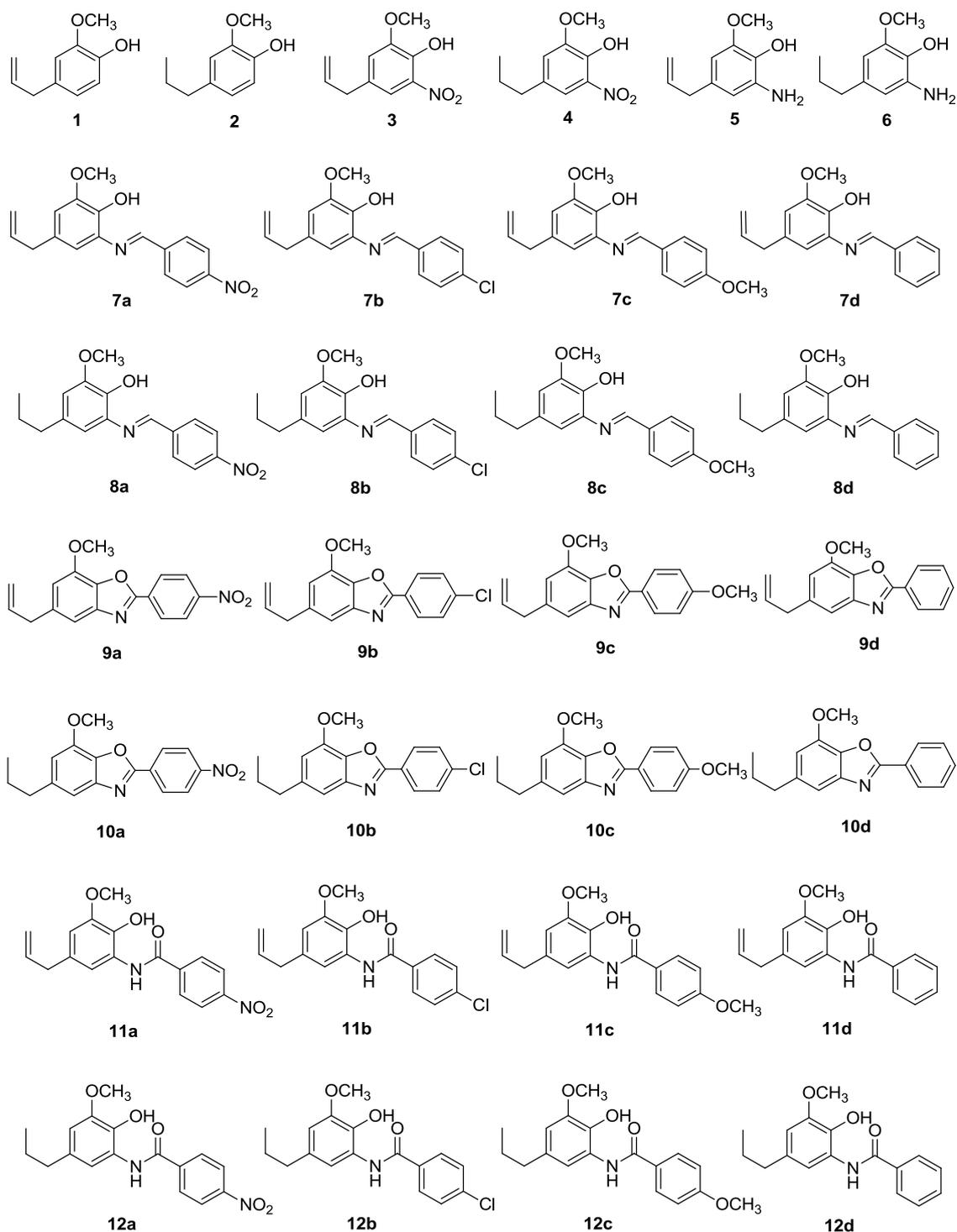


Fonte: Do autor.

Notas: i) NaNO_3 , KHSO_4 , sílica/ H_2O (1:1, p/p), CH_2Cl_2 , t.a.; ii) $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, etanol, 70°C ; iii) aldeído, APTS, peneira molecular, CH_2Cl_2 , t.a.; iii') aldeído, HCl , MgSO_4 anidro, etanol, 90°C ; iv) cloreto de acila, NaHCO_3 , éter etílico, água, 0°C - t.a.; v) Ag_2O , CH_2Cl_2 , t.a.; vi) APTS, tolueno, 100°C .

Na Figura 15, são apresentadas as estruturas de todos os intermediários, bem como dos produtos finais envolvidos na rota sintética apresentada acima, além dos códigos a eles atribuídos.

Figura 15 – Estruturas dos materiais de partida, intermediários e produtos finais



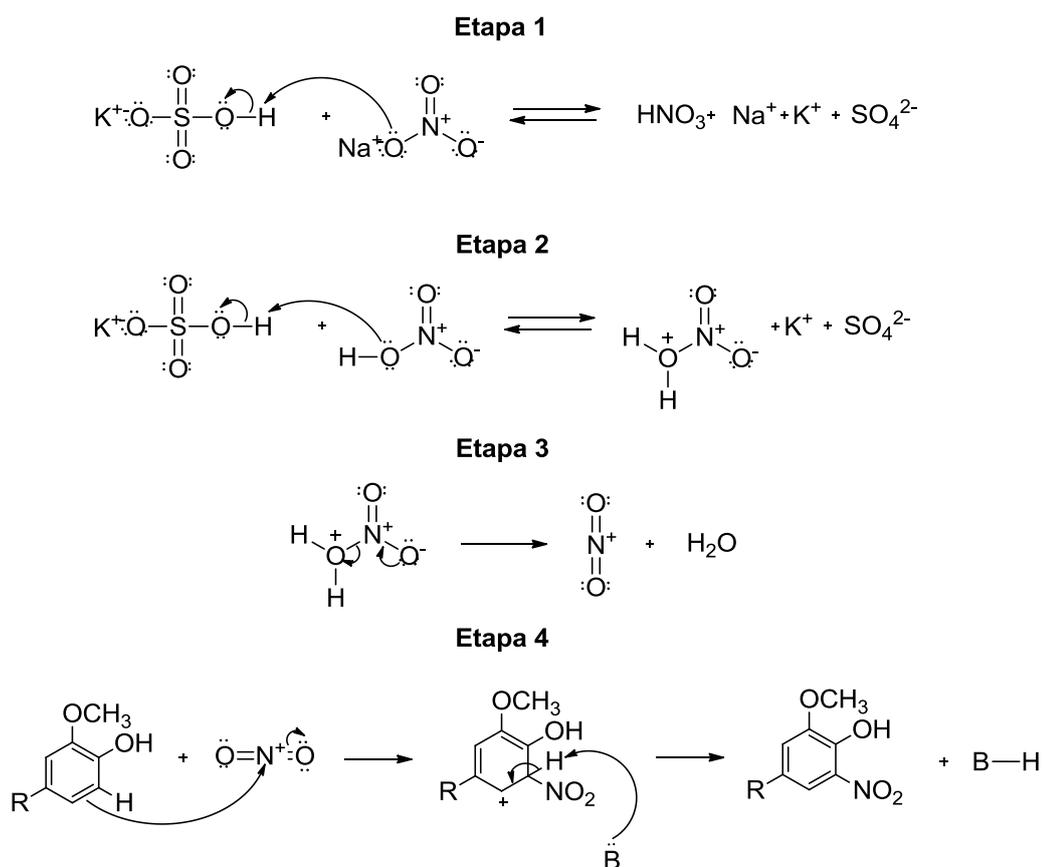
Fonte: Do autor.

A reação de nitração foi realizada conforme descrito por Zolfigol, Ghaemi e Madrakian (2001) e foi escolhida por ser específica para introdução de grupos nitro em fenóis e apresentar seletividade pela posição *orto*, a qual é necessária para obtenção dos benzoxazóis. Além disso, é realizada em condições brandas, sem o uso de reagentes de alta periculosidade como os ácidos nítrico e sulfúrico, empregados nos métodos tradicionais de

nitração aromática. Altos rendimentos foram descritos para esse método, porém o rendimento obtido aqui foi bem inferior àqueles relatados.

Durante a reação, o bissulfato de potássio interage com o nitrato de sódio, promovendo a geração *in situ* de ácido nítrico, que por sua vez interage com outra molécula de bissulfato de potássio, havendo a formação do íon nitrônio. Esse íon é o eletrófilo que reage com o eugenol, por ataque do sistema π do anel aromático, formando um íon arênio, que é estabilizado por ressonância. Essa etapa é lenta, uma vez que a substância é convertida em outra menos estável. Em seguida, o íon arênio perde um próton para uma base de Lewis, nesse caso provavelmente a própria água gerada na reação, para então formar os produtos nitrado 3 e 4. A última etapa é rápida, pois restaura a aromaticidade (ZOLFIGOL; GHAEMI; MADRAKIAN, 2001; SYKES, 1985). O mecanismo proposto para a formação dos derivados 3 e 4 está representado abaixo (FIGURA 16).

Figura 16 – Mecanismo provável da formação dos produtos 3 e 4.

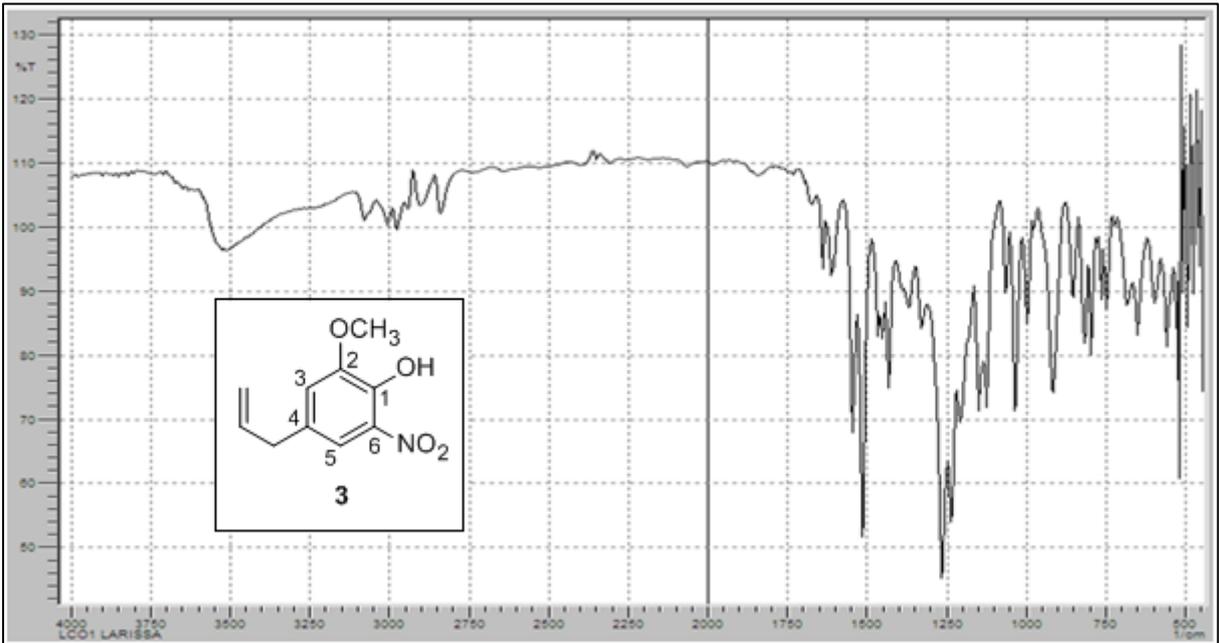


Fonte: Do autor.

Dos dados obtidos pela análise em espectrômetro no IV para a substância 3, obtido à partir do eugenol (FIGURA 17), destacam-se duas bandas, uma em 1515 e outra em 1440

cm^{-1} , aproximadamente, características de grupo nitro (NO_2). Pode-se observar ainda a presença de bandas características do eugenol, como uma banda larga centrada a 3520 cm^{-1} , característica de grupos hidroxila; uma banda a 1550 cm^{-1} , referente às ligações duplas do anel aromático; uma banda a 1600 cm^{-1} correspondente às ligações $\text{C}=\text{C}$ de alcenos; e uma banda característica de ligação $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ de éter, a 1270 cm^{-1} .

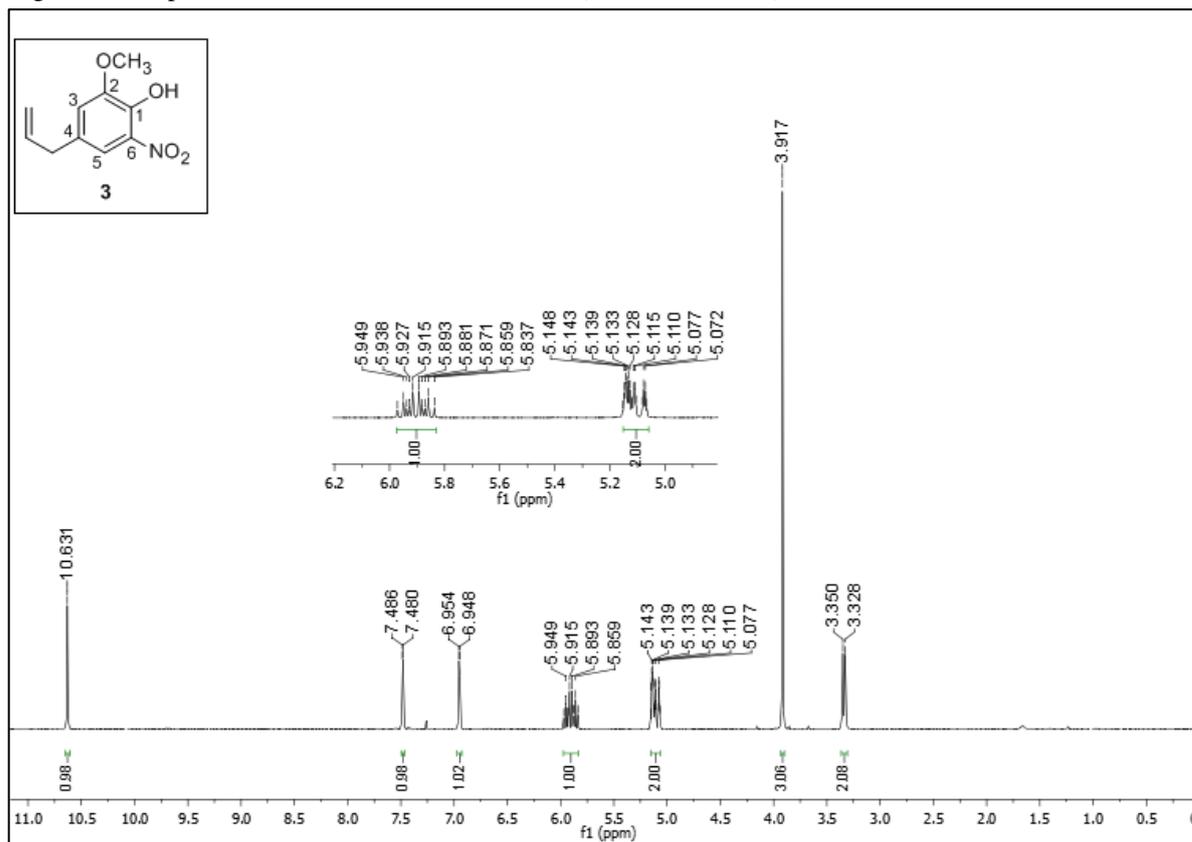
Figura 17 – Espectro no IV da substância 3



Fonte: Do autor.

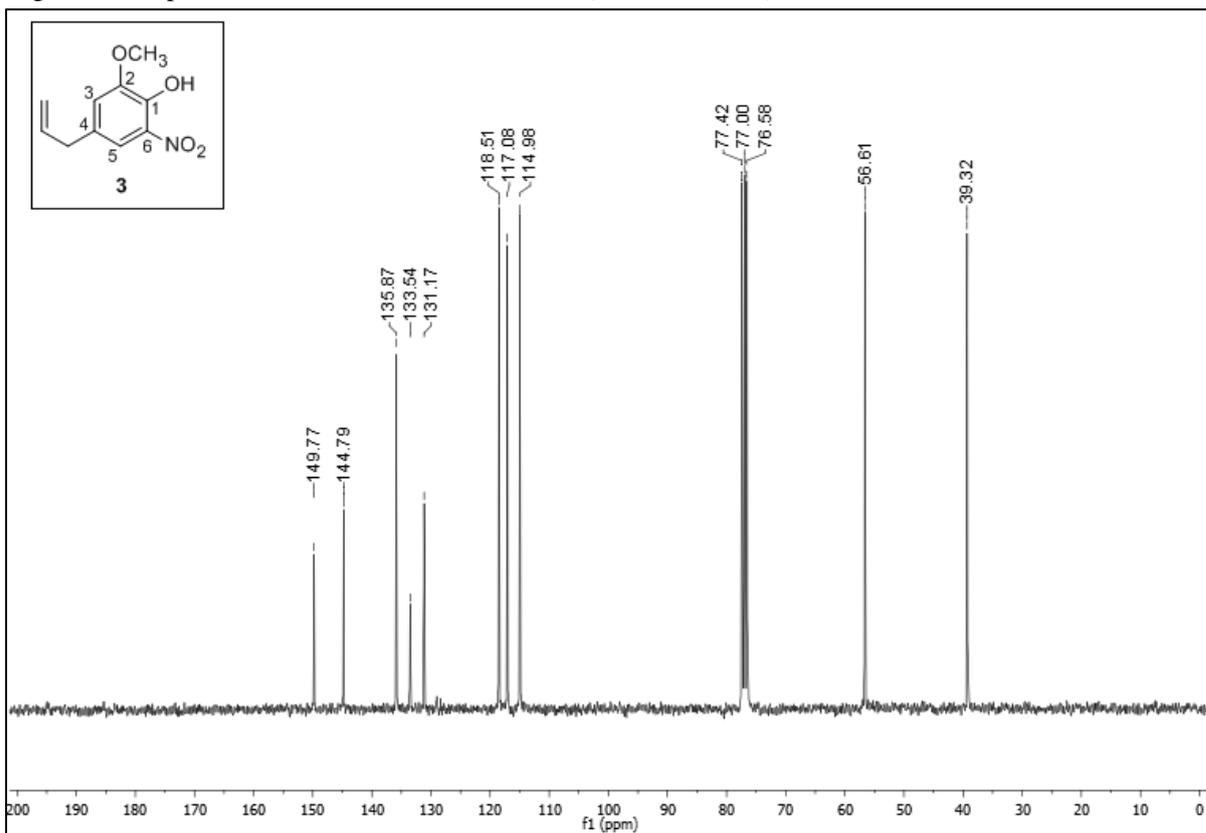
No espectro de RMN de ^1H da substância 3 (FIGURA 18), podem-se notar os simpletos relativos aos hidrogênios dos grupos OCH_3 e OH , além dos dupletos referentes aos dois hidrogênios aromáticos a δ 3,917 , 10,631 , 7,483 e 6,951 respectivamente. Dentre os hidrogênios aromáticos, aquele que apresenta maior δ é o que está mais próximo do grupo nitro, uma vez que esse grupo exerce um efeito retirador de elétrons, deixando os átomos próximos a ele com menor densidade eletrônica e, portanto, maior capacidade de absorver a radiação incidida sobre eles. Também se observam os dois multipletos e o dupletos referentes aos hidrogênios da cadeia alílica a δ 5,949 – 5,859 ($\text{HC}=\text{CH}_2$), 5,143 – 5,072 ($\text{HC}=\text{CH}_2$) e 3,339 (CH_2-CH), respectivamente.

Figura 18 – Espectro de RMN de ^1H da substância 3 (CDCl_3 , 300 MHz)

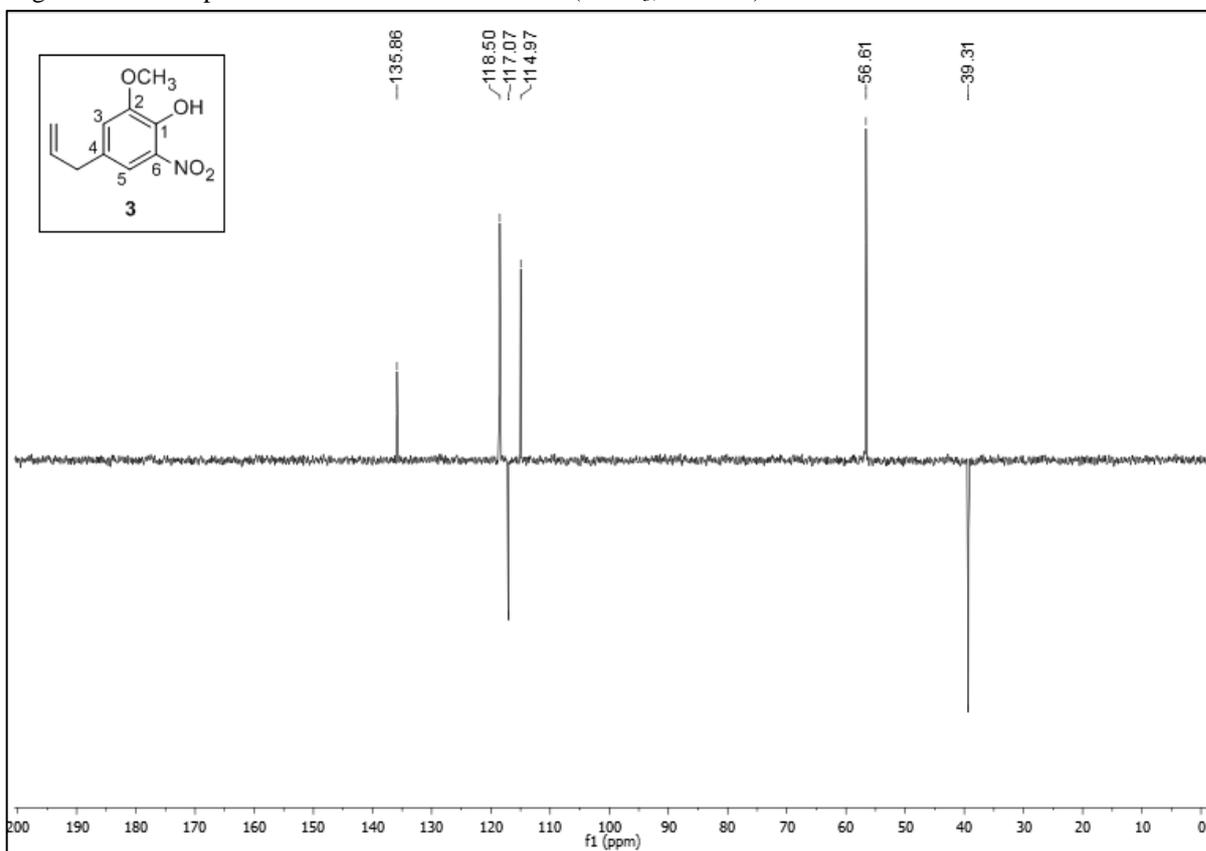


Fonte: Do autor.

No espectro de RMN de ^{13}C da substância 3 (FIGURA 19), pode-se observar um sinal relativo ao carbono da metoxila a δ 56,61, bem como os sinais referentes aos carbonos da cadeia lateral alílica a δ 39,32 ($\text{H}_2\text{C}-\text{CH}=\text{CH}_2$), 117,08 ($\text{HC}=\text{CH}_2$) e 135,87 ($\text{HC}=\text{CH}_2$). Os carbonos aromáticos hidrogenados são notados a δ 118,50 e 114,98, sendo o primeiro correspondente ao carbono mais próximo ao grupo nitro, que é retirador de elétrons. A δ 149,77, 144,79, 133,54 e 131,17 notam-se os carbonos aromáticos ligados aos grupos nitro, hidroxila, metoxila e a cadeia alílica, respectivamente. Pelo subspectro DEPT-135 (FIGURA 20), pode-se confirmar parte das atribuições feitas anteriormente, com destaque para os sinais de carbono metilênico a δ 117,08 e 39,32.

Figura 19 – Espectro de RMN de ^{13}C da substância 3 (CDCl_3 , 75 MHz)

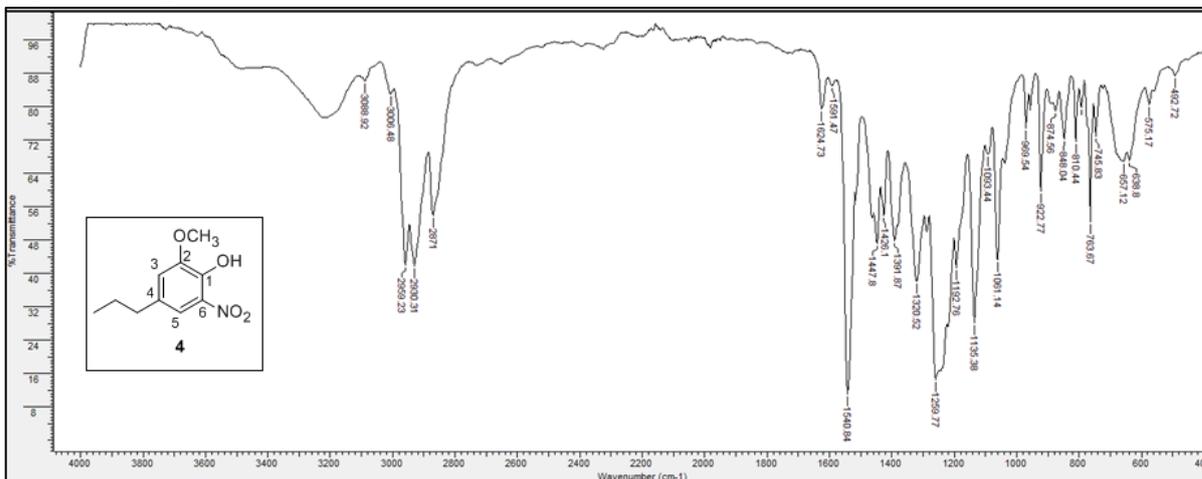
Fonte: Do autor.

Figura 20 – Subespectro DEPT-135 da substância 3 (CDCl_3 , 75 MHz)

Fonte: Do autor.

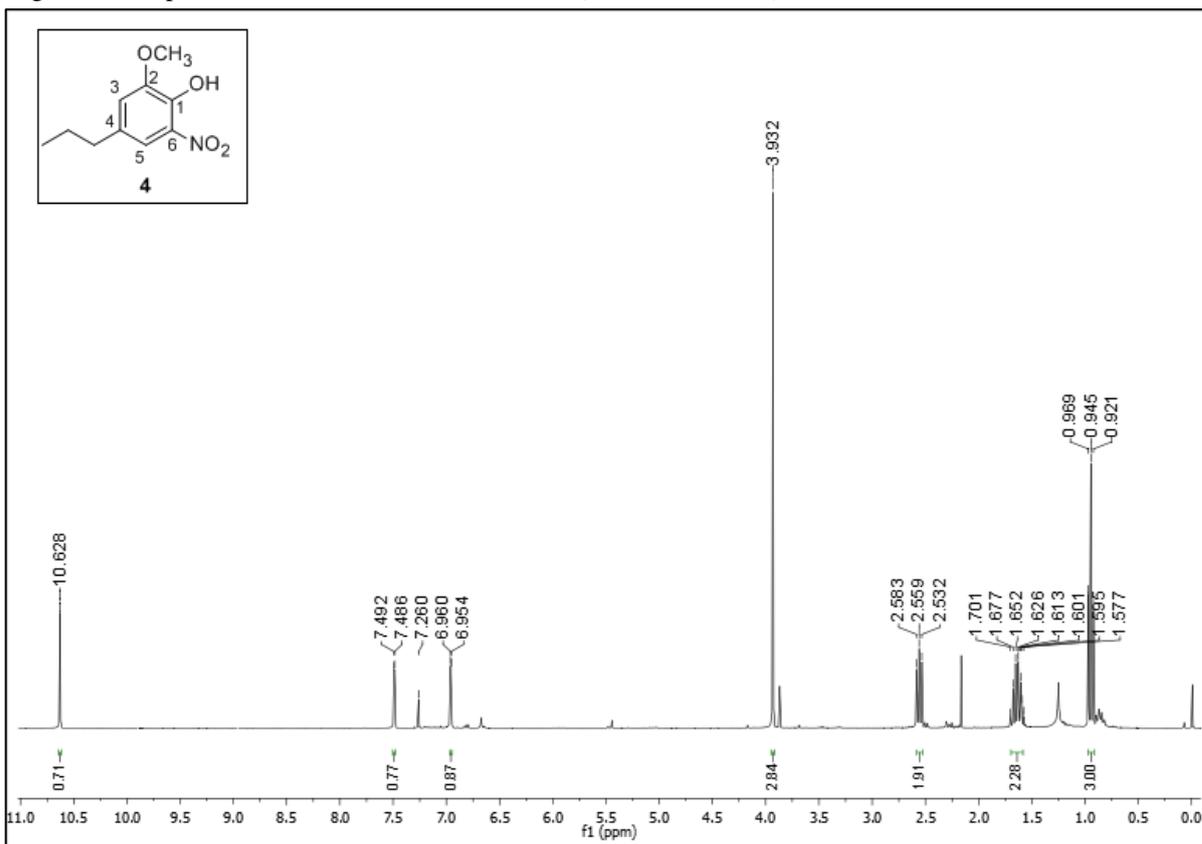
A reação de nitração foi realizada também para o diidroeugenol, obtendo-se o produto 4. No espectro no IV da substância 4 (FIGURA 21) destacam-se duas bandas, uma em 1541 e uma em 1448 cm^{-1} , resultantes da deformação axial do grupo nitro (NO_2).

Figura 21 – Espectro no IV da substância 4.



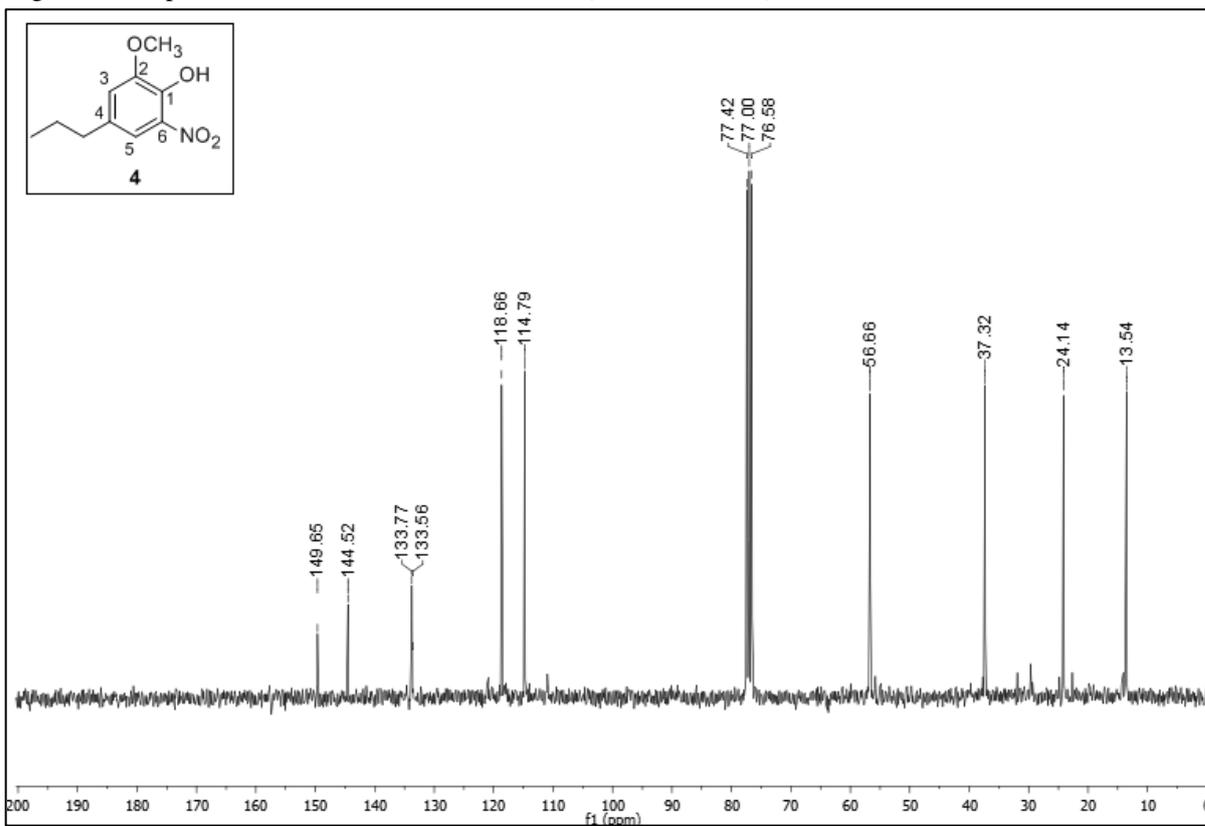
Fonte: Do autor.

No espectro de RMN de ^1H da substância 4 (FIGURA 22), podem-se notar os simples relativos aos hidrogênios dos grupos OCH_3 e OH a δ 3,932 e 10,628, respectivamente. Os sinais referentes aos dois hidrogênios aromáticos aparecem como dupletos a δ 7,489 e 6,957, sendo que o hidrogênio com maior δ é o que está mais próximo do grupo nitro, devido ao efeito retirador de elétrons exibido por esse grupo, o que diminui a densidade eletrônica dos átomos mais próximos a ele. Observa-se sinais característicos da cadeia propílica, como os tripletos e o multipletos correspondentes aos hidrogênios da cadeia propílica a δ 2,559 ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2$ -), 1,701-1,577 ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2$ -) e 0,945 ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2$ -).

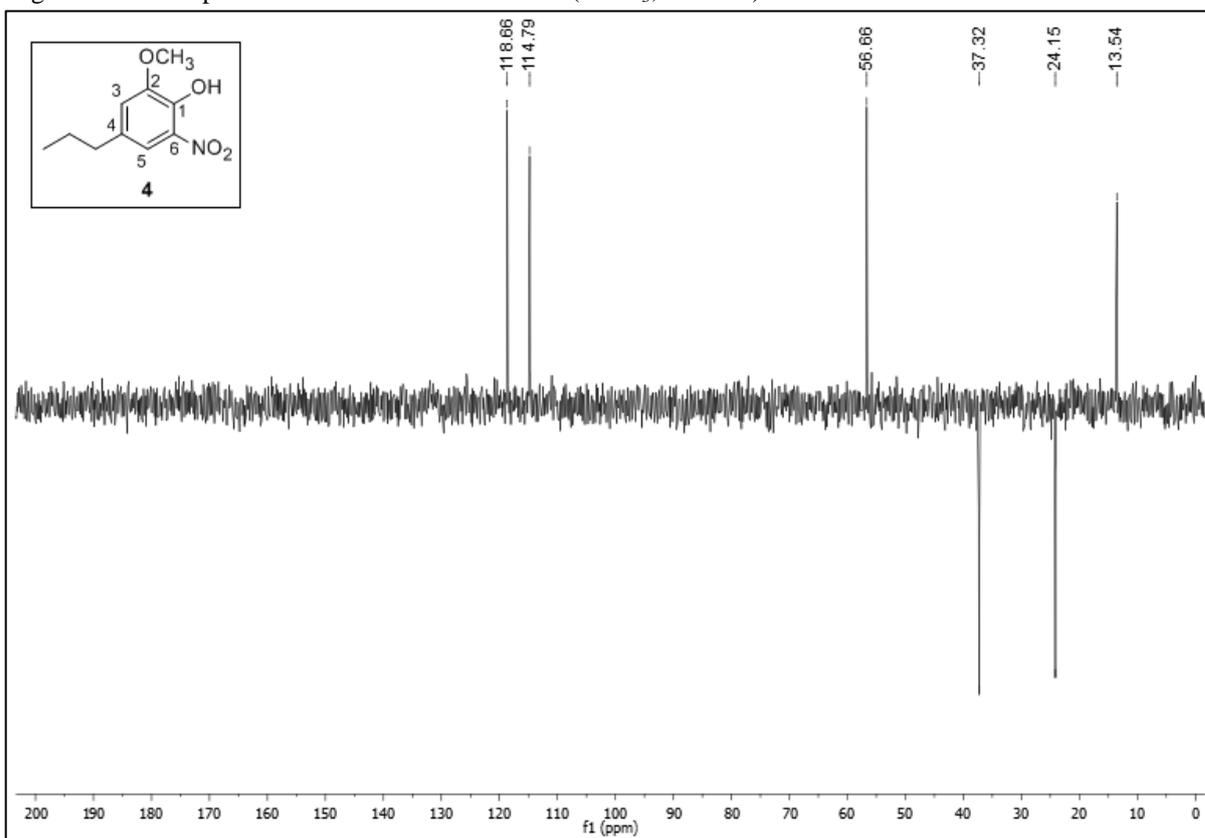
Figura 22 – Espectro de RMN de ^1H da substância 4 (CDCl_3 , 300 MHz)

Fonte: Do autor.

No espectro de RMN de ^{13}C da substância 4 (FIGURA 23), destacam-se a presença de sinais relativos aos carbonos da cadeia propílica, a δ 37,32 ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2$ -), 24,14 ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2$ -) e 13,54 ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2$ -). Os carbonos aromáticos hidrogenados são notados a δ 118,66 e 114,79, sendo o primeiro correspondente ao carbono mais próximo ao grupo nitro, que é retirador de elétrons. Pelo subspectro DEPT-135 (FIGURA 24), pode-se confirmar parte das atribuições feitas anteriormente, com destaque para os sinais de carbono metilênico a δ 37,32 e 24,14.

Figura 23 – Espectro de RMN de ^{13}C da substância 4 (CDCl_3 , 75 MHz).

Fonte: Do autor.

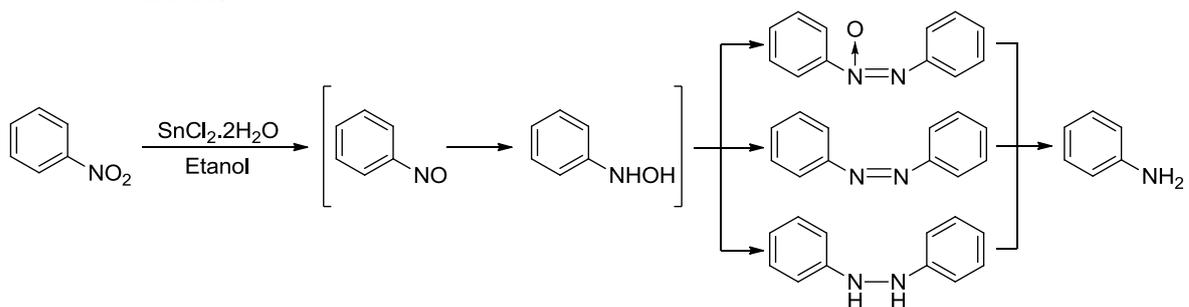
Figura 24 – Subespectro DEPT-135 da substância 4 (CDCl_3 , 75 MHz).

Fonte: Do autor.

Após obtenção dos produtos nitrados, foram realizadas reações de redução do grupo nitro das substâncias 3 e 4, para obtenção dos substâncias 5 e 6, contendo grupo amino. O método de nitro-redução escolhido (BELLAMY, 1984), assim como o método de nitração, emprega condições mais brandas de reação, não sendo necessário o uso de ácidos. Além disso, tal método é específico para a redução de grupos nitro de substâncias aromáticas e é bastante seletivo, uma vez que outros grupos capazes de sofrer redução, bem como grupos sensíveis a presença de ácidos, são recuperados de forma inalterada. Tal método ainda promove a redução de grupos nitro em bons rendimentos, independente da natureza ou posição dos substituintes no anel benzênico. Apesar de os rendimentos aqui obtidos terem sido menores que aqueles relatados no trabalho utilizado como referência, tais valores ainda foram considerados satisfatórios para o propósito desse trabalho.

Nesse caso, o cloreto de estanho di-hidratado atua fornecendo elétrons e prótons, necessários para que aconteça a reação de redução (FIGURA 25). Ocorre uma reação radicalar, com transferência de elétrons não emparelhados provenientes do estanho para o nitrogênio do grupo nitro, seguida de protonação do ânion-radical e eliminação de hidroxilas. Durante a reação, há formação dos derivados contendo grupo nitroso, hidroxilamino, azoxi, azo e, por fim, grupo amino (GAMBLE et al, 2007; ISENMANN, 2013; KUMAR; RAI, 2012; PASHA; JAYASHANKARA, 2005).

Figura 25 – Sequência de etapas envolvidas na redução com cloreto de estanho de substâncias aromáticas nitradas

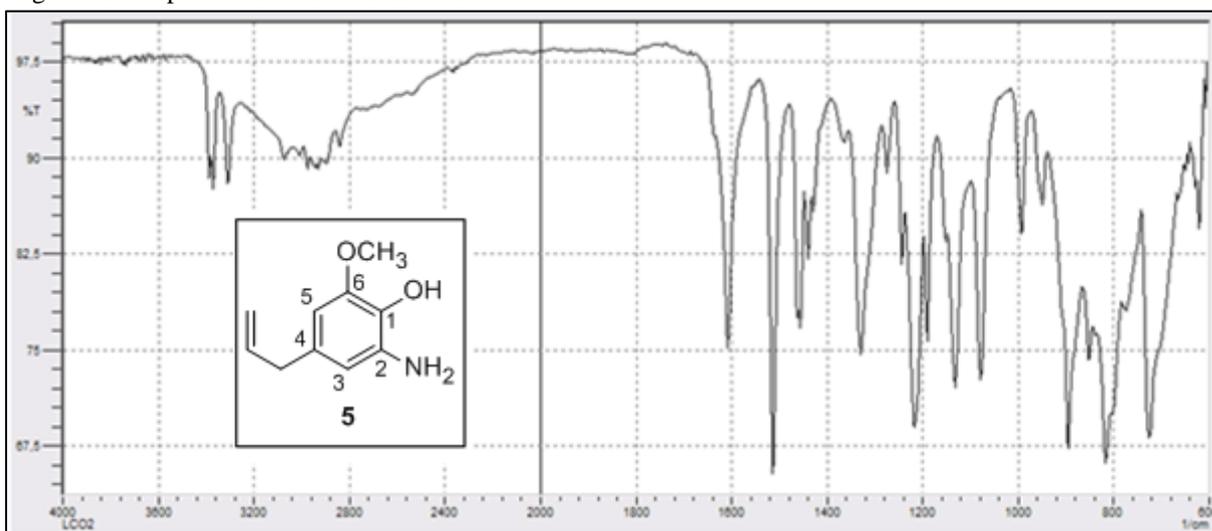


Fonte: Do autor.

Ao fim da reação, o meio fica ácido, sendo necessário ajustar o pH com solução saturada de bicarbonato de sódio para aproximadamente 7. Isso porque o meio fortemente ácido deixa o grupamento amino protonado, favorecendo sua afinidade pela fase aquosa e prejudicando sua obtenção por extração líquido-líquido. Assim, para a obtenção do produto puro, deve-se neutralizar o meio de modo que o grupo amino fique na forma desprotonada, o que permite que o produto passe para a fase orgânica durante a extração.

Dos dados obtidos pela análise no IV da substância 5, obtida a partir do nitroeuugenol (3) (FIGURA 26), destacam-se a presença de duas bandas, a 3371 e 3311 cm^{-1} , características de deformações axiais de aminas primárias (NH_2) e a ausência das bandas características de grupo nitro, indicando sucesso da reação.

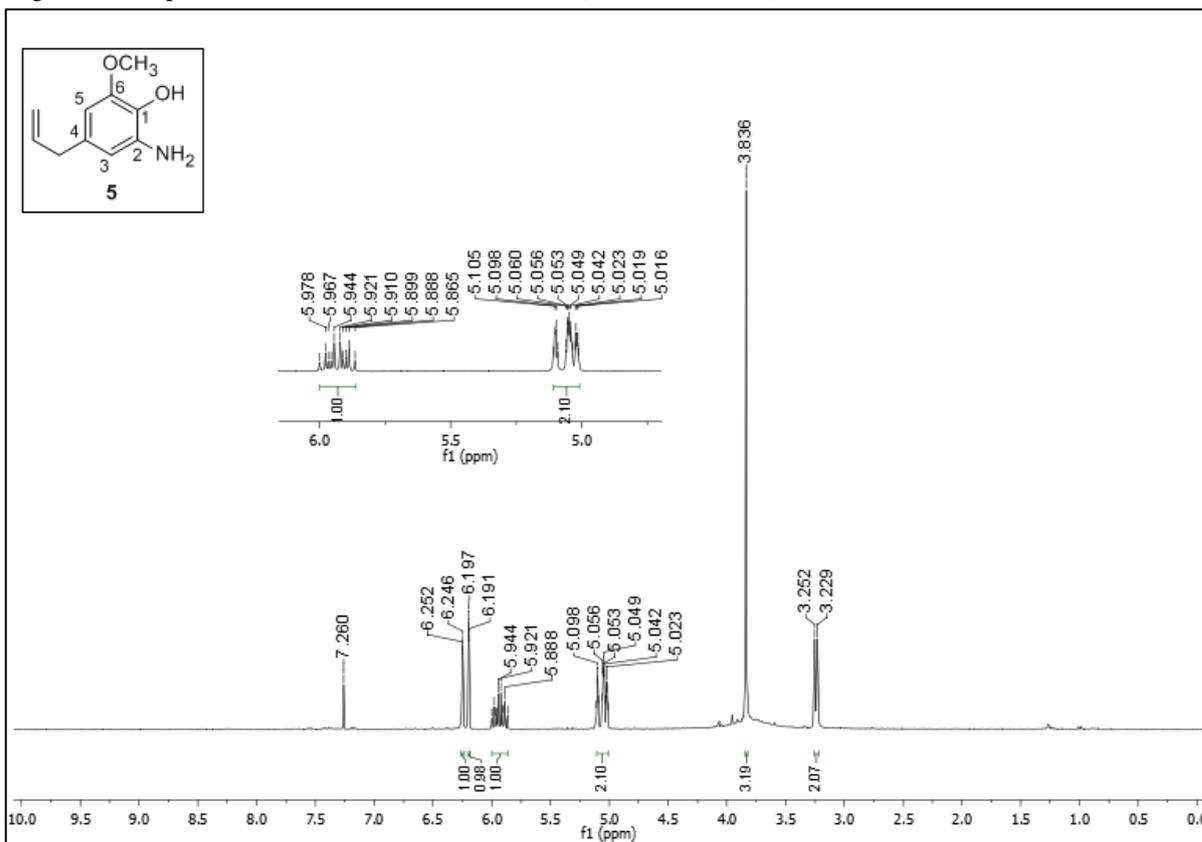
Figura 26 – Espectro no IV da substância 5.



Fonte: Do autor.

No espectro de RMN de ^1H da substância 5 (FIGURA 27), podem-se notar pequenas diferenças nos valores de δ dos hidrogênios aromáticos em relação ao espectro obtido para a substância 3. Esses sinais são observados a δ 6,249 e 6,194. Esses valores são menores aqueles observados para o produto 3 devido ao efeito doador de elétrons do grupo amina, que ao contrário do grupo nitro, faz com que os átomos próximos a ele tenham uma maior densidade eletrônica, absorvendo uma menor quantidade de radiação. Tal efeito é sentido nas posições *orto* e *para* ao grupo amina, sendo a posição *orto* a mais afetada entre as duas. Sendo assim, dentre os hidrogênios aromáticos, aquele que apresenta maior δ é o que está mais distante do grupo amina, ou seja, aquele na posição *para*.

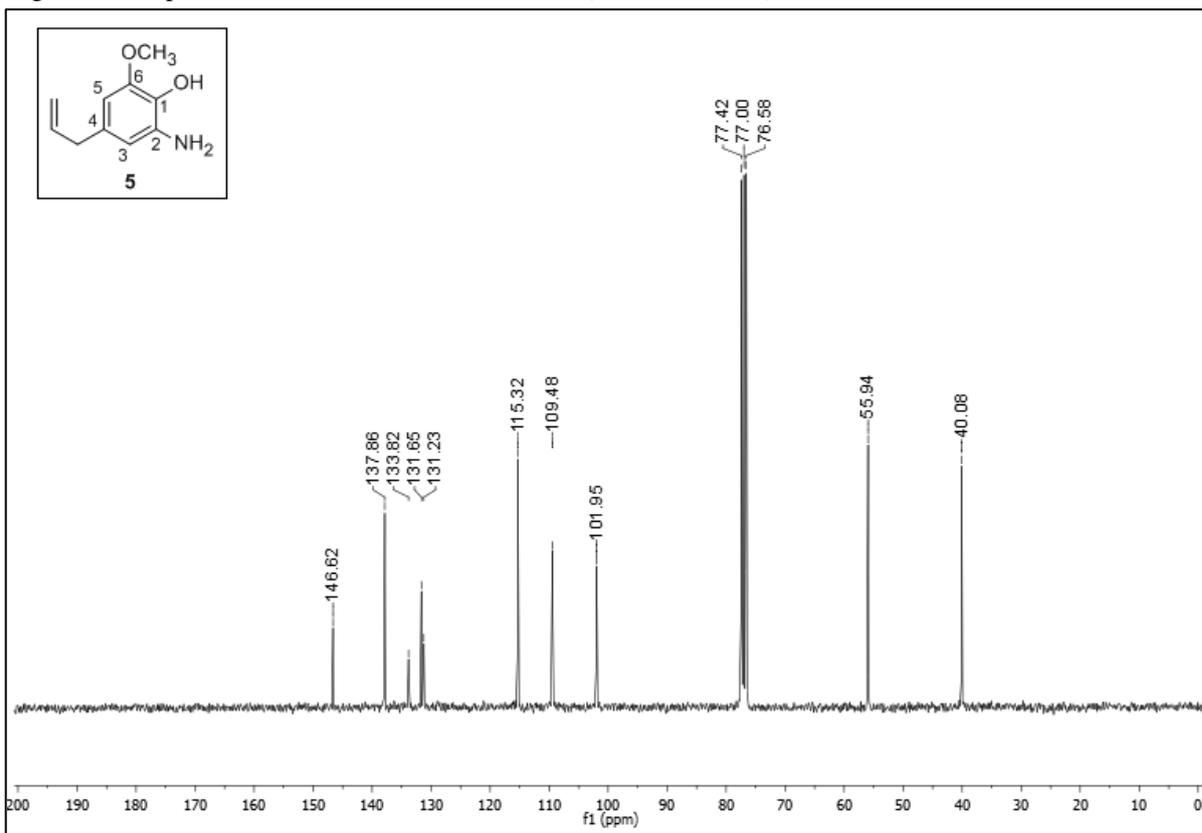
Figura 27 – Espectro de RMN de ^1H da substância 5 (CDCl_3 , 300 MHz).



Fonte: Do autor.

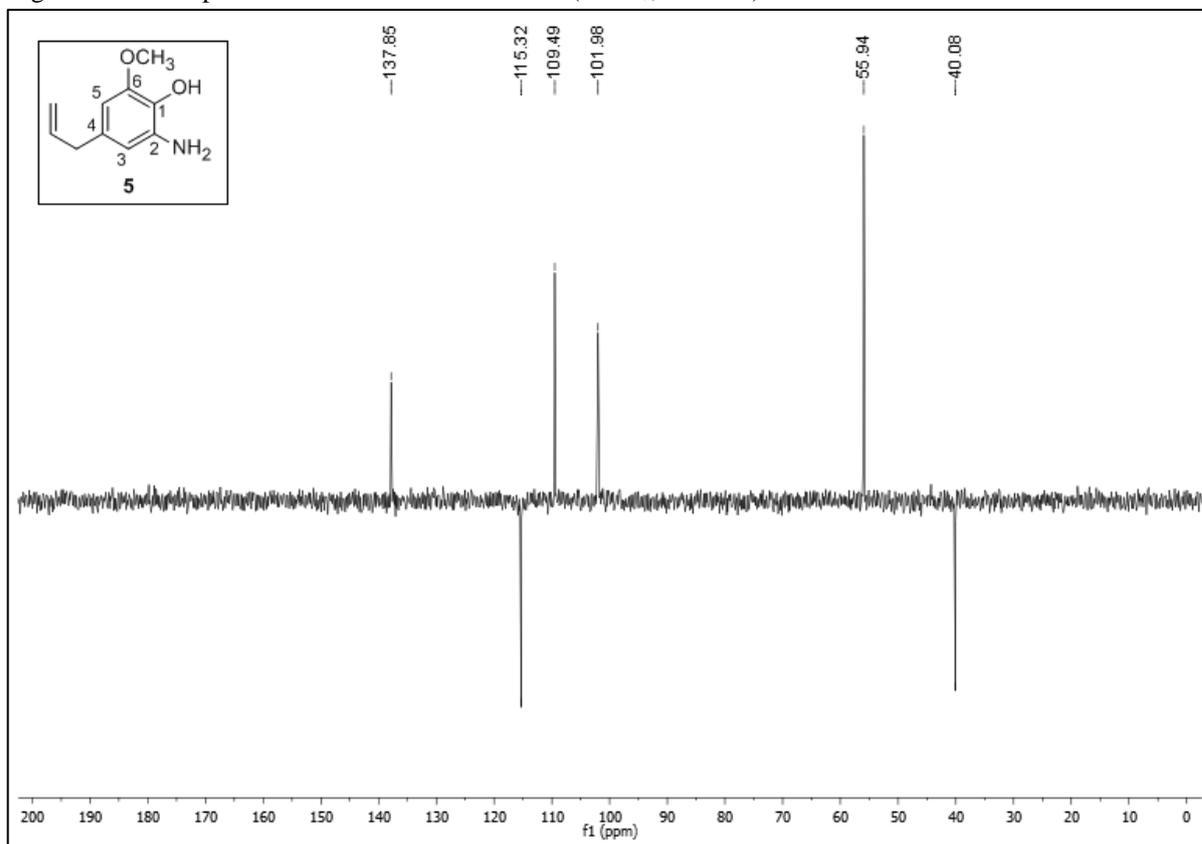
O espectro de RMN de ^{13}C da substância 5 (FIGURA 28) também apresentou apenas pequenas diferenças em relação ao espectro obtido para o produto 3. Os carbonos aromáticos hidrogenados podem ser notados a δ 109,48 e 101,95, sendo que o primeiro corresponde aquele mais distante do grupo amino (posição *para*). Tais valores são menores que aqueles observados para os carbonos aromáticos da substância 3 devido ao já citado efeito doador de elétrons exercido pelo grupo amino. O carbono aromático ligado ao grupo amino é visualizado a δ 133,84. A diminuição do deslocamento em relação ao carbono ligado ao grupo nitro presente no produto 3 também é devida ao efeito doador de elétrons do grupo amino. O subspectro DEPT-135 (FIGURA 29) auxiliou na atribuição dos sinais de carbonos metilênicos no espectro de RMN- C^{13} .

Figura 28 – Espectro de RMN de ^{13}C da substância 5 (CDCl_3 , 75 MHz).



Fonte: Do autor.

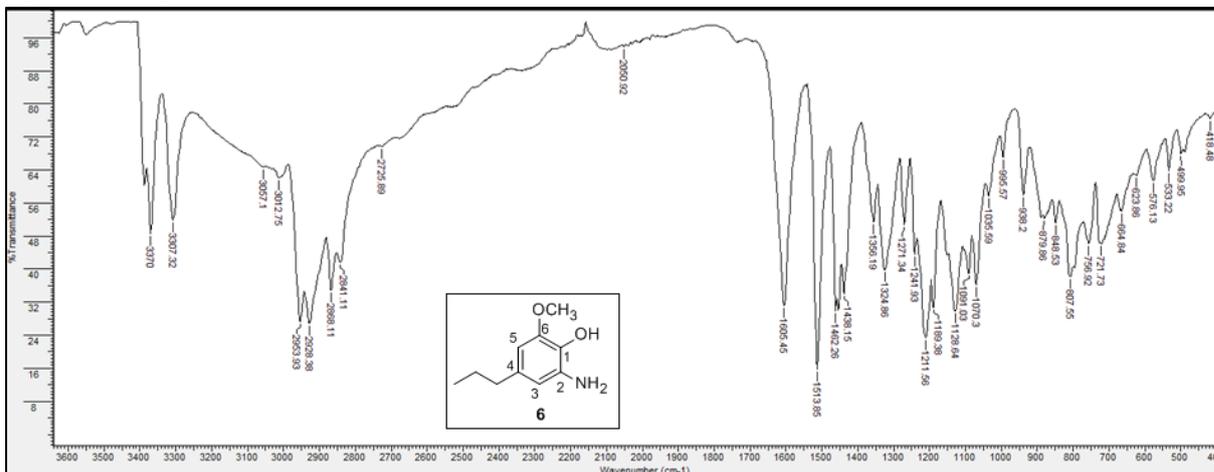
Figura 29 – Subespectro DEPT-135 da substância 5 (CDCl_3 , 75 MHz).



Fonte: Do autor.

No espectro no IV da substância 6 (FIGURA 30), obtida a partir do nitrodiidroeugenol (4), merece destaque a presença de duas bandas, a 3370 e 3307 cm^{-1} , características de deformações axiais de amins primárias (NH_2).

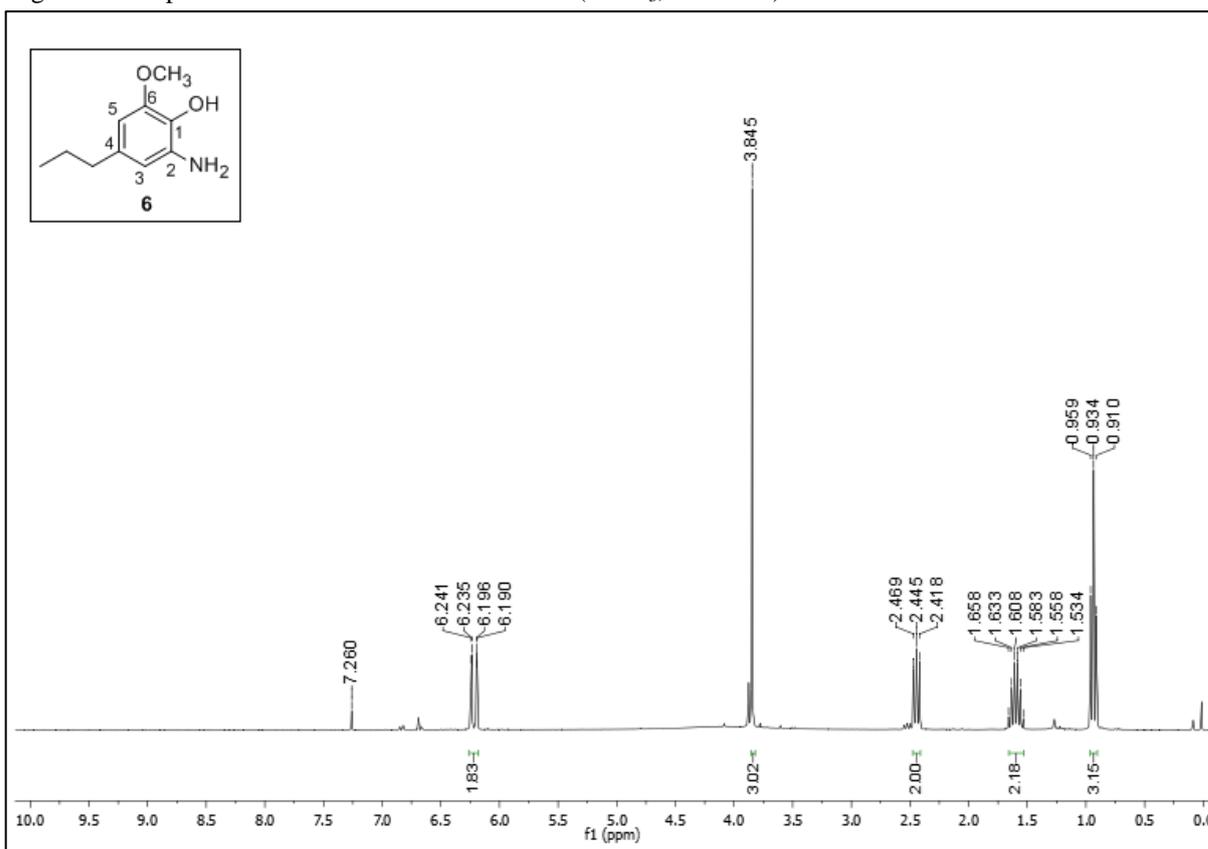
Figura 30 – Espectro no IV da substância 6.



Fonte: Do autor.

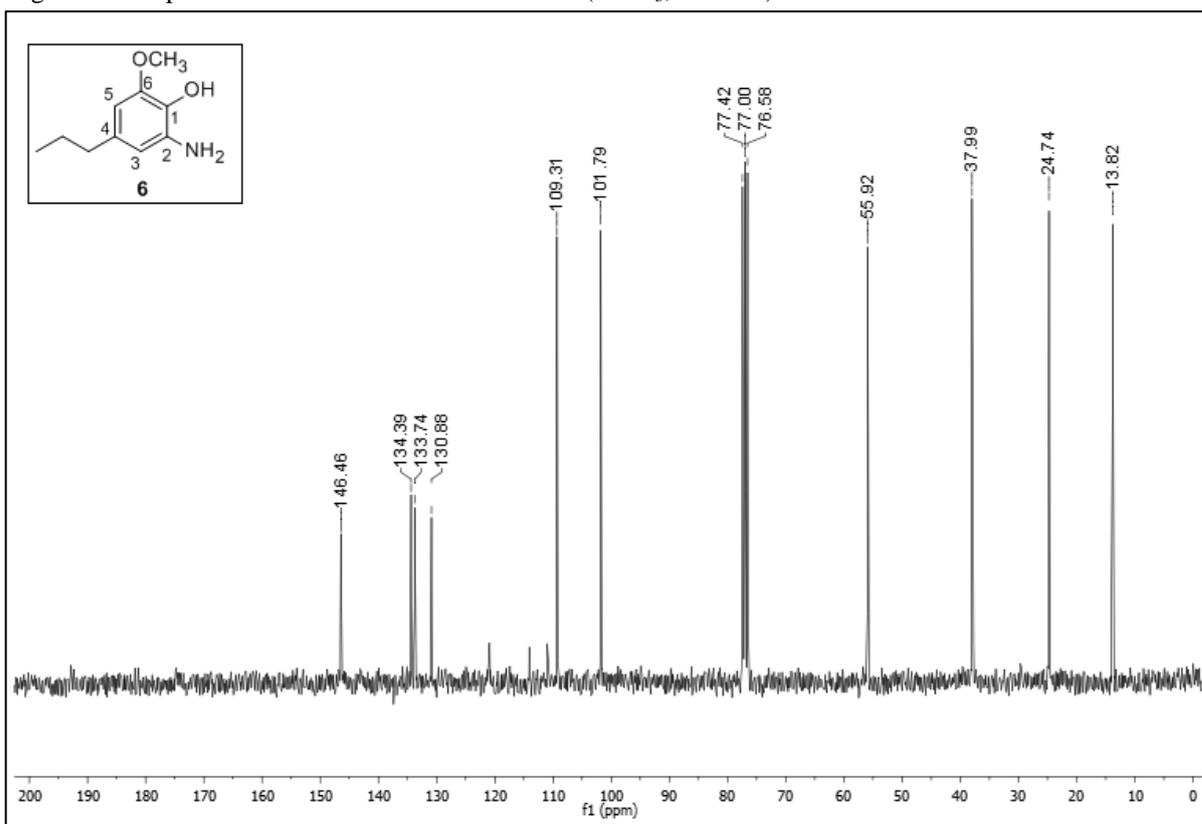
Já no espectro de RMN de ^1H da substância 6 (FIGURA 31), observa-se que os sinais relativos aos hidrogênios aromáticos, em δ 6,238 e 6,193, também são menores quando comparados aos sinais desses hidrogênios no produto 4. Esse efeito é explicado pelo efeito doador de elétrons do grupo amino, fazendo com que os átomos vizinhos possuam maior densidade eletrônica. Dessa forma, o sinal em δ 6,193 corresponde ao hidrogênio aromático mais próximo ao grupo amino, na posição *orto*.

Figura 31 – Espectro de RMN de ^1H da substância 6 (CDCl_3 , 300 MHz).

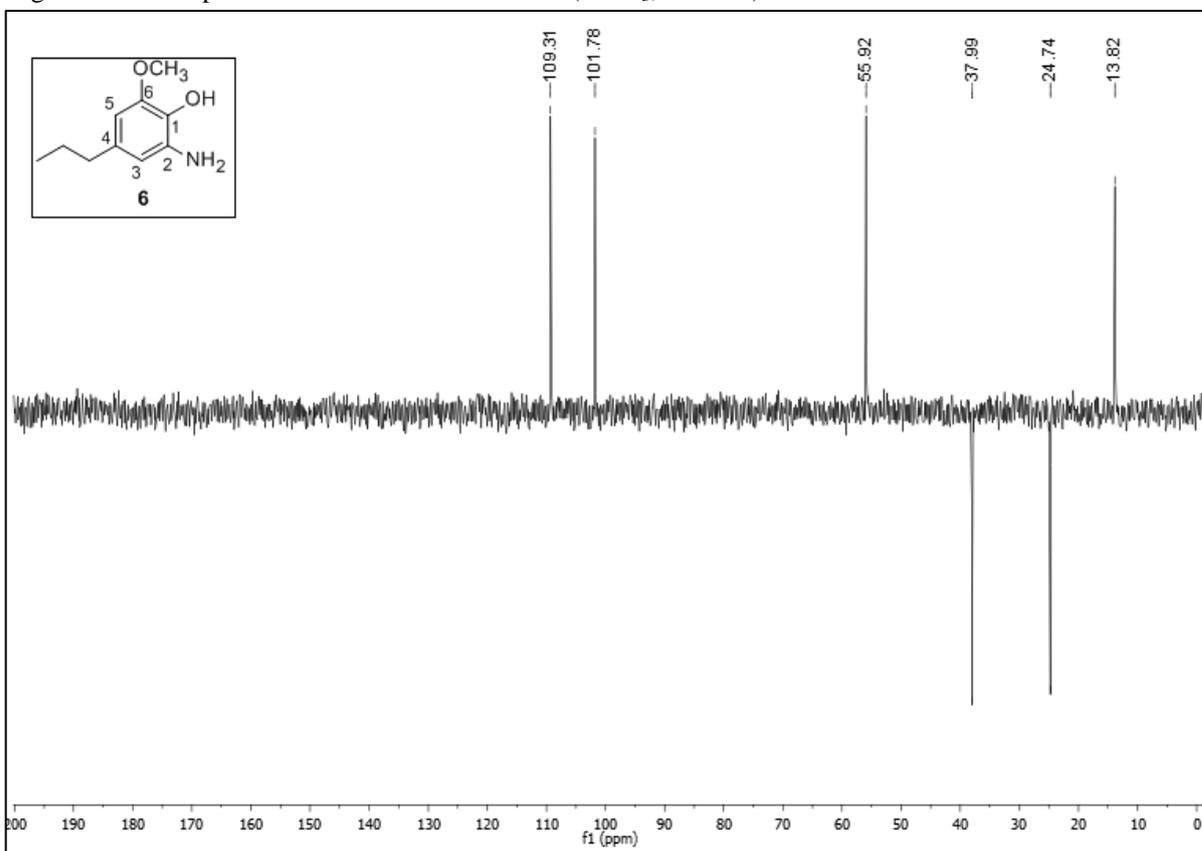


Fonte: Do autor.

No espectro de RMN de ^{13}C da substância 6 (FIGURA 32) nota-se os sinais relativos aos carbonos aromáticos hidrogenados a δ 109,31 e 101,79. O efeito doador de elétrons do grupo amino também influencia nesses valores, pois ao aumentar a densidade eletrônica dos átomos de carbono vizinhos, diminui a quantidade de energia absorvida por eles, fazendo com que os sinais apareçam em valores menores aos observados para o produto 4. Assim, o carbono aromático *ortho* ao grupo amino apresenta menor valor de deslocamento químico. Da mesma forma, o carbono aromático ligado diretamente ao grupo amino é visualizado a δ 134,39, valor menor aquele observado para o carbono ligado ao grupo nitro, na substância 4. O subspectro DEPT-135 (FIGURA 33) auxiliou na atribuição dos sinais de RMN- ^{13}C .

Figura 32 – Espectro de RMN de ^{13}C da substância 6 (CDCl_3 , 75 MHz).

Fonte: Do autor.

Figura 33 – Subespectro DEPT-135 da substância 6 (CDCl_3 , 75 MHz).

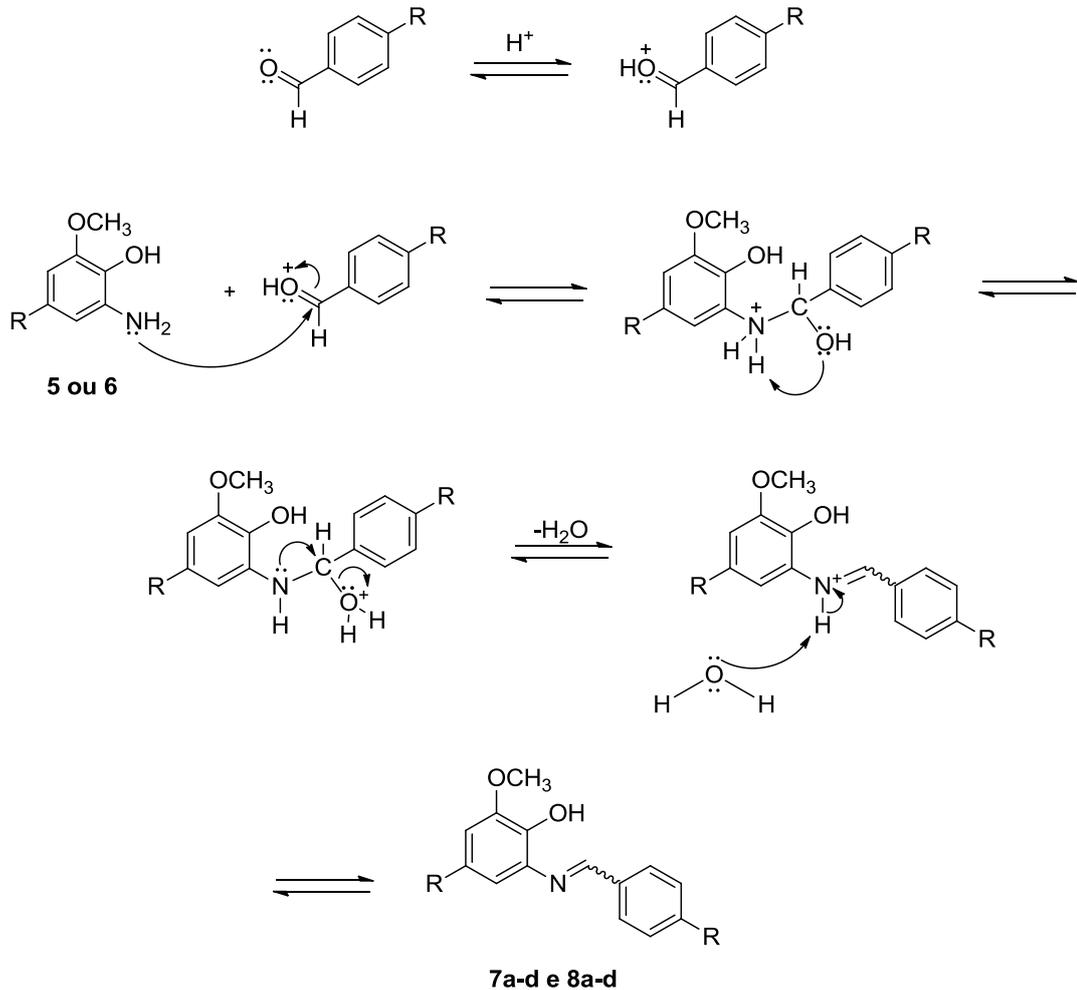
Fonte: Do autor.

Uma vez obtidas as substâncias 5 e 6, elas foram utilizadas para obtenção de bases de Schiff (7a-d e 8a-d) (iminas que contém um grupo aromático em pelo menos uma das extremidades da ligação N=C) e amidas (11a-d e 12a-d). Esses intermediários imínicos e amídicos foram sintetizados como precursores dos benzoxazois, obtidos por reações subsequentes de ciclo-oxidação e ciclo-desidratação, respectivamente.

As iminas são geralmente sintetizadas pela condensação de um aldeído ou cetona com uma amina primária sob diversas condições reacionais. Aqui, a síntese das iminas foi realizada de duas formas. Em ambos os casos, a reação ocorreu na presença de ácido. A catálise ácida é importante, pois auxilia na eliminação de uma hidroxila, na forma de água, para formação do produto final. Sem ela a reação é lenta, pois depende da saída do hidrogênio ácido da amina. Porém é necessário que o pH fique entre 4 a 6. Em pH menor que 4, a amina será protonada, diminuindo sua nucleofilicidade e tornando a reação mais lenta. Já em pH maior que 6, a concentração de prótons é baixa, dificultando a protonação da hidroxila (CLAYDEN; GREEVES; WARREN, 2012; LAYER, 1962; PATIL; ADIMURTHY, 2013).

As reações de formação de iminas envolvem adição nucleofílica da amina ao aldeído seguida de eliminação de água. O ácido presente no meio reacional é capaz de protonar o oxigênio carbonílico do aldeído, aumentando a eletrofilia do carbono ligado a ele. Em seguida, o grupo amina age como nucleófilo e o nitrogênio se liga ao carbono carbonílico do aldeído, passando a ter uma carga positiva. Ao mesmo tempo, a ligação π entre o carbono e oxigênio se desfaz e os elétrons se movem para o oxigênio, neutralizando sua carga positiva. Depois, ocorre a transferência de um próton do nitrogênio para o oxigênio, que adquire uma carga positiva. Então, o nitrogênio usa seu par de elétrons para formar uma ligação π com o carbono vizinho, também adquirindo uma carga positiva, e a ligação carbono-oxigênio então se quebra, eliminando uma molécula de água. Por fim, a água age como base e remove um próton do nitrogênio, restaurando seu par de elétrons e neutralizando sua carga (FIGURA 34) (PATRICK, 2004)

Figura 34 – Mecanismo da reação das substância 5 e 6 com aldeídos, na presença de ácido.



Fonte: Do autor.

As iminas são facilmente hidrolisáveis e durante sua síntese deve haver a remoção de água da mistura reacional. Isso pode ser conseguido com o uso do Dean Stark, de peneiras moleculares ou de agentes desidratantes (CLAYDEN; GREEVES; WARREN, 2012). Assim, no primeiro método (método A), a reação entre os produtos 5 ou 6 com aldeídos foi realizada na presença de APTS e peneira molecular à temperatura ambiente (ANDRADE, 2004; BENACHENHOU; MESLI; GUILARD, 2013; TAGUCHI; WESTHEIMER, 1971). A peneira molecular tem a função de captar a água formada durante a reação, dificultando a hidrólise das iminas, deslocando o equilíbrio no sentido de formação dos produtos. O APTS é um ácido orgânico forte, solúvel em solventes orgânicos polares, e atua como catalisador sólido nessa reação. Esse ácido tem sido muito utilizado em reações orgânicas. Apresenta diversas vantagens, como o baixo custo, baixa toxicidade e grande estabilidade. Além disso, é reciclável, fácil de manusear e termicamente robusto. É particularmente interessante para

síntese de iminas, uma vez que não introduz água na reação, como acontece com o HCl, por exemplo (BAGHERNEJAD, 2011).

As iminas também foram sintetizadas por reação das substâncias 5 ou 6 com aldeídos na presença de HCl e MgSO₄ anidro, à 90°C (método B). O MgSO₄ anidro atua como agente desidratante, substituindo a peneira molecular, e rendimentos altos já foram obtidos utilizando-o nessas sínteses (LIU, 1999). O HCl atua como catalisador ácido, facilitando a formação do produto por desidratação do amina (PATIL; ADIMURTHY, 2013).

Durante as reações entre a substância 6 e o benzaldeído e 4-nitrobenzaldeído, observou-se, por CCD, que outro produto menos polar havia sido formado, e haviam apenas traços de iminas. Esses produtos foram isolados por CCS (hexano/ acetato de etila, 9,5:0,5, v/v) e analisados por espectroscopias no IV e de RMN, pelas quais pode-se confirmar se tratar dos benzoxazóis 10a e 10d. As iminas provavelmente foram formadas num primeiro momento, mas o fato dessas substâncias não possuírem grupo doador de elétrons no anel benzênico provavelmente influenciou para que a formação dos benzoxazóis ocorresse rapidamente, *in situ*. Grupos doadores de elétrons aumentam a densidade eletrônica do carbono imínico, o que dificulta o ataque nucleofílico, que deve acontecer para formação do heterociclo. Uma vez que as iminas 8a e 8d não apresentam tais grupos, o carbono imínico fica mais eletrofílico. Assim, um par de elétrons livres da hidroxila fenólica faz um ataque nucleofílico a esse carbono, formando um intermediário que, em seguida, é oxidado ao derivado benzoxazólico. A oxidação é possível, uma vez que a reação ocorre em atmosfera de oxigênio, que pode agir como agente oxidante. O mecanismo é o mesmo que ocorre na presença de óxido de prata, apresentado na Figura 35.

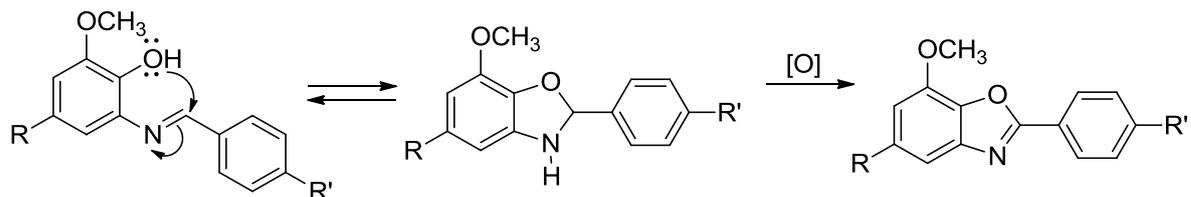
As iminas obtidas em ambos os casos não foram isoladas, pois essas substâncias são geralmente instáveis e não havia interesse em avaliar a atividade biológica das mesmas. Comparando os rendimentos brutos obtidos, podemos afirmar que o método B foi melhor que o método A, pois a reação é concluída em menor tempo e mais produto bruto é obtido. Sendo assim, para a síntese dos benzoxazóis (9a-d e 10b-c) foram utilizadas as iminas obtidas pelo segundo método.

A ciclo-oxidação de iminas por meio de vários agentes oxidantes para formação de benzoxazóis já foi descrita. Entretanto as reações geralmente requerem uso de grandes quantidades de oxidantes fortes (CHO; LEE; CHEON, 2013; SRIVASTAVA; VENKATARAMANI, 1988). Aqui, a síntese dos derivados benzoxazólicos foi baseada no trabalho de Yoshifuji, Nagase e Inamoto (1982), onde o agente oxidante utilizado é o óxido de

prata. Os autores afirmam que os produtos são obtidos em altos rendimentos, mesmo em condições mais brandas.

Acredita-se que os benzoxazois derivados de bases de Schiff sejam formados em duas etapas. Num primeiro momento, há um equilíbrio entre a base de Schiff e o intermediário cíclico benzoxazolina. Na etapa seguinte, esse intermediário é oxidado, resultando no benzoxazol (FIGURA 35) (CHO; LEE; CHEON, 2013).

Figura 35 – Mecanismo provável da reação de ciclo-oxidação dos produtos 7a-d e 8a-d



Fonte: Do autor.

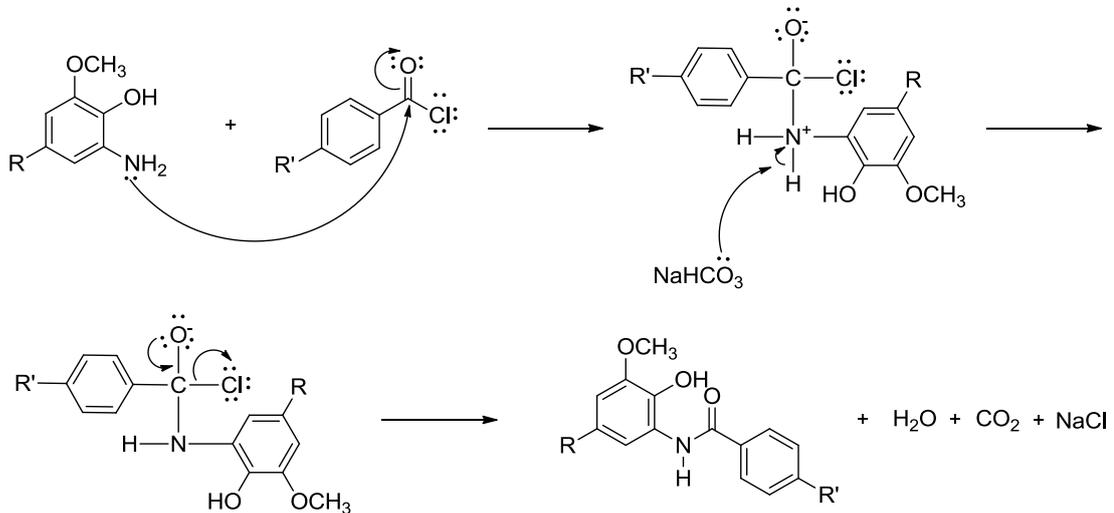
Os benzoxazois sintetizados por esse método foram obtidos com rendimentos muito baixos, ao contrário daqueles descritos no artigo utilizado como referência. Possivelmente a reação anterior, para formação das iminas, não apresentou um rendimento satisfatório.

Sendo assim, resolveu-se tentar obtê-los por outro método, partindo de amidas. As amidas podem ser obtidas por reação entre aminas e cloretos de acila, anidridos de ácidos, ésteres ou ácidos carboxílicos. Os cloretos de acila são mais reativos que as demais substâncias citadas, pois o átomo de cloro exerce efeito retirador de elétrons, o que aumenta a eletrofilicidade do carbono carbonílico, permitindo que este reaja até mesmo com nucleófilos fracos. Reações de acilação utilizando cloretos de acila ocorrem à temperatura ambiente, ou até mesmo à temperaturas mais baixas, e apresentam altos rendimentos. (CLAYDEN; GREEVES; WARREN, 2012; SOLOMONS; FRYHLE, 2002). Dessa forma, as amidas (11a-d e 12a-d) foram obtidas por reação entre os produtos 5 e 6 e cloretos de acila, na presença de NaHCO_3 (SENER et al, 2000).

O método escolhido utiliza condições brandas de reação e a mistura reacional permanece em banho de água/gelo durante a adição do cloreto de acila, a qual ocorre aos poucos. Porém, os cloretos de acila podem ainda reagir com hidroxilas alcoólicas ou fenólicas, formando ésteres. Uma vez que as substâncias 5 e 6 apresentam, além do grupo amino, uma hidroxila fenólica, durante a reação pode haver a formação de ésteres, o que não é desejado. Entretanto, sob as condições reacionais descritas, o cloreto reage preferencialmente com o grupo amino, que é mais nucleofílico que a hidroxila, dificultando a formação do éster.

As aminas reagem com os cloretos de acila por meio de reação de adição-eliminação nucleofílica em carbono acíclico. O átomo de carbono da carbonila do cloreto de acila sofre ataque nucleofílico pelo par de elétrons livres do nitrogênio da amina, formando um intermediário tetraédrico. Em seguida, uma base presente no meio, nesse caso o ânion bicarbonato, capta um hidrogênio do intermediário. Por fim, um par de elétron do oxigênio forma novamente a ligação dupla e o átomo de cloro é liberado, resultando no produto final (FIGURA 36). Dessa forma, o ânion bicarbonato atua como base de Lewis e neutraliza o HCl liberado durante a reação (CLAYDEN; GREEVES; WARREN, 2012).

Figura 36 – Mecanismo da reação das substâncias 5 ou 6 e cloretos de acila, para obtenção de amidas.



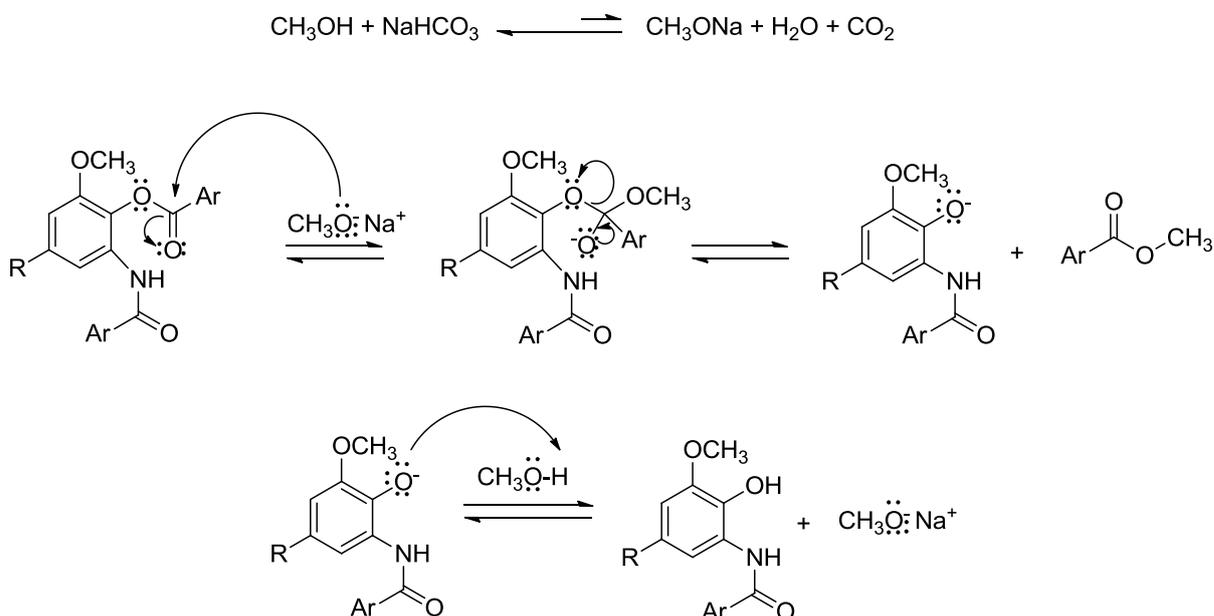
Fonte: Do autor.

Apesar das condições suaves de reação, em alguns casos foi detectada, por CCD, a formação de outro produto. Na dúvida quanto à identidade dessas substâncias e havendo a possibilidade de serem os produtos de acilação da hidroxila fenólica, todas as vezes em que houve a formação de duas substâncias, o produto bruto foi tratado com solução de bicarbonato de sódio em metanol e água por 24 horas à temperatura ambiente (BORA, 2011). Apesar de existirem relatos da obtenção de benzoxazois partindo de amidas quando a hidroxila fenólica também é acilada (DeLUCA; KERWIN, 1997), optamos por realizar sua desacilação, para que fosse possível isolar e caracterizar as amidas. Essa condição é suave e permite desacilar a hidroxila fenólica sem alterar a amida. Os ésteres sofrem ataques nucleofílicos em condições mais brandas e mais rapidamente do que as amidas, uma vez que essas são muito estáveis devido à deslocalização de elétrons. Por exemplo, para serem hidrolisadas, as amidas devem ser submetidas à mais condições drásticas, como aquecimento a temperaturas elevadas e uso de ácidos ou bases fortes, por longos períodos. Ésteres de fenóis, como nesse caso, são mais

facilmente hidrolisados que ésteres de álcool, uma vez que o fenol formado tem sua estrutura estabilizada por ressonância (CLAYDEN; GREEVES; WARREN, 2012; SOLOMONS; FRYHLE, 2002).

O mesmo se aplica a reações de transesterificação, como a que foi utilizada na desbenzoilação dos subprodutos tipo éster. Na Figura 37 é mostrado o mecanismo sugerido para essa reação.

Figura 37 – Mecanismo proposto de desacilação de éster na presença de bicarbonato de sódio, água e metanol.

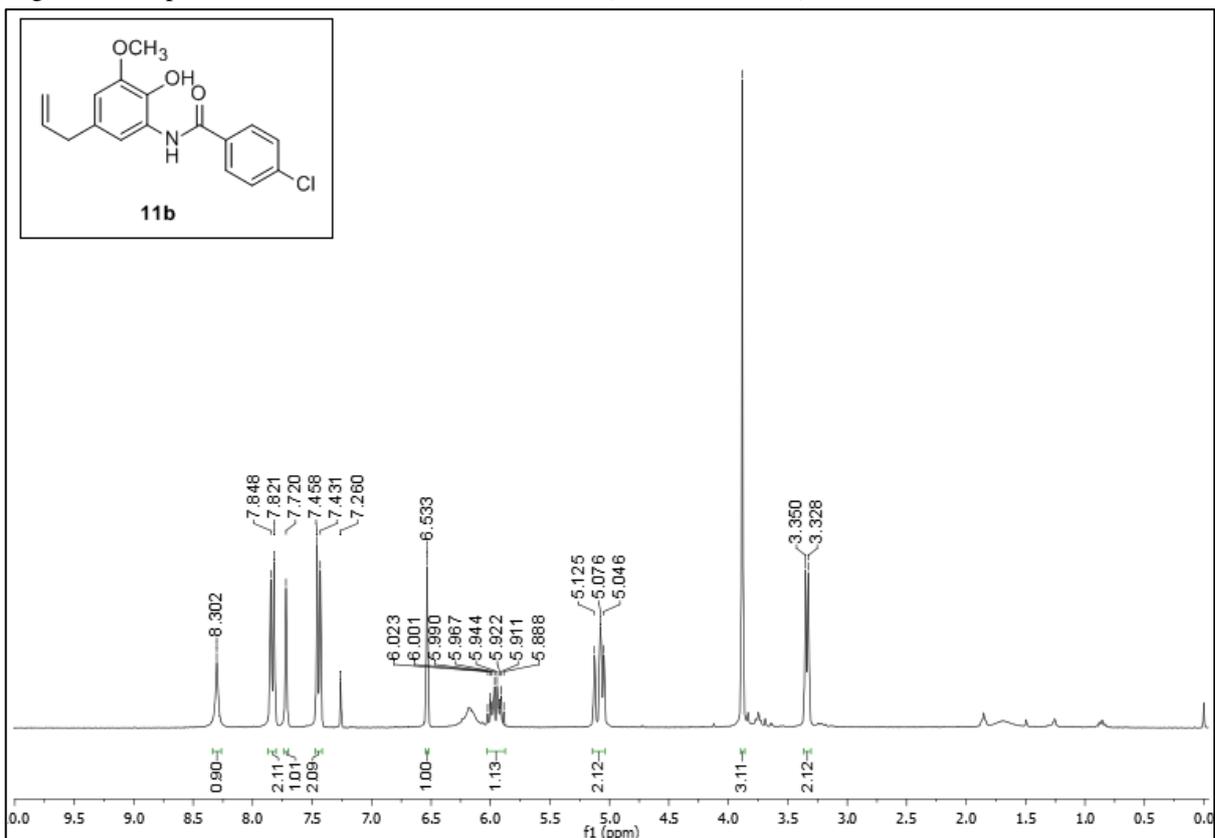


Fonte: Do autor.

A seguir, são apresentados os espectros de RMN das amidas 11b e 12c, representativas das séries derivadas do eugenol e diidroeugenol, respectivamente, bem como a discussão dos principais sinais observados.

No espectro de RMN de ^1H da substância 11b (FIGURA 38), destacam-se a presença dos sinais referentes aos quatro hidrogênios do anel que contém um átomo de cloro, os quais são visualizados como dois dupletos em 7,835 e 7,445 ppm. Por ser um átomo doador de elétrons por ressonância, o cloro blindava os hidrogênios mais próximos a ele, que apresentam um menor deslocamento químico. Também merecem destaque o sinal à 8,302 ppm, que corresponde ao hidrogênio ligado ao nitrogênio. Nota-se ainda diferenças nos valores dos hidrogênios do anel aromático derivado do eugenol em relação ao amino. Aqui, aparecem à 7,720 e 6,533, sendo o de maior valor aquele mais próximo ao grupo amida, pois este exerce um efeito retirador de elétrons, ao contrário do grupo amino, que é doador de elétrons.

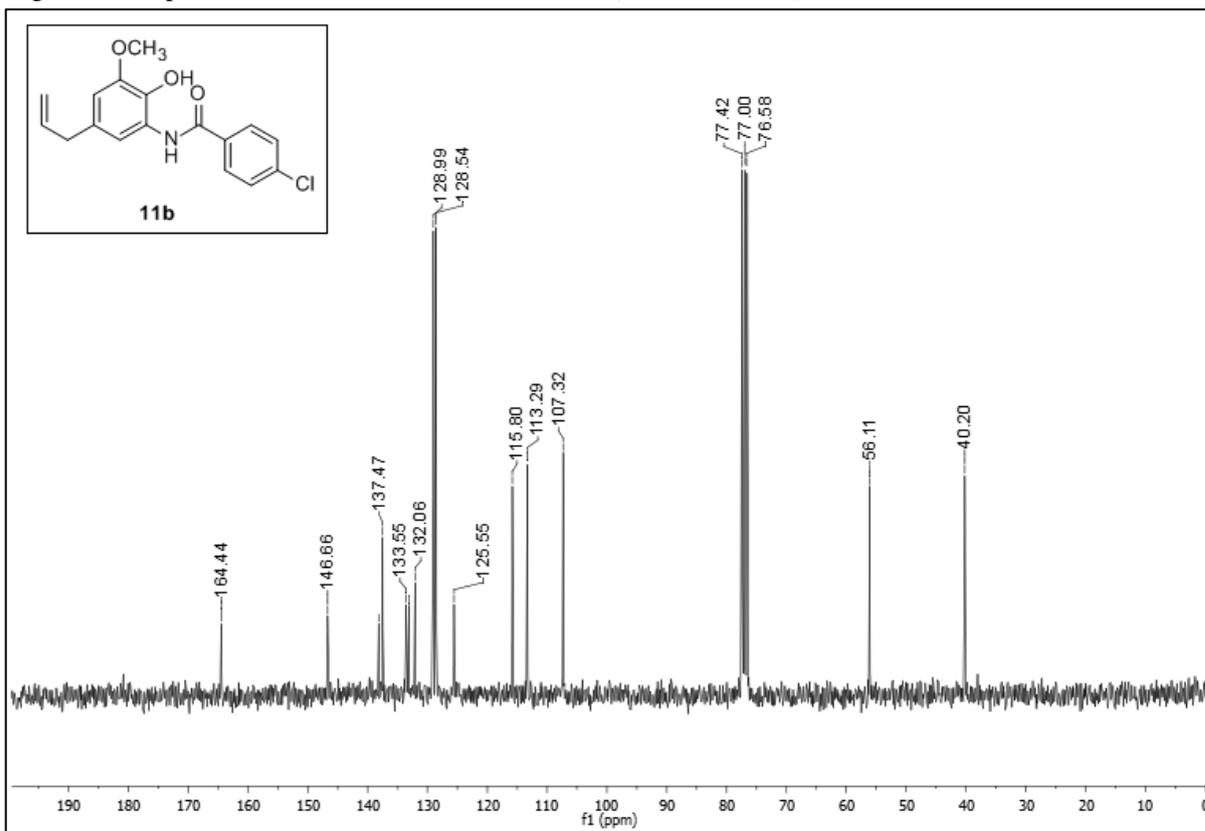
Figura 38 – Espectro de RMN de ^1H da substância 11b (CDCl_3 , 300 MHz).



Fonte: Do autor.

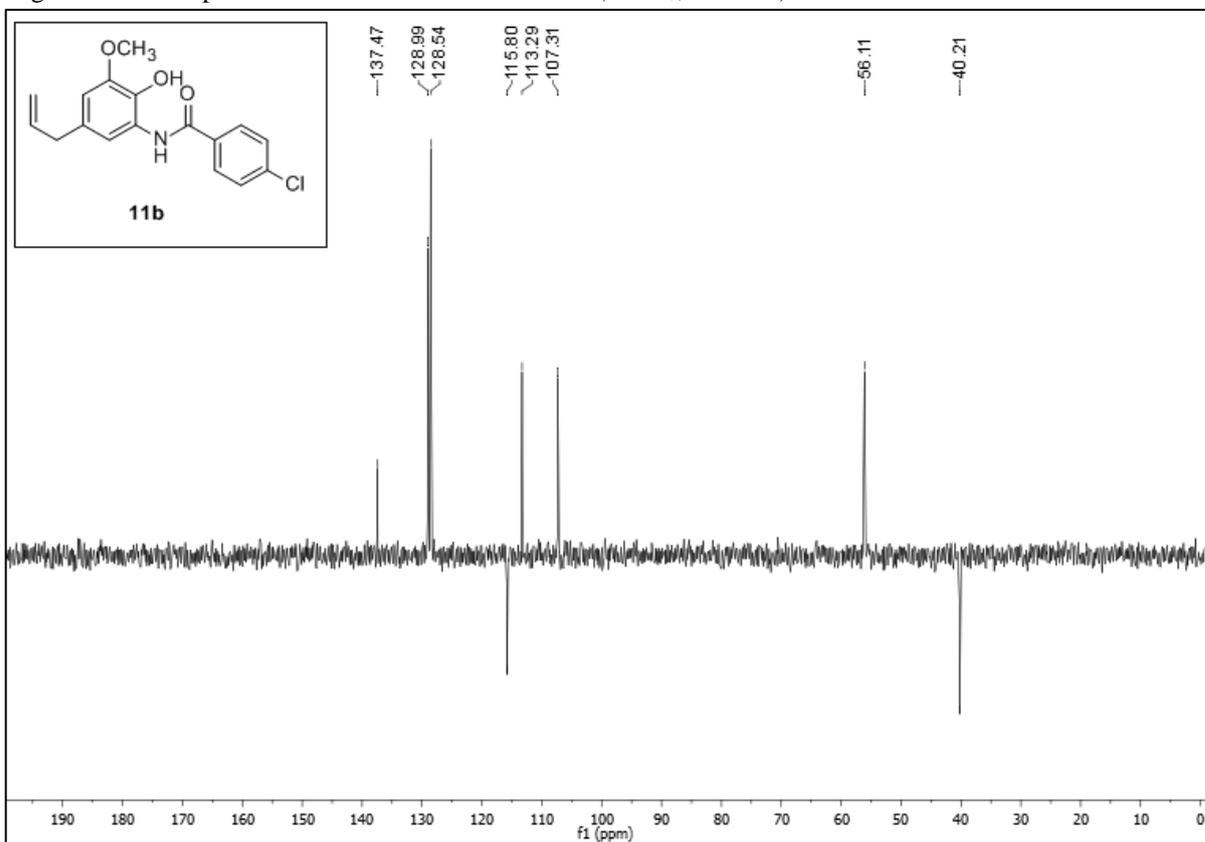
No espectro de RMN de ^{13}C da substância 11b (FIGURA 39), destaca-se a presença do sinal à 164,44 ppm, correspondente ao carbono carbonílico. Também verifica-se a presença dos sinais referentes aos quatro carbonos no anel contendo o átomo de cloro, à 138,13, 133,10, 128,99 e 128,54 ppm. O carbono ligado diretamente ao cloro apresenta maior deslocamento químico devido ao efeito retirador de elétrons por efeito indutivo exercido por esse átomo. Algumas atribuições podem ser confirmadas pelo subespectro DEPT-135 (FIGURA 40).

Figura 39 – Espectro de RMN de ^{13}C da substância 11b (CDCl_3 , 75 MHz).



Fonte: Do autor.

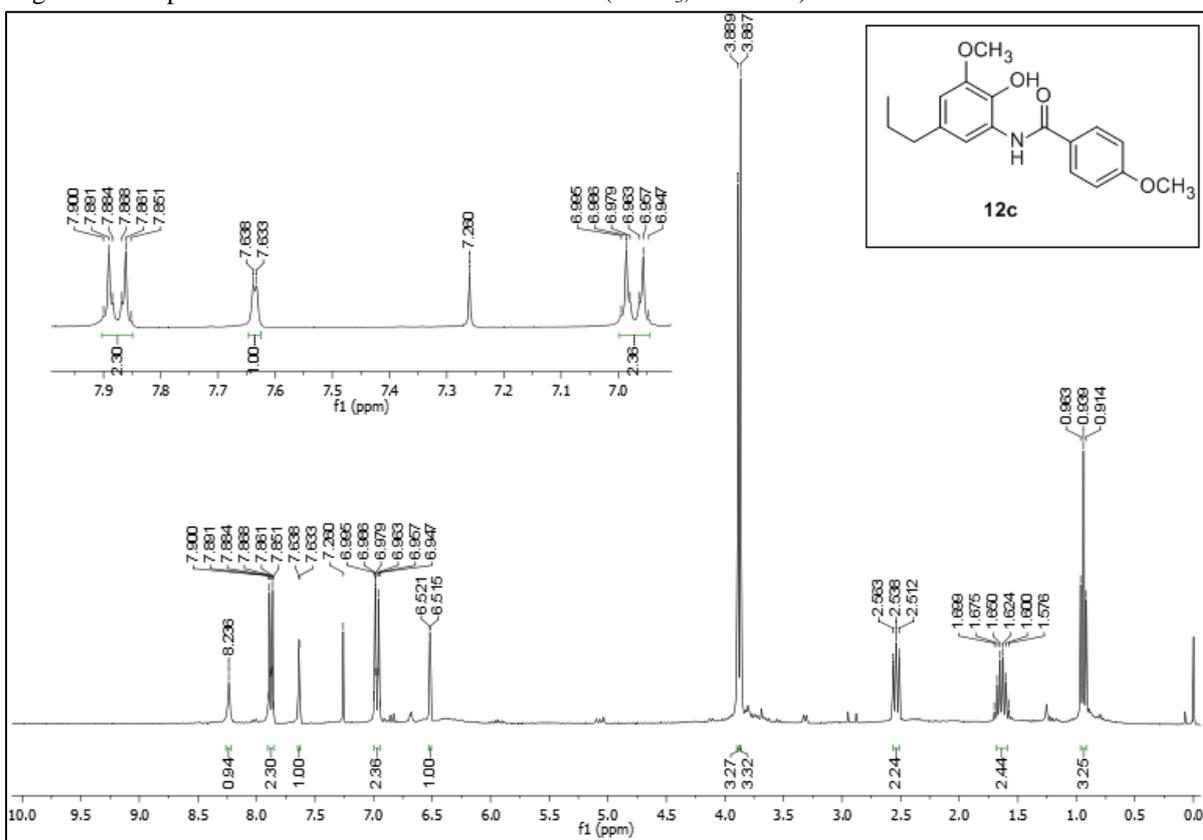
Figura 40 – Subespectro DEPT-135 da substância 11b (CDCl_3 , 75 MHz).



Fonte: Do autor.

No espectro de RMN de ^1H da substância 12c (FIGURA 41), destacam-se a presença dos sinais referentes aos quatro hidrogênios do anel que contém o grupo metoxila. Esses hidrogênios são observados como dois multipletos em 7,900-7,851 e 6,995-6,947 ppm. O grupo metoxila, assim como o átomo de cloro, é um grupo doador de elétrons por ressonância, e age blindando os hidrogênios mais próximos a ele, que apresentam um menor deslocamento químico. Observa-se ainda o sinal à 8,236 ppm, referente ao hidrogênio ligado ao nitrogênio.

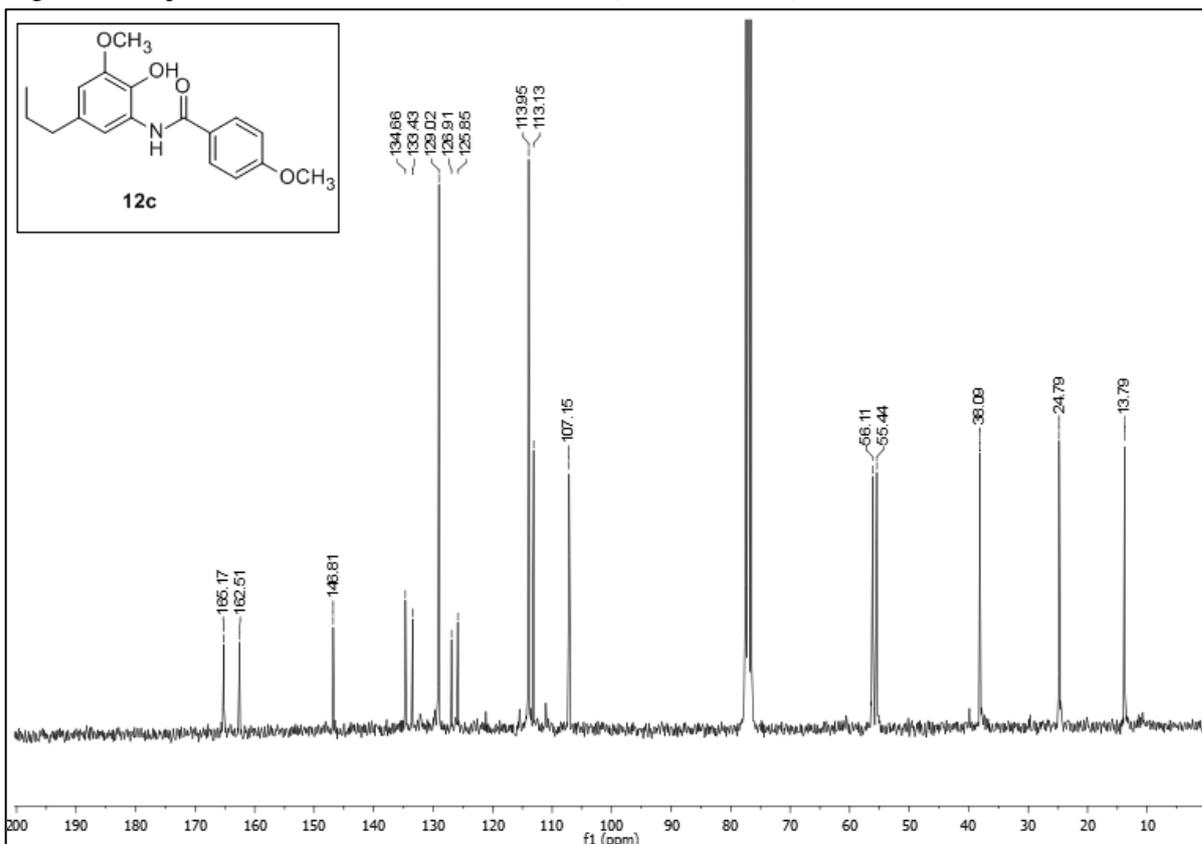
Figura 41 – Espectro de RMN de ^1H da substância 12c (CDCl_3 , 300 MHz).



Fonte: Do autor.

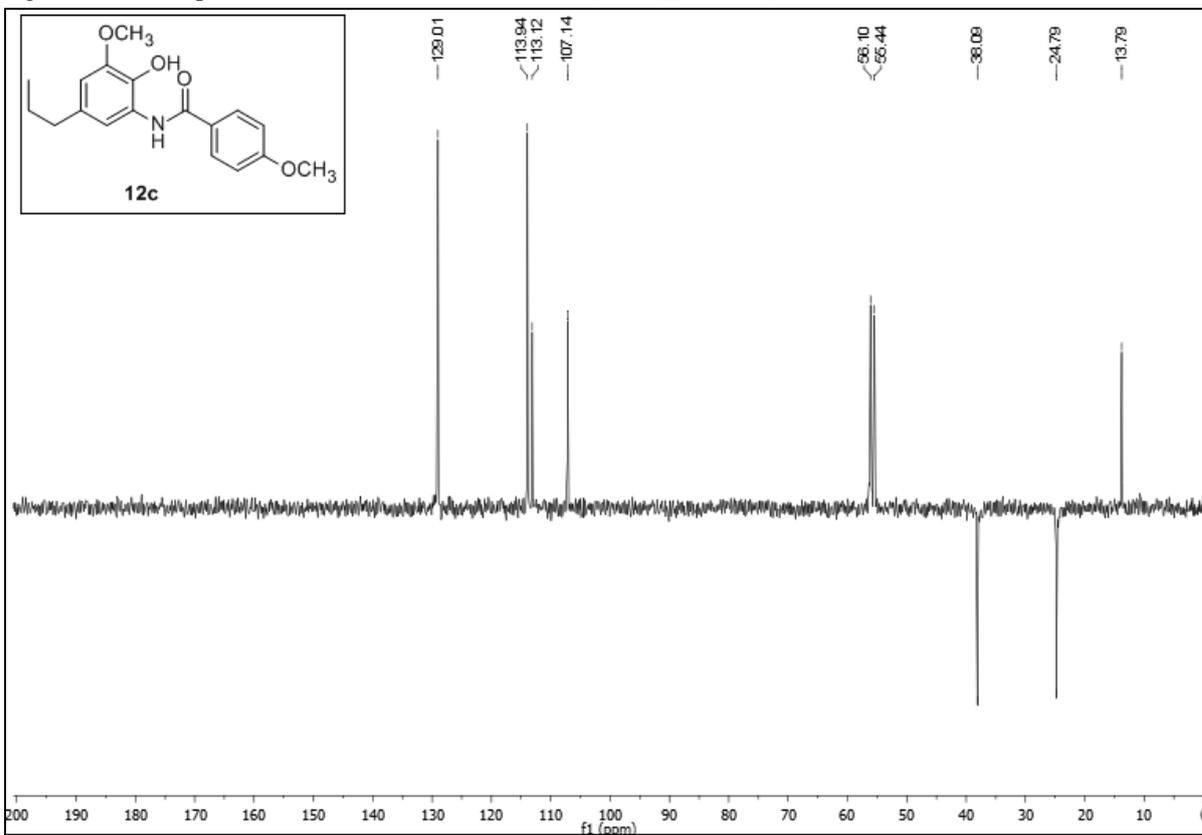
No espectro de RMN de ^{13}C da substância 12c (FIGURA 42), destaca-se a presença do sinal à 165,17 ppm, correspondente ao carbono carbonílico. Os sinais referentes aos quatro carbonos no anel contendo o átomo de cloro são visualizados à 162,51, 129,02, 125,85 e 113,95 ppm. O carbono ligado diretamente à metoxila apresenta maior deslocamento químico devido ao efeito retirador de elétrons por efeito indutivo exercido por esse grupo, o qual ocorre devido a eletronegativa do átomo de oxigênio. Por ser um forte doador de elétrons por ressonância, o grupo metoxila faz com que os carbonos vizinhos fiquem mais blindados que aqueles mais distantes. Algumas atribuições podem ser confirmadas pelo subspectro DEPT-135 (FIGURA 43).

Figura 42 – Espectro de RMN de ^{13}C da substância 12c (CDCl_3 , 75 MHz).



Fonte: Do autor.

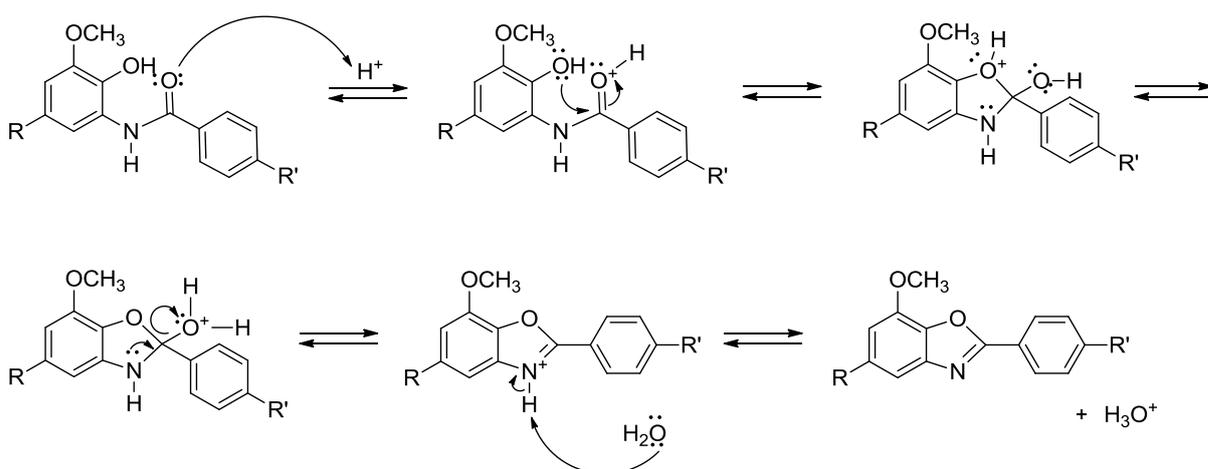
Figura 43 – Subespectro DEPT-135 da substância 12c (CDCl_3 , 75 MHz).



Fonte: Do autor.

Por fim, através da ciclização dessas amidas (11a-d e 12a-d), foram obtidos novamente os benzoxazóis (9a-d e 10a-d). A reação ocorreu em tolueno na presença de APTS à 110°C. O procedimento é simples e rendimentos consideráveis são descritos para essa metodologia (NAKAMURA; YASUI; BAN, 2013). O APTS presente no meio reacional é capaz de protonar a carbonila da amida, aumentando sua eletrofilia, a qual então fica mais suscetível à ataques por nucleófilos. Em seguida, a hidroxila fenólica ataca esse carbono, formando um heterociclo intermediário. Então, ocorre uma transferência de prótons, seguida de eliminação de uma molécula de água e formação de dupla ligação entre nitrogênio e carbono, sendo que o nitrogênio adquire carga positiva. Um dos pares de elétrons livres do oxigênio da molécula de água liberada capta o hidrogênio que está ligado ao átomo de nitrogênio, neutralizando sua carga e formando o produto final. Esse provável mecanismo de reação está representado abaixo (FIGURA 44).

Figura 44 – Mecanismo provável de obtenção dos derivados benzoxazólicos via amidas.



Fonte: Do autor.

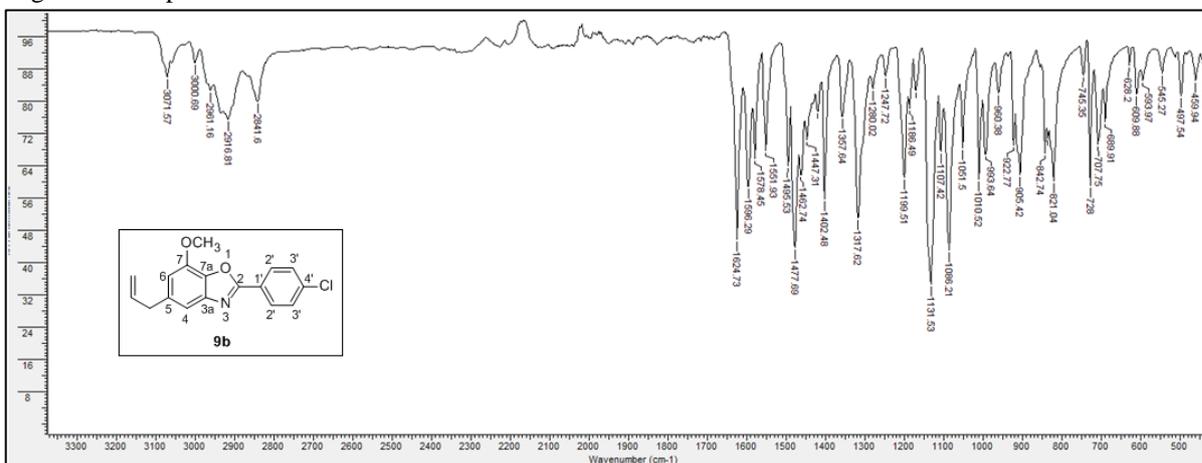
O uso do APTS como catalisador dessa reação se justifica devido ao seu baixo custo, facilidade de manuseio (por ser um ácido sólido) e baixa toxicidade, além de ser estável e solúvel em solventes orgânicos, como o tolueno. Como é necessária a eliminação de água para que ocorra a formação dos benzoxazóis, seu uso é apropriado, uma vez que não introduz água na reação (BAGHERNEJAD, 2011).

Na sequência, são apresentados e discutidos os espectros no IV e de RMN de dois benzoxazóis representativos da série, 9b e 10c.

Dos dados obtidos pela análise por espectroscopia no IV para a substância 9b (FIGURA 45), nota-se a ausência de bandas características de carbonila (1820-1630 cm^{-1}), de

hidroxila ($3200\text{-}2500\text{ cm}^{-1}$) e de ligação N-H ($3500\text{-}3070\text{ cm}^{-1}$), o que indica que bandas relacionadas à amida de partida não mais existem no produto. Destaca-se a presença de uma banda à $1624,73\text{ cm}^{-1}$, característica de deformação axial de ligação C=N.

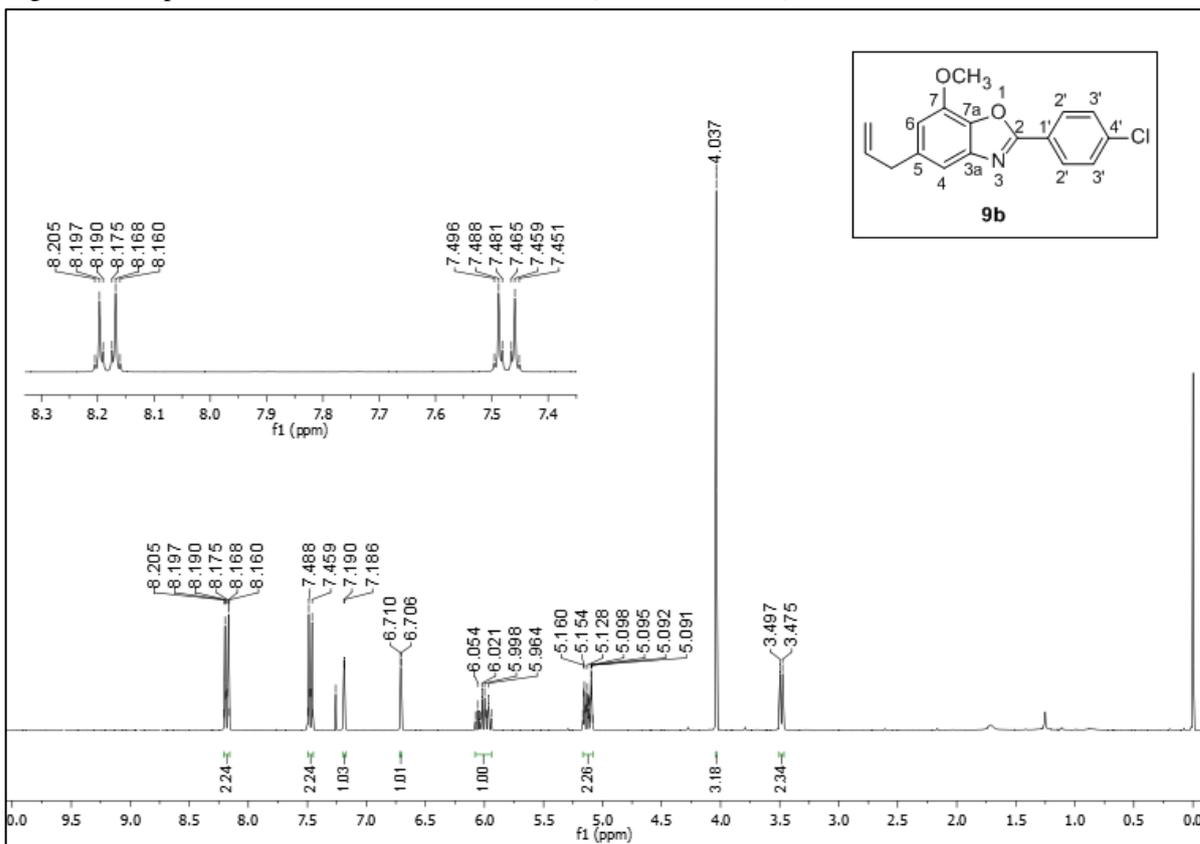
Figura 45 – Espectro no IV da substância 9b.



Fonte: Do autor.

No espectro de RMN de ^1H da substância 9b (FIGURA 46), destacam-se os sinais relativos aos átomos de hidrogênio presentes no anel benzênico *para*-substituído, que aparecem como multipletos a δ 8,205-8,160 (H2') e δ 7,496-7,451 (H3'). Nesse caso, o H3' apresenta um menor deslocamento químico comparado ao H2' devido ao efeito doador de elétrons do átomo de cloro, que faz com que átomos mais próximos a ele possuam uma maior densidade eletrônica, ficando mais blindado. Observam-se também diferenças nos valores de deslocamento químico dos hidrogênios aromáticos do anel proveniente do eugenol quando comparados aos sinais exibidos para o amino-eugenol. O H4 aparece a δ 7,188 e o H6 a δ 6,708. Tais valores são maiores que os obtidos para o amino-eugenol, provavelmente devido à mudança na hibridização do nitrogênio, de sp^3 para sp^2 , o que aumenta sua capacidade de atrair elétrons, desblindando os hidrogênios vizinhos. Sinais característicos da cadeia alílica do eugenol e da metoxila estão presentes.

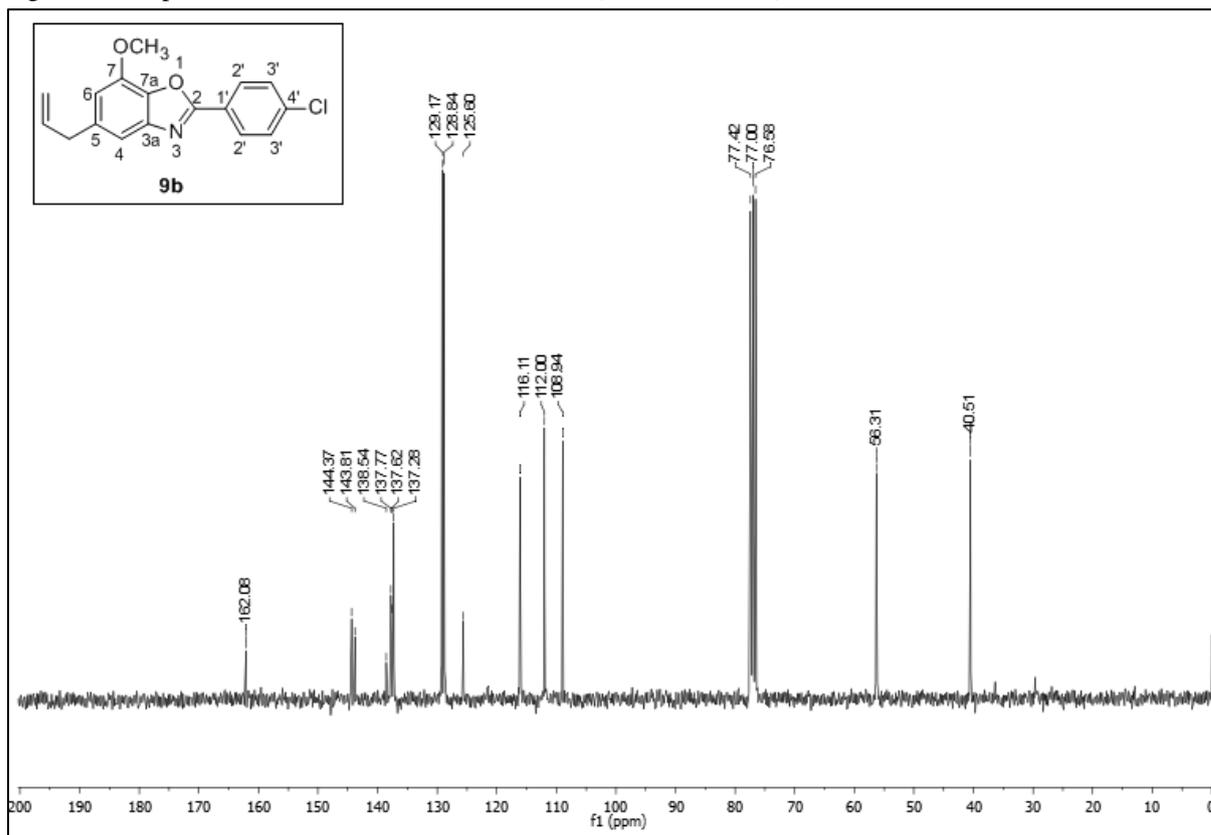
Figura 46 – Espectro de RMN de ^1H da substância 9b (CDCl_3 , 300 MHz).



Fonte: Do autor.

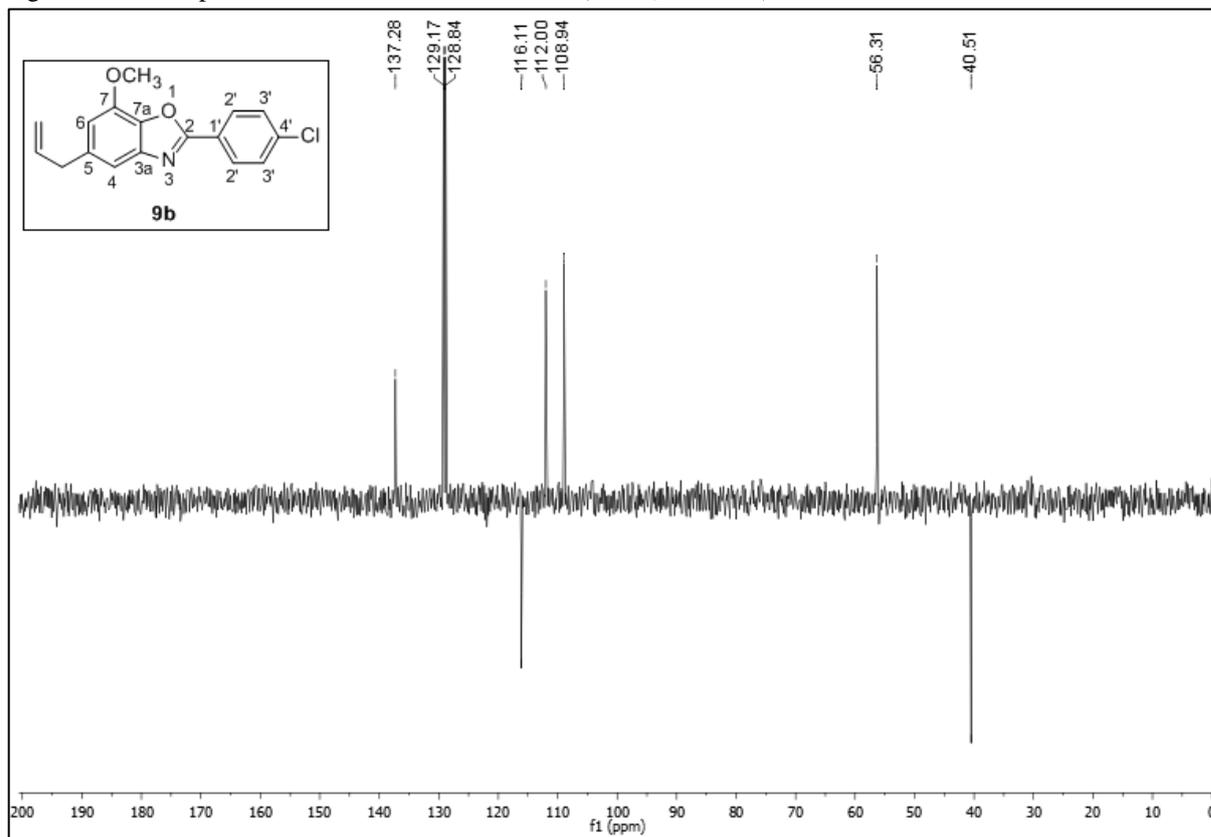
No espectro de RMN de ^{13}C da substância 9b (FIGURA 47), destacam-se os sinais referentes aos 6 carbonos do anel benzênico para-substituído à δ 125,60 (C1'), 128,84 (C2'), 129,17 (C3') e 137,77 (C4'). Por ser um átomo eletronegativo, o átomo de cloro exerce um efeito retirador de elétrons no carbono ligado diretamente à ele, o qual fica mais desblindado que os demais carbonos do anel. Também é importante notar o sinal a δ 162,08, correspondente ao C2, do anel benzoxazólico. Os sinais relativos aos carbonos 3a e 7a aparecem a δ 143,81 e 137,62. O sinal do carbono 7a é diferente dos valores encontrados na literatura, que são em torno de 150 ppm. Isso pode ser explicado pelo efeito doador de elétrons exercido pela metoxila próxima à este carbono, que o deixa com uma maior densidade eletrônica, conseqüentemente absorvendo uma menor quantidade de energia e apresentando menor deslocamento químico. Já os sinais de C2 e C3a são próximos aos encontrados em outros trabalhos (VARMA; KUMAR, 1998; SCHNURCH; HAMMERLE; STANETTY, 2010). O sinal característico de carbono carbonílico está ausente. As atribuições relativas aos carbonos metilênicos podem ser confirmadas pelo subspectro DEPT-135 (FIGURA 48).

Figura 47 – Espectro de RMN de ^{13}C da substância 9b (CDCl_3 , 75 MHz).



Fonte: Do autor.

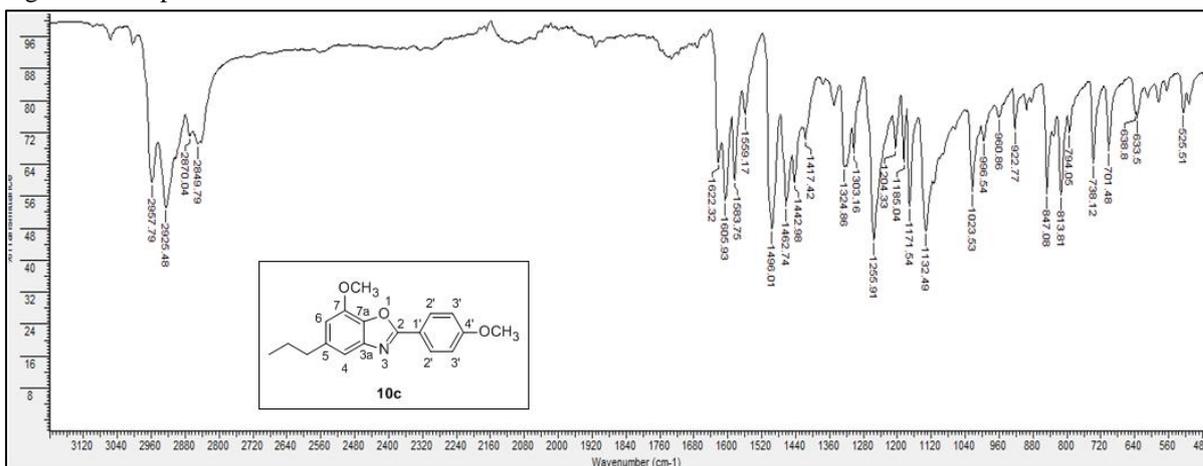
Figura 48 – Subespectro DEPT-135 da substância 9b (CDCl_3 , 75 MHz).



Fonte: Do autor.

Dos dados obtidos pela análise na região do IV para a substância 10c (FIGURA 49), também é possível notar a ausência de bandas características de carbonila ($1820-1630\text{ cm}^{-1}$), de hidroxila ($3200-2500\text{ cm}^{-1}$) e de ligação N-H ($3500-3070\text{ cm}^{-1}$), além da presença de uma banda à $1622,32\text{ cm}^{-1}$, característica de deformação axial de ligação C=N, sugerindo a formação do benzoxazol, a qual foi comprovada pela análise dos espectros de RMN.

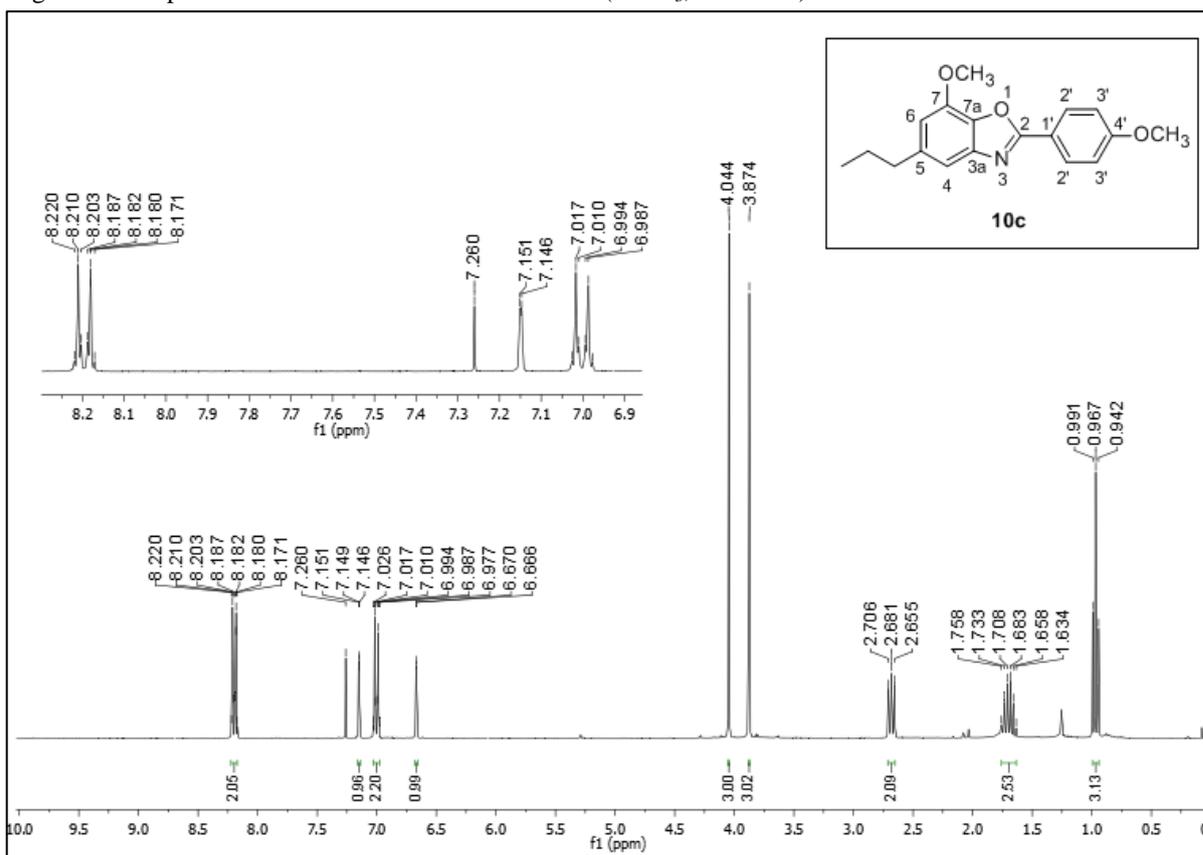
Figura 49 – Espectro no IV da substância 10c.



Fonte: Do autor.

No espectro de RMN de ^1H da substância 10c (FIGURA 50), destacam-se os multipletos relativos aos átomos de hidrogênio presentes no anel benzênico *para*-substituído, a δ 8,220-8,171 (H2') e δ 7,026-6,917 (H3'). Aqui, o H3' também apresenta um menor deslocamento químico comparado ao H2', porém devido ao efeito doador de elétrons do grupo metoxila, que torna os átomos vizinhos mais blindados, o que diminui a quantidade de energia absorvida por eles. Nota-se também que os valores de deslocamento químico dos hidrogênios aromáticos do anel proveniente do eugenol, à δ 7,149 (H4) e δ 6,668 (H6) são maiores que aqueles obtidos para o aminodiidroeugenol, devido à já citada mudança na hibridização do nitrogênio. Sinais característicos da cadeia propílica do diidroeugenol e da metoxila estão presentes. Além disso, nota-se um sinal referente aos três átomos de hidrogênio do outro grupo metoxila, presente no anel benzênico, a δ 3,875.

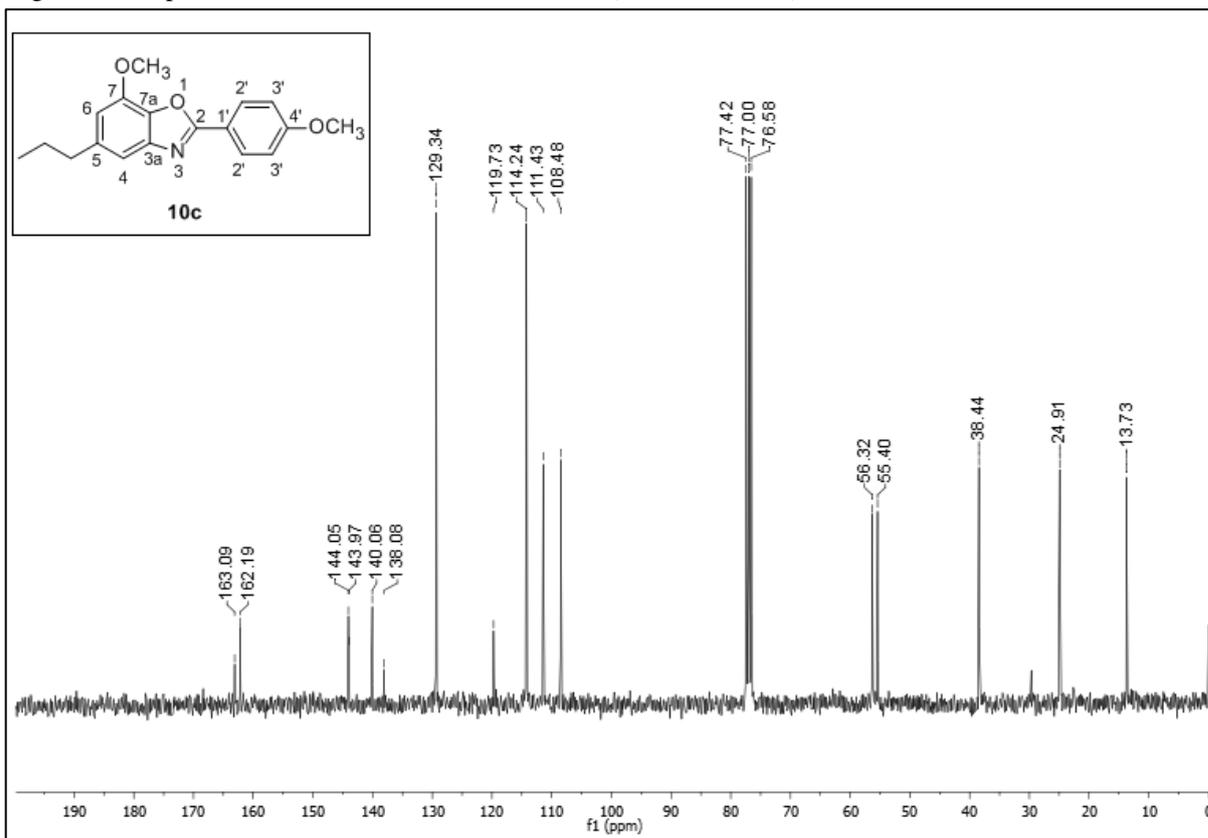
Figura 50 – Espectro de RMN de ^1H da substância 10c (CDCl_3 , 300 MHz).



Fonte: Do autor.

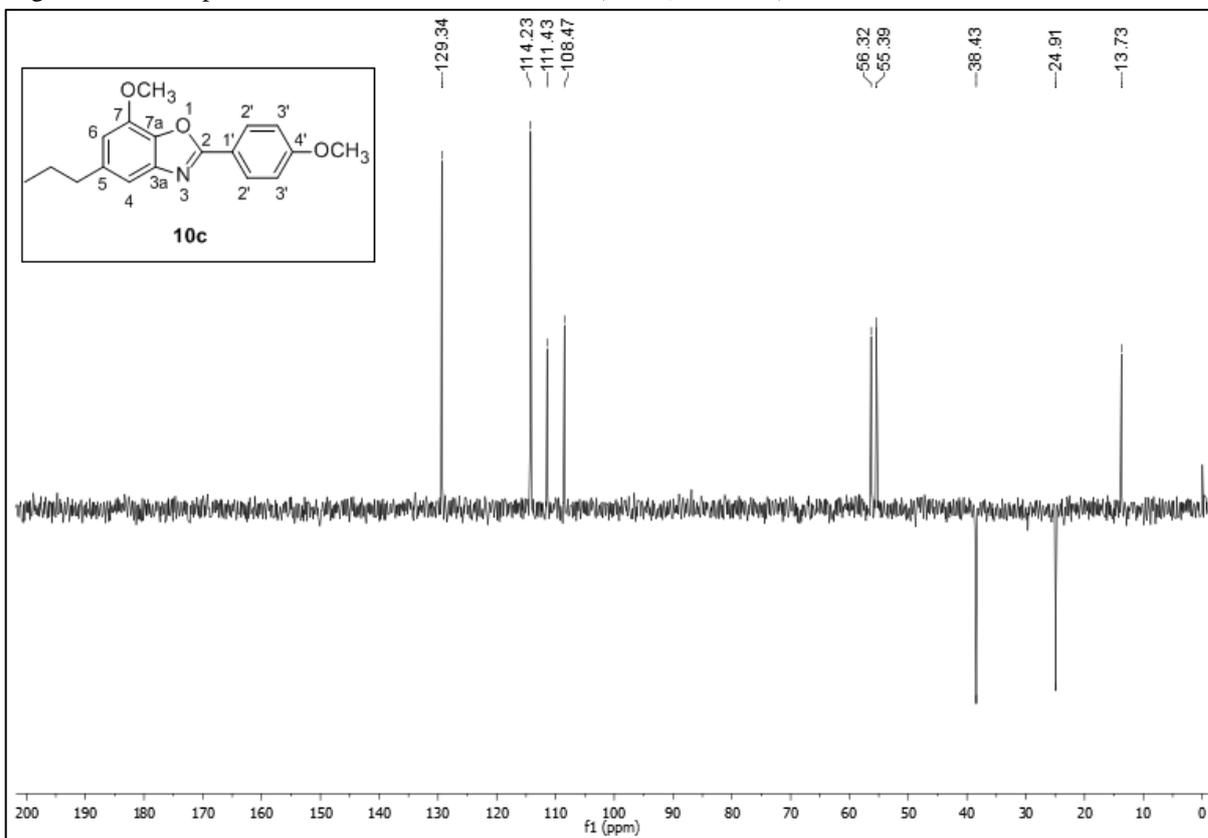
No espectro de RMN de ^{13}C da substância 10c (FIGURA 51), observam-se os sinais referentes aos seis carbonos do anel benzênico à δ 119,73 ($\text{C}1'$), 129,34 ($\text{C}2'$), 114,24 ($\text{C}3'$) e 162,19 ($\text{C}4'$), além do sinal do carbono da metoxila liga a esse anel a δ 55,40. O átomo de oxigênio da metoxila é eletronegativo e, assim como o átomo de cloro, exerce um efeito retirador de elétrons no carbono ligado diretamente à ele, o qual fica mais desblindado que os demais carbonos do anel. Por ser mais eletronegativo que o cloro, o oxigênio deixa o carbono mais desblindado, razão pela qual seu deslocamento químico é ainda maior. Ainda, o efeito doador de elétrons da metoxila faz com que átomos na posição orto fiquem mais blindados que aqueles na posição meta, o que é observado nos valores de $\text{C}2'$ e $\text{C}3'$. Também é importante notar o sinal a δ 163,09, correspondente ao $\text{C}2$ do anel benzoxazólico, o qual é desblindado principalmente devido aos efeitos retirador de elétrons dos átomos de oxigênio e nitrogênio, além do fato de estar ligado a um nitrogênio hibridizado sp^2 , o que faz com que os elétrons fiquem mais deslocalizados, diminuindo a nuvem eletrônica desse carbono. Os sinais relativos aos carbonos 3a e 7a aparecem a δ 143,97 e 138,08. Por fim, também não é observado sinal característico de carbono carbonílico Pelo subespectro DEPT-135 (FIGURA 52), pode-se confirmar parte das atribuições.

Figura 51 – Espectro de RMN de ^{13}C da substância 10c (CDCl_3 , 75 MHz).



Fonte: Do autor.

Figura 52 – Subespectro DEPT-135 da substância 10c (CDCl_3 , 75 MHz).



Fonte: Do autor.

Os benzoxazois sintetizados à partir das amidas foram obtidos em rendimentos superiores àqueles formados à partir das iminas, como foi possível observar na Tabela 8, mostrada anteriormente. As metodologias utilizadas são mais simples e rápidas, gerando menores custos. Sendo assim, esse foi o método mais eficiente para obtenção dos derivados benzoxazólicos propostos nesse trabalho.

4.2 AVALIAÇÃO BIOLÓGICA

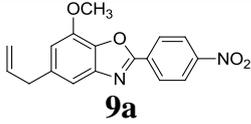
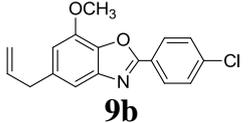
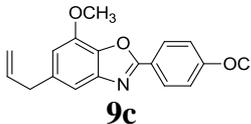
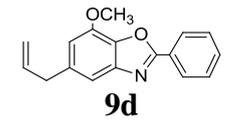
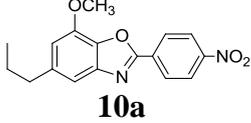
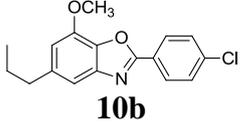
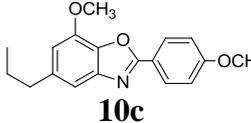
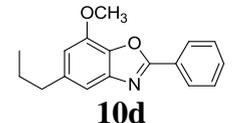
Os oito derivados benzoxazólicos sintetizados bem como o eugenol, foram avaliados quanto à atividade antifúngica contra *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis*, e à ação antibacteriana, contra *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538). Também foi avaliada a citotoxicidade dessas substâncias frente à células sanguíneas mononucleares periféricas humanas.

Os produtos considerados ativos foram aqueles que promoveram a inibição do crescimento da espécie microbiana testada em concentrações até 100 µg/mL. Isso não implica necessariamente que os demais produtos sejam desprovidos de atividade, mas sim que, se forem capazes inibir o crescimento microbiano, essa inibição ocorre em concentrações acima de 100 µg/mL. Tais concentrações não foram testadas por diferir muito das concentrações encontradas para as substâncias de referência, portanto sem utilidade prática a nosso ver.

Analisando os resultados obtidos para os testes de atividade antibacteriana, os quais foram realizados contra a bactéria Gram negativa *Escherichia coli* e contra a bactéria Gram positiva *Staphylococcus aureus*, concluímos que nenhum dos derivados benzoxazólicos foi capaz de inibir o crescimento dessas espécies nas concentrações avaliadas. O eugenol também não exibiu ação contra essas bactérias. Por sua vez, o cloranfenicol, fármaco utilizado como padrão, mostrou grande atividade contra essas espécies. O padrão, que é uma substância capaz de inibir o crescimento dos micro-organismos utilizados nas análises, deve sempre ser testado, juntamente com os produtos de interesse, pois tem como função ser o controle positivo do teste que está sendo realizado.

Já na avaliação antifúngica foram obtidos alguns resultados interessantes. Tais resultados, assim como aqueles advindos da avaliação de citotoxicidade frente à células humanas, estão resumidos na Tabela 9 e discutidos adiante.

Tabela 9 – Resultados obtidos da avaliação da atividade antifúngica e de citotoxicidade sobre células sanguíneas mononucleares dos derivados benzoxazólicos.

Substância	CI ₅₀ (µM)					CC ₅₀ (µM)	IS
	CA	CT	CK	CP	CG		
 9a	i	i	i	i	i	1208	-
 9b	i	i	i	i	i	558	-
 9c	338	i	i	i	338	888	2,6
 9d	380	i	i	i	i	1111	2,9
 10a	321	i	321	i	i	613	1,9
 10b	i	i	332	i	332	629	1,9
 10c	i	i	i	i	i	1216	-
 10d	i	i	i	i	i	489	-
 Eugenol	i	i	610	i	i	549	0,9
Fluconazol	1,6	3,3	104,3	3,3	52,2	na	na

Fonte: Do autor.

Notas: CA: *C. albicans*, CT: *C. tropicalis*, CK: *C. krusei*, CP: *C. parapsilosis*, CG: *C. glabrata*.IS: Índice de seletividade, dado pela razão CC₅₀/CI₅₀.i: inativo até 100 µg.mL⁻¹. na: não avaliado.

O eugenol exibiu atividade apenas contra *C. krusei*, porém com potência cerca de duas vezes menor que para os produtos 10a e 10b. Os mesmos foram apenas três vezes menos potentes que o fármaco referência fluconazol contra essa espécie. Os produtos 9c, 9d e 10a, ao contrário do eugenol, exibiram atividade contra *C. albicans*. De acordo com um trabalho realizado por Podunavac-Kuzmanovića e colaboradores (2012), quanto maior o logP da substância, maior sua ação contra *C. albicans*. Uma vez que os benzoxazóis são mais lipofílicos que o eugenol, esse achado corrobora os resultados encontrados por esses autores. As substâncias 9c e 10b foram capazes de inibir o crescimento de *C. glabrata*, enquanto o eugenol não apresentou qualquer atividade contra essa espécie nas concentrações testadas. Porém, nenhum dos produtos testados foi capaz de inibir o crescimento de *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* nas concentrações utilizadas. Sendo assim, quando comparados ao eugenol, alguns derivados benzoxazólicos apresentaram melhoria na potência antifúngica. Embora relevantes, tais valores ainda são muito inferiores àqueles apresentados pelo fluconazol, utilizado como referência. Entretanto, como não foram efetuados estudos de mecanismos de ação, essas substâncias não agem, necessariamente, no mesmo alvo molecular que o fármaco referência.

Analisando-se os resultados obtidos na avaliação de citotoxicidade, pode-se notar que os benzoxazóis são menos tóxicos às células humanas que o eugenol, uma vez que é necessária uma maior quantidade dessas substâncias para exercer efeitos nocivos nas células. Entre as substâncias que exibiram atividade, a 9d foi a que apresentou menor citotoxicidade (cerca de 3 vezes). Considerando as substâncias 9c, 9d, 10a e 10b, que foram aquelas que apresentaram atividade antifúngica em concentrações menores que 100 µg/mL, esses valores são interessantes, pois observa-se que são maiores que aqueles necessários para que haja a ação.

Nesse trabalho, foram propostas as trocas da cadeia lateral alílica do eugenol por uma cadeia propílica, e do substituinte do anel aromático ligado ao núcleo benzoxazólico, para avaliar como esses grupos afetariam a atividade biológica e a citotoxicidade. Pelos dados apresentados, pode-se notar que não há uma relação clara entre a natureza da cadeia lateral ou a presença grupos doadores ou retiradores elétrons e a inibição do crescimento dos fungos, ao contrário do observado no estudo de Vodela (2013), onde afirmou-se que o derivado com substituinte 4-nitrofenila exibia uma maior atividade antifúngica e que a presença de grupos fenila e 4-clorofenila também influenciavam positivamente a ação biológica. Ertan e colaboradores (2009) também observaram em seu estudo que a presença de um átomo de cloro potencializava a ação antifúngica.

Por outro lado, observa-se que as substâncias ativas derivadas do eugenol apresentam menor citotoxicidade quando comparados aos derivados do diidroeuogenol, apesar de estes ainda serem menos tóxicos que o eugenol. Já os grupos presentes na posição 4 do anel benzênico parecem não influenciar na toxicidade frente às células humanas.

Por fim, conclui-se que a união entre eugenol ou diidroeuogenol e um núcleo benzoxazólico é interessante, pois resulta em produtos menos tóxicos que seu precursor, e com maior atividade antifúngica, apesar de os valores de CI_{50} encontrados serem maiores que aqueles obtidos para o fluconazol. Outras modificações estruturais podem ser feitas nas substâncias obtidas, a fim de se obter produtos com maior potência e menor toxicidade.

5 CONCLUSÕES

Nesse trabalho foram sintetizados oito benzoxazois inéditos por hibridização molecular envolvendo o eugenol. A preparação dos mesmos por meio da síntese e ciclocondensação de amidas foi mais eficaz que empregando iminas como intermediários. Esses benzoxazois, ao serem avaliados frente a micro-organismos, não apresentaram ação antibacteriana contra *S. aureus* ou *E. coli*. Entretanto, os benzoxazois 9c, 9d, 10a e 10b foram ativos contra ao menos uma espécie de *Candida* sp. Os valores de CI_{50} encontrados para essas substâncias foram inferiores aquele obtido para o eugenol, embora elas tenham sido muito menos ativas que o fluconazol. Em termos de citotoxicidade, esses quatro benzoxazois foram menos tóxicos que o eugenol. Não foi observada influência clara das diferenças estruturais nos efeitos encontrados. Mesmo assim, esses achados mostram que novos benzoxazois podem ser planejados a partir do eugenol a fim de se obter derivados com atividades superiores.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRÃO, P. H. O. et al. Synthesis and Biological Evaluation of New Eugenol Mannich Bases as Promising Antifungal Agents. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 86, n. 4, p. 459-65, 2015

ADDLA, D. et al. Design, synthesis and antimicrobial evaluation of novel 1-benzyl 2-butyl-4-chloroimidazole embodied 4-azafluorenones via molecular hybridization approach. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 22, p. 7475–7480, 2012.

AHMAD, A. et al. Evolution of ergosterol biosynthesis inhibitors as fungicidal against *Candida*. **Microbial Pathogenesis**, v. 48, n. 1, p. 35–41, 2010a.

AHMAD, A. et al. In vitro synergy of eugenol and methyleugenol with fluconazole against clinical *Candida* isolates. **Journal of Medical Microbiology**, v. 59, n. 10, p. 1178–1184, 2010b.

AHMAD, A. et al. Proton translocating ATPase mediated fungicidal activity of eugenol and thymol. **Fitoterapia**, v. 81, n. 8, p. 1157–1162, dez. 2010c.

ALMEIDA, L. F. D et al. Atividade antifúngica de óleos essenciais frente a amostras clínicas de *Candida albicans* isoladas de pacientes HIV positivos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, Botucatu**, v. 14, n. 4, p. 649–655, 2012.

AMARAL, M. F. Z. J.; BARA, M. T. F. Avaliação da atividade antifúngica de extratos de plantas sobre o crescimento de fitopatógenos. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 2, n. 2, p. 5–8, 2005.

ANDRADE, C. K. Z. et al. Molecular sieves in ionic liquids as an efficient and recyclable medium for the synthesis of imines. **Synlett**, n. 12, p. 2135-2138, 2004.

ANTHONY, J.; FYFE, L.; SMITH, H. Plant active components: a resource for antiparasitic agents? **Trends in Parasitology**, v. 21, n. 10, p. 462–468, 2005.

ARAÚJO, C. R. M. et al. Desenvolvimento de fármacos por hibridação molecular: uma aula prática de química medicinal usando comprimidos de paracetamol e sulfadiazina e a ferramenta virtual SciFinder®. **Química Nova**, v. 38, n. 6, p. 868-873, 2015.

BAGHERNEJAD, B. Application of p-toluenesulfonic acid (PTSA) in organic synthesis. **Current Organic Chemistry**, v. 15, p. 3091-3097, 2011.

BELLAMY, F. D. Selective reduction of aromatic nitro compounds with stannous chloride in non acidic and non aqueous medium. **Tetrahedron Letters**, v. 25, n. 8, p. 839–842, 1984.

BENACHENHOU, F.; MESLI, A.; GUILARD, R. Synthesis of Schiff bases by aromatic amine condensation with 3,3'-bithiophenes-2,2' and 4,4'-dicarbaldehydes. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 6, n. 3, p. 313-317, 2013.

BENENCIA, F.; COURRGES, M.C. In vitro and in vivo activity of eugenol on human herpesvirus. **Phytotherapy Research**, v. 14, p. 495–500, 2000.

BORA, U. An eco-friendly and mild process for deacetylation reactions in water. **Asian Journal of Chemistry**, v. 23, n. 2, p. 941-942, 2011.

BOUGRIN, K.; LOUPY, A.; SOUFIAOUI, M. Trois nouvelles voies de synthèse des dérivés 1,3-azoliques sous micro-ondes. **Tetrahedron**, v. 54, n. 28, p. 8055-8064, 1998.

BRAGA, P. C. et al. Eugenol and thymol, alone or in combination, induce morphological alterations in the envelope of *Candida albicans*. **Fitoterapia**, v. 78, p. 396–400, 2007.

CARRASCO, H. et al. Antifungal activity of eugenol analogues. Influence of different substituents and studies on mechanism of action. **Molecules**, v. 17, n. 1, p. 1002–1024, 2012.

CHO, Y.; LEE, C.; CHEON, C. Cyanide as a powerful catalyst for facile synthesis of benzofused heteroaromatic compounds via aerobic oxidation. **Tetrahedron**, v. 69, p. 6565 – 6573, 2013.

CLAYDEN, J. GREEVES, N. WARREN, S. **Organic Chemistry**. 2. ed. [S.l.]: Oxford University Press, 2012.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Methods for dilution antimicrobial susceptibility testes for bacteria that grow aerobically. Approved Standard-Ninth Edition. M07-A9. Wayne, PA, USA: CLSI, 2012.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved Standard-Third Edition. M27-A3. Wayne, PA, USA: CLSI, 2008.

COSTA, A. R. T. et al. Ação do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M.Perry sobre as hifas de alguns fungos fitopatogênicos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 13, n. 2, p. 240–245, 2011.

DANIEL, A. N. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of eugenol essential oil in experimental animal models. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n.1B, p. 212–217, 2009.

DARVISHI, E. et al. The antifungal eugenol perturbs dual aromatic and branched-chain amino acid permeases in the cytoplasmic membrane of yeast. **Plos One**, v. 8, n. 10, p. 1-9, 2013.

DeLUCA, M. R.; KERWIN, S. M. The *para*-toluenesulfonic acid-promoted synthesis of 2-substituted benzoxazoles and benzimidazoles from diacylated precursors. **Tetrahedron**, v. 53, n. 2, p. 457-464, 1997.

DEVI, K. P. et al. Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 130, n. 1, p. 107–115, 2010.

DIAS, K. S. et al. Semisynthesis and antimicrobial activity of novel guttiferone-A derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 20, p. 2713-2720, 2012.

DI PASQUA, R. et al. Changes in membrane fatty acids composition of microbial cells induced by addition of thymol, carvacrol, limonene, cinnamaldehyde, and eugenol in the growing media. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 2745–2749, 2006.

ERTAN, T. et al. Synthesis, biological evaluation and 2D-QSAR analysis of benzoxazoles as antimicrobial agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, n. 2, p. 501–510, 2009.

FARAGO, P. V. et al. Atividade antibacteriana de óleos essenciais de *Ocimum selloi* Benth. (Lamiaceae). Publicativo UEPG: Ciências Biológicas e da Saúde, Ponta Grossa, v. 10, n. 3/4, p. 59–63, 2004.

GAMBLE, A. B. et al. Aryl nitro reduction with iron powder or stannous chloride under ultrasonic irradiation. **Synthetic Communications**, v. 37, n. 16, p. 2777-2786, 2007.

GILL, A. O.; HOLLEY, R. A. Inhibition of membrane bound ATPases of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* by plant oil aromatics. **International Journal of Food Microbiology**, n. 111, p. 170–174, 2006a.

GILL, A. O.; HOLLEY, R. A. Disruption of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus sakei* cellular membranes by plant oil aromatics. **International Journal of Food Microbiology**, v. 108, p. 1 – 9, 2006b.

GUENETTE, S. A. et al. Pharmacokinetics and anesthetic activity of eugenol in male Sprague–Dawley rats. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 29, n. 4, p. 265–270, 2006.

HEGEDUS, L. S. et al. Synthesis of 2,5-disubstituted 3,6-diamino-1,4-benzoquinones. **Journal of Organic Chemistry**, v. 47, p. 2607-2613, 1982.

HEIN, D. W.; LEAVITT, J. J. The use of polyphosphoric acid in the synthesis of 2-aryl- and 2-alkyl-substituted benzimidazoles, benzoxazoles and benzothiazoles. **Journal of American Chemical Society**, v. 79, n. 2, p. 427–429, 1957.

HIDALGO, M. E. et al. Antioxidant capacity of eugenol derivates. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1467–1470, 2009.

HOLAN, G.; EVANS, J. J.; LINTON, M. Formation of benzimidazoles at high pressure. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1**, p. 1200-1203, 1977.

ISENMANN, A. F. **Princípios da Síntese Orgânica**. 2. ed. [S.l.:s.n.], 2013.

JARDOSH, H. H.; PATEL, M. P. Design and synthesis of biquinoloneeisoniazid hybrids as a new class of antitubercular and antimicrobial agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 65, p. 348-359, 2013.

JAUHARI, P. K. et al. Synthesis of some novel 2-substituted benzoxazoles as anticancer, antifungal, and antimicrobial agents. **Medicinal Chemistry Research**, v. 17, p. 412–424, 2008.

KAMATOU, G. P.; VERMAAK, I.; VILJOEN, A. M. Eugenol—From the remote Maluku Islands to the international market place: a review of a remarkable and versatile molecule. **Molecules**, v. 17, n. 6, p. 6953–6981, 2012.

KANAOKA, Y.; HAMADA, T.; YONEMITSU, O. Polyphosphate Ester as a Synthetic Agent. XIII. Syntheses of 2-Substituted Benzoxazoles and Benzthiazoles with PPE. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 18, n. 3, p. 587-590, 1970.

KAPLANCIKLI, Z. A. et al. Synthesis and study of antibacterial and antifungal activities of novel 2-[[benzoxazole/benzimidazole-2-yl)sulfanyl] acetylamino]thiazoles. **Archives of Pharmacal Research**, v. 27, n. 11, p. 1081–1085, 2004.

KAR, A. **Medicinal Chemistry**. 4. ed. [S.l.]: New Age International (P) Limited Publishers, 2007.

KAUFMAN, T. S. The multiple faces of eugenol. A versatile starting material and building block for organic and bio-organic synthesis and a convenient precursor toward bio-based fine chemicals. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 26, n. 6, p. 1055-1085, 2015.

KHUNT, M. D. et al. Easy, Simplistic and green synthesis of various benzimidazole and benzoxazole derivatives using PEG400 as a green solvent. **International Letters of Chemistry, Physics and Astronomy**, v. 6, p. 61-68, 2014.

KIM, B. J. et al. Synthesis of benzoxazole amides as novel antifungal agents against *Malassezia Furfur*. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, v. 31, n. 5, p. 1270–1274, 2010.

KONDO, T. et al. Ruthenium complex-catalyzed facile synthesis of 2-substituted benzoxazoles. **Chemistry Letters**, v. 20, n. 7, p. 1275-1278, 1991.

KUMAR, K. R.; SATYANARAYANA, P. V. V.; REDDY, B. S. NaHSO₄-SiO₂-promoted solvent-free synthesis of benzoxazoles, benzimidazoles, and benzothiazole derivatives. **Journal of Chemistry**, 10 páginas, 2013, Article ID 151273.

KUMAR, P. S.; RAI, K. M. L. Reduction of aromatic nitro compounds to amines using zinc and aqueous chelating ethers: Mild and efficient method for zinc activation. **Chemical Papers**, v. 66, n. 8, p. 772–778, 2012.

KUROYANAGI, J. et al. 1,3-Benzoxazole-4-carbonitrile as a novel antifungal scaffold of b-1,6-glucan synthesis inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 21, p. 7593–7606, 2010.

LAYER, R. W. **The Chemistry of Imines**. B. F. Goodrich Co., Research Center, p. 489-510, 1962.

LAZAR, C. et al. Drug evolution concept in drug design: 1. Hybridization method. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, p. 6973-6982, 2004.

LIMA, I. O. et al. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 2, p. 197–201, 2006.

LIU, G. et al. Synthesis of enantiomerically pure n-tert-butanesulfinyl imines (tert-butanesulfinimines) by the direct condensation of tert-butanesulfinamide with aldehydes and ketones. **Journal of Organic Chemistry**, v. 64, p. 1278-1284, 1999.

MACHADO, M. et al. Anti-Giardia activity of *Syzygium aromaticum* essential oil and eugenol: Effects on growth, viability, adherence and ultrastructure. **Experimental Parasitology**, v. 127, n. 4, p. 732–739, 2011.

MANIKANDAN, P. et al. Eugenol induces apoptosis and inhibits invasion and angiogenesis in a rat model of gastric carcinogenesis induced by MNNG. **Life Sciences**, v. 86, n. 25/26, p. 936–941, 2010.

MISHRA, A. et al. Synthesis and evaluation of new diaryl ether and quinoline hybrids as potential antiplasmodial and antimicrobial agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 24, p. 1719–1723, 2014.

MOGHADDAM, F. M. et al. Facile and efficient one-pot protocol for the synthesis of benzoxazole and benzothiazole derivatives using molecular iodine as catalyst. **Synthetic Communications**, v. 36, p. 2543–2548, 2006.

NAKAMURA, H.; YASUI, Y.; BAN, H. S. Synthesis and biological evaluation of ortho-carborane containing benzoxazole as an inhibitor of hypoxia inducible factor (HIF)-1 transcriptional activity. **Journal of Organometallic Chemistry**, v. 747, p. 189-194, 2013.

OLIVEIRA, M. S. et al. Atividade antioxidante e antifúngica de extratos vegetais. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 18, n. 3, p. 267–275, 2007.

OSMAN, A. M.; BASSIOUNI, I. 2-arylnaphthoxazoles and some other condensed oxazoles. **Journal of Organic Chemistry**, v. 27, n. 2, p. 558-561, 1962.

OYEDEMI, S. O. et al. The proposed mechanism of bactericidal action of eugenol, α -terpineol and γ -terpinene against *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes*, *Proteus vulgaris* and *Escherichia coli*. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 7, p. 1280–1286, 2009.

PASHA, M. A.; JAYASHANKARA, V. P. Reduction of aryl nitro compounds to azoarenes and/or arylamines by Al/NaOH in methanol under ultrasonic conditions. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 12, p. 433–435, 2005.

PATIL, R. D.; ADIMURTHY, S. Catalytic methods for imines synthesis. **Asian Journal of Organic Chemistry**, vol. 2, n. 9, p. 726–744, 2013.

PATRICK, G. L. **Organic Chemistry** (Instant Notes Series). 2. ed. [S.l.]: Garland Science/BIOS Scientific Publishers, 2004.

PEREIRA, N. F. M. C. Atividade antifúngica de produtos naturais contra leveduras que deterioram alimentos. 2011. 46f. Monografia (Especialização em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

PODUNAVAC-KUZMANOVIĆA, S. O. et al. A chemometric approach for prediction of antifungal activity of some benzoxazole derivatives against *Candida albicans*. **Acta Periodica Technologica**, v. 43, p. 273–282, 2012.

POTTORF, R. S. et al. Parallel synthesis of benzoxazoles via microwave-assisted dielectric heating. **Tetrahedron Lett**, v. 44, n. 1, p. 175–178, 2003.

RAMALINGAN, C. et al. Synthesis and study of antibacterial and antifungal activities of novel 1-[2-(benzoxazol-2-yl)ethoxy]-2,6-diarylpiperidin-4-ones. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 39, n. 6, p. 527–533, 2004.

SADEGHIAN, H. et al. Design and synthesis of eugenol derivatives, as potent 15-lipoxygenase inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 2, p. 890–901, 2011.

SAJJAD, M.; KHAN, A.; AHMAD, I. Antibiofilm activity of certain phytochemicals and their synergy with fluconazole against *Candida albicans* biofilms. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, p. 618–621, 2012.

SAMOTA, M. K.; JHAJHARIA, P.; SETH, G. Synthesis, characterization, and biological activity of organophosphates derived from substituted benzoxazole. **Heteroatom Chemistry**, v. 20, n. 5, p. 309–315, 2009.

SCHNURCH, M.; HAMMERLE, J.; STANETTY, P. Section 11.13: Benzoxazoles and Other Annulated Oxazoles, **Science of Synthesis Updates**, Georg Thieme Verlag KG, 2010.

- SENER, E. A. et al. Synthesis and microbiological activity of some *N*-(*o*-hydroxyphenyl)benzamides and phenylacetamides as the possible metabolites of antimicrobial active benzoxazoles: part II. **II Farmaco**, v. 55, p. 469–476, 2000.
- SHENG, C. et al. Design, synthesis and antifungal activity of isosteric analogues of benzoheterocyclic *N*-myristoyltransferase inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, p. 3531-3540, 2010.
- SHIRAIISHI, S.; HAYAKAWA, T.; SHIGEMOTO, T. The reaction of benzonitrile oxides with *S,S*-dimethyl-*N*-(2,4,6-trihalophenyl) sulfimides. The Formation of benzoxazole derivatives. **Bulletin of Chemical Society of Japan**, v. 56, n. 5, p. 1514-1518, 1983.
- SHRIVASTAVA, D. Synthesis, evaluation and antimicrobial activity of benzoxazole derivatives. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 1, n. 2, p. 744–754, 2012.
- SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B. **Química Orgânica**. Tradução de Whei Oh Lin. 7 ed. Rio de Janeiro: LTC Editora S.A., 2002.
- SOUZA, T. B. et al. New eugenol glucoside-based derivative shows fungistatic and fungicidal activity against opportunistic *Candida glabrata*. **Chemical Biology & Drug Design**, 2015a. doi: 10.1111/cbdd.12625.
- SOUZA, T. B. et al. Synthesis and antimicrobial activity of 6-triazolo-6-deoxy eugenol glucosides. **Carbohydrate Research**, v. 410, p. 1-8, 2015b.
- SOUZA, T. B. et al. Synthesis and in vitro evaluation of antifungal and cytotoxic activities of eugenol glycosides. **Medicinal Chemistry Research**, v. 23, p. 496-502, 2014.
- SRIKANYH, L. et al. Synthesis and evaluation of new phenylamino-thiadiazolo oxadiazolo-1,3-benzoxazoles for their antifungal and anti-inflammatory activity. **Der Pharma Chemica**, v. 2, n. 4, p. 231–243, 2010.
- SRIVASTAVA, R. G.; VENKATARAMANI, P. S. Barium manganate oxidation in organic synthesis: Part III: oxidation of schiff's bases to benzimidazoles, benzoxazoles and benzothiazoles. **Synthetic Communications**, v. 18, n. 13, p. 1537 – 1544, 1988.
- STEPHENS, F.F. Heterocyclic compounds from Schiff's bases. **Nature**, v. 64, p. 243-243, 1949.

SYKES, P. **A guidebook to mechanism in organic chemistry**. 6. ed. Cambridge: Longman Scientific & Technical, 1985.

TAGUCHI, K.; WESTHEIMER, F.H. Catalysis by molecular sieves in the preparation of ketimines and enamines. **Journal of Organic Chemistry**, v. 36, p. 1570–1572, 1971.

TERASHIMA, M.; ISHII, M.; KANAOKA, Y. A facile synthesis of 2-substituted benzoxazoles. **Synthesis**, v. 6, p. 484–485, 1982.

THEILACKER, W. Zur bildung der benzoxazole aus o-aminophenolen. **Journal Fur Praktische Chemie**, v. 153, n. 1-3, p. 54-56, 1939.

TRAGOOLPUA, Y.; JATISATIENR, A. Anti-herpes simplex virus activities of *Eugenia caryophyllus* (Spreng.). Bullock & S. G. Harrison and essential oil, eugenol. **Phytotherapy Research**, v. 21, p. 1153–1158, 2007.

TRUJILLO-FERRARA, J. G. et al. The E and Z isomers of 3-(benzoxazol-2-yl)prop-2-enoic acid. **Acta Crystallographica Section C**, v. 60, p. 723–726, 2004.

UEDA-NAKAMURA, T. et al. Antileishmanial activity of eugenol-rich essential oil from *Ocimum gratissimum*. **Parasitology International**, v. 55, n. 2, p. 99–105, 2011.

VARMA, R. S.; KUMAR, D. Manganese triacetate oxidation of phenolic Schiff's bases: synthesis of 2-arylbenzoxazoles. **Journal of Heterocyclic Chemistry**, v. 35, p. 1539–1540, 1998.

VENTUROSIO, L. R.; BACCHI, L. M. A.; GAVASSONI, W. L. Atividade antifúngica de extratos vegetais sobre o desenvolvimento de fitopatógenos. **Summa Phytopathologica**, v. 37, n. 1, p. 18-23, 2011.

VIEGAS-JUNIOR, C. et al. Molecular hybridization: a useful tool in the design of new drug prototypes. **Current Medicinal Chemistry**, v. 14, p. 1829-1852, 2007.

VODELA, S. et al. Design, synthesis and screening of some novel benzoxazole based 1,3,4-oxadiazoles as potential antimicrobial agents. **Chinese Chemical Letters**, v. 24, p. 625–628, 2013.

YILDIZ-OREN, I. et al. Synthesis and structure–activity relationships of new antimicrobial active multisubstituted benzazole derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 39, n. 3, p. 291–298, 2004.

YOSHIFUJI, M.; NAGASE, R.; INAMOTO, N. Reactions of α -*N*-diarylnitrones with *o*-methyl diphenylphosphinothioate and oxidations of *N*-alkylidene-2-hydroxyanilines with silver oxide. Preparation of benzoxazoles. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, v. 55, p. 873 – 876, 1982.

ZENGIN, G. Synthesis, antimicrobial activity, and structure-activity relationships of eugenol, menthol and genistein esters. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 47, n. 4, p. 550–555, 2011.

ZHANG, P. et al. Enhanced chemical and biological activities of a newly biosynthesized eugenol glycoconjugate, eugenol α -D-glucopyranoside. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 55, n. 7, p. 3156–3163, 2011.

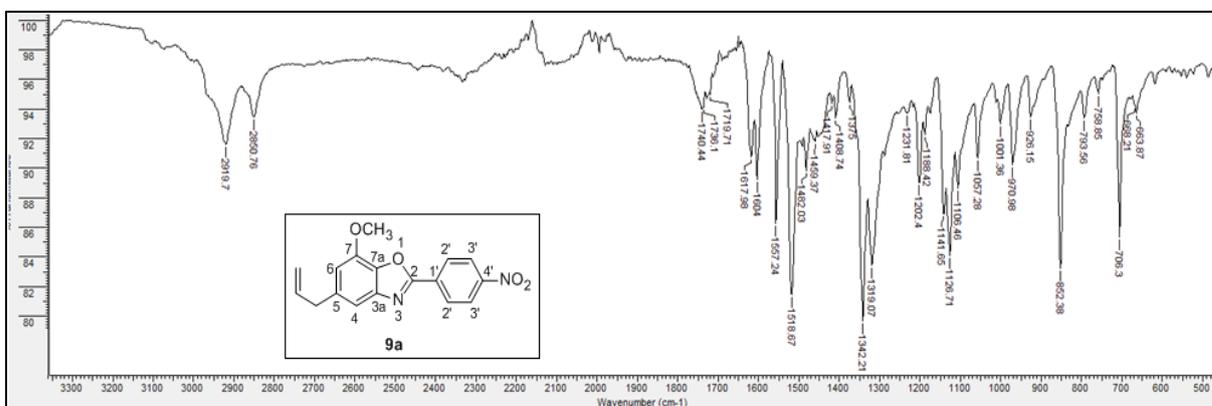
ZIEGLER, E.; KAPPE, T.; KOLLENZ, G. Synthesen von heterocyclen, mitt.: ber reaktionen mit salicyls urechlorid . **Journal of Monatshefte Fur Chemie**, v. 99, n. 5, p. 2024-2031, 1968.

ZOLFIGOL, M. A.; GHAEMI, E.; MADRAKIAN, E. Nitration of phenols under mild and heterogeneous conditions. **Molecules**, v. 6, p. 614-620, 2001.

ZORE, G. B. et al. Terpenoids inhibit *Candida albicans* growth by affecting membrane integrity and arrest of cell cycle. **Phytomedicine**, v. 18, n. 13, p. 1181–1190, 2011.

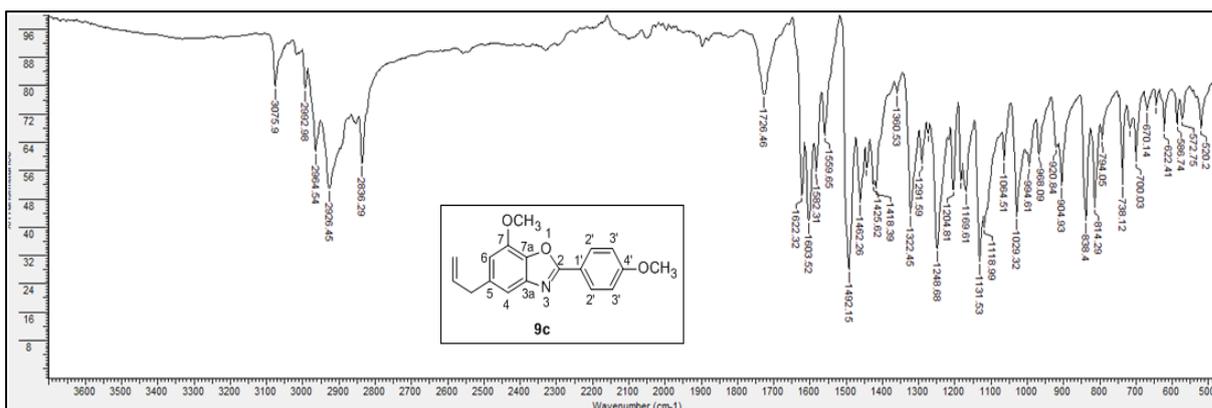
APÊNDICES

APÊNDICE A – Espectro no IV da substância 9a



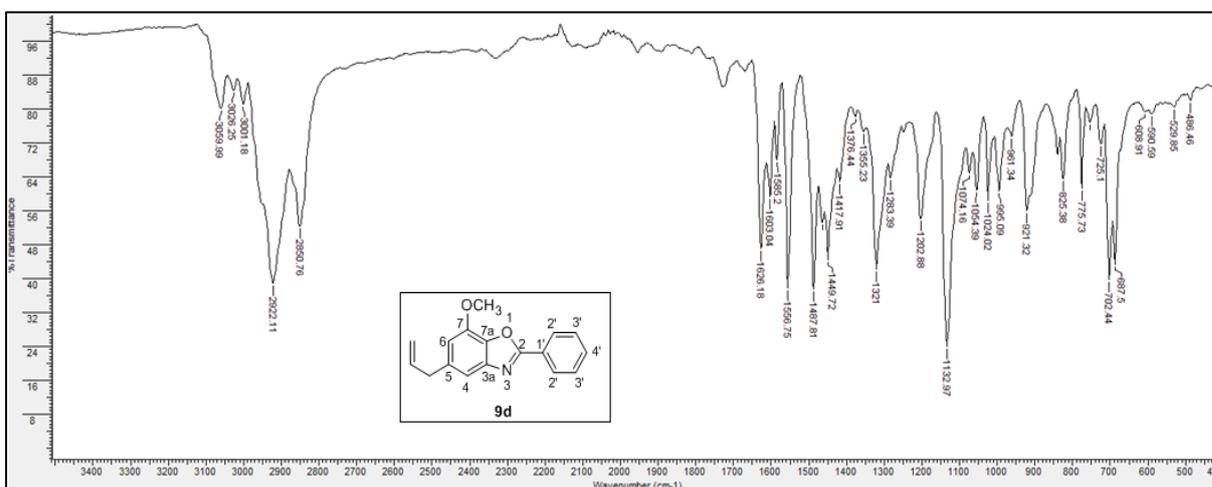
Fonte: Do autor.

APÊNDICE B – Espectro no IV da substância 9c



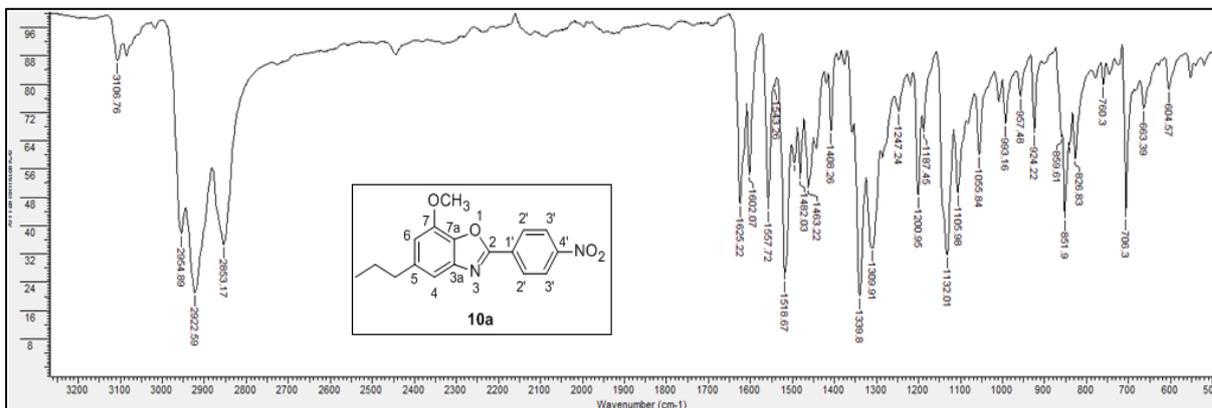
Fonte: Do autor.

APÊNDICE C – Espectro no IV da substância 9d



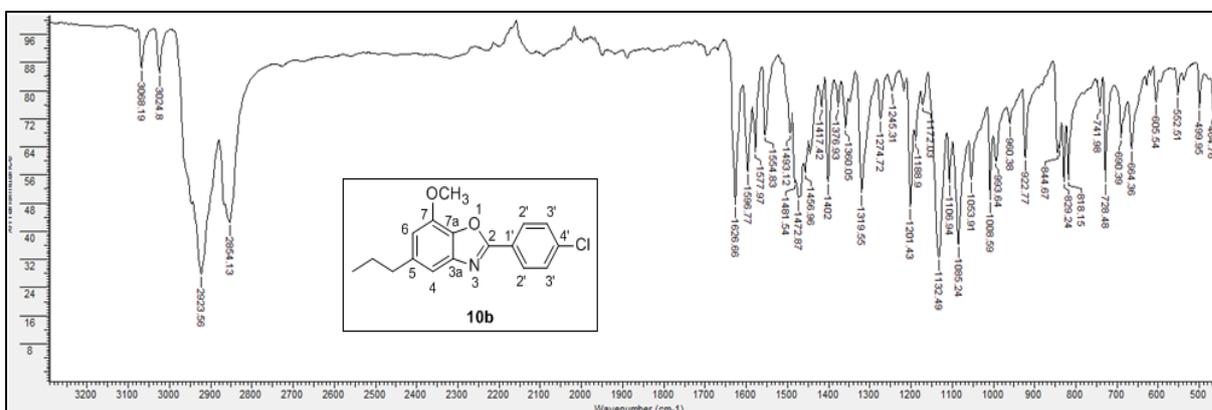
Fonte: Do autor.

APÊNDICE D – Espectro no IV da substância 10a



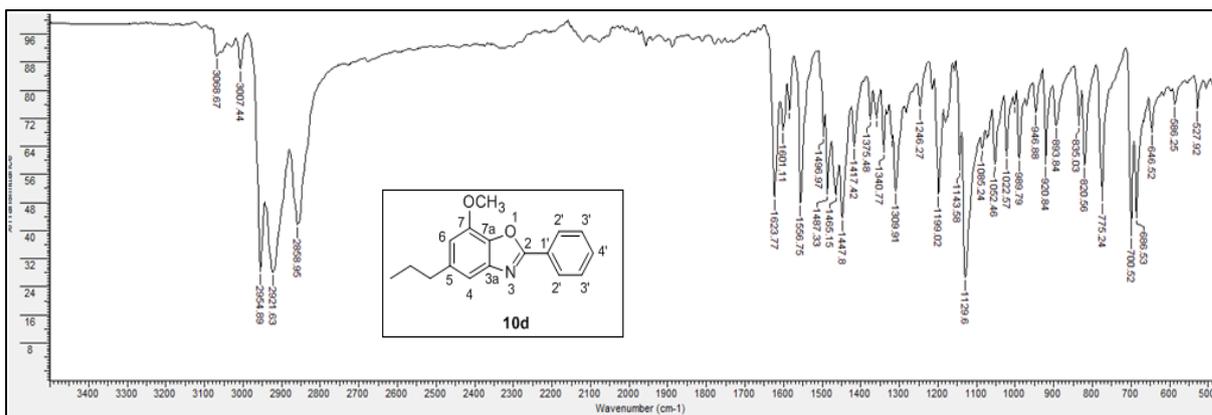
Fonte: Do autor.

APÊNDICE E – Espectro no IV da substância 10b



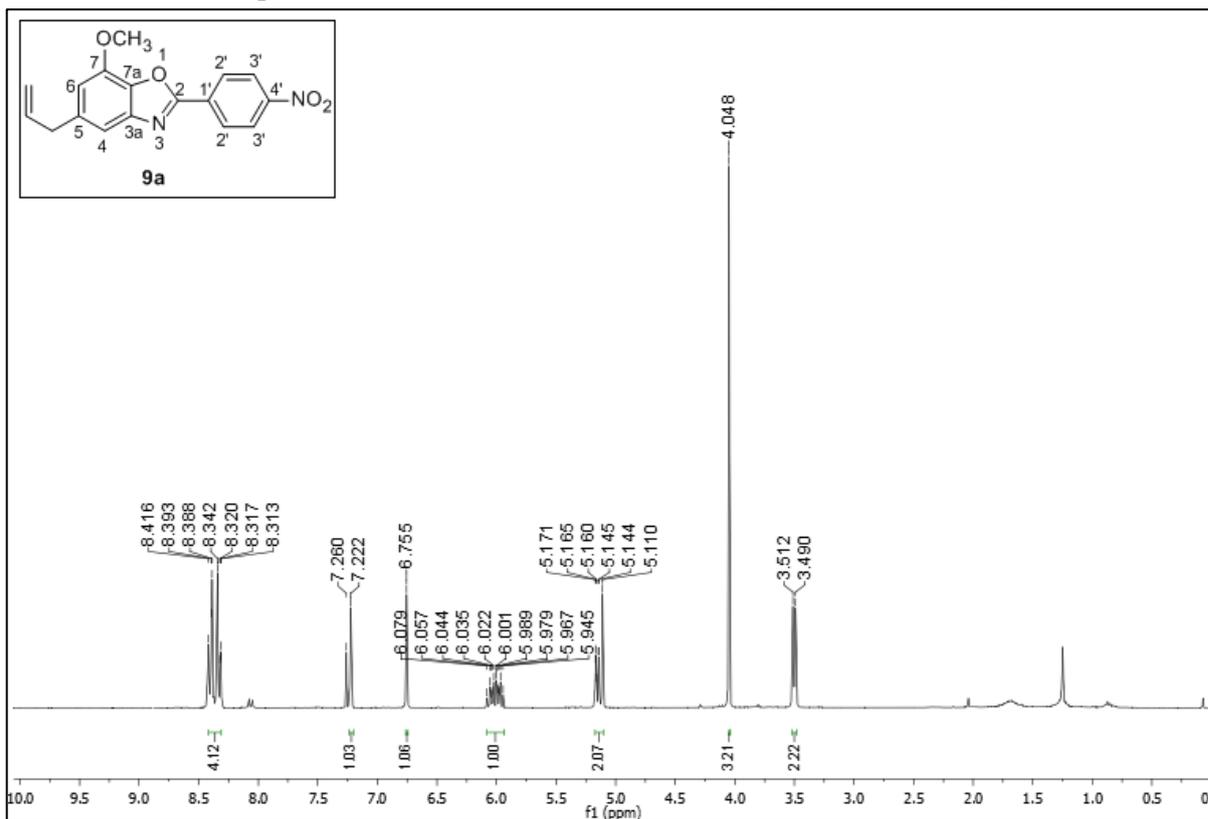
Fonte: Do autor.

APÊNDICE F – Espectro no IV da substância 10d



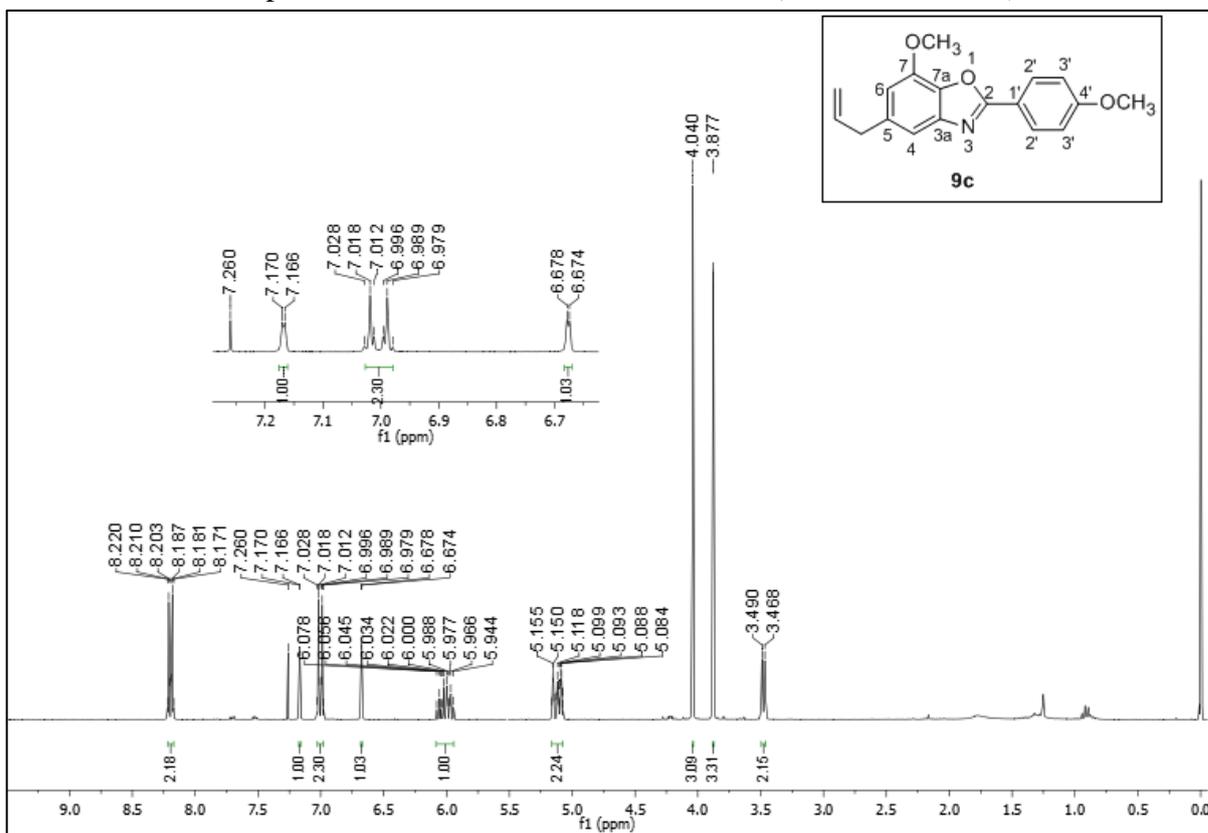
Fonte: Do autor.

APÊNDICE G – Espectro de RMN de ^1H da substância 9a (CDCl_3 , 300 MHz)



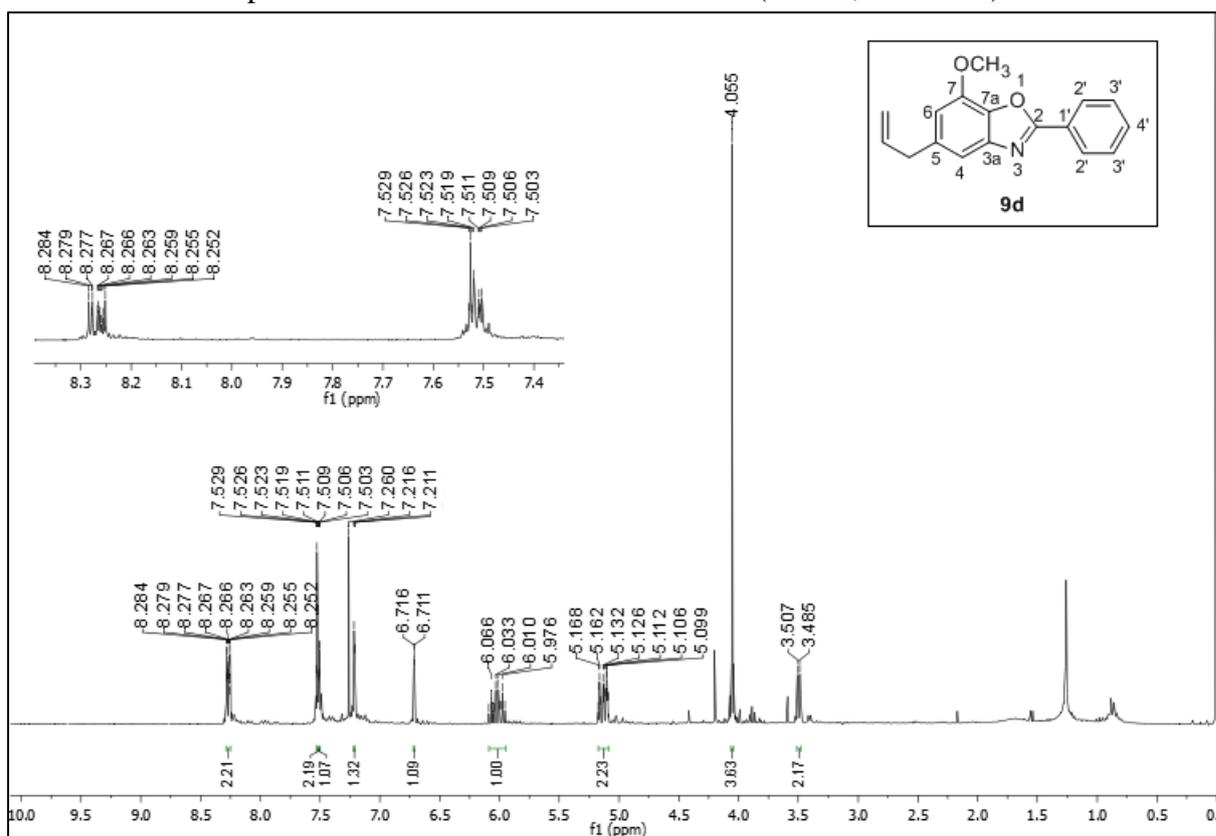
Fonte: Do autor.

APÊNDICE H – Espectro de RMN de ^1H da substância 9c (CDCl_3 , 300 MHz)



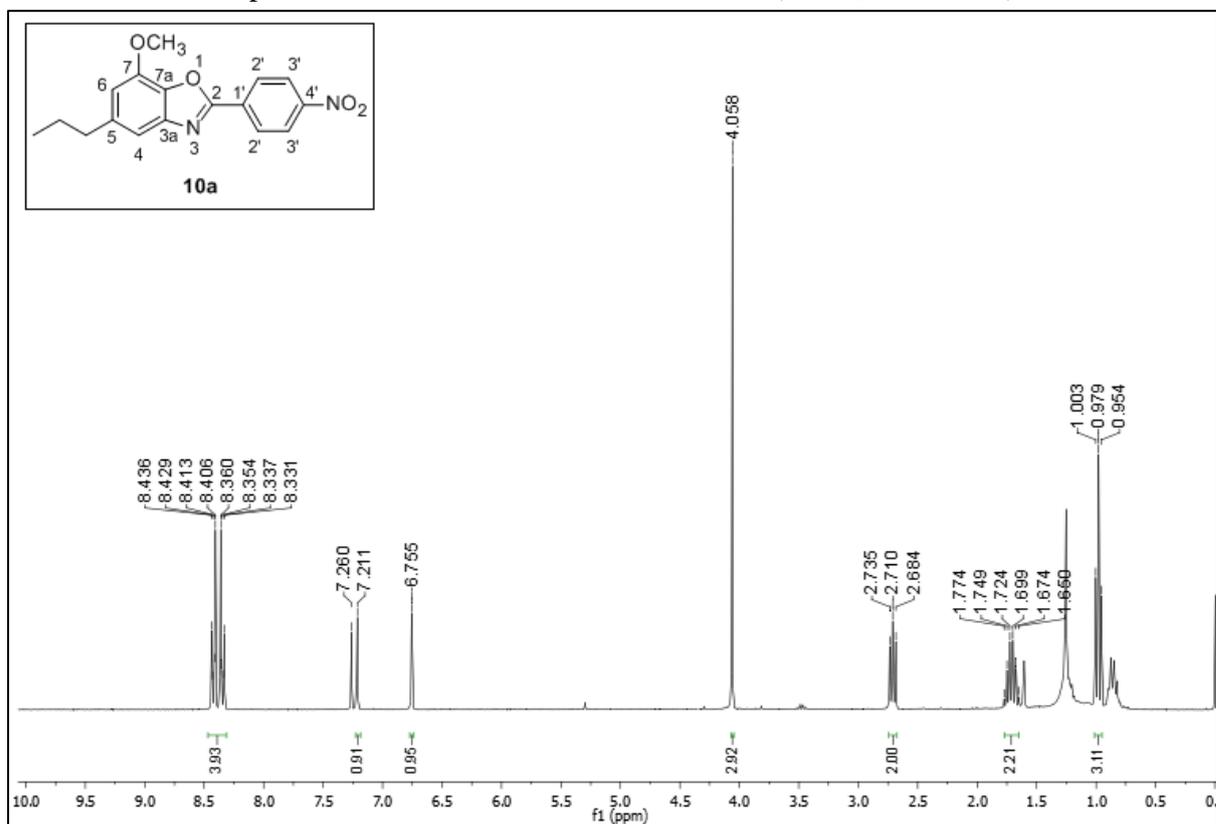
Fonte: Do autor.

APÊNDICE I – Espectro de RMN de ^1H da substância 9d (CDCl_3 , 300 MHz)



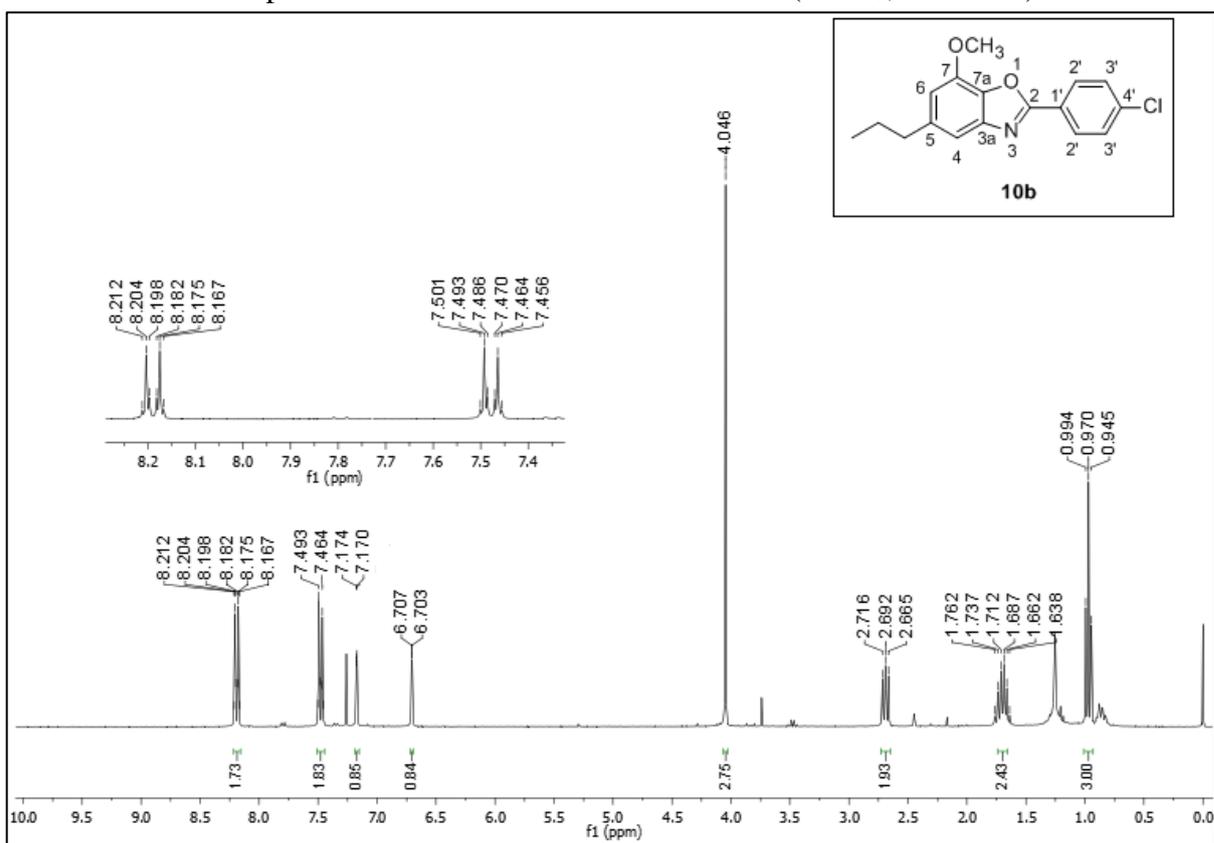
Fonte: Do autor.

APÊNDICE J – Espectro de RMN de ^1H da substância 10a (CDCl_3 , 300 MHz)



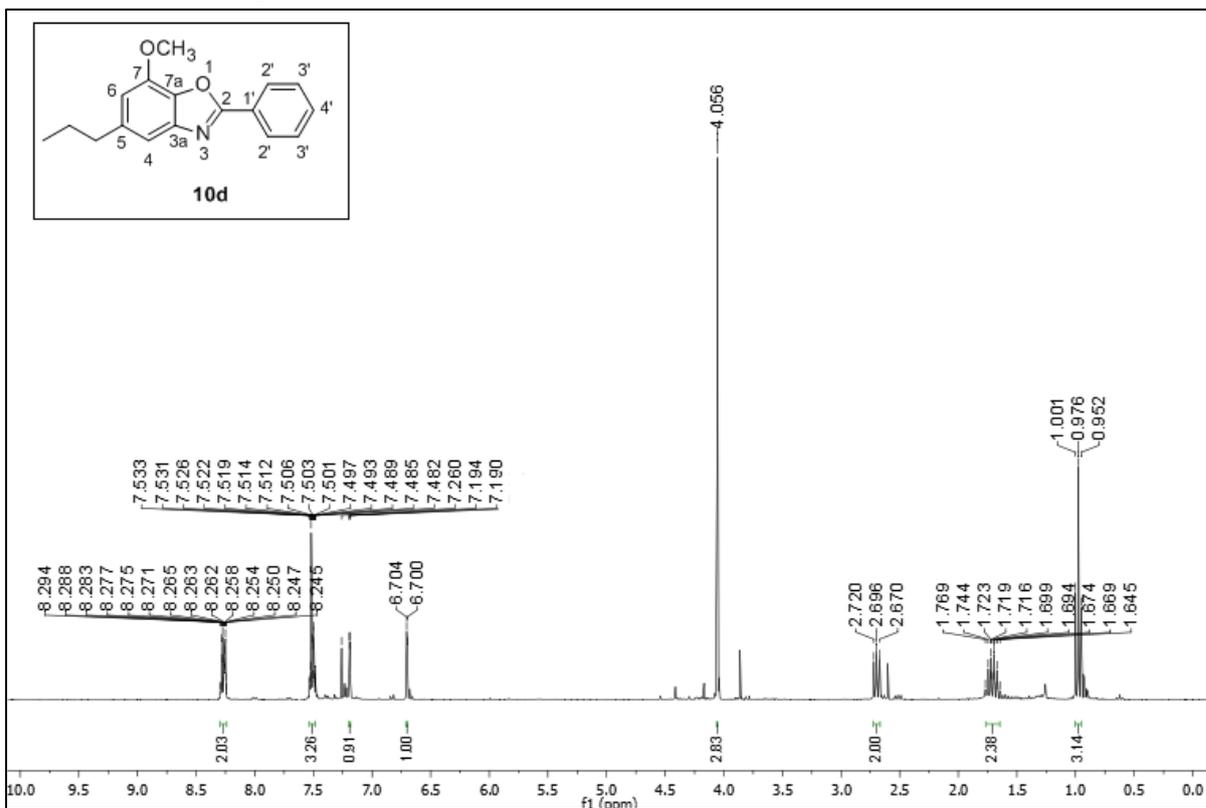
Fonte: Do autor.

APÊNDICE K – Espectro de RMN de ^1H da substância 10b (CDCl_3 , 300 MHz)



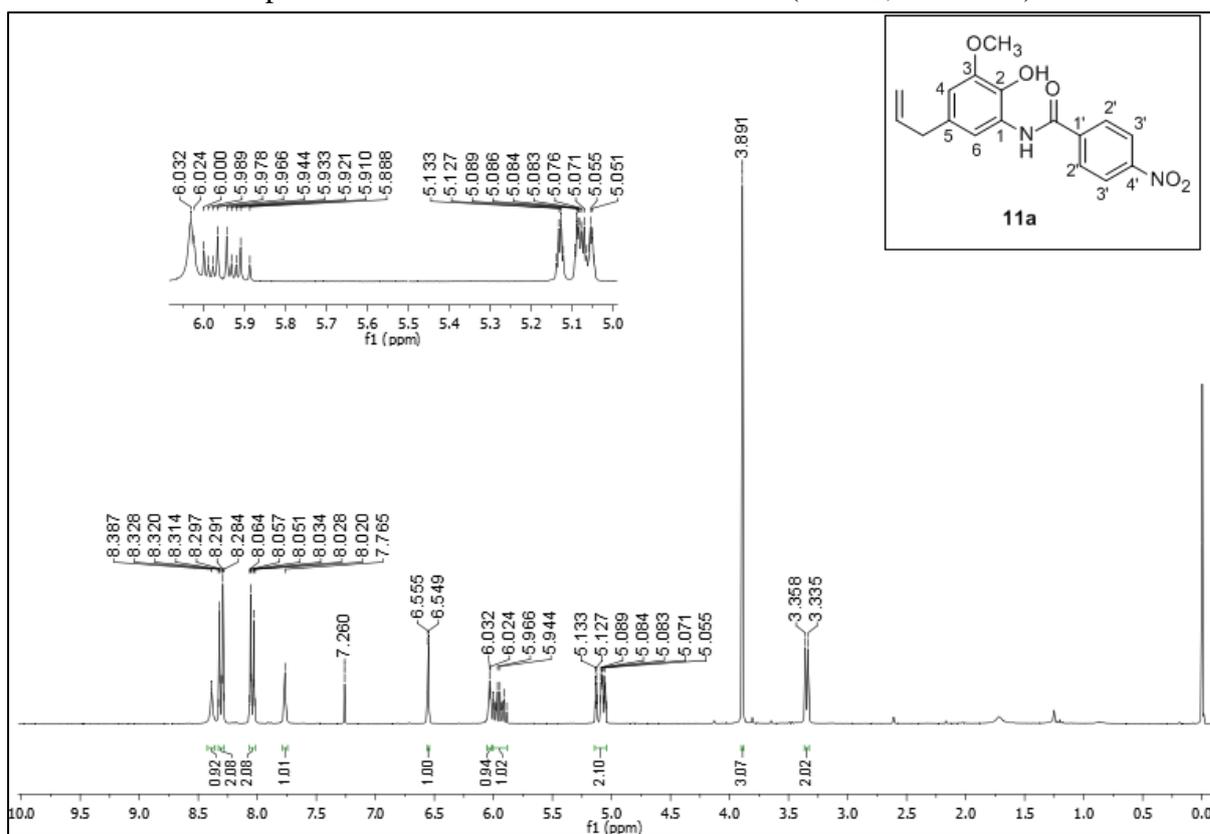
Fonte: Do autor.

APÊNDICE L – Espectro de RMN de ^1H da substância 10d (CDCl_3 , 300 MHz)



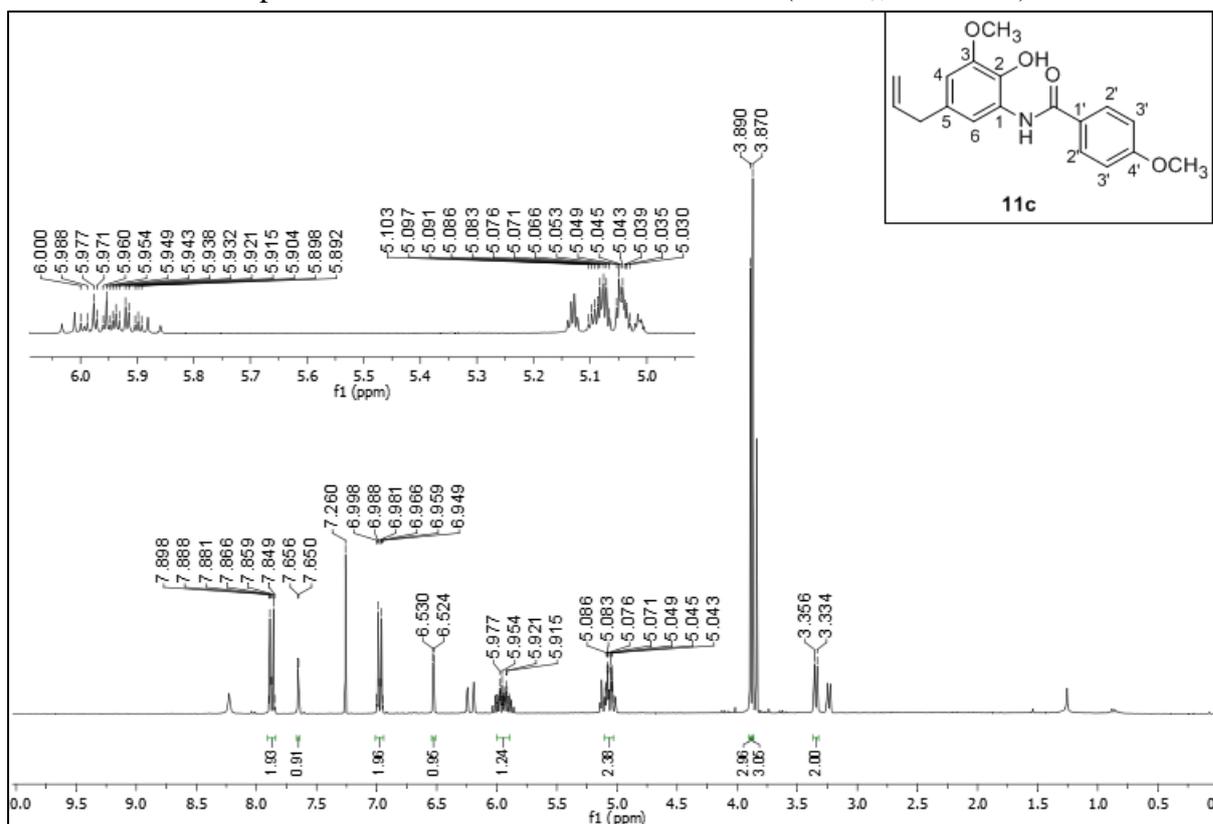
Fonte: Do autor.

APÊNDICE M – Espectro de RMN de ^1H da substância 11a (CDCl_3 , 300 MHz)



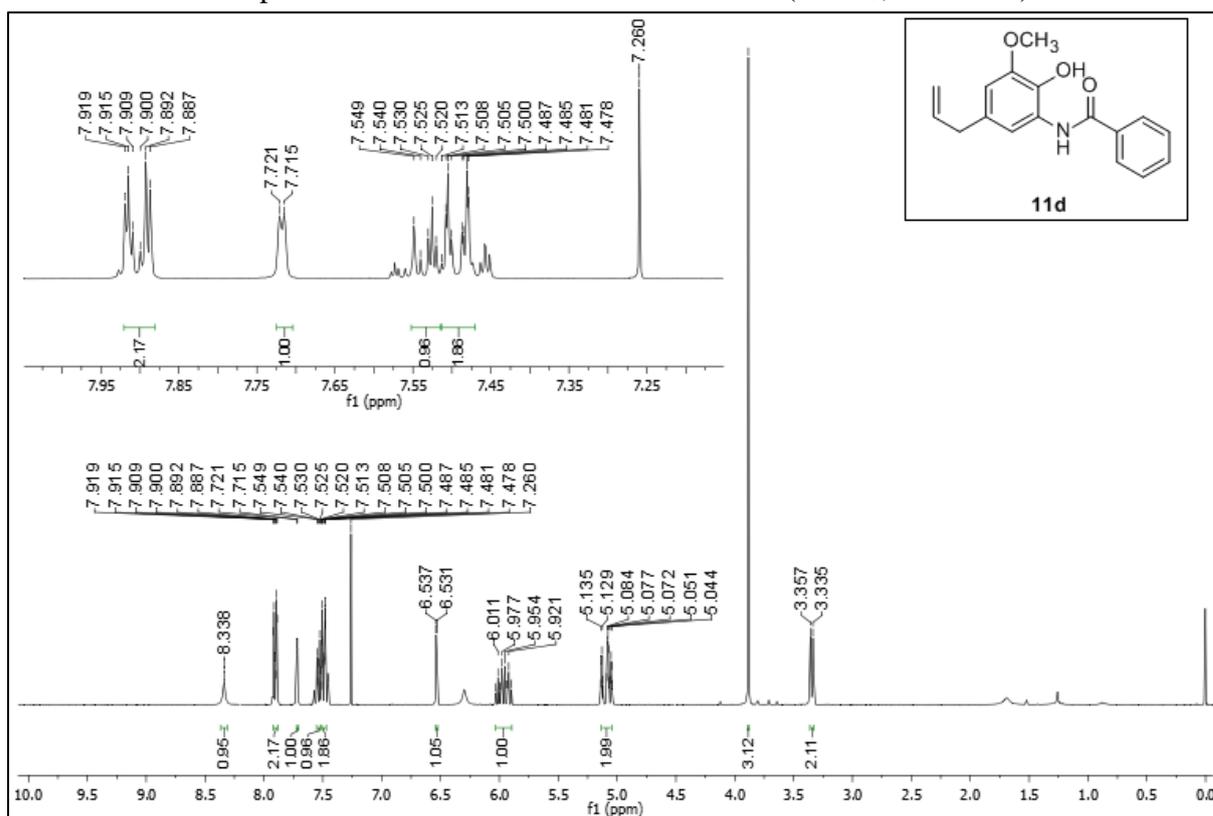
Fonte: Do autor.

APÊNDICE N – Espectro de RMN de ^1H da substância 11c (CDCl_3 , 300 MHz)



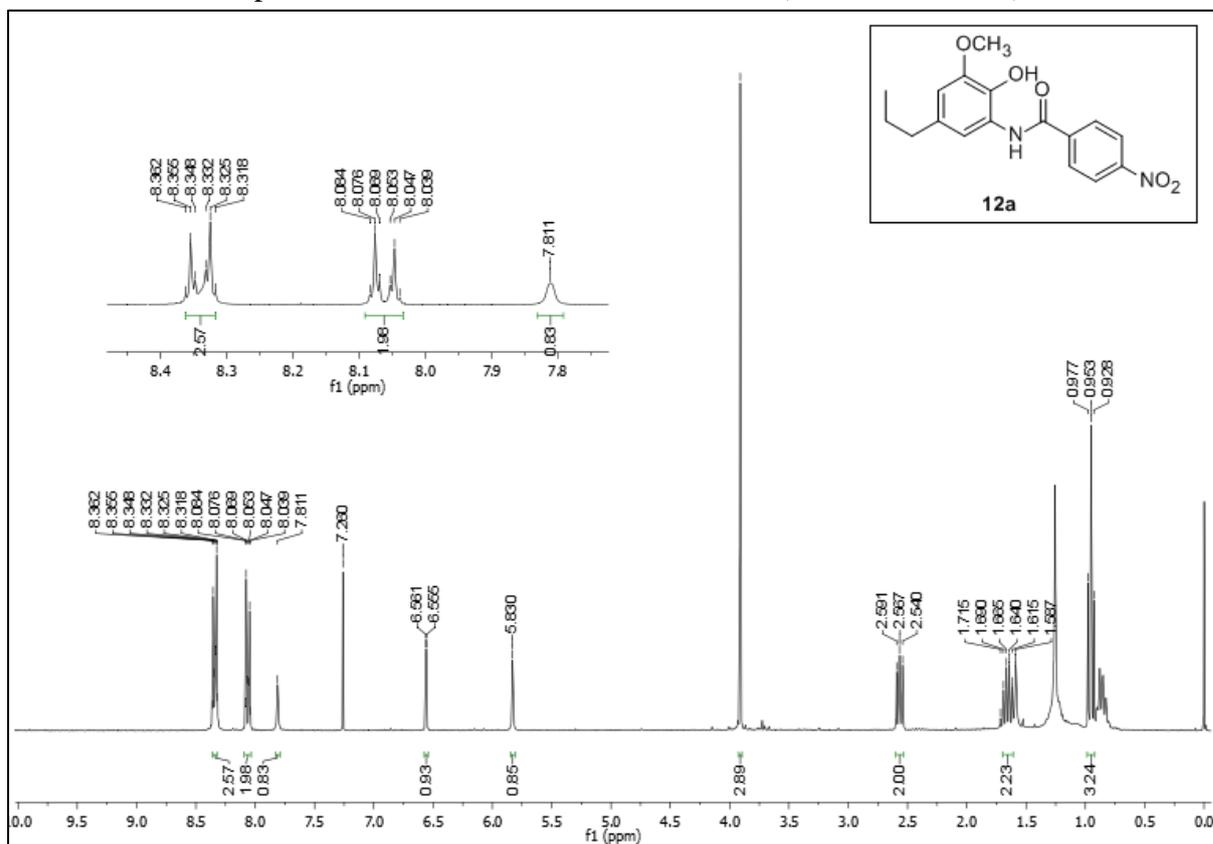
Fonte: Do autor.

APÊNDICE O – Espectro de RMN de ^1H da substância 11d (CDCl_3 , 300 MHz)



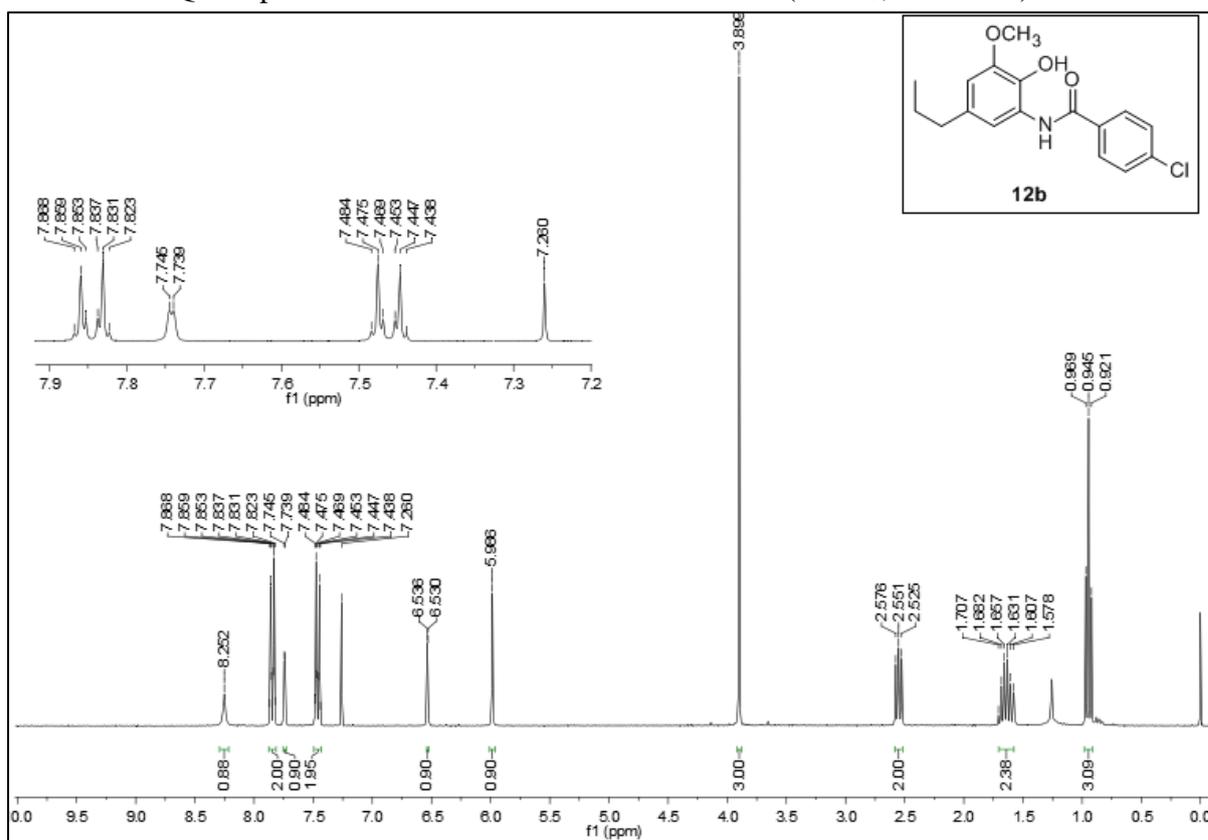
Fonte: Do autor.

APÊNDICE P – Espectro de RMN de ^1H da substância 12a (CDCl_3 , 300 MHz)



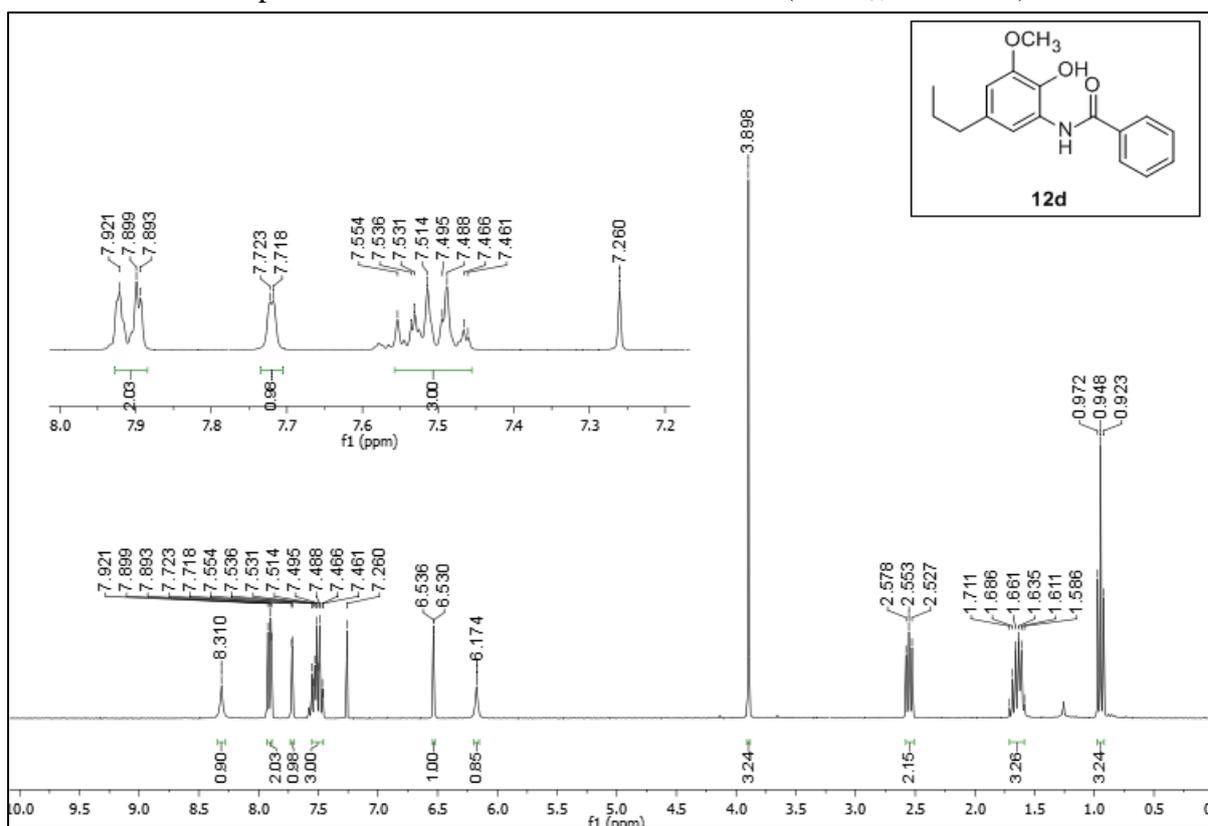
Fonte: Do autor.

APÊNDICE Q – Espectro de RMN de ^1H da substância 12b (CDCl_3 , 300 MHz)



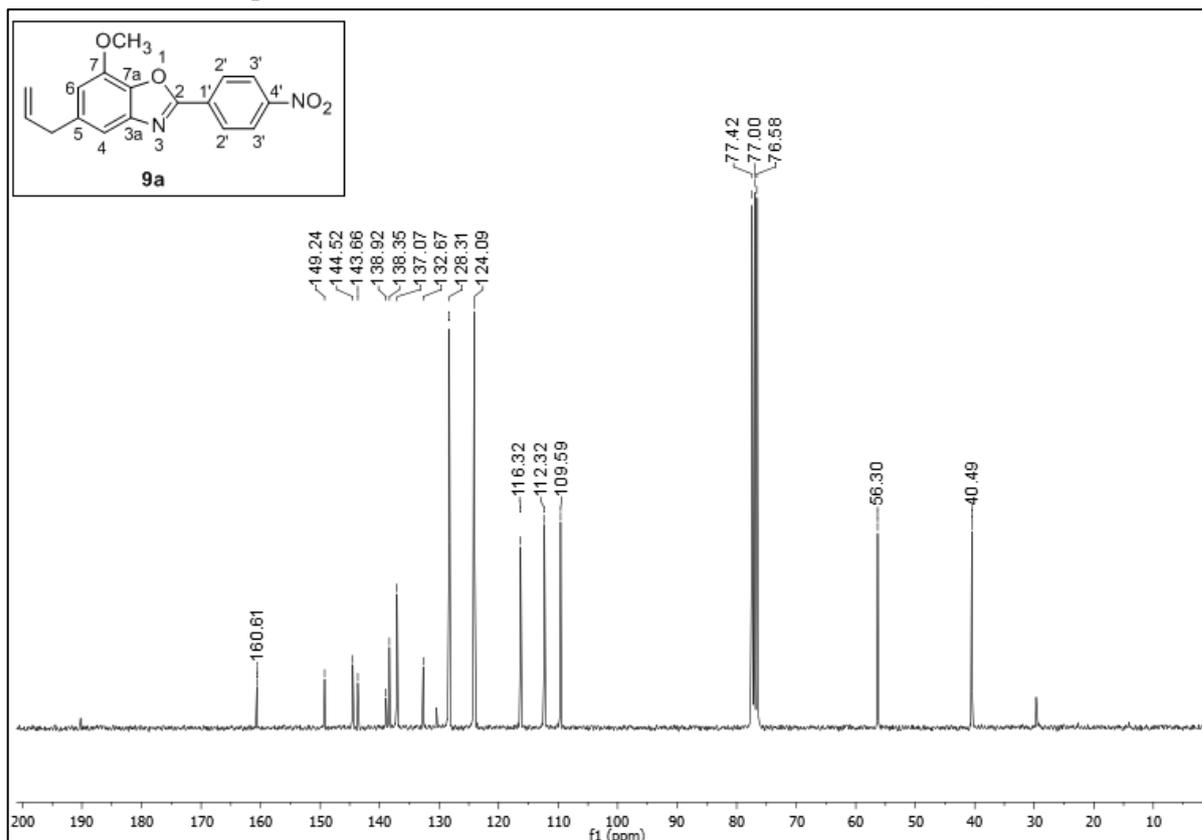
Fonte: Do autor.

APÊNDICE R – Espectro de RMN de ^1H da substância 12d (CDCl_3 , 300 MHz)



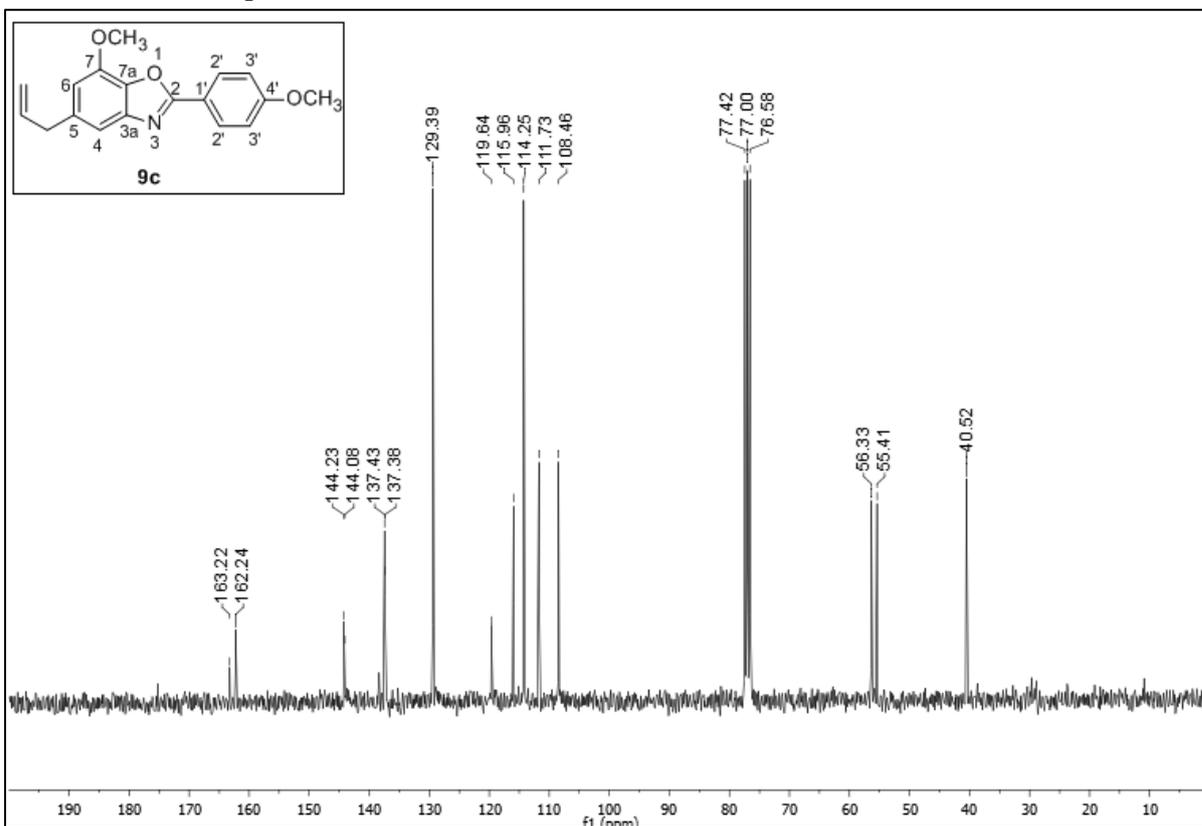
Fonte: Do autor.

APÊNDICE S – Espectro de RMN de ^{13}C da substância 9a (CDCl_3 , 75 MHz)



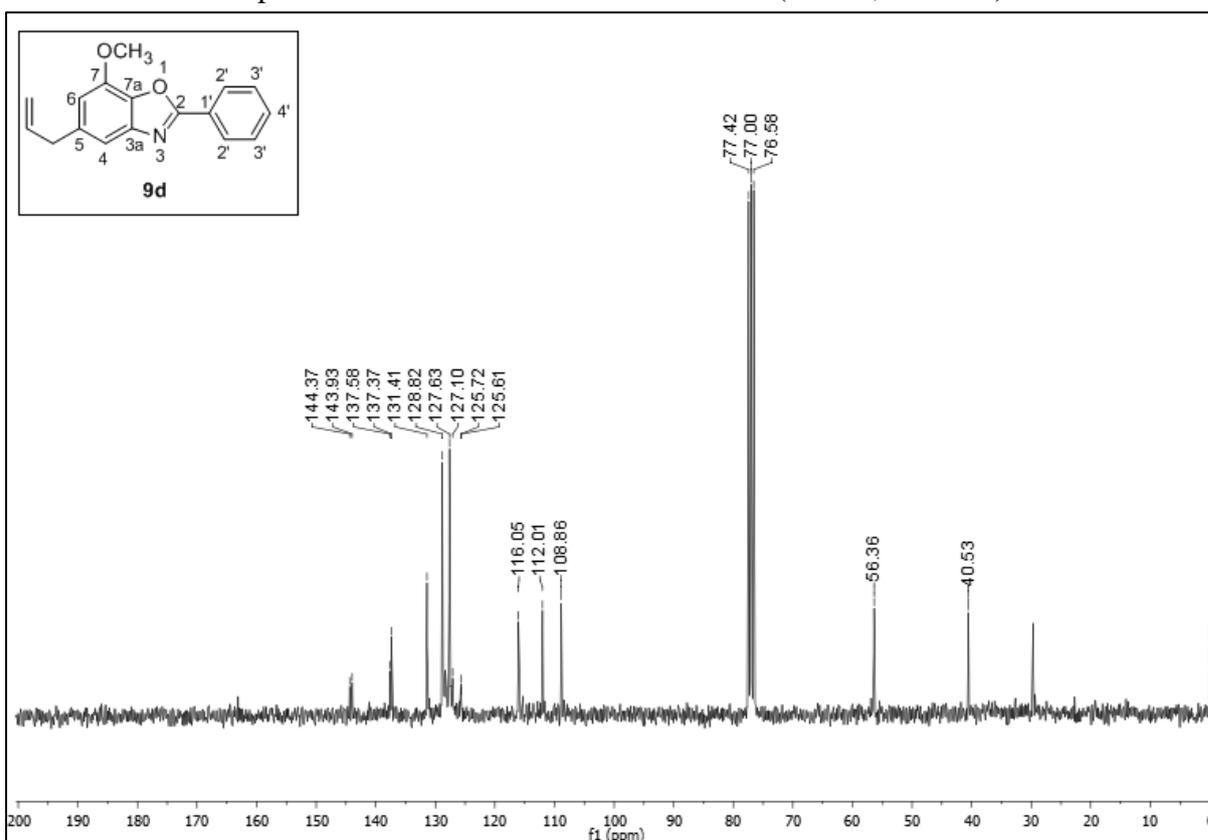
Fonte: Do autor.

APÊNDICE T – Espectro de RMN de ^{13}C da substância 9c (CDCl_3 , 75 MHz)



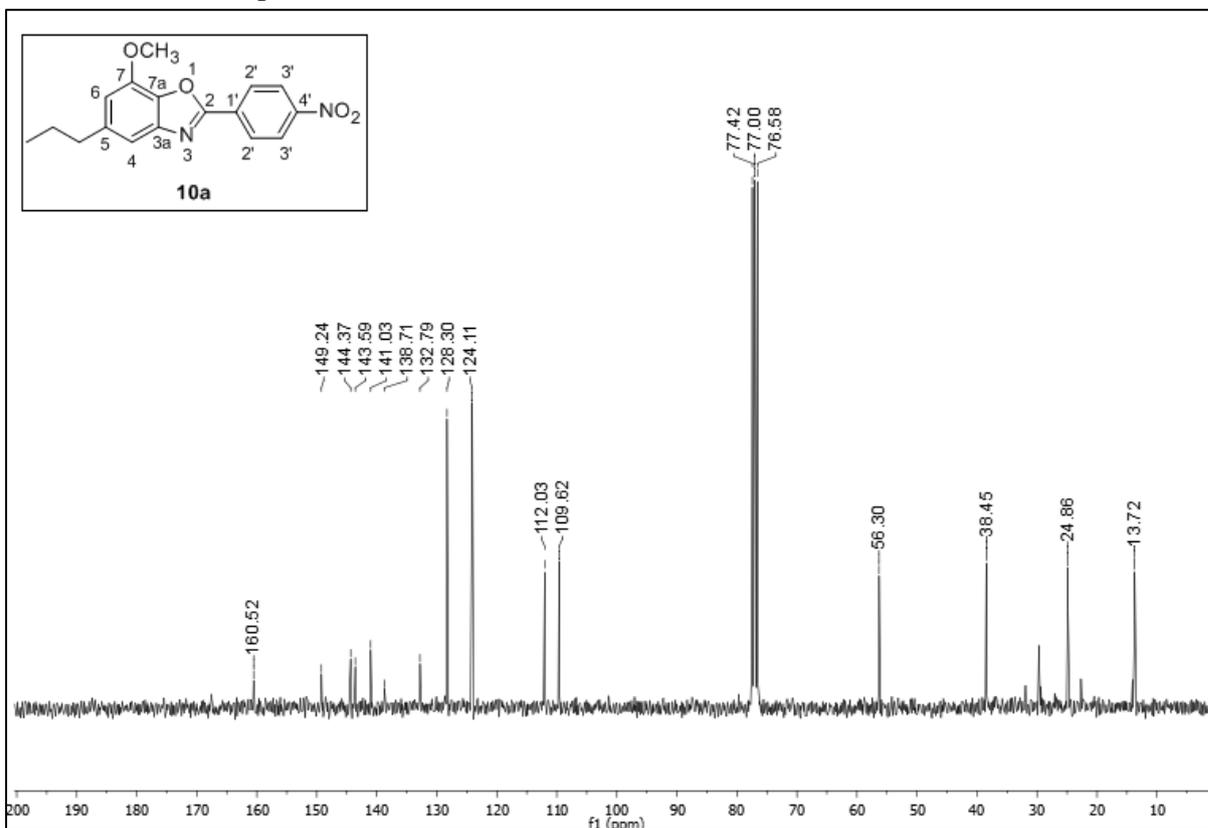
Fonte: Do autor.

APÊNDICE U – Espectro de RMN de ^{13}C da substância 9d (CDCl_3 , 75 MHz)



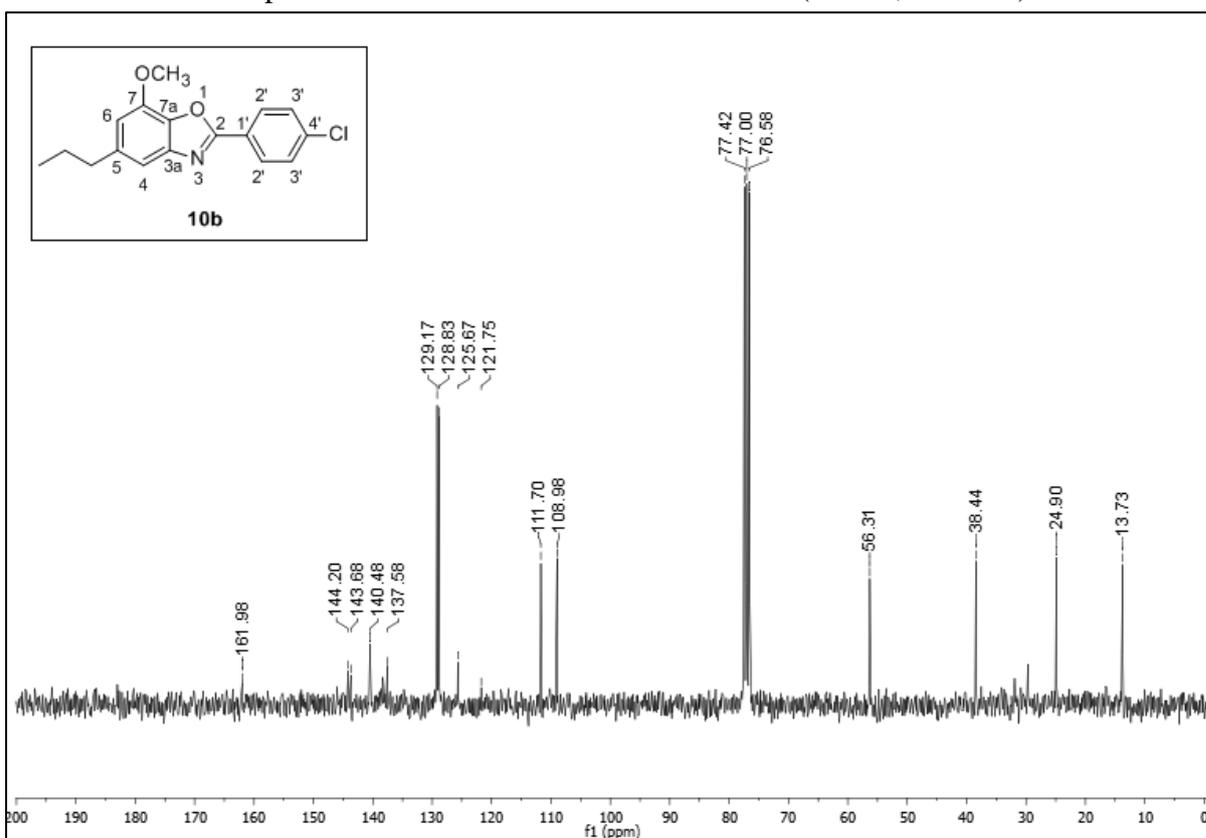
Fonte: Do autor.

APÊNDICE V – Espectro de RMN de ^{13}C da substância 10a (CDCl_3 , 75 MHz)



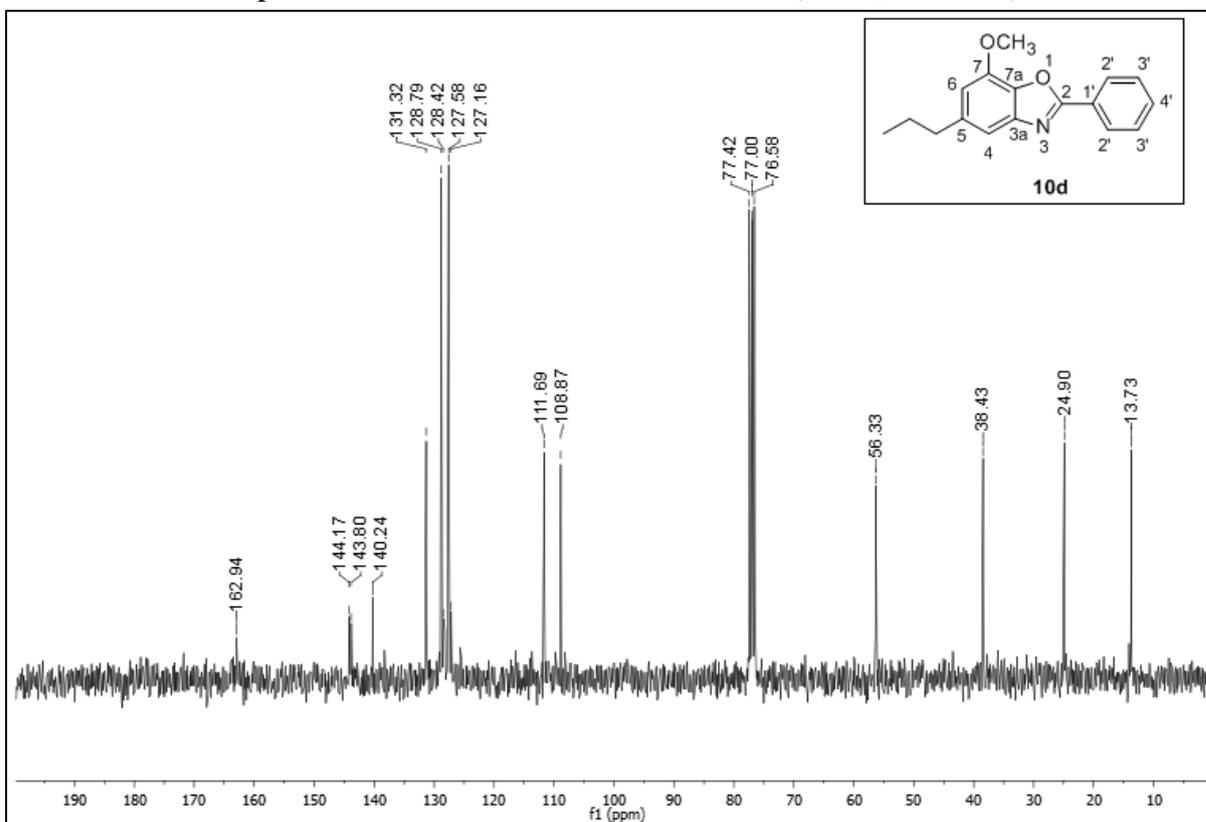
Fonte: Do autor.

APÊNDICE W – Espectro de RMN de ^{13}C da substância 10b (CDCl_3 , 75 MHz)



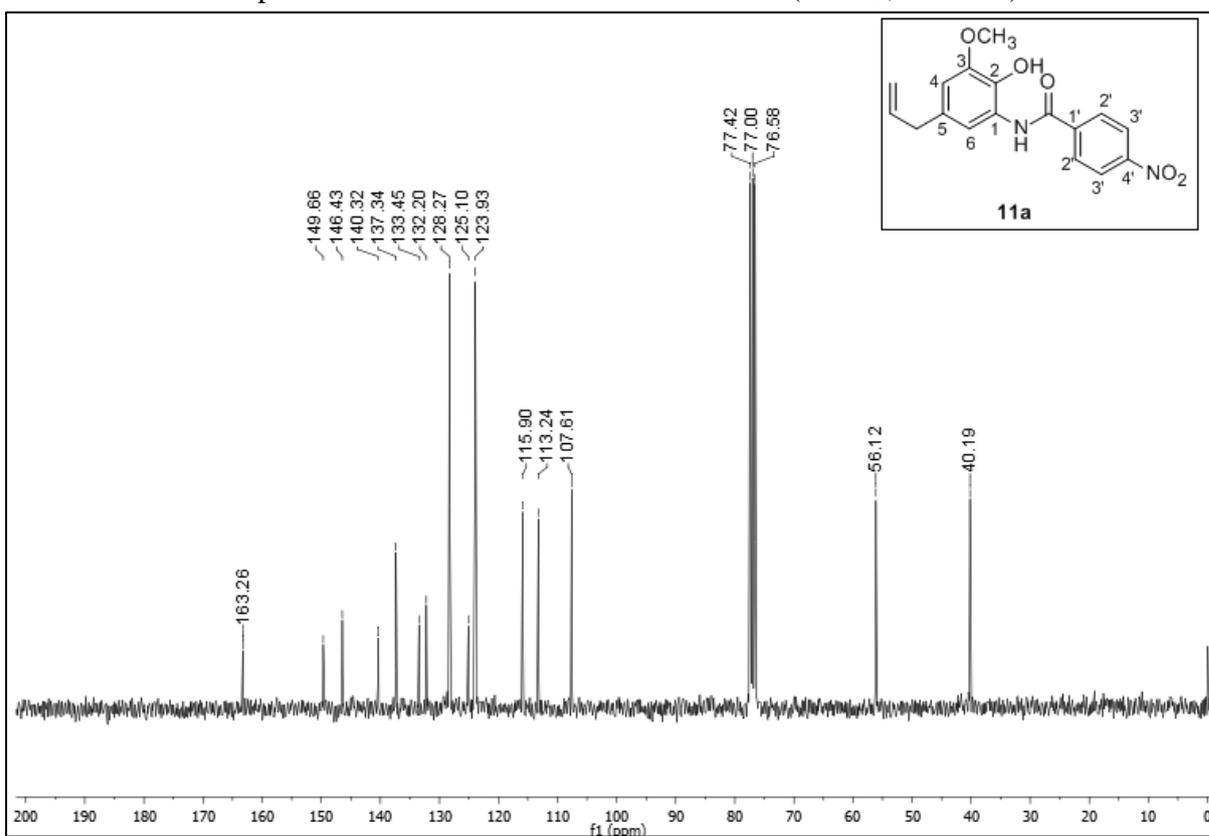
Fonte: Do autor.

APÊNDICE X – Espectro de RMN de ^{13}C da substância 10d (CDCl_3 , 75 MHz)



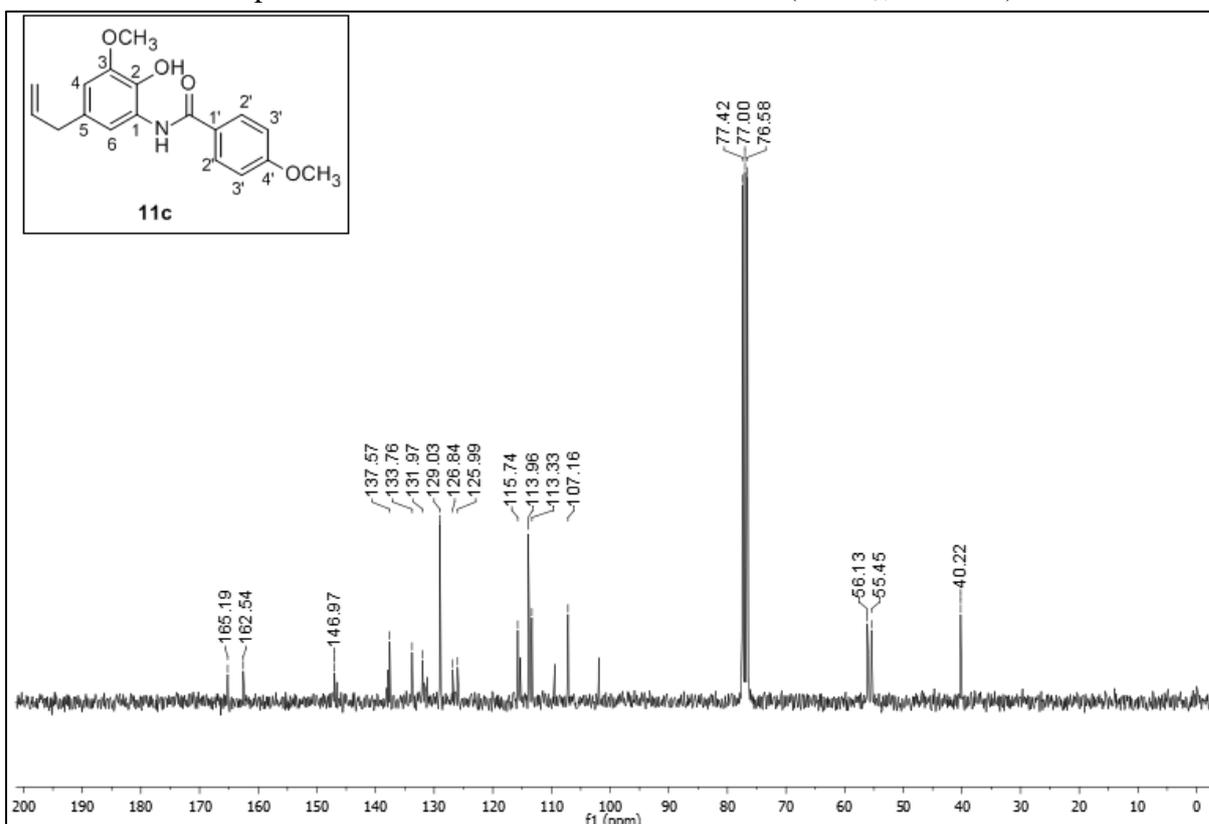
Fonte: Do autor.

APÊNDICE Y – Espectro de RMN de ^{13}C da substância 11a (CDCl_3 , 75 MHz)



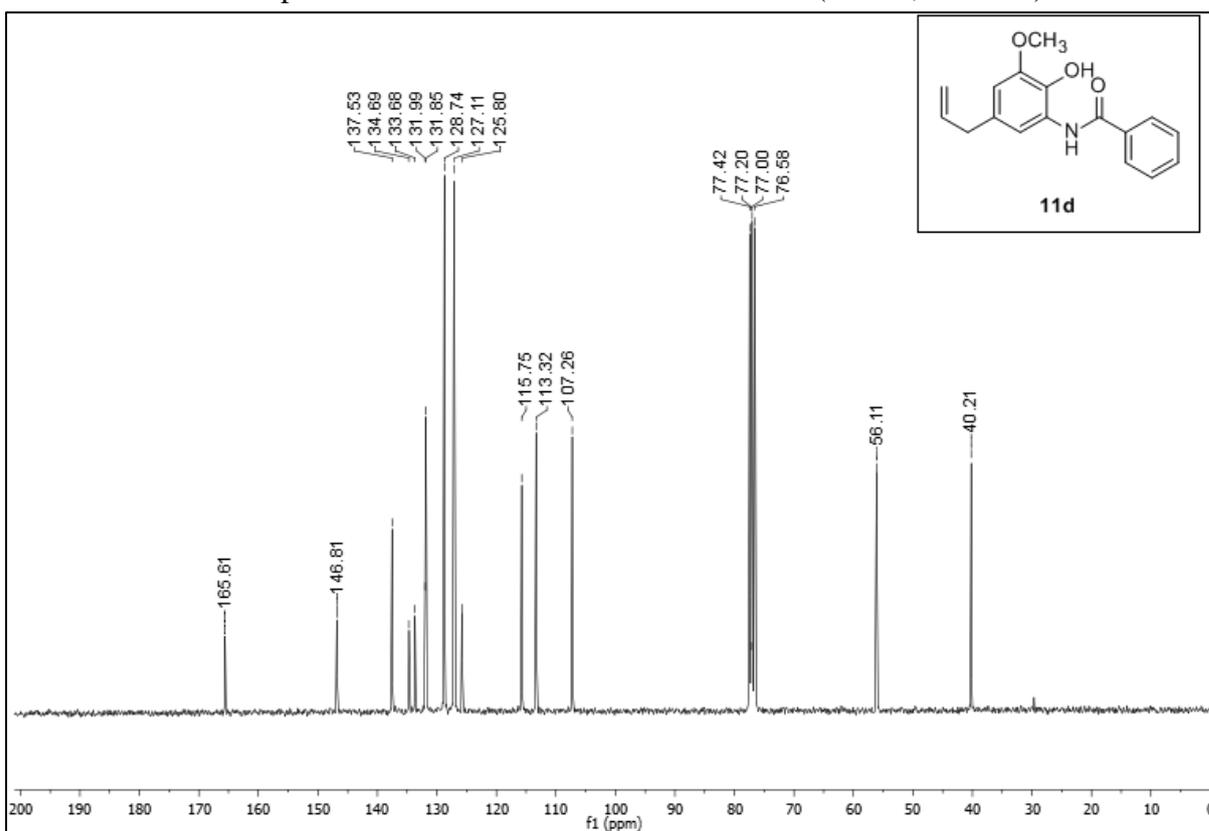
Fonte: Do autor.

APÊNDICE Z – Espectro de RMN de ^{13}C da substância 11c (CDCl_3 , 75 MHz)



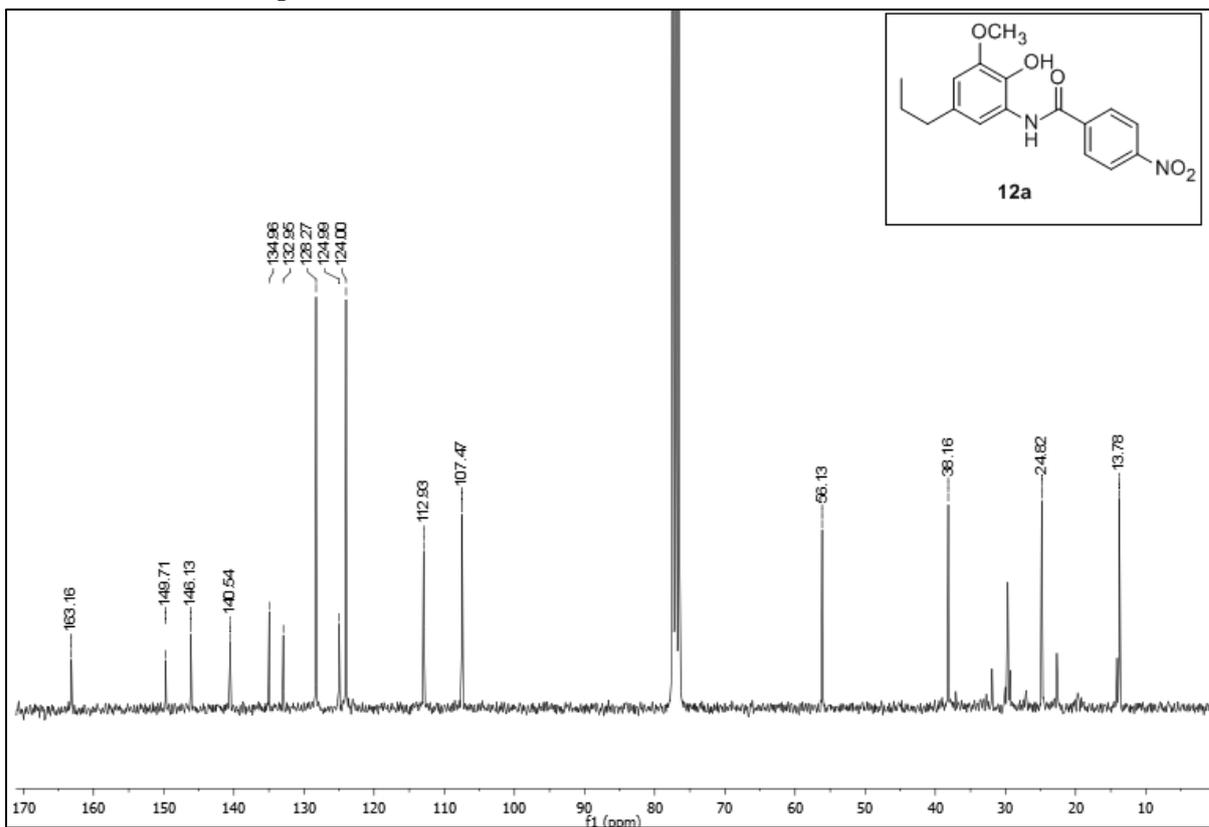
Fonte: Do autor.

APÊNDICE AA – Espectro de RMN de ^{13}C da substância 11d (CDCl_3 , 75 MHz)



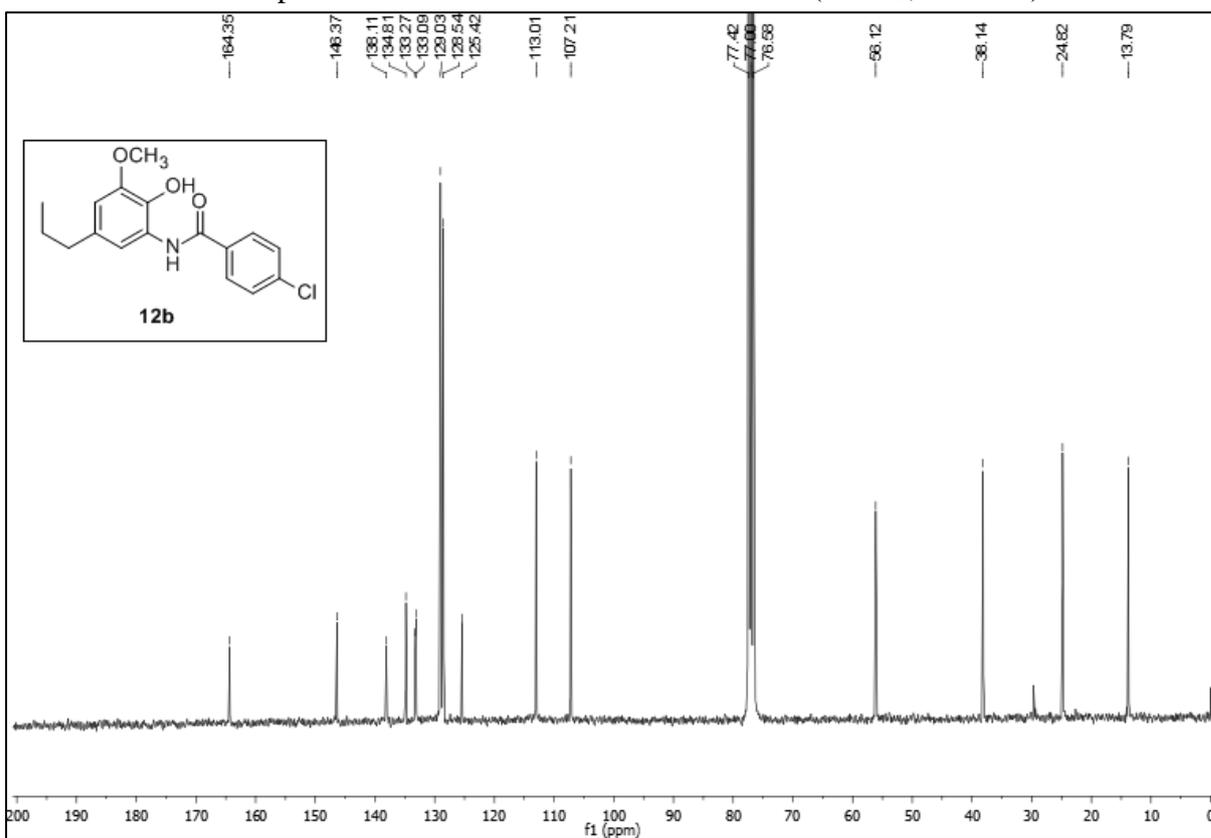
Fonte: Do autor.

APÊNDICE BB – Espectro de RMN de ^{13}C da substância 12a (CDCl_3 , 75 MHz)



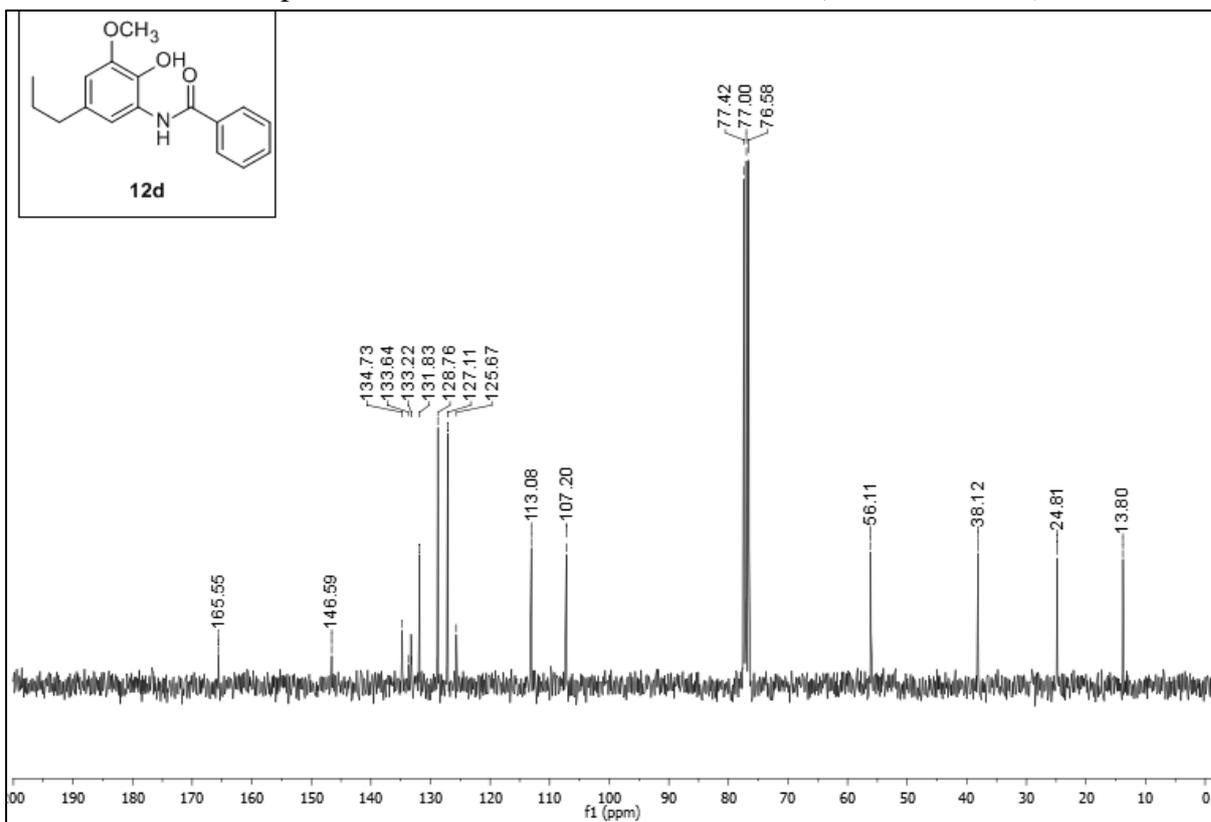
Fonte: Do autor.

APÊNDICE CC – Espectro de RMN de ^{13}C da substância 12b (CDCl_3 , 75 MHz)



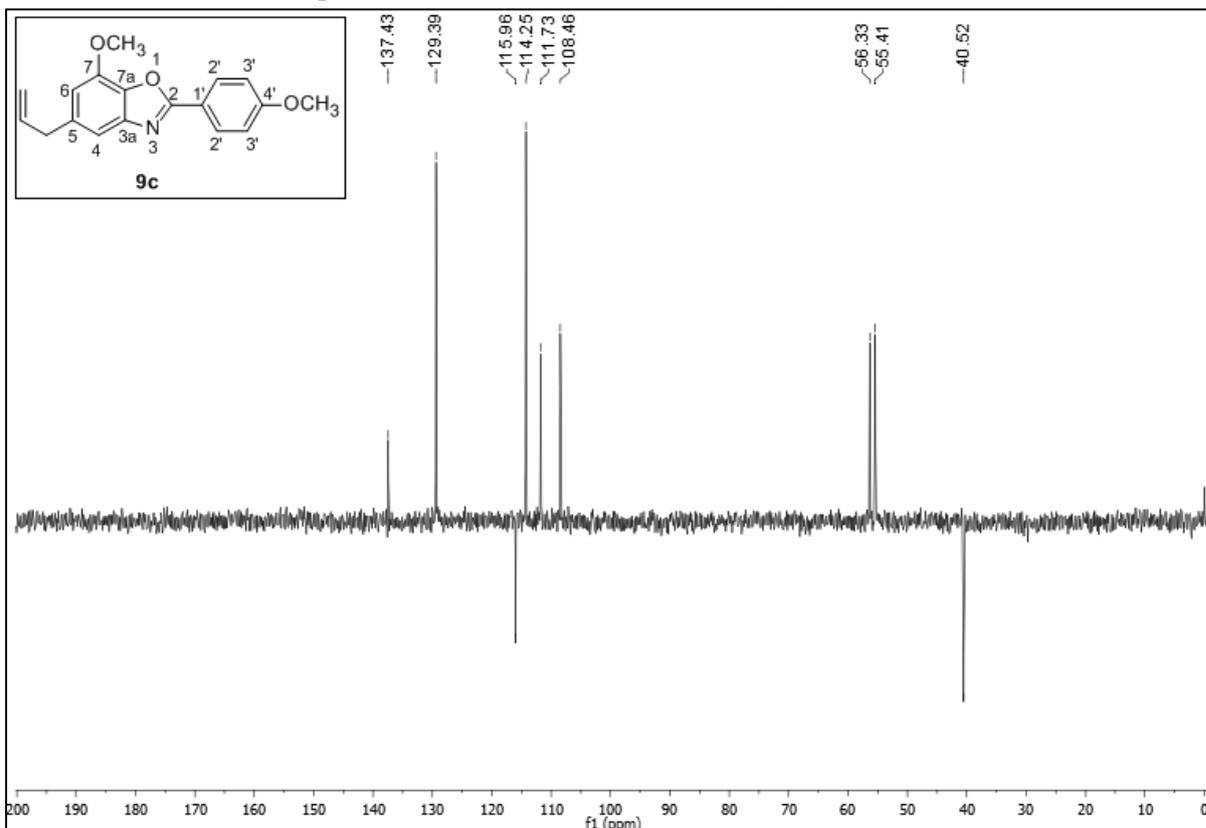
Fonte: Do autor.

APÊNDICE DD – Espectro de RMN de ^{13}C da substância 12d (CDCl_3 , 75 MHz)



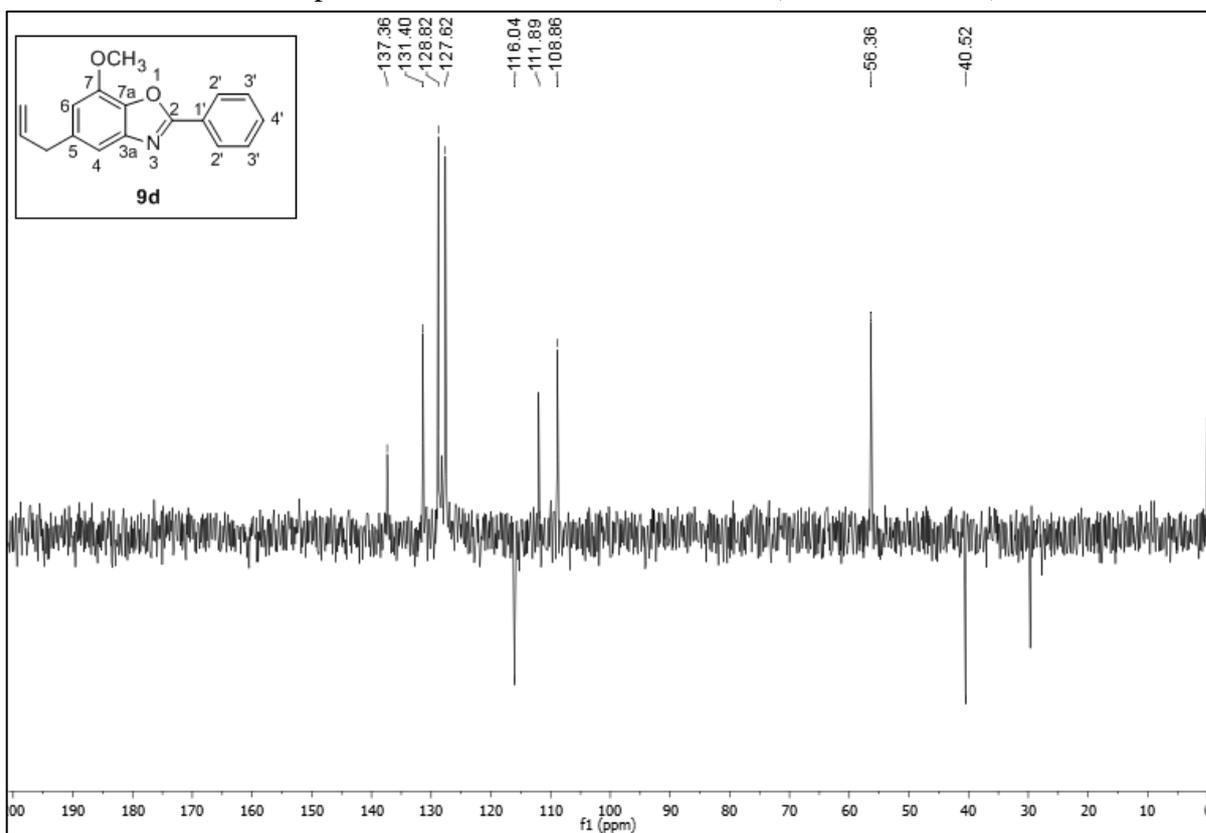
Fonte: Do autor.

APÊNDICE EE – Subespectro DEPT-135 da substância 9c (CDCl₃, 75 MHz)



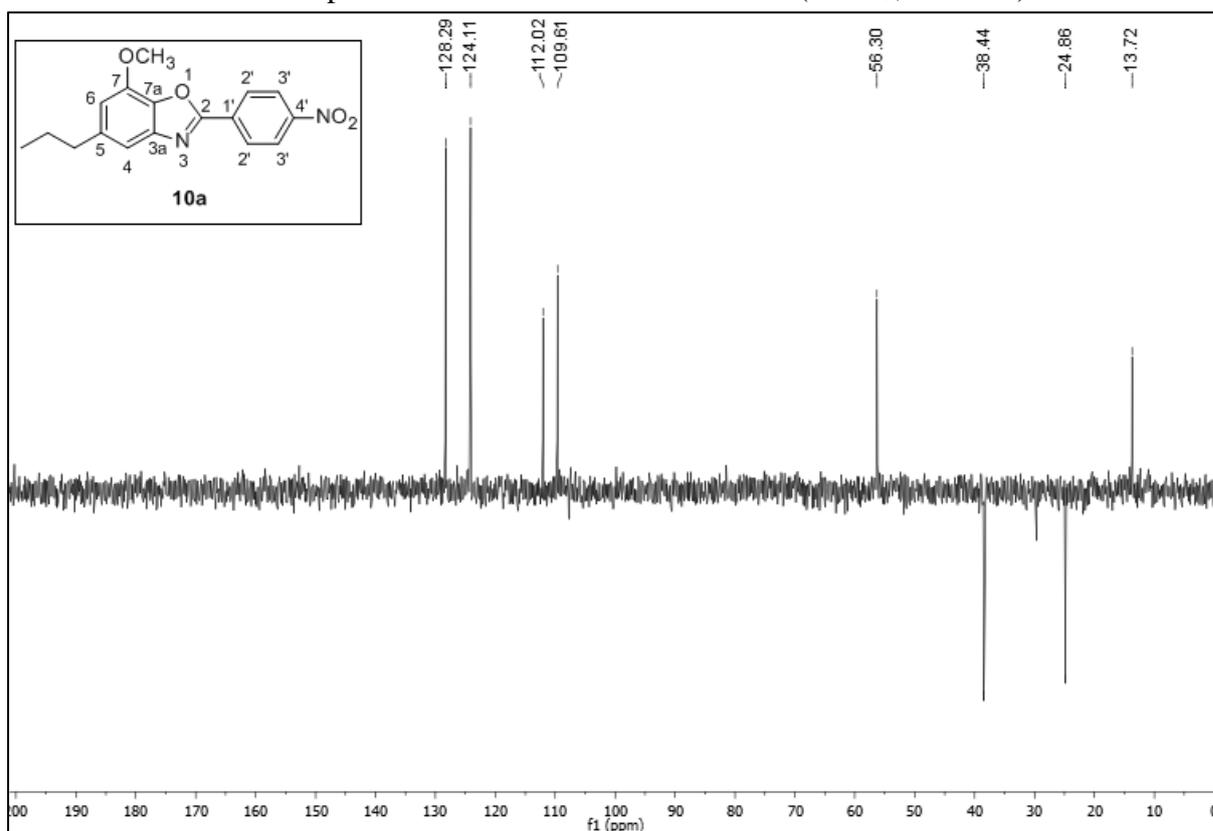
Fonte: Do autor.

APÊNDICE FF – Subespectro DEPT-135 da substância 9d (CDCl₃, 75 MHz)



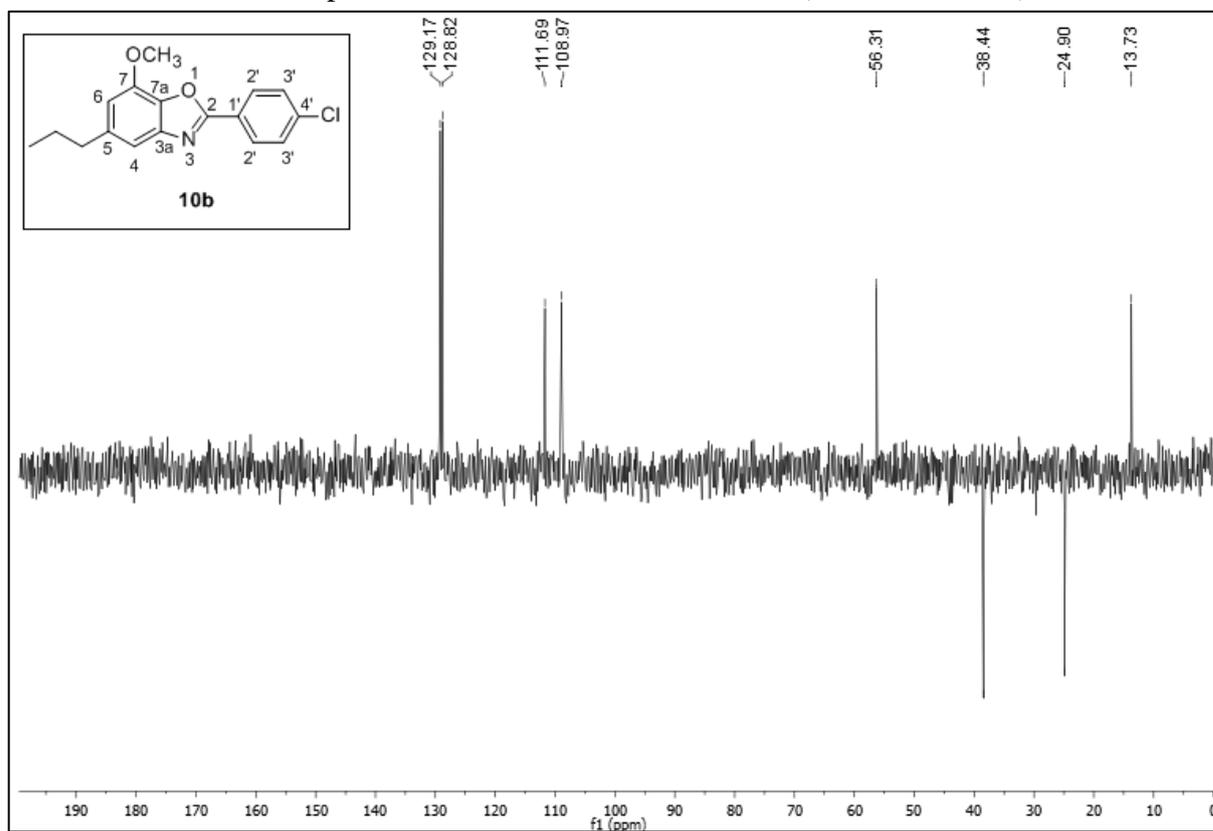
Fonte: Do autor.

APÊNDICE GG – Subespectro DEPT-135 da substância 10a (CDCl₃, 75 MHz)



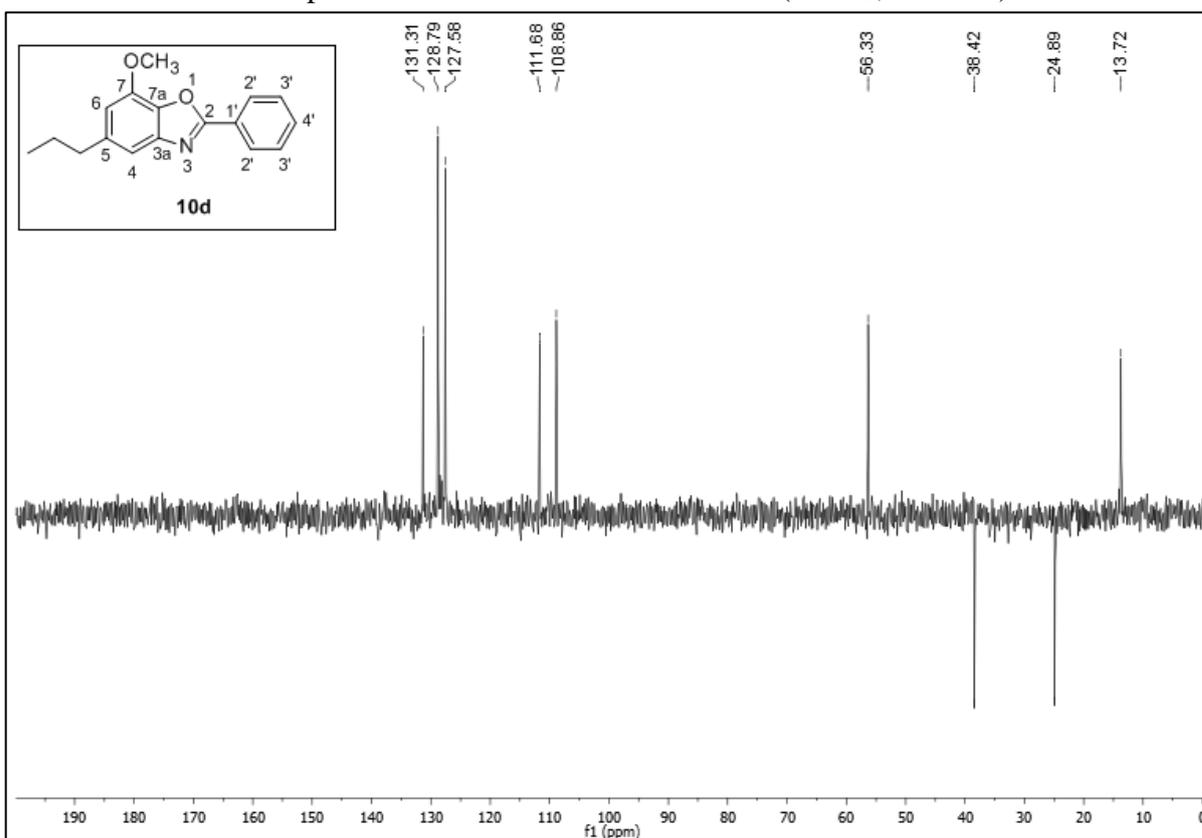
Fonte: Do autor.

APÊNDICE HH – Subespectro DEPT-135 da substância 10b (CDCl₃, 75 MHz)



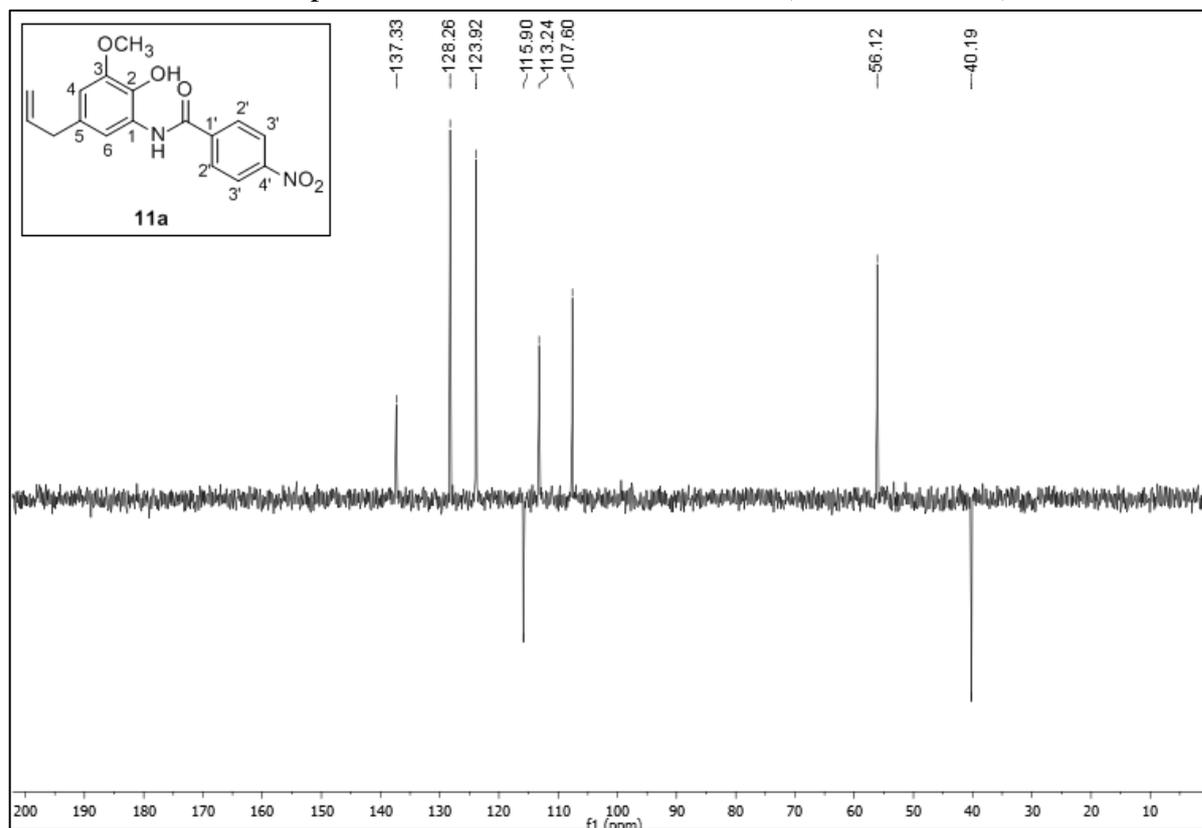
Fonte: Do autor.

APÊNDICE II – Subespectro DEPT-135 da substância 10d (CDCl₃, 75 MHz)



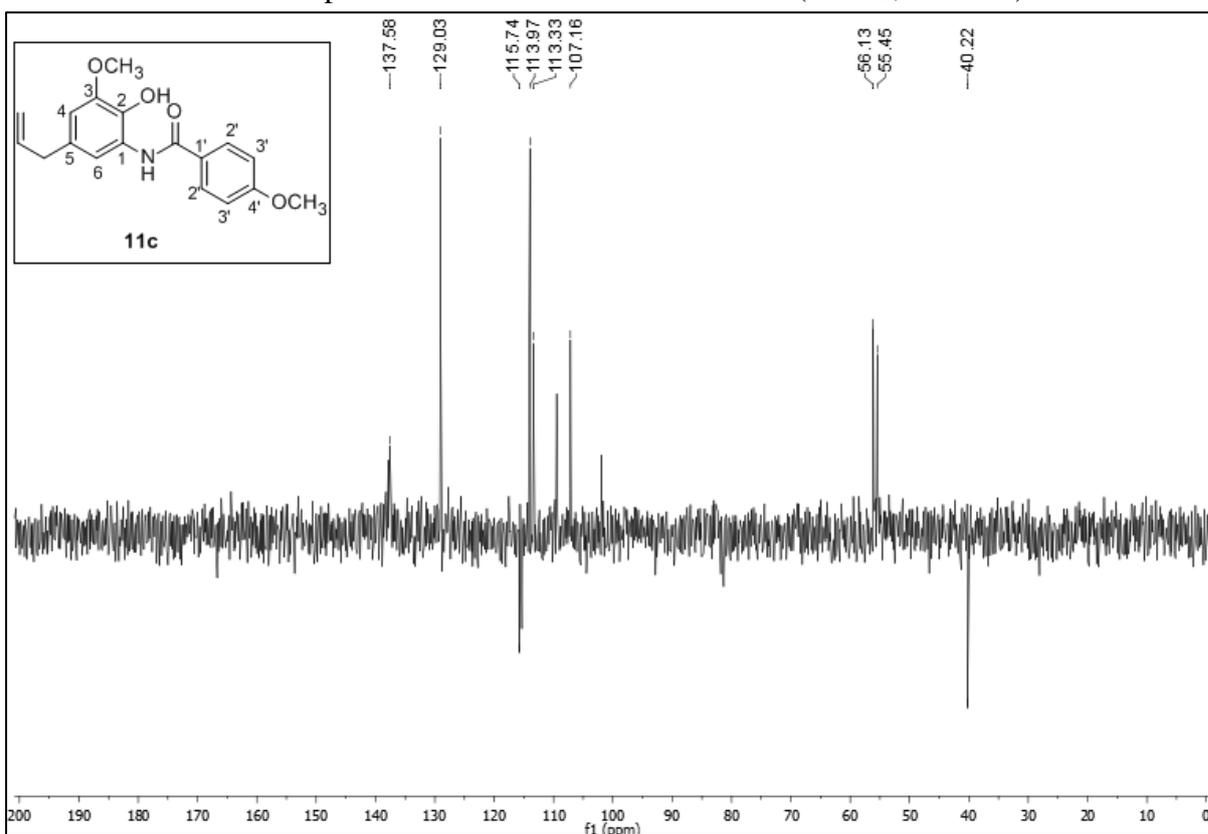
Fonte: Do autor.

APÊNDICE JJ – Subespectro DEPT-135 da substância 11a (CDCl₃, 75 MHz)



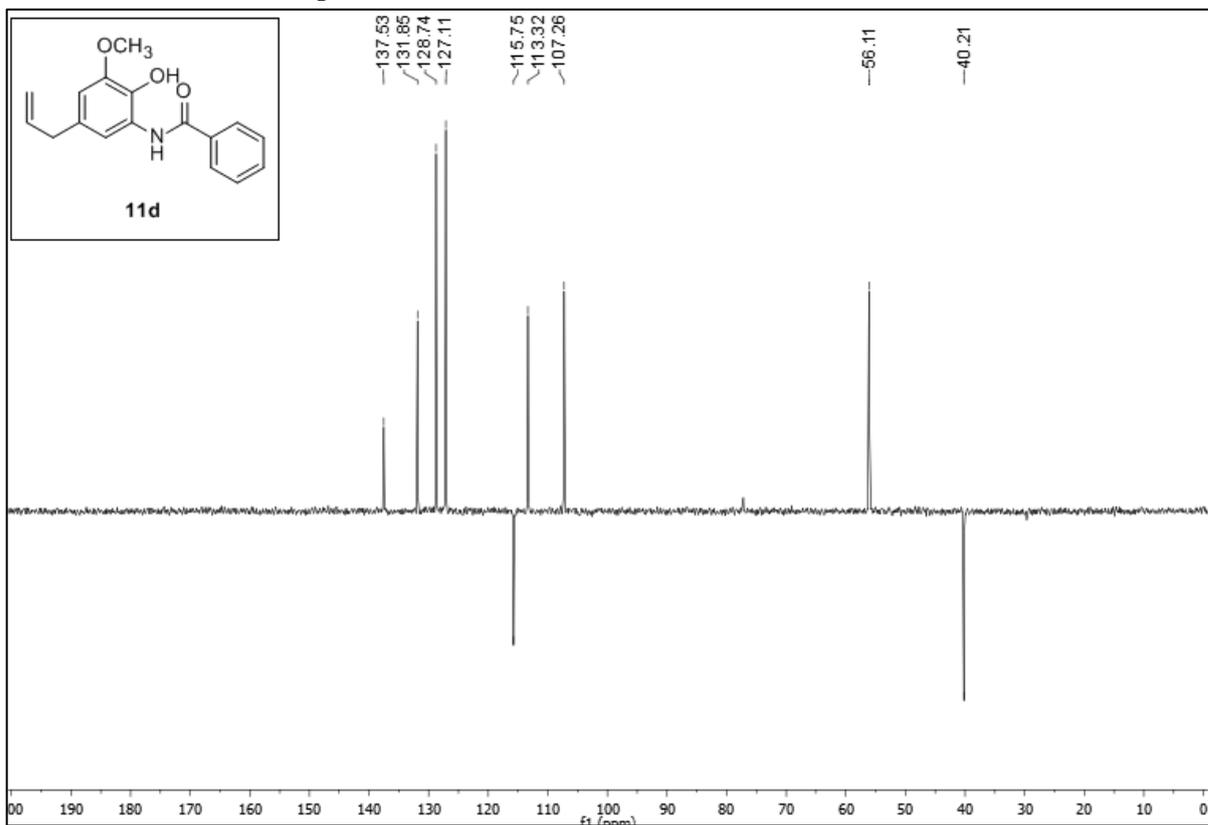
Fonte: Do autor.

APÊNDICE KK – Subespectro DEPT-135 da substância 11c (CDCl₃, 75 MHz)

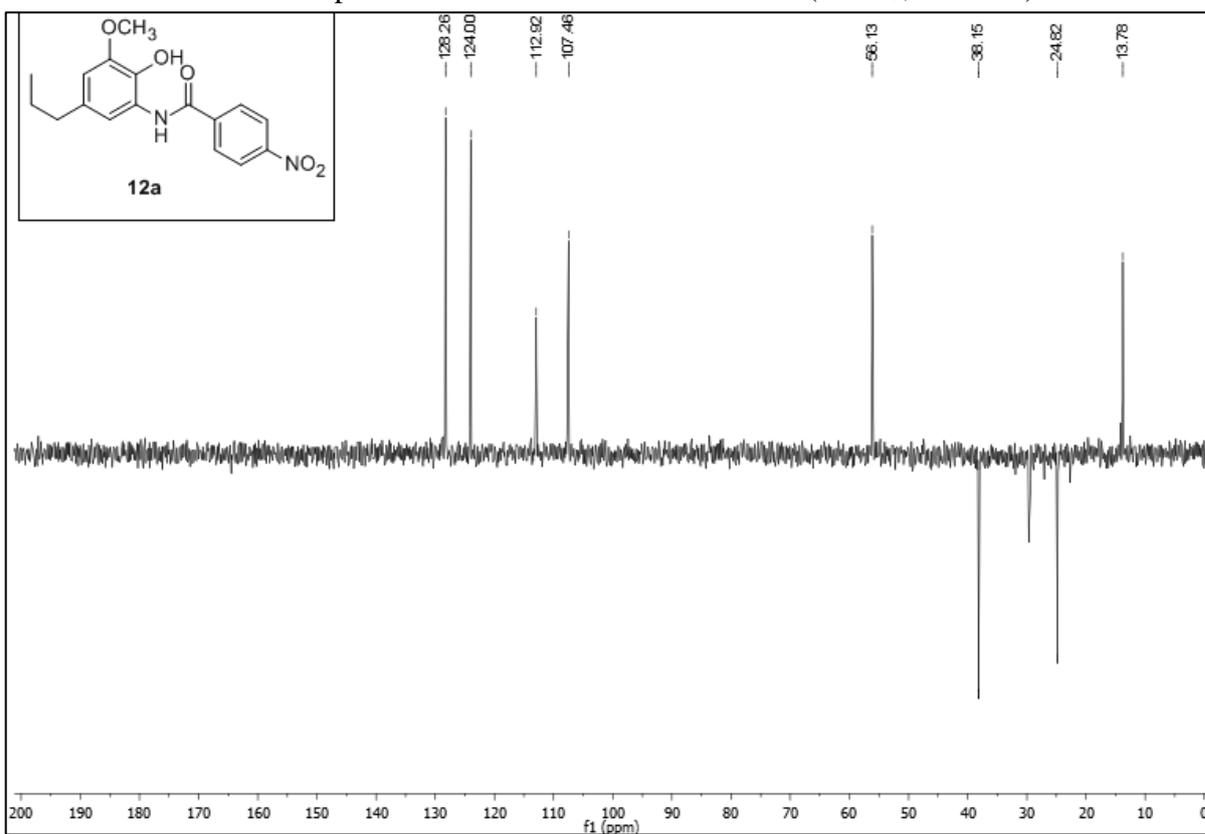


Fonte: Do autor.

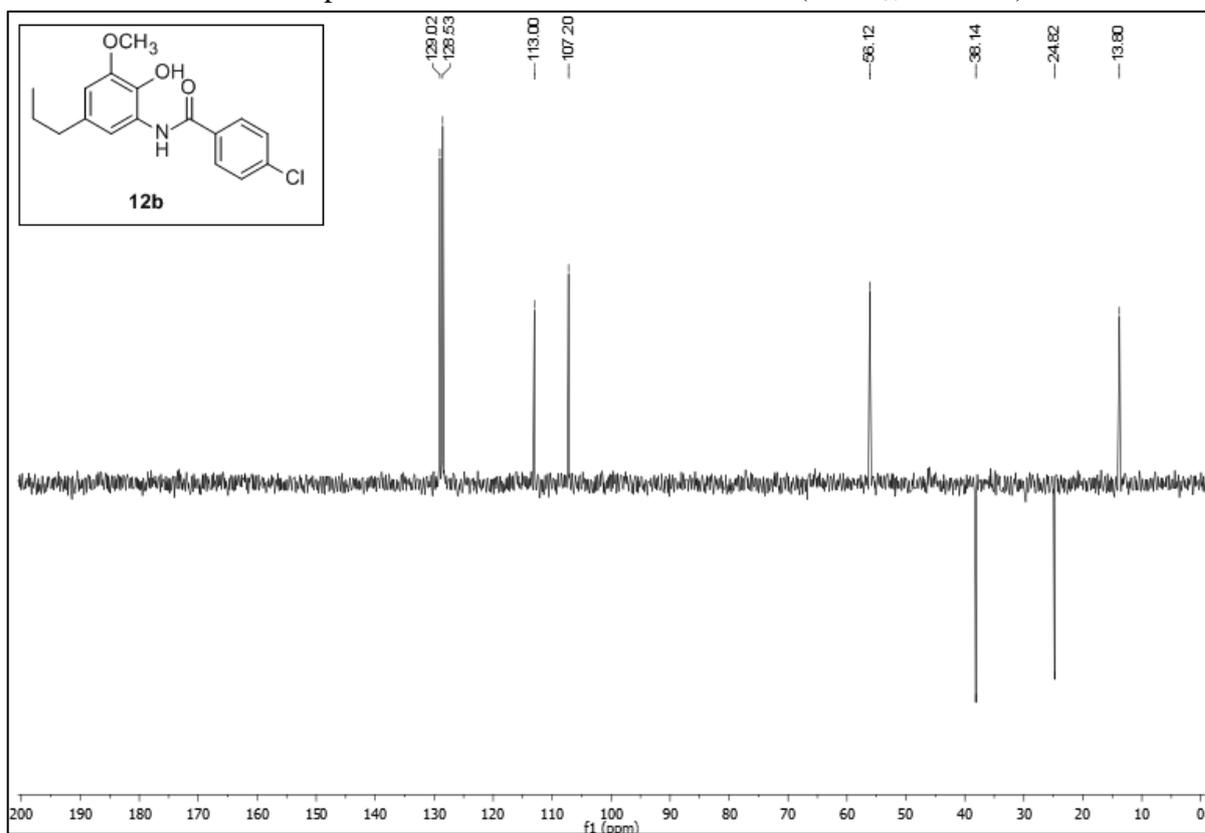
APÊNDICE LL – Subespectro DEPT-135 da substância 11d (CDCl₃, 75 MHz)



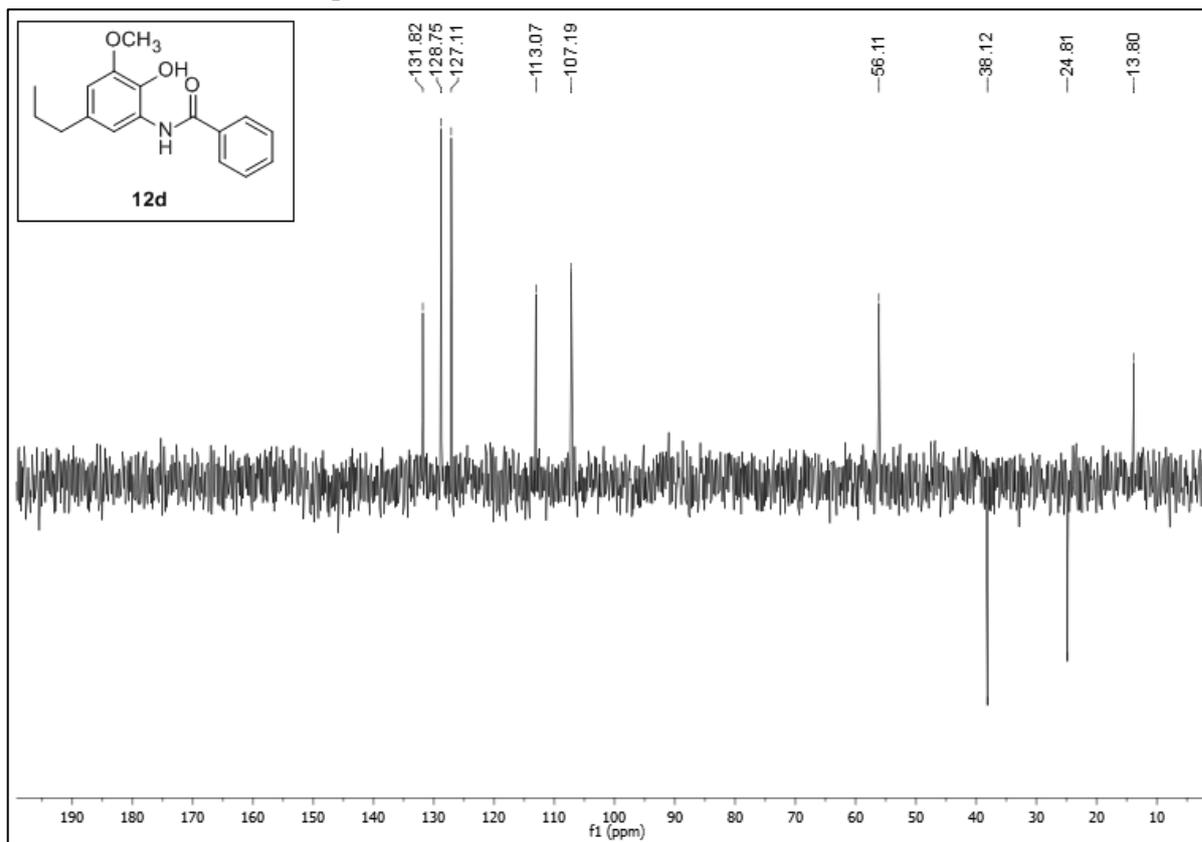
Fonte: Do autor.

APÊNDICE MM – Subespectro DEPT-135 da substância 12a (CDCl₃, 75 MHz)

Fonte: Do autor.

APÊNDICE NN – Subespectro DEPT-135 da substância 12b (CDCl₃, 75 MHz)

Fonte: Do autor.

APÊNDICE OO – Subespectro DEPT-135 da substância 12d (CDCl₃, 75 MHz)

Fonte: Do autor.