

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

ANTONIO MACIEL FREGNAN

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

Alfenas/MG

2016

ANTONIO MACIEL FREGNAN

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DE DERIVADOS BENZISOXAZOLINÔNICOS 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 e Prof. Luiz Felipe Leomil Coelho.

Alfenas/MG

2016

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

Fregnan, Antonio Maciel.

Síntese e avaliação de derivados benzisoxazolinônicos do eugenol como potenciais agentes antifúngos / Antonio Maciel Fregnan. – Alfenas/MG, 2016.

117 f.

Orientador: Diogo Teixeira Carvalho.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Alfenas, 2016.

Bibliografia.

1. Antifúngicos. 2. Eugenol. 3. ATPase Translocadora de Prótons.
4. Compostos Heterocíclicos. I. Carvalho, Diogo Teixeira. II. Título.

CDD-615.31

ANTONIO MACIEL FREGNAN

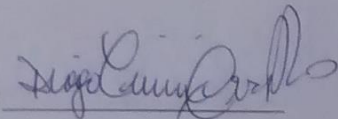
“Síntese e avaliação de derivados benzisoxazolinônicos do eugenol
como potenciais agentes antifúngicos”

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.

Aprovado em: 25, 02, 2016

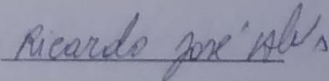
Prof. Dr. Diogo Teixeira Carvalho
Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura:



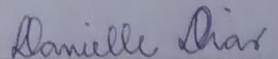
Prof. Dr. Ricardo José Alves
Instituição: UFMG

Assinatura:



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

Assinatura:



Dedico esse trabalho à minha mãe e família, que sempre me apoiou e me incentivou em todos os momentos. À Pórtya pelo companheirismo e aos meus amigos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por permitir que tudo isso fosse possível.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Diogo Teixeira Carvalho, pelo companheirismo, dedicação e competência. Também por contribuir para minha formação profissional.

À minha mãe, irmão e padrasto que me deram forças quando precisei. A minha família que através de sua união me deu forças para seguir em frente

À minha namorada Pórtya, que foi meu alicerce durante esses dois anos. Juntamente com todos os seus familiares.

Aos meus amigos pelos momentos de descontração, que tornaram essa fase mais leve.

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

A todos os colegas de laboratório, em especial ao Thiago, Larissa, Antônio, Helloana, Carol, Letícia, Guilherme, Lucas e Taciane.

Ao grande e saudoso amigo Guilherme (em memória) companheiro de congressos.

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

Ao CNPq pelo financiamento da pesquisa e à CAPES pela bolsa de estudos.

Enfim, a todos que fizeram e fazem parte desse trabalho!

“A ciência, como um tudo, não é nada mais do que um refinamento do pensar diário.”
(Albert Einstein)

“Na vida, não existe nada a temer, mas a entender.”
(Marie Curie)

RESUMO

A procura por novos agentes com ação antifúngica está se intensificando nos últimos anos. A incidência de infecções fúngicas causadas por espécies do gênero *Candida* sp tem aumentado consideravelmente, principalmente em pacientes imunocomprometidos, nos quais podem apresentar gravidade. Por esse motivo, há uma intensa busca por novas substâncias com atividade antifúngica concomitante com pesquisa de novos alvos farmacológicos. A proteína H⁺-ATPase presente na membrana plasmática dos fungos é um novo alvo promissor, já que é exclusiva de células fúngicas. O Ebselen, mostrou ser um bom inibidor de H⁺-ATPase, sendo utilizado em alguns estudos como padrão de inibição dessa enzima. O eugenol, presente nos óleos essenciais de várias espécies vegetais é conhecido por apresentar diversas propriedades biológicas, incluindo ação antifúngica, a qual também parece estar relacionada à inibição desta ATPase microbiana. Soma-se a isso, o fato das 1,2-benzisoxazolin-3-onas, serem uma classe pouco explorada quanto ao seu perfil de ação biológica. Nesse contexto, foram planejados e sintetizados por hibridização molecular seis derivados benzisoxazolinônicos do eugenol e substâncias correlatas. Destes, quatro são inéditos, sendo que nenhum deles foi explorado quanto ao potencial antifúngico. Os produtos planejados foram sintetizados por meio de procedimentos sintéticos clássicos, tendo em comum as etapas finais de formação de intermediários do tipo ácido hidroxâmico seguido de ciclização às benzisoxazolinonas via reação de Mitsunobu. Os produtos finais foram caracterizados pelos métodos espectrométricos usuais. Na sequência, os produtos finais, bem como intermediários de síntese, foram avaliados quanto à sua atividade antifúngica *in vitro* frente a espécies de *Candida* spp. por meio de testes de microdiluição. Adicionalmente, os produtos mais promissores tiveram avaliados seus perfis de citotoxicidade para determinação do índice de seletividade. Os testes revelaram que todos os compostos sintetizados apresentam atividade antifúngica superior à do eugenol. As *N*-fenilbenzisoxazolinonas (**18**, **19** e **20**) foram as mais promissoras, apresentando, em alguns casos, valores de IC₅₀ comparáveis ou até igual ao do fármaco fluconazol contra as espécies *C. krusei* e *C. glabrata*. O composto **19** apresentou um IC₅₀ de 142 µM frente a *C. krusei*, valor esse bem próximo ao alcançado pelo fluconazol (104 µM), sendo também o único híbrido planejado que se mostrou fungicida. O produto de hibridização **18**, alvo do planejamento desse trabalho, foi o mais ativo contra *C. glabrata* com um CI₅₀ de 53 µM. Ele obteve um índice seletividade bom (IS 3,4) e sua potência foi igual à do fluconazol (CI₅₀ 52 µM). Essa classe de heterociclos é ainda pouco explorada e mostrou ter

atividade antifúngica, sendo passível de alterações estruturais para otimização dessa atividade biológica.

Palavras-chave: Antifúngicos. Eugenol. Benzisoxazolinonas. Hibridização Molecular.

ABSTRACT

The incidence of fungal infections caused by *Candida* spp. has increased considerably, especially in immunocompromised patients, who may present gravity. The most widely used antifungal agents in the treatment of these infections are amphotericin B and azole. However, resistance to drugs and severe side effects limit the success of therapeutics. For these reasons, there is an intensive search for new substances with antifungal activity, mainly those acting in new molecular targets. Ebselen, a seleno-organic compound is a good inhibitor of H⁺-ATPase, an essential and unique yeast enzyme. On the other hand, eugenol is a natural product present in the essential oils of several plant species, especially in clove, is and it known for its various biological properties, including antifungal action, which also seems to be related to inhibition of this microbial ATPase. Likewise, of benzisoxazolinones, are heterocycles chemically similar to ebselen, but relatively little explored as bioactive compounds. In this context, we describe here the design and synthesis of benzisoxazolinones derived from eugenol (our related substances) and ebselen, planned according to molecular hybridization strategy. They were synthesized by classical synthetic procedures and the final step consisted cyclization in hydroxamic acids into benzisoxazolinone via Mitsunobu reaction. The final products were obtained with yields ranging from 5 to 70% and were characterized by standard spectroscopic methods. Next, the final products, and synthetic intermediates were evaluated for their *in vitro* antifungal activity against *Candida* spp. by microdilution tests. In addition, the most promising products were evaluated for their cytotoxicity profiles for determining the selectivity indexes. Tests have shown that all synthesized compounds have antifungal activity higher than eugenol. The *N*-phenylbenzisoxazolinones (**18**, **19** and **20**) were the most promising ones showing in some instances IC₅₀ values comparable or equal to those of fluconazole against *C. krusei* and *C. glabrata*. Compound **19** showed an IC₅₀ of 142 μM against *C. krusei*, very close to that achieved by fluconazole (104 μM) and was the only hybrid with fungicidal activity. Product **18**, eugenol-ebselen hybrid, was the most active one against *C. glabrata* with an IC₅₀ of 53 μM, good selectivity index (3.4) and potency equal to that of fluconazole (IC₅₀ 52 μM). These results highlight these derivatives as good compounds for structural optimization and further studies, as investigations on its molecular mechanism of antifungal action.

Keywords: Antimicrobial. Eugenol. Benzisoxazolinones. Molecular hybridization.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Vias de transporte para a manutenção da homeostase iônica em <i>S. cerevisiae</i>	23
Figura 2 - Estrutura do eugenol, com numeração oficial.	24
Figura 3 - Estrutura do ebselen.....	27
Figura 4 - Esquema reacional para síntese do ebselen.	28
Figura 5 - Estrutura do hídrido eugenol-ebselen e dos derivados benzisoxazolinônicos correlatos.....	30
Figura 6 - Reação de Reação de formilação do eugenol	32
Figura 7 - Reação de formação de 2	33
Figura 8 - Reação de formação de 3 e 5	34
Figura 9 - Reação de formação de 6, 7 e 8	36
Figura 10 - Reação de formação de 9, 10 e 11	36
Figura 11 - Reação de formação de 12, 13 e 14	38
Figura 12 - Reação de formação de 15, 16 e 17	41
Figura 13 - Reação de formação de 18, 19 e 20	43
Figura 14 - Roteiro sintético para obtenção dos derivados benzisoxazolinônicos (i: hexamina, HAc glacial, 140°C; ii: Ag ₂ O, NaOH (aq), 25°C; iii: Ac ₂ O, piridina, 25°C; iv: SOCl ₂ , DMF, DCM, 25°C; v: CH ₃ NHOH, Na ₂ HCO ₃ , DCM, 0°C; vi: PhNHOH, Na ₂ HCO ₃ , DCM, 0°C; vii: DIAD, Ph ₃ P, THF, 0-25°C).	48
Figura 15 - Mecanismo da reação de formilação via reação de Duff.....	49
Figura 16 - Espectro no IV do composto 1.....	50
Figura 17 - Espectro de RMN de ¹ H do composto 1 (CDCl ₃ , 300 MHz).....	51
Figura 18 - Espectro de RMN de ¹³ C e subespectro DEPT-135 de 1 (CDCl ₃ , 75 MHz).....	52
Figura 19 - Espectro no IV do composto 2.....	53
Figura 20 - Espectro de RMN de ¹ H do composto 2 (CDCl ₃ , 300 MHz).....	54
Figura 21 - Espectro de RMN de ¹³ C e subespectro DEPT-135 de 2 (CDCl ₃ , 75 MHz).....	55

Figura 22 - Mecanismo da reação de acetilação de fenóis	56
Figura 23 - Espectro no IV do composto 3.....	57
Figura 24 - Espectro de RMN de 1H do composto 3 (CDCl ₃ , 300 MHz)	58
Figura 25 - Espectro de RMN de 13C do composto 3 (CDCl ₃ , 75 MHz).	59
Figura 26 - Espectro no IV do composto 5.....	59
Figura 27 - Espectro de RMN de 1H do composto 5 (DMSO-d ₆ , 300 MHz).	60
Figura 28 - Espectro de RMN de 13C e subspectro DEPT-135 de 5 (DMSO-d ₆ , 75 MHz)..	61
Figura 29 - Mecanismo de formação de cloretos de ácido catalisados por DMF	62
Figura 30 - Mecanismo de reação da formação do ácido N-metilhidroxâmicos e subsequente desacelitação	63
Figura 31 - Espectro no IV do composto 9.....	64
Figura 32 - Espectro de RMN de 1H do composto 9 (CDCl ₃ , 300 MHz).....	65
Figura 33 - Espectro de RMN de 13C e subspectro DEPT-135 de 9 (CDCl ₃ , 75 MHz)	66
Figura 34 - Espectro no IV do composto 10.....	67
Figura 35 - Espectro de RMN de 1H do composto 10 (DMSO-d ₆ , 300 MHz).	68
Figura 36 - Espectro de RMN de 13C do composto 10 (DMSO-d ₆ , 75 MHz).....	69
Figura 37 - Espectro no IV do composto 11.....	69
Figura 38 - Espectro de RMN de 1H do composto 11 (CDCl ₃ , 300 MHz).....	70
Figura 39 - Espectro de RMN de 13C e subspectro DEPT-135 de 11 (CDCl ₃ , 75 MHz).	71
Figura 40 - Mecanismo de formação de formação dos ácidos N-fenilhidroxâmicos.....	72
Figura 41 - Espectro de RMN de 1H do composto 12a (CDCl ₃ , 300 MHz).	74
Figura 42 - Espectro de RMN de 13C do composto 12a (CDCl ₃ , 75 MHz).	75
Figura 43 - Espectro no IV do composto 13a.....	76
Figura 44 - Espectro de RMN de 1H do composto 13a (CDCl ₃ , 300 MHz).	77
Figura 45 - Espectro de RMN de 13C do composto 13a (CDCl ₃ , 75 MHz).	78
Figura 46 - Espectro de RMN de 1H do composto 14a (CDCl ₃ , 75 MHz).	79
Figura 47 - Espectro de RMN de 13C do composto 14a (CDCl ₃ , 75 MHz).	80

Figura 48 - Mecanismo de formação do produto O-acilado.....	81
Figura 49 - Espectro de RMN de ¹ H do composto 13b (CDCl ₃ , 300 MHz).....	81
Figura 50 - Espectro de RMN de ¹³ C do composto 13b (CDCl ₃ , 75 MHz).	82
Figura 51 - Esquema reacional de formação de N-alkil-benzisoxazolinonas	83
Figura 52 - Proposta de mecanismo de formação do par iônico na reação para a síntese dos derivados benzisoxazolinônicos	84
Figura 53 - Proposta de mecanismo de formação do núcleo bezisoxasolinônico	85
Figura 54: - Espectro no IV do composto 15.....	86
Figura 55 - Espectro de RMN de ¹ H do composto 15 (CDCl ₃ , 300 MHz).....	87
Figura 56 - Espectro de RMN de ¹³ C e subspectro DEPT-135 de 15 (CDCl ₃ , 75 MHz).	88
Figura 57 - Espectro no IV do composto 16.....	89
Figura 58 - Espectro de RMN de ¹ H do composto 16 (CDCl ₃ , 300 MHz).....	90
Figura 59 - Espectro de RMN de ¹³ C do composto 16 (CDCl ₃ , 75 MHz)	91
Figura 60 - Espectro no IV do composto 17.....	91
Figura 61 - Espectro de RMN de ¹ H do composto 17 (CDCl ₃ , 300 MHz)	92
Figura 62 - Espectro de RMN de ¹³ C do composto 17 (CDCl ₃ , 75 MHz)	93
Figura 63 - Espectro de RMN de ¹ H do composto 18 (CDCl ₃ , 75 MHz)	94
Figura 64 - Espectro de RMN de ¹³ C do composto 18 (CDCl ₃ , 75 MHz)	95
Figura 65 - Espectro no IV do composto 19.....	95
Figura 66 - Espectro de RMN de ¹ H do composto 19 (CDCl ₃ , 300 MHz)	96
Figura 67 - Espectro de RMN de ¹³ C do composto 19 (CDCl ₃ , 75 MHz)	97
Figura 68 - Espectro no IV do composto 20.....	97
Figura 69 - Espectro de RMN de ¹ H do composto 20 (CDCl ₃ , 300 MHz)	98
Figura 70 - Espectro de RMN de ¹³ C do composto 20 (CDCl ₃ , 75 MHz)	99
Figura 71 - Estruturas dos materiais de partida, intermediários e produtos finais avaliados no teste antifúngico.....	100
Figura 72 - Isomerização da benzisoxazolinona a benzoxazolinona	104

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resultados obtidos da avaliação da atividade antifúngica dos derivados benzisoxazolinônicos.....	101
Tabela 2 - Resultados obtidos da avaliação da atividade antifúngica e de citotoxicidade sobre células sanguíneas mononucleares dos derivados benzisoxazolinônicos.....	106

LISTA DE ABREVIACÕES, SIGLAS E SÍMBOLOS

ATCC	- <i>American Type Culture Collection</i>
ATR	- <i>Attenuated total reflectance</i>
CC ₅₀	- Concentração citotóxica para 50% das células
CCD	- Cromatografia em camada delgada
CCS	- Cromatografia em coluna de sílica
CDCl ₃	- Clorofórmio deuterado
CI ₅₀	- Concentração capaz de inibir 50% do crescimento microbiano
CI ₉₀	- Concentração capaz de inibir 90% do crescimento microbiano
d	- Duplete
dd	- Duplo duplete
dt	- Duplo tripleto
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
MTT	- Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
Nm	- Nanômetro
p/p	- Peso por peso
P.F.	- Ponto de fusão
Ppm	- Partes por milhão
RMN	- Ressonância magnética nuclear
s	- Simpleto
t	- Tripleto
t.a.	- Temperatura ambiente

- v/v - Volume por volume
- δ - Deslocamento químico (ppm)
- $\bar{\nu}$ - Número de onda (cm^{-1})
- DIAD - Azodicarboxilato de diisopropila
- Ph_3P - Trifenilfosfina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	FUNGOS PATOGÊNICOS	16
1.2	MECANISMOS DE AÇÃO E RESISTÊNCIA AOS PRINCIPAIS ANTIFÚNGICOS	17
1.2.1	Anfotericina B	17
1.2.2	Azólicos	18
1.2.3	Equinocandinas	20
1.3	PESQUISA DE NOVOS ANTIFÚNGICOS	21
1.4	EQUILÍBRIO IÔNICO FÚNGICO	21
1.5	EUGENOL	23
1.6	EBSELEN	26
2	OBJETIVOS	30
3	PARTE EXPERIMENTAL	31
3.1	QUÍMICA	31
3.1.1	Procedimentos Gerais	31
3.1.2	Síntese	32
3.1.2.1	<i>Síntese do derivado 5-alil-2-hidroxi-3-metoxibenzaldeido (1; RAO et al. 1949)</i>	32
3.1.2.2	<i>Síntese do ácido 5-alil-2-hidroxi-3-metoxibenzóico (adaptado de PEARL, et al., 1963).</i>	33
3.1.2.3	<i>Síntese dos derivados O-acetilados 3 e 5 (adaptado de KURTI, et al. 2005).</i>	34
3.1.2.4	<i>Síntese dos cloretos de ácido 6, 7 e 8 (adaptado de KHALIKOV, et al 2006).</i>	36
3.1.2.5	<i>Síntese dos ácidos N-metilhidroxâmicos 9, 10 e 11 (adaptado de JING, et al. 2013, Shi, 2000).</i>	36
3.1.2.6	<i>Tentativa de síntese dos ácidos N-fenilhidroxâmicos 12 e 13 (adaptado de JING, et al. 2013, Shi, 2000).</i>	38
3.1.2.7	<i>Síntese dos derivados 2-metilbenzisoxasolinônicos 15, 16 e 17 (adaptado de Shi, 2000).</i>	41
3.1.2.8	<i>Síntese dos derivados 2-fenilbenzisoxasolinônicos 18, 19 e 20 (adaptado de Shi, 2000)</i>	43
3.2	AVALIAÇÃO BIOLÓGICA	44
3.2.1	Avaliação da atividade antifúngica	45

3.2.2	Avaliação da citotoxicidade frente à células sanguíneas monucleares periféricas humanas	45
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
4.1	QUÍMICA.....	48
4.2	AVALIAÇÃO BIOLÓGICA	100
5	CONCLUSÃO.....	108
	REFERÊNCIAS	109

1 INTRODUÇÃO

A procura por novos agentes com ação antifúngica está se intensificando nos últimos anos. A incidência de infecções fúngicas causadas por espécies do gênero *Candida* sp tem aumentado consideravelmente, principalmente em pacientes imunocomprometidos, nos quais podem apresentar gravidade. Por esse motivo, há uma intensa busca por novas substâncias com atividade antifúngica concomitante com pesquisa de novos alvos farmacológicos.

1.1 FUNGOS PATOGÊNICOS

Os fungos podem causar infecção em indivíduos saudáveis, mas a maior proporção de humanos afetados são os indivíduos imunocomprometidos, considerando as infecções oportunistas que acometem pacientes portadores de HIV e câncer. Recentemente, os avanços na terapia medicamentosa proporcionaram a sobrevivência de muitos pacientes, em contrapartida, muitos destes tornaram-se suscetíveis a infecções causadas por fungos que eram considerados de baixa virulência ou até mesmo não patogênicos (SANDVEN et al., 2000; GARBER et al., 2001; PFALLER e DIEKEMA, 2007)

Candida albicans presente na cavidade bucal e trato gastrointestinal de indivíduos saudáveis é um dos principais agentes causadores das micoses humanas, sendo a quarta causa mais comum de infecções sistêmicas (RANGEL-FRAUSTO et al., 1999; SHAO et al., 2007). O diagnóstico precoce dessas infecções é limitado pela ineficácia dos testes, desfavorecendo diagnósticos rápidos e específicos (SANGLARD, 2002; KONTOYIANNIS; SHAO et al., 2007). Somam-se a isso, manifestações clínicas inespecíficas, sensibilidade baixa das técnicas microbiológicas de hemoculturas, além da indisponibilidade das culturas de amostras teciduais, devido aos riscos associados aos procedimentos invasivos utilizados na obtenção desses tecidos (MÉAN et al, 2008).

As infecções causadas por fungos leveduriformes estão se destacando pelo recente crescimento nos números de casos (SWOBODA et al, 2003; PASQUALOTTO et al, 2006;). Nos Estados Unidos, as espécies de *Candida* sp. já alcançaram o quarto lugar entre as causas de infecções hospitalares, sendo responsável por 9 a 16% dos casos de septicemia (PFALLER

e DIEKEMA, 2007). Na Alemanha, a espécie isolada com mais frequência é *C. albicans* (59.5%), seguida por *C. parapsilosis* (9.0%) e *C. tropicalis* (8.5%) (ZEPELIN et al, 2007). No Brasil, a incidência superou a dos países europeus e Estados Unidos, sendo *C. albicans* a espécie mais isolada em todos os hospitais, e entre as *Candida* não-*albicans* houve predominância de *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* (COLOMBO et al., 2007). Com isso, a candidíase representa um problema de saúde pública e as pesquisas de novos alvos, bem como de novos agentes antifúngicos são essenciais para a melhora deste quadro.

1.2 MECANISMOS DE AÇÃO E RESISTÊNCIA AOS PRINCIPAIS ANTIFÚNGICOS

Atualmente existem cinco classes predominantes de fármacos antifúngicos (polienos, fluoropirimidina, azóis, equinocandinas e alilaminas), todas elas com sérias desvantagens. Alguns não possuem amplo espectro de ação, outro têm uma baixa seletividade para o fungo, sendo tóxicos para o homem. Alguns desses fármacos são fungistáticos e não fungicidas, aumentando o risco de recidivas e também do aparecimento de cepas resistentes aos antifúngicos, o que é um sério problema (BECK-SAGUE e JARVIS 1993; CHEN et al.; 2007).

1.2.1 Anfotericina B

De 1950 até a descoberta dos antibióticos azólicos, os agentes antifúngicos poliênicos eram utilizados como padrão na terapia de infecções causadas por fungos (SUGAR,1986). A anfotericina B e a nistatina, correspondem aos antibióticos poliênicos efetivamente em uso. Estes possuem um anel lactônico macrocíclico, caracterizado por insaturações conjugadas, que compõem a subunidade rígida e lipofílica e a região flexível hidrofílica, composta por grupos hidroxílicos (MARTINEZ, 2006).

Atuam ligando-se ao ergosterol na membrana fúngica causando extravasamento de metabólitos essenciais e proteínas, culminando na morte celular. Também geram uma lesão oxidativa que resulta em alterações metabólicas prejudiciais à sobrevivência celular. Ligam-se

também, em menor escala, ao colesterol da membrana das células humanas, provocando efeitos adversos (MARTINEZ, 2006; NOBRE et al, 2002). A anfotericina B produz frequentes efeitos adversos, relacionados à infusão, toxicidade celular e tecidual (MARTINEZ, 2006). A toxicidade renal dela é um efeito colateral importante, não sendo rapidamente reversível pela suspensão do fármaco (NOBRE et al, 2002). Novas formulações de anfotericina B estão sendo desenvolvidas. Diversas preparações lipossomais, por exemplo, estão sendo utilizadas na clínica de pacientes acometidos por doenças fúngicas (CANOTO e RODERO,2002).

A resistência à anfotericina B é rara, foram detectados mecanismos de resistência em espécies de levedura e fungos filamentosos. Estes mecanismos ainda são mal compreendidos, embora a maioria deles estejam relacionados com uma diminuição na quantidade de ergosterol da membrana ou o aumento de fosfolípidos que reduz a interação do fármaco com esteróis. Estas alterações têm sido associadas com mutações dos genes OPS2 OPS3, que codificam as enzimas envolvidas na via de síntese do ergosterol (RUIZ-CAMPS, 2009). Nos últimos anos, não ha relatos de outros mecanismos de resistência à anfotericina B associados ao efeito oxidativo induzido pelo polieno na célula fúngica. A principal limitação da utilização dessa classe de fármacos é a sua elevada toxicidade, dessa forma o seu uso é indicado em tratamentos de curta duração (BLUM, et al., 2008).

1.2.2 Azólicos

Com o lançamento dos azóis, nova classe de antifúngicos com disponibilidade de administração oral, iniciou-se uma nova era para o tratamento de infecções por *Candida* sp. Os azóis são os agentes antifúngicos mais utilizados, caracterizados pela presença de anéis imidazólicos ou triazólicos(MARTINEZ, 2006).

Também agem modificando a síntese de lipídeos e inativando enzimas do processo oxidativo dos fungos. Os antifúngicos azólicos, principalmente os imidazólicos, exercem ação apenas fungistática (MARTINEZ, 2006). Eles atuam sobre enzimas do citocromo P450 dos fungos, bloqueando a desmetilação do lanosterol e, conseqüentemente, a biossíntese do ergosterol através da inibição da enzima lanosterol 14- α -desmetilase. Isso causa alterações na fluidez e permeabilidade da membrana citoplasmática do fungo, prejudicando a captação dos

nutrientes, inibindo o crescimento das células e originando alterações morfológicas que resultam em morte celular (CHEN e SORRELL, 2007; MARTINEZ, 2006; NOBRE et al, 2002).

O espectro de ação dos fármacos imidazólicos e triazólicos abrange os agentes etiológicos de paracoccidiodomicose, histoplasmose, coccidiodomicose, criptococose, blastomicose norte-americana e dermatomicoses. A maioria das espécies de *Candida* sp. mostra susceptibilidade aos azólicos, notando-se que *C. krusei* e *C. glabrata* são menos susceptíveis (MARTINEZ, 2006). *C. krusei* apresenta resistência intrínseca ao fluconazol e *C. glabrata* desenvolve resistência rapidamente após contato com este fármaco, isso acontece pelo aumento da expressão de bombas de efluxo e mutações do gene ERG11 que modifica o alvo farmacológico dos azóis. Ambas as espécies têm emergido como importantes agentes em infecções sistêmicas em pacientes hospitalizados (REX et al.,1995; SPELLBERG et al., 2006).

A resistência aos azóis é a questão de maior interesse quando tratamos da resistência a fármacos antifúngicos. A resistência ao fluconazol, itraconazol e a prevalência crescente de espécies resistentes ao voriconazol são considerados os problemas mais importantes da resistência aos antifúngicos azólicos. O alvo destes fármacos é o lanosterol 14-alfa desmetilase, produto do gene ERG11, conhecidos como CYP51. São exemplos de alterações do gene ERG11 relacionados à resistência, mutações pontuais, superexpressão ou a amplificação do gene devido à duplicação cromossômica e as recombinações mitóticas com conversão genética. Entre estes, o mecanismo mais comum de resistência são as mutações pontuais que produzem uma enzima alterada, diminuindo a afinidade dos azóis ao ergosterol (ALCAZAR, et al., 2010). No entanto, o mecanismo de resistência é mais frequentemente detectado em isolados clínicos de fungos é a redução da concentração intracelular dos azóis. Esta redução ocorre devido à diminuição da absorção do fármaco ou, mais comumente, pelo aumento do número e da atividade das bombas de efluxo. É um mecanismo secundário de resistência que ocorre devido à sobre-expressão de genes que regulam esse transportadores. Existem dois tipos de bombas de efluxo, transportadores ABC e MFS. Os Transportadores ABC estão associados à resistência a todos os azóis. O MFS parece se referir apenas a resistência ao fluconazol (MORSCHHAUSER, 2013).

Em alguns países, a resistência ao fluconazol em cepas que causam a candidíase sistêmica, pode chegar a até 30%, portanto, estudos epidemiológicos periódicos devem ser realizados para detectar alterações com significado terapêutico, como o aumento da

prevalência de *C. glabrata*, *C. krusei* ou leveduras emergentes que podem ser resistentes a azoles (CUESTA, et al., 2012).

1.2.3 Equinocandinas

As equinocandinas são lipopeptídeos sinteticamente modificados, com estrutura química de hexapeptídeos cíclicos ligados a uma cadeia lateral de ácido graxo originalmente derivado de caldos de fermentação de vários tipos de fungos. Vários outros análogos e derivados de equinocandinas foram descritos: asarbocandinas, papulacandinas, a neumocandina B e a mulucandina (DIOMED, 2004).

Diferentemente da anfotericina B e dos antifúngicos azólicos, as equinocandinas têm como alvo a parede celular, inibindo a enzima ligada à síntese de β -glucana. A glucana na forma de microfibrilas é um dos principais componentes da parede celular fúngica. O bloqueio de sua síntese resulta em desequilíbrio osmótico, prejudicando a viabilidade do microrganismo. (MARTINEZ, 2006; KATHIRAVAN et al, 2012). A inibição desta enzima resulta em esgotamento dos polímeros de glucana na célula fúngica, resultando em uma parede celular anormal, fraca e incapaz de resistir ao estresse osmótico. Toxicidade associada à equinocandina é rara, pois sua ação é específica sobre a glucana presente na parede celular e as células de mamíferos não possuem essa estrutura (CHEN e SORRELL, 2007).

A resistência intrínseca a esta família de antifúngicos em espécies que contem 1,6-beta glucana em sua parede, como *Cryptococcus* spp., *Fusarium* spp. e outras espécies. É descrito também, mutações e substituições de aminoácidos em duas regiões do gene Fks1 (Fks1 e 2), que codificam a subunidade maior da glucano-sintetase. Estas mutações geram resistência as três equinocandinas e isso tem sido associado às falhas no tratamento antifúngico (CUESTA, et al., 2012).

1.3 PESQUISA DE NOVOS ANTIFÚNGICOS

Assim, o desenvolvimento de novos antifúngicos tem sido constantemente requerido na terapêutica clínica. Contrariamente ao que ocorre na terapêutica bacteriana, os avanços no tratamento das infecções fúngicas são mais lentos. Embora o arsenal de fármacos antifúngicos tenha expandido, atualmente, os agentes antifúngicos disponíveis não atendem ao aumento crescente das infecções na população, especialmente em pessoas imunocomprometidas (MUTHU, 2012).

Novos sítios de ação estão sendo estudados para o desenvolvimento de fármacos antifúngicos, como por exemplo, isoleucil-tRNA e a síntese proteica (MUTHU, 2012). A proteína H^+ -ATPase, presente na membrana plasmática dos fungos, também é um novo alvo promissor, já que essa isoforma apresenta baixa homologia em humanos. Esta enzima desempenha um papel crucial na fisiologia fúngica, mantendo o gradiente eletroquímico de prótons através da membrana, essencial para a captação de nutrientes, regulação do pH e para o crescimento celular (AHMAD et al, 2010c; YATIME et al, 2009).

O desenvolvimento de novas classes de antifúngicos com sítios alternativos de ação pode resolver os problemas de toxicidade e resistência apresentados pelos antifúngicos atuais. Pode ainda gerar alternativas na clínica médica e aumentar a gama de associações medicamentosas, que por motivo de resistência do patógeno se torna ineficaz (SOTEROPOULOS, 2000).

1.4 EQUILÍBRIO IÔNICO FÚNGICO

O ambiente em que os fungos se encontram pode sofrer algumas variações de pH, quantidade de água, disponibilidade de nutrientes e concentração de solutos. A capacidade de desenvolver respostas rápidas é importante para que as leveduras sobrevivam a tais mudanças, que muitas vezes geram estresses e podem comprometer suas funções celulares normais (CAUSTON et al., 2001).

Alguns fungos são capazes de crescer em meio com pH entre 4,5 e 6,5 e o mecanismo de resposta a um estresse ácido se deve ao funcionamento da H^+ -ATPase da membrana

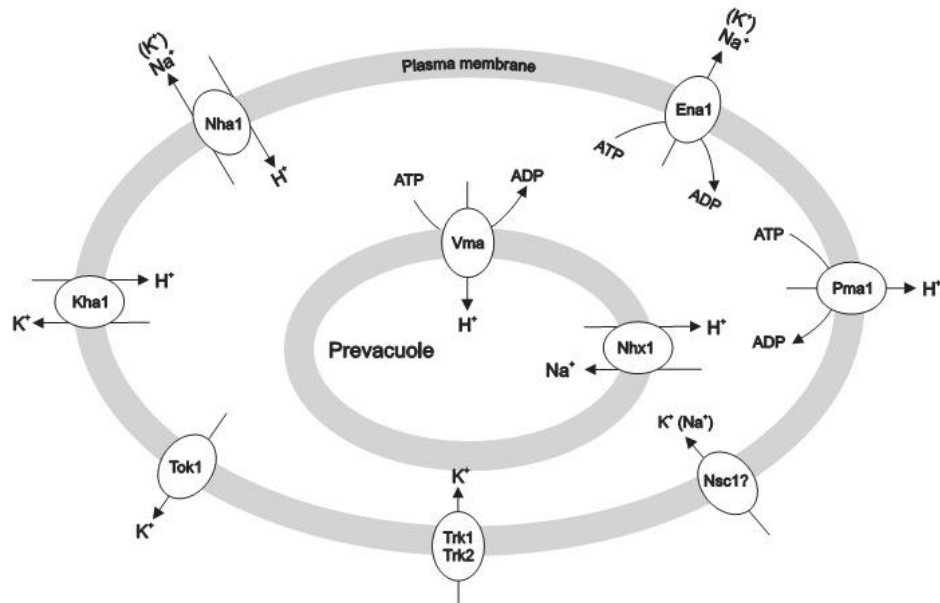
plasmática. Ela responde por grande parte das proteínas estruturais da membrana plasmática, perfazendo de 20 a 50% do total de proteínas presentes na membrana (SERRANO et al., 1986). A H^+ -ATPase (Pma1p) é um membro da família ATPase do tipo P, constituindo-se em uma bomba de prótons que transporta prótons às custas da hidrólise de ATP. Ela é constituída por 10 α -hélices transmembranares, um domínio catalítico de hidrólise de ATP, e um domínio de transdução de prótons. A Pma1p consiste de uma única subunidade de 100 kDa, codificada pelo gene PMA1. Este gene é essencial para o crescimento normal do fungo, e a supressão desses genes em cepas haploides desse microrganismo é letal (AMBESI et al., 2000). Esse transportador desempenha um papel importante na regulação do pH intracelular e na manutenção do gradiente eletroquímico necessário para a absorção de nutrientes.

Pesquisas mostram que a alteração do pH meio gera um aumento na atividade da enzima H^+ -ATPase nos fungos, a qual catalisa a extrusão de prótons H^+ para o meio extracelular, equilibrando o pH citosólico. Isso induz a expressão gênica do PMA1, que é o gene que codifica as proteínas da H^+ -ATPase, aumentando assim a síntese de Pma1p (H^+ -ATPase) catalisando a extrusão do íons H^+ às custas de ATP (PIPER et al., 2001; RAO et al., 1992; PORTILLO, 2000).

Além da troca de íons H^+ com o meio extracelular, há um transporte de íons intracelular, compreendendo principalmente o transporte antiporte de cátions, trocando cátions de metais alcalinos por H^+ nas membranas vacuolares (Vnx1), endossomal (NHX1) e Golgi (KHA1). Além disso, embora o gene ainda não tenha sido descrito, há uma troca muito eficiente de K^+ para o H^+ na membrana mitocondrial. Assim, semelhante aos transportadores de membrana, esses dispositivos servem para regular a homeostase em nível citosólico (ARINO et al., 2010).

Além da manutenção do pH citosólico, a H^+ -ATPase da membrana plasmática é responsável por manter um gradiente eletroquímico de prótons que favorece o funcionamento da maior parte dos transportadores secundários, importantes para a captação de nutrientes e íons. Os transportadores secundários conservam o equilíbrio iônico celular. A atividade destes transportadores conserva níveis de K^+ e Na^+ intracelulares dentro de uma faixa ideal, de forma a não comprometer outras funções. Na Figura 1 pode-se visualizar o modelo dos transportadores de íons primário (Pma1p) e secundários. A expulsão de íons Na^+ é de responsabilidade da Ena1p que é uma bomba de sódio, cuja atividade também é ATP dependente assim como a Pma1p e V-ATPase. (MONK, 1995; GARCIADÉBLAS et al., 1993; SYCHROVÁ, et al., 1999).

Figura 1 - Vias de transporte para a manutenção da homeostase iônica em *S. cerevisiae*.



Fonte: Adaptado de ARIÑO et al, 2010.

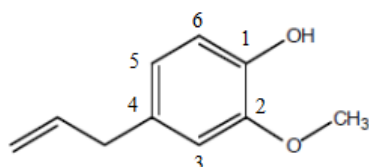
1.5 EUGENOL

O uso de espécies vegetais como estratégia terapêutica é praticado pela maioria das populações dos países em desenvolvimento. Além disso, muitos fármacos utilizados na medicina são provenientes de plantas, enquanto que outros fármacos são obtidos por semissíntese a partir de produtos naturais ou por síntese baseada em moléculas dessa fonte. 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).

Fenilpropanóides são moléculas hidrofóbicas, de baixo peso molecular, presente nos óleos essenciais de praticamente todas as plantas. Essas moléculas são sintetizadas nos tecidos das plantas, a partir do aminoácido fenilalanina e armazenadas em vesículas ou mesmo na parede celular. Os fenilpropanóides têm uma grande variedade de funções incluindo defesa contra bactérias, fungos e animais herbívoros (PICHERSKY et al., 2006).

O eugenol é um derivado fenilpropanóide (Figura 2), quimicamente designado como 4-alil-2-metoxifenol ou 2-metoxi-4-(2-propenil)fenol (MORRISON & BOYD, 1961), cuja fórmula molecular é $C_{10}H_{12}O_2$, possuindo um peso molecular de 164,21g/mol. À temperatura ambiente, o eugenol é um líquido viscoso amarelo pálido com um sabor forte de cravo. O eugenol é pouco solúvel em água e facilmente solúvel em solventes orgânicos. (KONG et al, 2014). Ele é conhecido comumente como essência de cravo, pois está presente em grande quantidade no óleo essencial de cravo da Índia (ESCOBAR, 2002).

Figura 2 - Estrutura do eugenol, com numeração oficial.



Fonte: do autor

Está presente também nos óleos essenciais de várias plantas, entre as quais, pode-se destacar: *Ocimum tenuiflorum* (KOTHARI et al., 2004); *Caryophyllus aromaticus*; *Ocimum gratissimum*, muito usada no Brasil no tratamento de distúrbios intestinais, sendo facilmente encontrada no Nordeste brasileiro (MADEIRA et al, 2005); *Eugenia caryophyllus*, *Dicopelium cariophyllatum*, Pimenta dioica (KIM et al, 1997; UEDA-NAKANURA et al, 2006). É possível encontrá-lo também na noz moscada, canela, folha de louro, sassafrás, mirra entre outros (KIM et al, 2003). Ele pode ser obtido por fracionamento de óleos essenciais de plantas, extraído de diversas partes delas (folhas, botões florais, frutos, ramos finos), por meio de destilação por arraste de vapor d'água (CRAVEIRO et al, 1981).

O eugenol vem sendo utilizado desde o século XVI e foi introduzido na odontologia em 1873 para, junto com o óxido de zinco, formar o eugenolato de zinco e ser aplicado diretamente na cavidade dentinária (ESCOBAR, 2002).

O eugenol com o óxido de zinco através de uma reação de quelação para formar o eugenolato de zinco. O eugenolato de zinco, quando analisado estruturalmente, apresenta conformação de grãos de óxido de zinco embebidos numa matriz de eugenolato de zinco. Ao ser exposto a meio aquoso como a saliva e o fluido dental ocorre uma hidrólise do eugenolato liberando hidróxido de zinco e eugenol que se difundem da dentina para a polpa, onde produz

efeitos anti-inflamatórios e anestésicos (MARKOWITZ et al, 1992). O eugenol também é utilizado nas formulações de antissépticos bucais e dentifrícios (ESCOBAR, 2002).

Várias propriedades farmacológicas do eugenol já foram relatadas na literatura, incluindo atividades como antibacteriana (CARRASCO, 2012; BARBOSA, 2012), antifúngica (AHMAD et al., 2010a; AHMAD et al., 2010b; AHMAD et al., 2010c), antiparasitária (MACHADO et al., 2011; UEDA-NAKAMURA et al., 2011), nociceptiva (Leal-Cardoso, 1994), antiviral (BOURNE et al., 1999; WRIGHT et al., 1995), anticarcinogênica (MANIKANDAN et al., 2010) e antioxidante (OLIVEIRA et al., 2007), incluindo potente modulação da glutathione-S-transferase, interferindo nos níveis intracelulares de glutathione (BUDAVARI, 1996).

Estudos tem mostrado que o eugenol possui atividade antifúngica contra *Candida albicans* (VILJOEN, 2012; RAKOTONIRAINY e LAVÉDRINE, 2005). Derivados do eugenol como acetileugenol, isoeugenol, e metileugenol também possuem atividade antifúngica contra os fungos *Betulina L.* e *Sulphureus L.* (SEN-SUNG et al., 2008). O mecanismo de ação antimicrobiano do eugenol ainda não é exatamente conhecido. Pesquisas demonstraram que a atividade antimicrobiana do eugenol é resultado de uma interação com a membrana celular dos microrganismos, danificando sua estrutura e alterando sua fluidez, aumentando a permeabilidade inespecífica. Isso induz a perda de íons e constituintes celulares, culminando em lise celular. (DEVI et al, 2010; DI PASQUA et al, 2006; KAMATOU; VERMAAK; VILJOEN, 2012).

O eugenol exibe atividade fungicida contra algumas espécies de *Candida*: (*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. glabrata*), sendo ativo também contra isolados resistentes ao fluconazol. O fluconazol, por sua vez, apresenta apenas ação fungistática. Além disso, o eugenol mostrou ser menos tóxico que os fármacos antifúngicos utilizados atualmente na clínica, lembrando que a toxicidade é a grande desvantagem das terapias antifúngicas atuais. O eugenol também apresentou atividade inibitória contra cepas de *Candida spp.*, testes bioquímicos e de microscopia eletrônica de varredura mostraram que o eugenol reduziu drasticamente o número de células fúngicas através da inibição dos transportadores do tipo H⁺-ATPase, isso pode ter levado a acidificação do citosol causando a morte do fungo (AHMAD, 2010c; PAULA, et al., 2014) .

Ahmad e colaboradores (2010c) examinaram a capacidade de bombeamento de prótons intracelulares para o meio externo de células de *Candida sp.* na presença de eugenol e observaram que a taxa de efluxo de H⁺ foi diminuída em 50%, sugerindo que o eugenol pode

exercer sua ação antifúngica através da inibição de bombas de efluxo (H^+ -ATPase) da membrana celular fúngica, levando à acidificação do meio intracelular e morte do fungo.

Foram observadas mudanças nas concentrações de cálcio e potássio no citosol de *Candida albicans* e *Saccharomyces cerevisiae* tratados com eugenol. Essas alterações foram diretamente proporcionais à concentração do eugenol. Foi observada, também, uma relação entre a diminuição do pH intracelular do fungo e as alterações dos íons em questão. Esse aumento de íons H^+ decorrente da inativação das H^+ -ATPase pode acabar com a força motriz do acoplamento dos transportadores secundários de H^+ , Ca^+ e K^+ , que conservam o equilíbrio iônico celular. Estes resultados reforçam a idéia de que a atividade antifúngica do eugenol é devida à alteração do gradiente de membrana, levando à desestabilização e ruptura da membrana plasmática (WANG et al, 2010).

Rao et al. (2010) também encontraram níveis semelhantes de cálcio e potássio citosólico em *Cândida albicans* e *Saccharomyces cerevisiae* pós exposição ao eugenol e a outros fenóis. O cálcio teve um pico nos primeiros minutos, enquanto que o potássio obteve um aumento inicial que se tornou constante em determinada concentração tomando a forma de um platô. Essas alterações foram acompanhadas de uma diminuição do pH citoplasmático e ruptura da membrana plasmática.

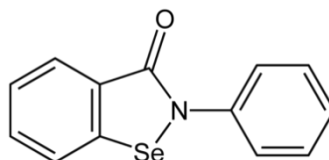
Carrasco e colaboradores (2012) sintetizaram alguns análogos estruturais do eugenol num esforço de elucidar a relação estrutura atividade dessas substância contra várias espécies de fungos patogênicos. Os pesquisadores concluíram que a hidroxila fenólica não tem papel relevante na ação antifúngica, uma vez que não foram observadas alterações relevantes na atividade de moléculas *o*-acetiladas ou *o*-metoxiladas. Ao contrário, a metoxila desempenha um papel importante na ação antifúngica dessas substâncias e sua alteração causa um decréscimo da atividade. Dos substituintes avaliados, a cadeia lateral alílica tem maior influência sob a atividade antifúngica, quando esse grupo foi oxidado, reduzido ou substituído houve uma diminuição ou perda total da atividade contra fungos testados.

1.6 EBSELEN

O interesse em compostos selenorgânicos remonta à década de 1920. Nas décadas seguintes, foram realizados outros estudos sobre essas substâncias, particularmente na Europa.

O ebselen (2-fenilbenzo[*d*][1,2]selenazol-3(2H)-ona - Figura 3) é um representante dessa classe de compostos, ele foi sintetizado pela primeira vez em 1924 por Lesser e Weiss. Ele apresenta diversas propriedades biológicas descritas, sendo a antioxidante a mais estudada (LESSER; WEISS, 1924; SIES, 1993; ZADE et al., 2005; AZAD, et al., 2014).

Figura 3 - Estrutura do Ebselen.



Fonte: do autor

Ebselen foi primeiramente testado em estudos clínicos pela Daiichi Pharmaceuticals em 1997 para tratamento de isquemia cerebral, mas o registro não foi autorizado pela Ministry of Health, Labour, and Welfare (MHLW), a autoridade reguladora japonesa. Os estudos clínicos na Europa não progrediram além da fase 1, principalmente por causa da preocupação da indústria farmacêutica com a possível toxicidade do selênio (IMAI, et al., 2001; TAKASAGO, et al., 1997). Em revisões de toxicologia e farmacologia, os autores questionaram a base toxicológica que foi usada na avaliação do desenvolvimento clínico e toxicológico do ebselen (NOGUEIRA, 2011; SCHEWE, 1995). Estudos sobre o mecanismo de ação, efeitos biológicos e desenvolvimento clínico do ebselen tem ganhado interesse dos pesquisadores em diversos polos científicos (SALUK, et al., 2013).

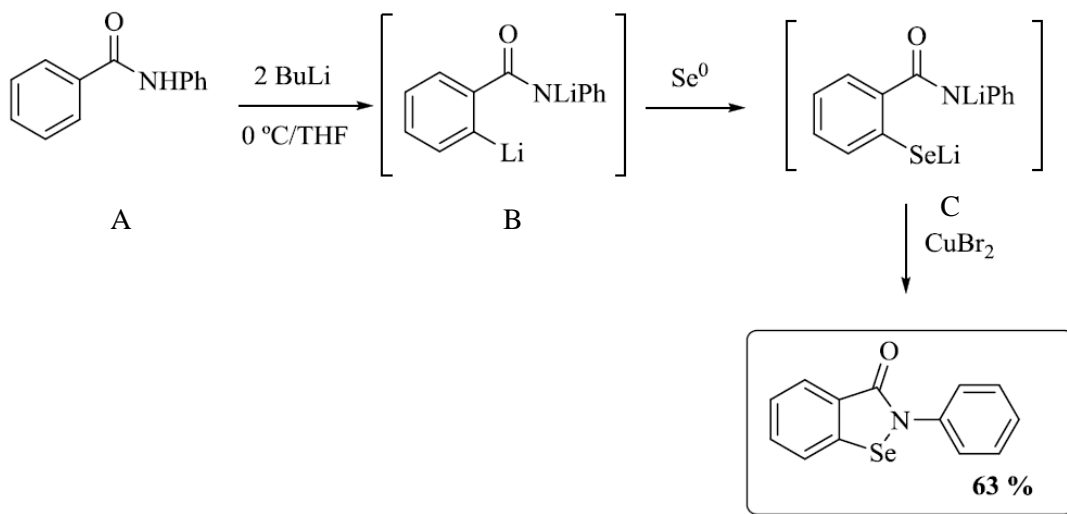
O ebselen exibe atividade mimética à enzima glutationa-peroxidase (GSH), ou seja, a redução de um hidroperóxido às custas de tiol. O controle das espécies reativas de oxigênio (EROs) nas células se dá principalmente pelo sofisticado sistema de defesa antioxidante dos organismos, especialmente através das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutationa peroxidase (GSH) que convertem essas espécies nocivas em metabólitos inócuos (URSINI, 1994). Nesse contexto, destaca-se a enzima glutationa-peroxidase, que é uma selenoenzima que atua catalisando a redução de peróxidos de hidrogênio e/ou peróxidos orgânicos (ROOH), consumindo tióis (glutaciona GSH), com formação de dissulfeto orgânico (glutaciona oxidada GSSG) e água e/ou álcoois (URSINI, 1994). Como consequência da sua ação, essa enzima exerce a função de proteger biomembranas e outros componentes celulares do estresse oxidativo (LUO, 1994; MAIORINO, 2005).

A atividade antioxidante do ebselen é semelhante à glutaciona-peroxidase (GSH-like). Uma variedade de derivados químicos tem sido sintetizada numa tentativa de aumentar a

especificidade, potência, diminuição da toxicidade (MULLER, et al. 1984). O ebselen em si é amplamente usado como uma ferramenta de pesquisa em estudos sobre hidroperóxidos e outras espécies reativas de oxigênio, principalmente porque seu mecanismo de ação, embora complexo, provou ser útil para o esclarecimento de processos oxidativos. Além disso, o ebselen tem demonstrado exercer efeitos seletivos sobre a geração de espécies oxidativas e sobre as reações catalisadas por enzimas específicas, muitas das quais não são relacionadas com a geração de espécies reativas de oxigênio (SIES, 1994).

Atualmente existem vários métodos descritos para a preparação do ebselen. Dentre estes, um dos mais utilizados foi descrito por Engman em 1989 (Figura 4). Esta metodologia consiste em uma reação “one pot” a partir do tratamento da *N*-fenilbenzamida **A** com dois equivalentes de butil lítio em THF, para gerar o diânion **B**. A adição de selênio elementar leva à formação do intermediário **C**, o qual é ciclizado mediante a adição do oxidante CuBr_2 para formar o ebselen em apenas uma etapa reacional com 63% de rendimento (ENGMAN, 1989).

Figura 4 - Esquema de síntese do ebselen.



Fonte: ENGMAN, 1989

Foi descoberto que o ebselen reage facilmente com pontes de dissulfeto e desse modo pode inibir uma série de enzimas, incluindo as proteínas quinases e H^+/K^+ ATPase gástrica. Este comportamento de inibição é observado frente às demais ATPases do tipo P, a principal proteína da membrana plasmática dos fungos, com baixa homologia em humanos e que é usada por fungos e outros fungos para estabelecer um gradiente eletroquímico de prótons através da membrana plasmática e para manter um pH intracelular apropriado (BILLACK,

2010). A inibição da H⁺-ATPase pelo ebselen resulta da interação covalente com os grupos tiol dos resíduos de cisteína, que são críticos para a atividade normal desse transportador. Alguns fatos indicou este mecanismo de ação. Um deles é a extrema facilidade com que o ebselen reage com grupos tiol endógenos, tais como os encontrados em certas enzimas e outras proteínas, para formar uma ligação enxofre-selênio com a abertura concomitante do anel isoselenazol. Outro fato é a correlação estreita que existe entre uma diminuição da capacidade de acidificação e uma diminuição da atividade da H⁺-ATPase (SOTEROPOULOS, 2000; PARNHAM, 2013).

Observou-se uma atividade antifúngica satisfatória do ebselen contra *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans* e *Saccharomyces cerevisiae*, em que foram observados a inibição da Pma1p e diminuição do pH citosólico, em valores de concentração inibitória mínima (CIM) de 5 a 10 µM. (SOTEROPOULOS, 2000; CHAN, 2007).

Chan e colaboradores também descobriram que o ebselen inibiu o crescimento de três estirpes de levedura de *Saccharomyces cerevisiae* de uma maneira dependente da concentração, com valores de CI₅₀ de 2,5 µM para as três estirpes. O presente estudo constatou, através de experimentos de análise de microscopia de varredura, que o ebselen possuía atividade fungicida. O ebselen também inibiu a atividade de H⁺-ATPase de *S. cerevisiae* de forma dependente da concentração, indicando que a ação fungicida do ebselen acontece, pela interferência na translocação de prótons devido à inativação da H⁺-ATPase.

No entanto, quantidades excessivas de ebselen são tóxicas para as células. Ebselen é genotóxico acima de uma concentração de 10 µM em células V79. Ele induz a apoptose em células HepG2 através de uma rápida depleção de tióis intracelulares. Em concentrações elevadas, estimula a liberação de Ca²⁺ a partir das mitocôndrias, através de um mecanismo NAD⁺ dependente de hidrólise. Isso acelera a respiração mitocondrial, o que é um indicativo de deterioração da função da mitocôndria (AZAD, 2014). Em doses baixas, ele exerce efeitos benéficos, enquanto que em doses elevadas, é tóxico e possivelmente cancerígeno. O limiar de concentração para estas atividades opostas ainda não está estabelecido (Miorelli, 2008).

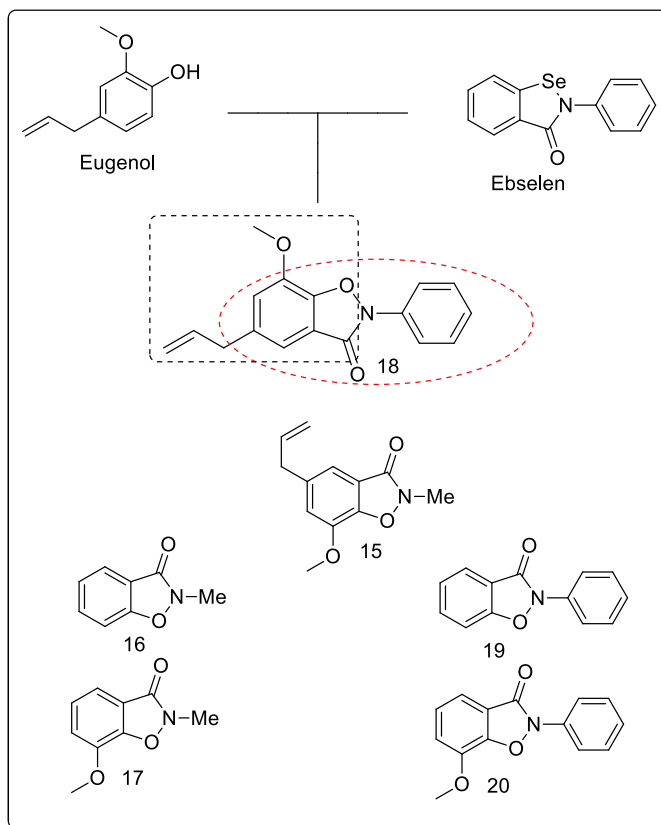
2 OBJETIVOS

Face ao exposto, o objetivo geral foi obter derivados benzisoxazolinônicos do eugenol e de fenóis correlatos que possam atuar como agentes antifúngicos.

Mais especificamente objetiva-se:

- Sintetizar produtos inéditos, que possuam o núcleo 1,2-benzisoxazolin-3-ona (Figura 5), com base na estratégia de hibridização molecular envolvendo a fusão da estrutura do ebselen e do eugenol ou análogos próximos.

Figura 5 - Estrutura do hírido eugenol-ebsele e dos derivados.



Fonte: do autor

- Avaliar a atividade antifúngica dos produtos frente às espécies de *Candida* sp. (*C. albicans*, *C. krusei* e *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsiloides*);
- Avaliar a citotoxicidade dos produtos frente a células sanguíneas monucleares humanas;
- Estabelecer relações preliminares e qualitativas entre a estrutura química dos derivados e as atividades observadas.

3 PARTE EXPERIMENTAL

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

3.1 QUÍMICA

As substâncias propostas foram sintetizadas no Laboratório de Pesquisa em Química Farmacêutica (LQFar) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNIFAL-MG. As etapas sintéticas foram executadas segundo técnicas clássicas de química orgânica ou por adaptação das mesmas. O planejamento sintético foi feito de acordo com os reagentes disponíveis no LQFar.

3.1.1 Procedimentos Gerais

A evolução das reações foi acompanhada por cromatografia em camada delgada de sílica (CCD), utilizando placas de sílica gel em suporte de alumínio com detector de fluorescência e placas de sílica sem o detector de fluorescência, ambas Macherey-Nagel. Foram utilizados reveladores tais como iodo e cloreto férrico. As purificações por cromatografia em coluna de sílica (CCS) foram realizadas com sílica gel 60, 70-230 mesh (Sorblin). Os eluentes empregados em ambos os casos estão descritos em cada procedimento.

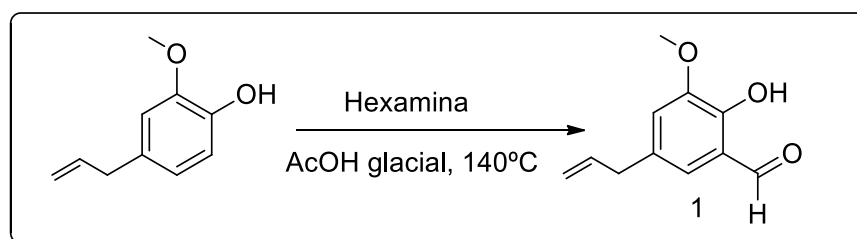
As análises por espectrometria na região do infravermelho (IV) foram realizadas em espectrômetros Shimadzu-Affinity-1 ou Thermo Scientific Nicolet-iS50 e os valores dados em número de onda ($\bar{\nu}_{\text{máx}}$, cm^{-1}). As faixas de fusão dos produtos foram obtidas utilizando-se um equipamento Buchi 535. As análises de ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C foram obtidas em espectrômetro Bruker AC-300, empregando-se como padrão interno o tetrametilsilano ou o sinal residual do solvente deuterado usado em cada caso. Os solventes utilizados foram o clorofórmio e DMSO deuterados. Os valores de deslocamento químico (δ) foram descritos em ppm. Ambas as análises foram realizadas no âmbito da UNIFAL-MG.

O diclorometano (DCM) e o tetraidrofurano (THF) foram previamente secos antes de serem utilizados nas etapas de formação do ácido hidroxâmico e ciclização. O DCM foi submetido a duas horas de refluxo utilizando-se como agente secante uma peneira molecular de 4 Å ativada. O THF foi seco com 5% p/v de sódio metálico, e aquecido a refluxo até mudança de coloração do indicador benzofenona para azul marinho.

3.1.2 SÍNTESE

3.1.2.1 Síntese do derivado 5-alil-2-hidroxi-3-metoxibenzaldeído (1; RAO et al. 1949)

Figura 6 - Reação de formilação do eugenol.

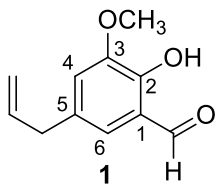


Fonte: do autor

Em um balão de fundo redondo foram dissolvidos o eugenol (32,6 mmol) e a hexamina (71,37 mmol) em aproximadamente 40 mL de ácido acético glacial. Deixou-se a mistura sob agitação magnética a 120°C por 5 horas. O acompanhamento da reação foi realizado por CCD (hexano/acetato de etila 7:3 v/v). Após o término da reação o ácido acético foi neutralizado com uma solução saturada de bicarbonato de sódio. Essa mistura foi extraída com éter etílico (4x50 mL). A fase orgânica, resultante da primeira extração, foi retro-extraída com uma solução de NaOH 10% p/v (4x50 mL). A fase aquosa foi resfriada e acidificada com HCl concentrado até pH 2 e, posteriormente, a solução foi extraída com éter etílico (4x50 mL). A fase orgânica foi concentrada em rotaevaporador e o produto foi então purificado por extração com éter de petróleo (5x20 mL). Após a extração, o éter de petróleo foi evaporado para obtenção do produto.

5-alil-2-hidroxi-3-metoxibenzaldeído

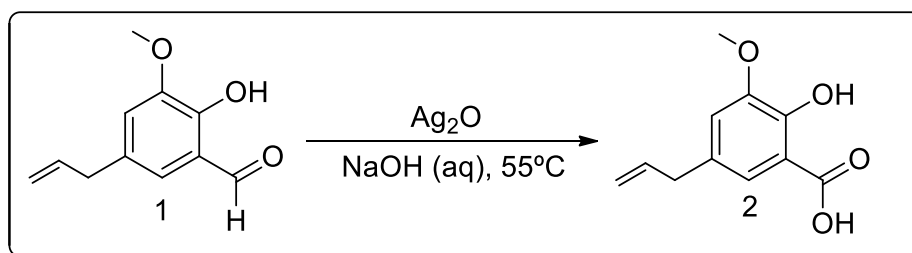
Sólido amarelo. Rendimento: 60,7 %

F.M.: C₁₁H₁₂O₃**M.M.:** 192 g.mol⁻¹

P.F: 44,8-46,4 °C; **IV ($\bar{\nu}/\text{cm}^{-1}$):** 3134 (O-H), 2968 (C-H), 2900 (C-H), 1655 (C=O), 1638 (C=C), 1508 (C=C), 1495 (C=C), 1261 (C-O). **RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃) δ :** 10,94 (1H, s, OH), 9,86 (1H, s, formílico), 6,97 (1H, dt, H-6, ⁴J= 2,1 ⁵J= 0,6 Hz), 6,93 (1H, d, H-4, ⁴J= 2,1), 5,92-5,86 (1H, m, CH₂=CH-CH₂), 5,12-5,06 (2H, m, CH₂=CH-CH₂), 3,89 (3H, s, OCH₃), 3,36 (2H, d, CH₂=CH-CH₂, ³J= 6,6). **RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ :** 196,6 (C=O), 150,1 (C3), 148,2 (C2), 136,8 (CH₂=CH-CH₂); 131,8 (C5), 123,78 (C4), 120,5 (C1), 118,7 (C6), 116,6(CH₂=CH-CH₂), 56,3 (OCH₃), 39,4 (CH₂=CH-CH₂).

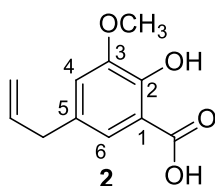
3.1.2.2 *Síntese do ácido 5-alil-2-hidroxi-3-metoxibenzóico (adaptado de PEARL, et al., 1963).*

Figura 7 - Reação de formação de **2**.



Fonte: do autor

Em um balão de fundo redondo foram adicionados o aldeído **1** (5,2 mmol) e 80 mL de solução de NaOH a 4 mol.L⁻¹. A mistura ficou sob agitação até a solubilização do aldeído. Em seguida, foi adicionado óxido de prata (4,32 mmol). A mistura reagente foi aquecida a 45°C sob agitação magnética até o termino da reação, que foi detectado por CCD (hexano/acetato de etila 7:3 v/v). Antes da análise em CCD, uma alíquota da mistura reagente foi neutralizada com uma solução 1 mol.L⁻¹ de HCl e extraída com acetato de etila e só assim aplicada na placa de CCD. Terminada a reação, a suspensão foi arrefecida e filtrada à pressão reduzida. O filtrado foi então acidificado até pH 3 com solução de HCl a 1 mol.L⁻¹. Na sequência, o mesmo foi extraído com acetato de etila (4x50 mL), o solvente eliminado em rotavapor e o sólido resultante foi purificado por CCS com hexano/acetato de etila 7:3 v/v.



ácido 5-alil-2-hidroxi-3-metoxibenzóico

Sólido branco. Rendimento: 80,3 %

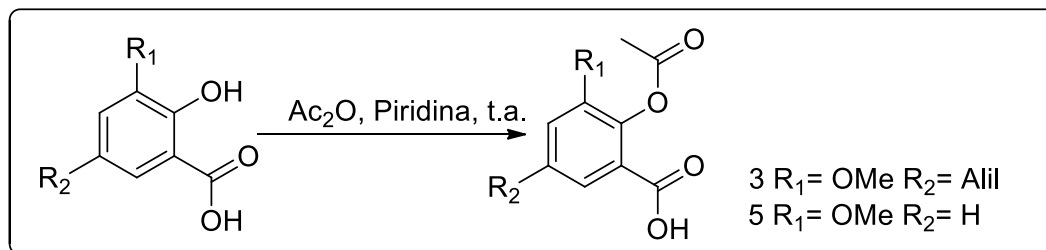
F.M.: C₁₁H₁₂O₄

M.M.: 208 g.mol⁻¹

P.F: 125,4-126,1 °C; **IV** ($\bar{\nu}/\text{cm}^{-1}$): 3061 (O-H), 2961 (C-H), 2922 (C-H), 1653 (C=O), 1610 (C=O), 1447 (C=C), 1264 (C-O), 1191 (C-O). **RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃)** δ : 10,48 (1H, s, OH), 7,33 (1H, dd, H-6, ⁴J= 2,1 ⁵J= 0,6 Hz), 6,92 (1H, d, H-4, ⁴J= 2,1 Hz), 6,01 - 5,87 (1H, m, CH₂=CH-CH₂), 5,12- 5,02 (2H, m, CH₂=CH-CH₂), 3,89 (3H, s, OCH₃), 3,33 (2H, d, CH₂=CH-CH₂, ³J= 6,6). **RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃)** δ : 174,8 (C=O), 151,0 (C3.), 148,5 (C2), 137,0 (CH₂=CH-CH₂); 130,8 (C5), 121,2 (C6), 118,4 (C4), 116,4 (CH₂=CH-CH₂), 111,4 (C1), 56,3 (OCH₃), 39,7 (CH₂=CH-CH₂).

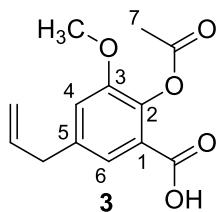
3.1.2.3 Síntese dos derivados O-acetilados 3 e 5 (adaptado de KURTI, et al. 2005)

Figura 8 - Reação de formação de 3 e 5.



Fonte: do autor

Em um balão de fundo redondo foi adicionado o fenol adequado (2,4 mmol) e o anidrido acético (4,8 mmol), em 5 mL de piridina. A mistura reagente foi deixada em agitação à temperatura ambiente até o consumo do material de partida. A reação foi acompanhada por CCD (hexano/acetato de etila 7:3 v/v). Ao término da reação a mistura foi acidificada com solução aquosa de HCl 1 molar até pH 3 e extraída com diclorometano (4x50 mL). A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ e evaporada à pressão reduzida.



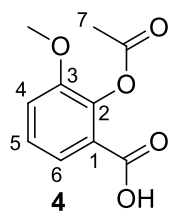
ácido 2-acetoxy-5-allyl-3-metoxibenzóico

Sólido branco. Rendimento: 80,3 %

F.M.: C₁₃H₁₄O₅

M.M.: 250,08 g.mol⁻¹

P.F: 121,2-121,9 °C; **IV** ($\bar{\nu}/\text{cm}^{-1}$): 2966 (C-H), 2929 (C-H), 1765 (C=O), 1694 (C=O), 1680 (C=C), 1591 (C=C), 1467 (C=C), 1269 (C-O), 1183 (C-O). **RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃)** δ : 7,47 (1H, dd, H-6, ⁴J= 2,1 ⁵J= 0,6 Hz), 7,01 (1H, d, H-4, ⁴J= 2,1 Hz), 6,03 – 5,88 (1H, m, CH₂=CH-CH₂), 5,17 – 5,10 (2H, m, CH₂=CH-CH₂), 3,84 (3H, s, OCH₃), 3,73 (2H, d, CH₂=CH-CH₂, ³J= 6,6 Hz), 2,34 (3H, s, 7-H). **RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃)** δ : 169,9 (C=O de ácido carboxílico), 169,3 (C=O de éster), 152,1 (C3), 139,5 (C2), 138,7 (C5), 136,3 (CH₂=CH-CH₂), 123,2 (C6), 123,1 (C1), 117,6 (C4), 117,0 (CH₂=CH-CH₂), 56,4 (OCH₃), 40,0 (CH₂=CH-CH₂), 20,8 (C7).



ácido 2-acetoxy-3-metoxibenzóico

Sólido branco. Rendimento: 95,8 %

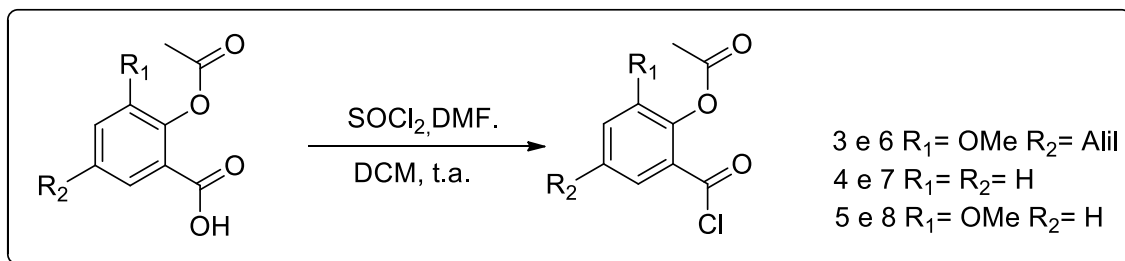
F.M.: C₁₀H₁₀O₅

M.M.: 210,05 g.mol⁻¹

P.F: 125,8-126,7 °C; **IV** ($\bar{\nu}/\text{cm}^{-1}$): 1759 (C=O), 1698 (C=O), 1631 (C=C), 1579 (C=C), 1476 (C=C), 1275 (C-O), 1163 (C-O). **RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃)** δ : 7,42 (1H, dd, H-6, ³J= 7,3 ⁴J= 2,3 Hz), 7,36-7,28 (2H, m, H-5, H-4), 3,78 (3H, s, OCH₃), 2,21 (3H, s, 7-H). **RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃)** δ : 168,4 (C=O ácido carboxílico), 165,6 (C=O éster), 151,8 (C3), 139,2 (C2), 126,3 (C5), 125,1 (C6), 122,1 (C1), 116,5 (C4), 58,1 (OCH₃), 20,5 (C7).

3.1.2.4 Síntese dos cloretos de ácido **6**, **7** e **8** (adaptado de KHALIKOV, et al 2006)

Figura 9 - Reação de formação de **6**, **7** e **8**.

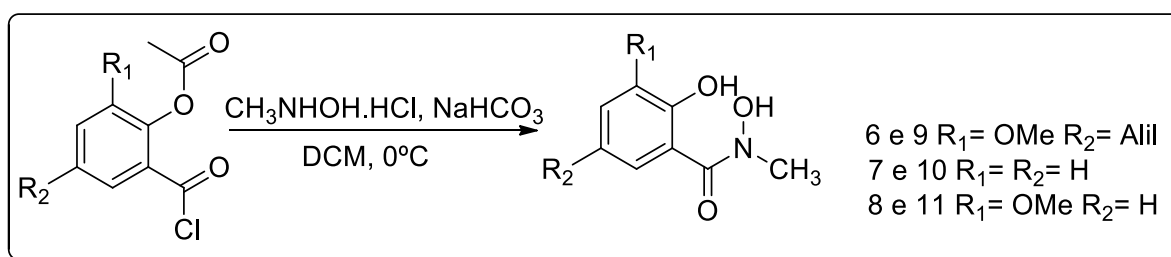


Fonte: do autor

Em um balão de fundo redondo adicionou-se o ácido carboxílico adequado (2,8 mmol) em quantidade suficiente de diclorometano seco para solubiliza-lo. Em seguida adicionou-se o cloreto de tionila (5,6 mmol) e uma quantidade catalítica de DMF (duas gotas). A mistura foi deixada sob agitação por 12 horas à temperatura ambiente. Devido à instabilidade do cloreto de ácido, o produto não foi isolado, mas utilizado imediatamente nas reações seguintes.

3.1.2.5 Síntese dos ácidos *N*-metilidroxâmicos **9**, **10** e **11** (adaptado de JING, et al. 2013, Shi, 2000)

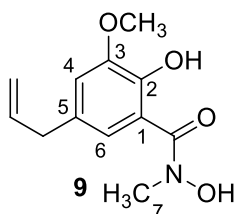
Figura 10 - Reação de formação de **9**, **10** e **11**.



Fonte: do autor

Em um balão de fundo redondo contendo diclorometano seco, foram adicionados o cloridrato de *N*-metilidroxilamina (3,0 mmol) e bicarbonato de sódio (15,0 mmol). Essa suspensão foi deixada em agitação por 10 min a 0°C e, então, adicionou-se, gota a gota com o auxílio de um funil de adição, o respectivo cloreto de ácido obtido no procedimento anterior. A reação foi acompanhada por CCD (hexano/acetato de etila 1:1 v/v). Ao término da reação o

sólido foi separado por filtração e o solvente do filtrado evaporado em rotaevaporador. O óleo resultante foi purificado por CCS (hexano/acetato 8:2 v/v).



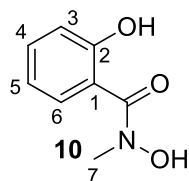
5-*alil*-*N*,2-diidroxi-3-metoxi-*N*-metilbenzamida

Óleo castanho. Rendimento: 73,1 %

F.M.: C₁₂H₁₅NO₄

M.M.: 237 g.mol⁻¹

IV ($\bar{\nu}/\text{cm}^{-1}$): 3177 (O-H), 2932 (C-H), 2839 (C-H), 1616 (C=O), 1577 (C-C), 1490 (C-C), 1262 (C-O), 1187 (C-O). **RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃)** δ : 6,85 (1H, s, H-6), 6,75 (1H, d, H-4, ⁴J= 1,5 Hz), 5,94 – 5,83 (1H, m, CH₂=CH-CH₂), 5,09 – 5,02 (2H, m, CH₂=CH-CH₂), 3,86 (3H, s, OCH₃), 3,38 (3H, s, H-7), 3,29 (2H, d, CH₂=CH-CH₂, ³J= 6,6 Hz). **RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃)** δ : 165,6 (C=O), 147,5 (C3), 143,8 (C2), 137,1 (CH₂=CH-CH₂), 131,5 (C5), 120,4 (C6), 117,2 (C1), 116,2 (C4), 114,0 (CH₂=CH-CH₂), 56,2 (OCH₃), 39,7 (CH₂=CH-CH₂), 37,9 (C7).



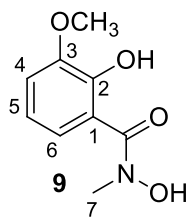
N,2-diidroxi-*N*-metilbenzamida

Sólido branco. Rendimento: 70,9 %

F.M.: C₈H₉NO₃

M.M.: 167 g.mol⁻¹

P.F: 120,1-121,3°C; **IV** ($\bar{\nu}/\text{cm}^{-1}$): 3094 (O-H), 1625 (C=O), 1608 (C=C), 1504 (C=C), 1449 (C=C), 1245 (C-O), 1185 (C-O). **RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃)** δ : 10,11 (1H, s, OH), 9,86 (1H, s, N-OH), 7,30 (1H, d, H-6, ³J= 7,4 Hz), 7,26 – 7,20 (1H, m, H-4), 6,88 – 6,78 (2H, m, H-3, H-5), 3,18 (3H, s, H-7). **RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃)** δ : 166,7 (C=O), 155,0 (C2), 130,7 (C4), 128,7 (C6), 122,0 (C5), 118,5 (C1), 115,9 (C3), 37,2 (C7).



N,2-diidroxi-3-metoxi-*N*-metilbenzamida

Sólido castanho. Rendimento: 74,4 %

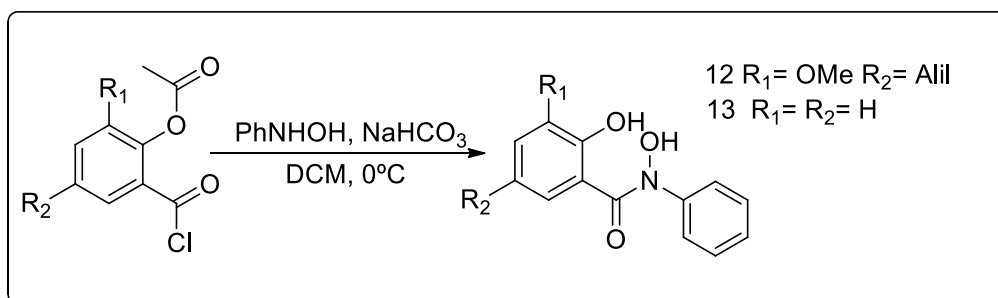
F.M.: C₉H₁₁NO₄

M.M.: 197 g.mol⁻¹

P.F.: 101,7-103,7 °C; **IV** ($\bar{\nu}/\text{cm}^{-1}$): 3115 (O-H), 1617 (C=O), 1584 (C=C), 1484 (C=C), 1238 (C-O), 1049 (C-O). **RMN-¹H** (300 MHz, CDCl₃) δ : 7,42 (1H, d, H-6, ³J= 7,7 Hz), 6,91 (1H, d, H-5, ³J= 7,8 ⁴J= 1,2 Hz), 6,82 (1H, t, H-4, ³J= 8,0 Hz), 3,87 (3H, s, OCH₃), 3,37 (3H, s, H-7). **RMN-¹³C** (75 MHz, CDCl₃) δ : 165,83 (C=O), 147,73 (C3), 145,97 (C2), 120,90 (C5), 119,48 (C6), 117,31 (C1), 113,61 (C4), 56,25 (OCH₃), 37,96 (C7).

3.1.2.6 Tentativa de síntese dos ácidos *N*-fenilidroxâmicos 12 e 13 (adaptado de JING, et al. 2013, Shi, 2000).

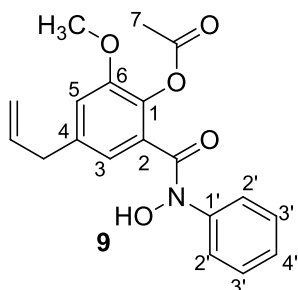
Figura 11 - Reação de formação de 12, 13 e 14.



Fonte: do autor.

Em um balão de fundo redondo, foram solubilizados a *N*-fenilidroxilamina (2,0 mmol) e o bicarbonato de sódio (10,0 mmol) em diclorometano seco. Essa suspensão foi deixada em agitação por 10 min a 0°C e, então, adicionou-se, gota a gota com o auxílio de um funil de adição, a mistura reagente obtida no procedimento 3.1.2.4. A reação foi acompanhada por CCD (hexano/acetato 7:3 v/v). Ao término da reação o sólido foi separado por filtração e, o solvente do filtrado, foi evaporado em rotaevaporador. Em seguida, uma solução de NaOH 10% foi adicionada à mistura até pH 9, a mistura foi deixada em agitação por 10 minutos. Passado esse tempo, HCl 2 Mol.L⁻¹ foi adicionada à mistura até pH 3 e o produto foi extraído com acetato de etila (3 x 25 mL). A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro. Após

filtração e remoção do solvente sob pressão reduzida, os produtos obtidos foram purificados por cromatografia (hexano/acetato de etila 9:1 v/v).



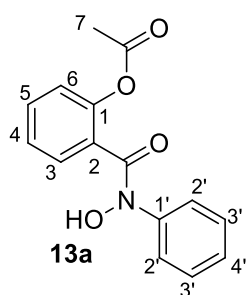
Acetato de 4-aliil-2-(hidroxi(fenil)carbamoil)-6-metoxifenila

Óleo castanho. Rendimento: 33,6 %

F.M.: C₁₉H₁₉NO₅

M.M.: 341 g.mol⁻¹

RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃) δ : 8,03 (1H, s, OH), 7,59 (2H, d, H-2', $J^3 = 7,5$ Hz), 7,37 – 7,32 (2H, m, H-3'), 7,22 (1H, d, H-3, $^4J = 1,6$ Hz), 7,14 (1H, ddd, H-4, $^3J = 8,5$ $^4J = 2,2$ $^5J = 1,1$ Hz), 6,91 (1H, d, H-5, $^4J = 1,6$ Hz), 6,00 – 5,88 (1H, m, CH₂=CH-CH₂), 5,17 – 5,10 (2H, m, CH₂=CH-CH₂), 3,84 (3H, s, OCH₃), 3,41 (2H, d, CH₂=CH-CH₂, $^3J = 6,6$ Hz), 2,32 (3H, s, CH₃). **RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃)** δ : 169,2 (C=O de éster), 163,4 (C=O de hidroxâmico), 151,2 (C6), 139,4 (C1'), 137,4 (C1), 136,2 (CH₂=CH-CH₂), 135,3 (C4), 129,9 (C2), 129,0 (C3'), 124,5 (C4'), 120,7 (C3), 119,7 (C2'), 116,8 (C5), 114,8 (CH₂=CH-CH₂), 56,2 (OCH₃), 39,9 (CH₂=CH-CH₂), 20,5 (C7).



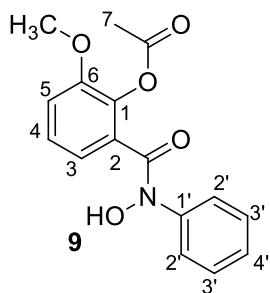
Acetato de 2-(hidroxi(fenil)carbamoil)fenila

Óleo castanho. Rendimento: 26,8 %

F.M.: C₁₅H₁₃NO₄

M.M.: 271 g.mol⁻¹

IV ($\bar{\nu}/\text{cm}^{-1}$): 3633 (O-H), 3059 (C-H), 3034 (C-H), 1791 (C=O), 1654 (C=O), 1481 (C=C), 1249 (C-O), 1161 (C-O). **RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃)** δ : 8,09 (1H, s, OH), 7,83 (1H, d, H-3, $^3J = 7,5$ Hz), 7,6 (2H, d, H-2', $^3J = 7,8$ Hz), 7,51 (1H, m, H-4), 7,38 – 7,31 (3H, m, H-5, H-3), 7,17 – 7,12 (2H, m, H-6, H-4'), 2,32 (3H, s, CH₃). **RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃)** δ : 169,4 (C=O de éster), 163,7 (C=O, hidroxâmico), 147,8 (C1), 137,5 (1C, C1'), 132,2 (C5), 130,0 (C3), 129,2 (C3'), 128,9 (C2), 126,6 (C4'), 124,8 (C4), 123,4 (C6), 120,0 (C2'), 21,1 (C7).



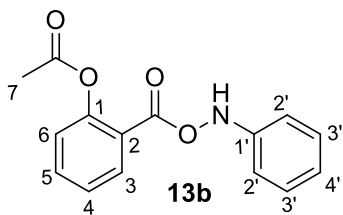
Acetato de 2-(hidroxi(fenil)carbamoil)-6-metoxifenila

Óleo castanho. Rendimento : 41,2 %

F.M.: C₁₆H₁₅NO₅

M.M.: 301 g.mol⁻¹

RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃) δ: 3,85 (s, 3H, OCH₃), 7,39 – 7,33 (m, 6H, H-4, H-5, H-6, H-3', H-4'), 7,59 (d, 2H, H-2', *J* = 7.5 Hz), 8,04 (s, 1H, NOH), 9,61 (s, 1H, OH). **RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ:** 169,1 (C=O de éster), 163,4 (C=O hidroxâmica), 149,3 (C6), 140,7 (C1), 137,8 (C1'), 130,3 (C4'), 129,4 (C3'), 127,2 (C2'), 124,6 (C4), 119,7 (C5), 114,6 (C2), 114,4 (C6), 56,2 (OCH₃), 20,5 (C7).



Acetato de 2-(hidroxi(fenil)carbamoil)fenila

Sólido branco. Rendimento 6,3 %

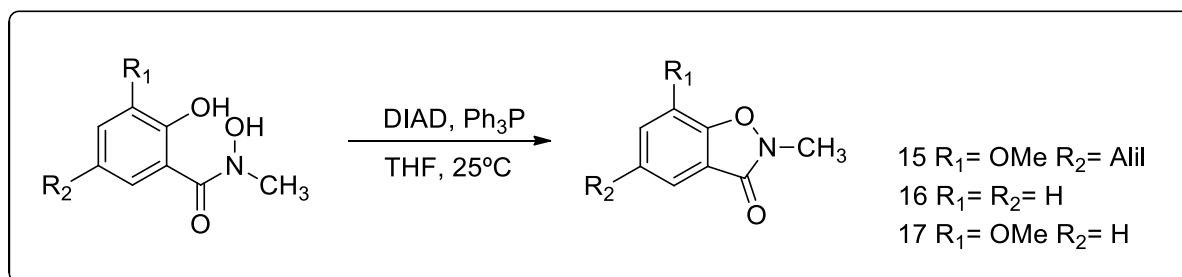
F.M.: C₁₅H₁₃NO₄

M.M.: 271 g.mol⁻¹

P.F: 168,1 – 170,3 °C. **RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃) δ:** 10,38 (1H, s, NH), 7,38 – 7,34 (5H, m, H-3, 2'-H, 3'-H), 7,29 – 7,24 (1H, m, 4'-H), 7,03 – 6,94 (2H, m, H-4, H-5), 6,57 – 6,50 (1H, m, H-6), 2,24 (3H, s, CH₃). **RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ:** 168,7 (éster, C=O), 167,8 (éster, C=O), 160,8 (C1), 141,2 (C1'), 134,2 (C5), 130,1 (C3), 129,7 (C3'), 129,4 (C4'), 127,6 (C2'), 118,5 (C3), 118,3 (C6), 113,8 (C2), 18,4 (C7).

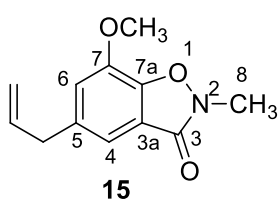
3.1.2.7 Síntese dos derivados 2-metilbenzoxasolinônicos **15**, **16** e **17** (adaptado de Shi, 2000)

Figura 12 - Reação de formação de **15**, **16** e **17**.



Fonte: do autor.

Em um balão de fundo redondo sob atmosfera de nitrogênio foram solubilizados o derivado *N*-metilhidroxâmico (0,8 mmol) e a trifenilfosfina (1,1 mmol) em 10 ml de THF seco. Essa solução foi deixada em agitação por 10 min a 0°C. Em seguida foi adicionado a essa solução, gota a gota com o auxílio de uma seringa, o DIAD (1,1 mmol). A reação foi acompanhada por CCD (hexano/acetato de etila 7:3 v/v). Após 24 horas, com o término da reação, o solvente foi evaporado em rotaevaporador. O óleo resultante foi purificado por CCS (hexano/acetato de etila 8:2 v/v).



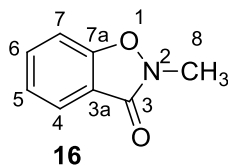
5-alil-7-metoxi-2-metilbenzo[d]isoxazol-3(2H)-ona

Óleo incolor. Rendimento: 64,5 %

F.M.: C₁₂H₁₃NO₃

M.M.: 219 g.mol⁻¹

IV ($\bar{\nu}/\text{cm}^{-1}$): 2978 (C-H), 2921 (C-H), 2839 (C-H), 1667 (C=O), 1618 (C=C), 1508 (C=C), 1437 (C=C), 1259 (C-O), 1231 (C-O). **RMN-¹H** (300 MHz, CDCl₃) δ : 7,18 (1H, d, H-4, ⁴J= 1,5 Hz), 6,86 (1H, d, H-6, ⁴J= 1,5 Hz), 5,98 – 5,86 (1H, m, CH₂=CH-CH₂), 5,11 – 5,05 (2H, m, CH₂=CH-CH₂), 3,94 (3H, s, OCH₃), 3,64 (3H, s, CH₃), 3,42 (2H, dd, CH₂=CH-CH₂, ³J= 3,9 ⁴J= 3,4 Hz). **RMN-¹³C** (75 MHz, CDCl₃) δ : 162,8 (C=O), 148,7 (C7), 143,7 (C7a), 136,9 (CH₂=CH-CH₂), 136,8 (C5), 117,9 (C3a), 116,6 (C4), 115,2 (C6), 114,6 (CH₂=CH-CH₂), 56, (OCH₃), 40,0 (CH₂=CH-CH₂), 32,8 (C8).



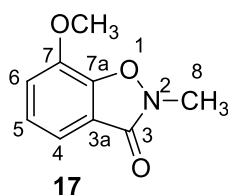
2-metilbenzo[d]isoxazol-3(2H)-ona

Óleo incolor. Rendimento: 70,3 %

F.M.: C₈H₇NO₂

M.M.: 149 g.mol⁻¹

IV ($\bar{\nu}/\text{cm}^{-1}$): 2980 (C-H), 2935 (C-H), 1668 (C=O), 1608 (C=C), 1443 (C=C), 1240 (C-O), 1107 (C-O). **RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃)** δ : 7,84 - 781 (1H, m, H-4), 7,60 (1H, ddd, H-6, ³J= 9,4 ⁴J= 7,3 ⁵J= 1,3 Hz), 7,29 - 7,20 (2H, m, H-5, 7-H), 3,67 (3H, s, CH₃). **RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃)** δ : 165,1 (C=O), 159,8 (C7a), 133,1 (C6), 128,5 (C4), 124,2 (C5), 123,5 (C3a), 109,7 (C7), 32,5 (C8).



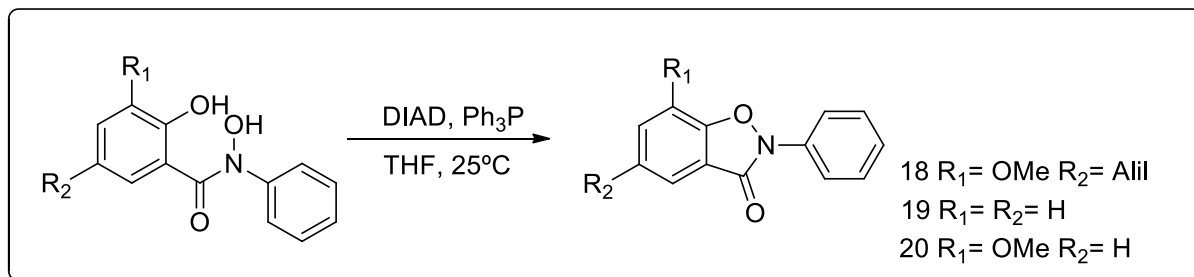
7-metoxi-2-metilbenzo[d]isoxazol-3(2H)-ona

Sólido branco. Rendimento: 50,3 %

F.M.: C₉H₉NO₃

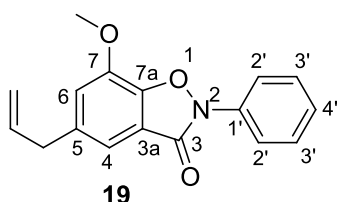
M.M.: 179 g.mol⁻¹

P.F.: 86,9-88,1 °C; **IV** ($\bar{\nu}/\text{cm}^{-1}$): 2967 (C-H), 2917 (C-H), 2839 (C-H), 1653 (C=O), 1623 (C=C), 1507 (C=C), 1436 (C=C), 1275 (C-O), 1073 (C-O). **RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃)** δ : 7,36 (1H, dd, H-4, ³J= 7,8 ⁴J= 1,1 Hz), 7,16 (1H, t, H-5, ³J= 7,8 Hz), 7,04 (1H, dd, H-6, ³J= 7,8 ⁴J= 1,1 Hz), 3,96 (3H, s, OCH₃), 3,66 (3H, s, CH₃). **RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃)** δ : 162,7 (C=O), 149,9 (C7), 144,0 (C7a), 124,3 (C5), 118,0 (C3a), 115,4 (C4), 114,7 (C6), 58,3 (OCH₃), 32,7 (C8).

3.1.2.8 Síntese dos derivados 2-fenilbenzoxasolinônicos **18**, **19** e **20** (adaptado de Shi, 2000)Figura 13 - Reação de formação de **18**, **19** e **20**.

Fonte: do autor.

Em um balão de fundo redondo sob atmosfera de nitrogênio foram solubilizados o derivado *N*-fenilhidroxâmico adequado (0,8 mmol) e a trifenilfosfina (1,1 mmol) em 10 ml de THF seco. Essa solução foi deixada em agitação por 10 min a 0°C. Em seguida foi adicionado a essa solução, gota a gota com o auxílio de uma seringa, o DIAD (1,1 mmol). A reação foi acompanhada por CCD (hexano/acetato de etila 8:2 v/v). Após 24 horas, com o término da reação, o solvente foi evaporado em rotaevaporador. O óleo resultante foi purificado por CCS (hexano/acetato de etila 9:1 v/v).

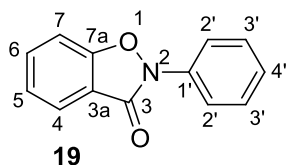
**5-ailil-7-metoxi-2-metilbenzo[d]isoxazol-3(2H)-ona**

Sólido branco. Rendimento: 10,3 %

F.M.: C₁₇H₁₅NO₃

M.M.: 281 g.mol⁻¹

P.F: 91,3-92,7 °C. **RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃)** δ : 7.92 (d, 2H, H-2', ³J= 7.5 Hz), 7.54 – 7.42 (d, 1H, H-3, H-2, H-3'), 7.37 – 7.32 (m, 2H, H-3'), 7.28 – 7.25 (m, 1H, H-4), 6.94 (d, 1H, H-5, J= 1.6 Hz), 5.96 – 5.86 (m, 1H, CH), 5.15 – 5.04 (m, 2H, CH₂), 4.00 (s, 3H, OCH₃), 3.33 (d, 2H, CH₂, J= 6,6 Hz). **RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃)** δ : 159.6 (C=O), 153.2 (C7), 143.6 (C1'), 139.8 (C7a), 137.1 (CH), 136.6 (C5), 129.7 (C3'), 129.0 (C4), 128.2 (C4'), 125.5 (C2'), 119.7 (C3a), 117.6 (C6), 116.8 (CH₂), 40,4 (CH₂), 56.9 (OCH₃)



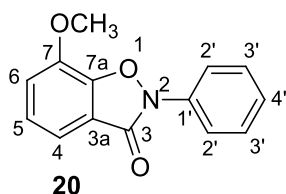
19

2-fenilbenzo[d]isoxazol-3(2H)-ona

Sólido branco. Rendimento: 30,3 %

F.M.: C₁₃H₉NO₂M.M.: 211 g.mol⁻¹

P.F: 80,7-81,5 °C **IV** ($\bar{\nu}/\text{cm}^{-1}$): 3016 (C-H), 2920 (C-H), 2851 (C-H), 1693 (C=O), 1594 (C=C), 1496 (C=C), 1204 (C-O). **RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃)** δ : 7,92 - 7,89 (3H, m, H-4, H-2'), 7,68 - 7,62 (1H, m, H-6), 7,50 - 7,44 (2H, m, H-3'), 7,34 - 7,25 (3H, m, H-5, 7-H, H-4'). **RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃)** δ : 159,4 (C=O), 159,1 (C7a), 136,7 (C1'), 133,7 (C6), 129,1 (C3'), 125,9 (C4), 124,6 (C4'), 123,9 (C5), 117,4 (C2'), 117,1 (C3a), 109,7 (C7).



20

7-metoxi-2-fenilbenzo[d]isoxazol-3(2H)-ona

Sólido branco. Rendimento: 25,6 %

F.M.: C₁₄H₁₁NO₃M.M.: 241 g.mol⁻¹

P.F: 108,1-111,5 °C **IV** ($\bar{\nu}/\text{cm}^{-1}$): 3058 (C-H), 2979 (C-H), 2939 (C-H), 1686 (C=O), 1591 (C=C), 1369 (C=C), 1268 (C-O), 1067 (C-O). **RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃)** δ : 7,95 (2H, d, H-2', ⁴J= 7,6 Hz), 7,52 - 7,47 (3H, m, H-3', H-4), 7,26 (2H, t, H-4, H-5), 7,14 (1H, dd, H-6, ³J= 8,0 ⁴J= 1,0 Hz) 4,03 (3H, s, OCH₃). **RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃)** δ : 159,7 (C=O), 149,27 (C7), 144,1 (C1'), 136,8 (C7a), 129,2 (C3'), 126,1 (C4'), 125,2 (C5), 124,7 (C4), 117,8 (C2'), 115,7 (C3a), 115,0 (C6), 56,4 (OCH₃).

3.2 AVALIAÇÃO BIOLÓGICA

Foi avaliada a atividade antifúngica *in vitro* dos produtos finais e seus precursores, bem como sua citotoxicidade frente a células humanas saudáveis.

A atividade antifúngica foi avaliada no Laboratório de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da UNIFAL-MG, com a supervisão da Prof^a. Dra. Amanda Latércia Tranches Dias.

A avaliação de citotoxicidade foi realizada no Laboratório de Vacinas do Instituto de Ciências Biomédicas da UNIFAL-MG, pelo Prof. Dr. Luiz Felipe Leomil Coelho.

3.2.1 Avaliação da atividade antifúngica.

A determinação dos valores de concentração inibitória foi realizada 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*).

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

A avaliação foi feita em placas de microdiluição contendo 96 poços 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.

3.2.2 Avaliação da citotoxicidade frente à células sanguíneas monucleares periféricas humanas.

Os produtos sintetizados foram avaliados quanto à citotoxicidade frente a células sanguíneas monucleares 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 $\mu\text{g/mL}$ e incubados a 37 °C em um incubador a 5% de CO_2 por 48

h. Em seguida, foram adicionados 10 μL do corante tetrazóico (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 $[(A-B)/A \times 100]$, 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 CC_{50} (concentração citotóxica para 50%). Os índices de seletividade foram expressos como a razão $\text{CC}_{50}/\text{CI}_{50}$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

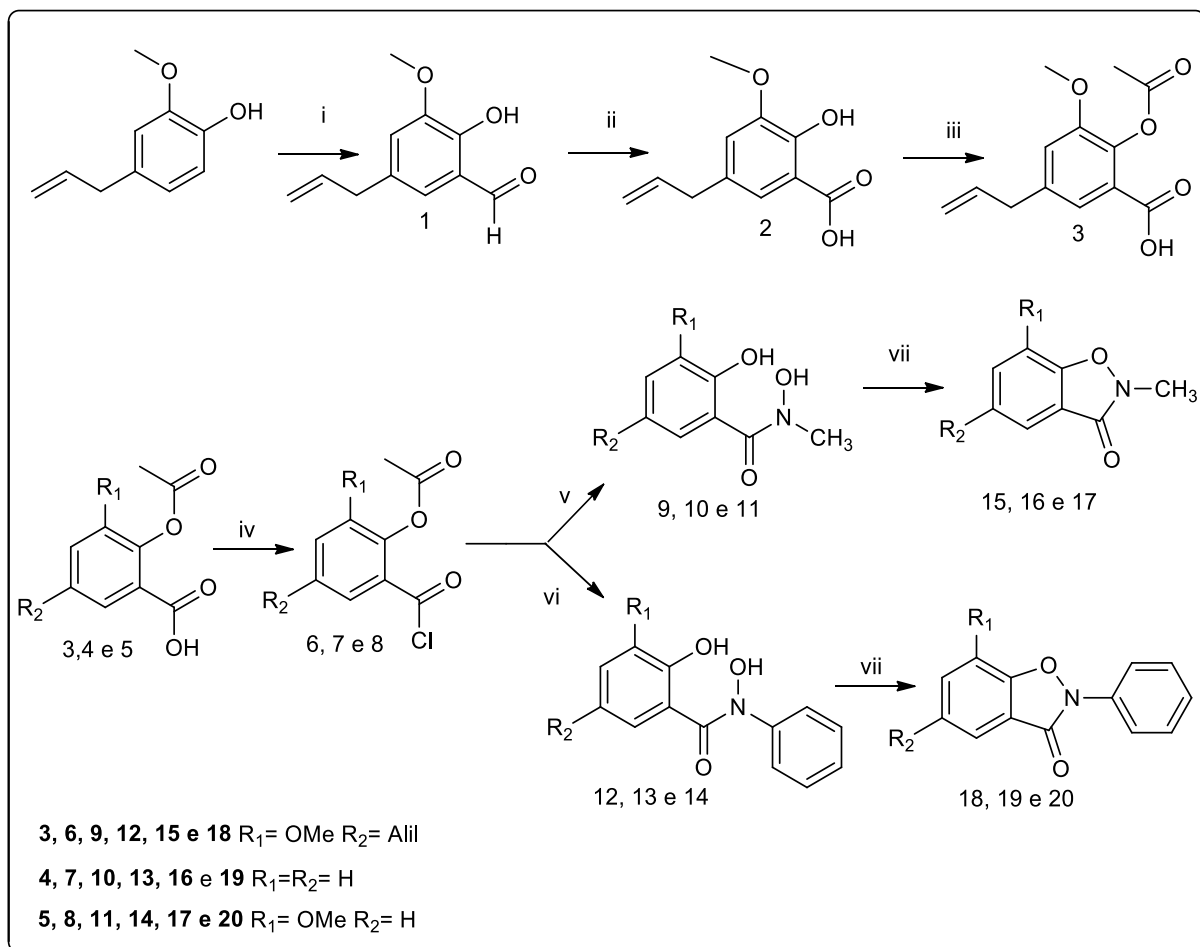
Em face da atividade do eugenol e do ebselen como antifúngicos, possivelmente por atuar como inibidores da H^+ -ATPase, procurou-se sintetizar um protótipo capaz de inativar esse transportador de prótons em fungos através da estratégia de hibridização molecular. O híbrido proposto foi uma benzisoxazolinona constituída por subunidades provenientes do eugenol e outras relacionadas ao ebselen. Outra estratégia utilizada foi a troca isostérica do selênio presente no ebselen por um átomo de oxigênio. Essa mudança se deu a fim de avaliar a toxicidade da molécula, visto que algumas pesquisas mostraram que a fonte de toxicidade do ebselen advém do selênio (MEOTTI et al., 2003). Isto também permitiria avaliar a influência da substituição isostérica na atividade biológica do híbrido, pois o oxigênio tem menor capacidade de interagir com pontes de dissulfeto, porém pode haver alguma interação catalítica entre o ciclo benzisoxazolinônico com outras moléculas portadoras de grupos funcionais à base de enxofre. Estudos semelhantes com análogos do ebselen, nos quais houve a troca do selênio por enxofre, oxigênio e carbono mostram que a atividade biológica é mantida. Um exemplo disso é o estudo de Thomas e colaboradores que avaliaram como essas mudanças bioisostéricas influenciariam na inibição da glutaminase e verificaram que os análogos permanecem ativos (THOMAS et al., 2013).

Além do híbrido com o eugenol, foram planejados híbridos com estruturas análogas, a fim de avaliar como esses grupos afetariam a atividade biológica. Isso foi planejado levando em conta a presença ou ausência da cadeia lateral alílica e da metoxila ligada ao anel aromático do biciclo, seguindo os estudos de Carrasco e colaboradores (2012). Analisou-se também os substituintes metila ou fenila ligados diretamente ao nitrogênio do heterociclo, já que os mesmos conferem perfis eletrônicos de estabilidade diferentes para o sistema benzisoxazolinônico, como foi mostrado por Sheradsky e Avramovici (1978).

4.1 QUÍMICA

Na figura 14 está representado o esquema sintético seguido. Para a síntese dos produtos finais planejados, foi necessário inicialmente, a preparação dos derivados acetilsalicilato (compostos **3** e **5**, respectivamente) do eugenol e do ácido 2-hidroxi-3-metoxibenzóico, sendo estes fenóis disponíveis comercialmente. Uma vez obtidos, poderiam seguir, junto ao ácido acetilsalicílico (**4**), a rota sintética comum.

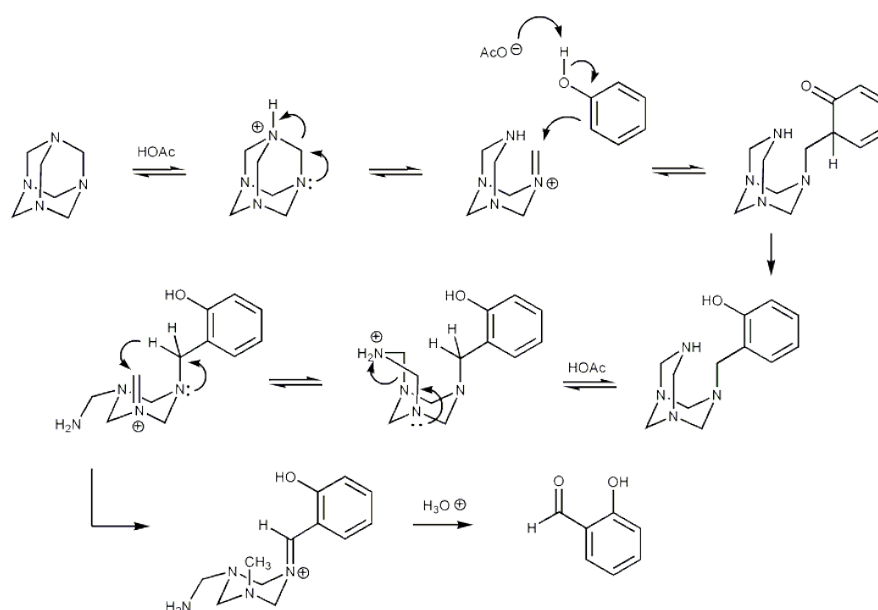
Figura 14 - Rota sintética para obtenção dos derivados benzisoxazolinônicos (i: hexamina, HAC glacial, 140°C; ii: Ag₂O, NaOH (aq), 25°C; iii: Ac₂O, piridina, 25°C; iv: SOCl₂, DMF, DCM, 25°C; v: CH₃NHOH.HCl, Na₂HCO₃, DCM, 0°C; vi: PhNHOH, Na₂HCO₃, DCM, 0°C; vii: DIAD, Ph₃P, THF, 0-25°C).



Fonte: do autor.

Nesse sentido, a reação de formilação do eugenol foi realizada conforme descrito por (RAO et al. 1949) empregando-se a metodologia conhecida por reação de Duff ou formilação aromática com hexamina. Essa é uma reação que apresenta seletividade pela posição *orto* à hidroxila fenólica. O mecanismo é iniciado com a protonação de uma das aminas terciárias da hexamina pelo ácido acético (Figura 15). A formação dessa amina carregada positivamente favorece a formação de uma segunda espécie, um intermediário imínio. Conseqüentemente, essa imina sofre um ataque eletrofílico do substrato aromático. Esse ataque eletrofílico é sucedido de uma perda momentânea da aromaticidade que é restaurada por meio de uma translocação intramolecular de hidrogênio reconstituindo também a hidroxila fenólica. Há uma série de reações de equilíbrio com o intermediário imínio, que ao final culmina em uma reação redox intramolecular e o carbono benzílico passa ao estado de oxidação de um aldeído, o qual é gerado por hidrólise ácida da imina.

Figura 15 - Mecanismo da reação de formilação via reação de Duff



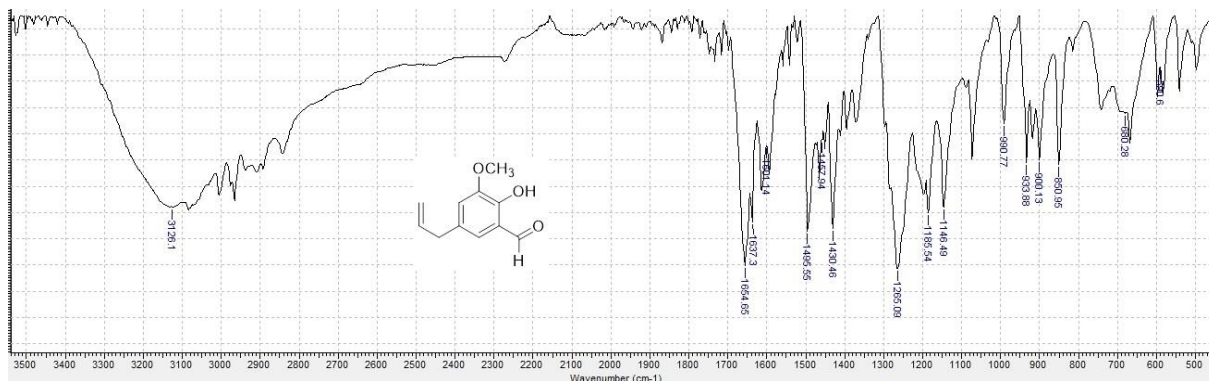
Fonte: do autor.

Baixos rendimentos foram descritos para esse método de formilação, porém o rendimento obtido aqui foi superior àqueles relatados (RAO et al., 1949). Houve uma modificação na técnica original, utilizando-se o método de cromatografia em coluna para purificação do produto final.

Dos dados obtidos pela análise espectrométrica no IV, destaca-se a presença de uma banda em 1655 cm^{-1} , característica de deformação axial de carbono carbonílico (C=O) de

aldeídos; uma banda larga centrada em 3134 cm^{-1} , que corresponde ao grupo hidroxila, duas bandas em 1638 , 1508 e 1495 cm^{-1} representando deformação axial das ligações (C=C) duplas do anel aromático.

Figura 16 - Espectro no IV do composto **1**.



Fonte: do autor.

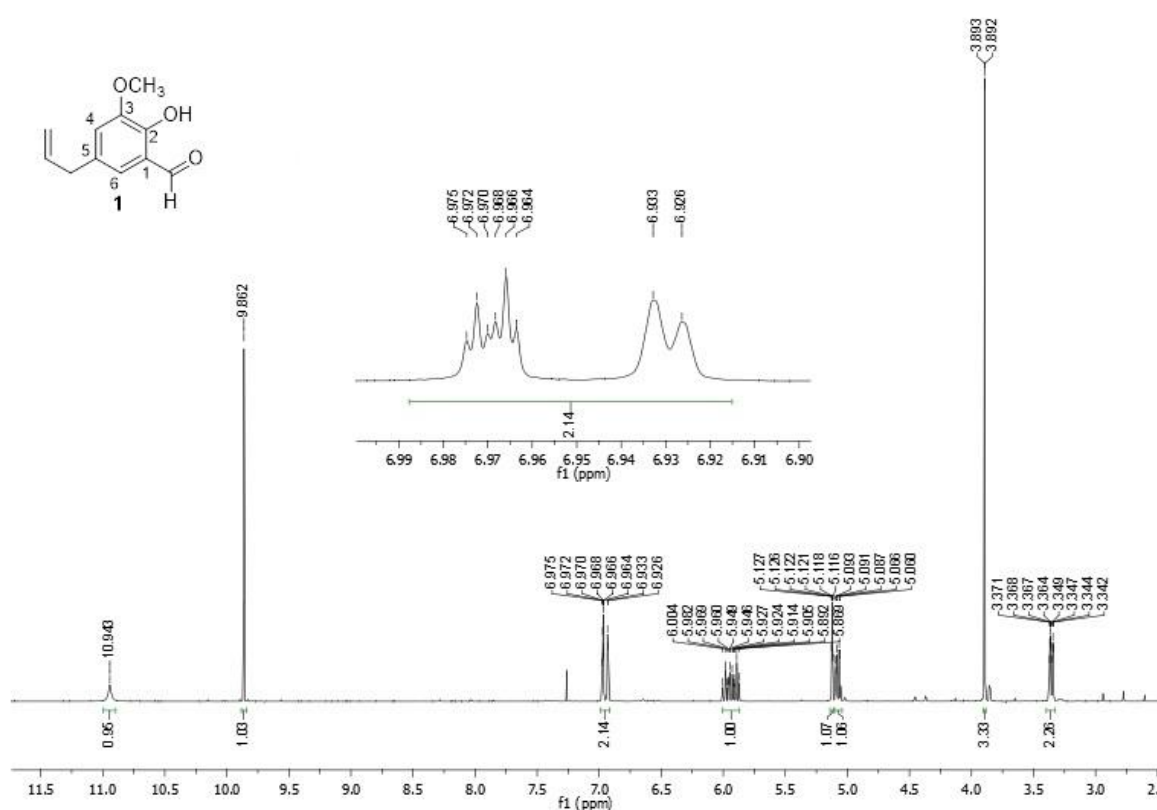
No espectro de RMN de ^1H , podem-se notar os simples relativos aos hidrogênios dos grupos OCH_3 e OH a δ 3,89, 10,94, além dos dois hidrogênios aromáticos H-6 e H-4 em δ 6,97 e 6,93, respectivamente. Dentre os hidrogênios aromáticos, aquele que se apresenta mais desblindado é o que está mais próximo da carbonila, uma vez que esse grupo exerce um efeito retirador de elétrons, deixando os átomos próximos a ele com menor densidade eletrônica e, portanto, com maior capacidade de absorver a radiação incidida sobre eles. Também se observam os dois multipletos e o duplete referentes aos hidrogênios da cadeia alílica a δ 5,92-5,86 ($\underline{\text{H}}\text{C}=\text{CH}_2$), 5,12-5,06 ($\text{HC}=\underline{\text{C}}\text{H}_2$) e 3,36 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-CH}$) com uma constante de acoplamento de 6,6 Hz.

Pode-se notar, também, um simples relativo ao hidrogênio ligado à carbonila com deslocamento químico de δ 9,86, característico de hidrogênios aldeídicos, o que indica que a formilação do eugenol foi efetiva.

No espectro de RMN de ^{13}C , há um sinal em δ 196,68, cujo deslocamento químico maior é característico de carbonos carbonílicos de aldeídos por serem altamente desblindados, caracterizando a inserção de um grupo formila à molécula de eugenol. Pôde-se observar um sinal relativo ao carbono da metoxila a δ 56,37, bem como os sinais referentes aos carbonos da cadeia lateral alílica a δ 39,48 ($\text{H}_2\underline{\text{C}}\text{-CH}=\text{CH}_2$), 116,61 ($\text{HC}=\underline{\text{C}}\text{H}_2$) e 136,81 ($\text{HC}=\underline{\text{C}}\text{H}_2$). Os carbonos aromáticos hidrogenados podem ser notados a δ 123,78 C-6 e 118,79 C-4, sendo o primeiro correspondente ao carbono mais próximo à carbonila, que é retiradora de elétrons e o segundo carbono *orto* à metoxila que é doadora por ressonância. Na região que compreende

os sinais δ 150,14 a 120,54, observa-se a presença dos 4 átomos de carbonos aromáticos e de um carbono alílico, tendo este último o deslocamento químico de δ 136,81. A δ 150,14, 148,29, 131,81 e 120,54 notam-se os sinais de carbonos aromáticos ligados aos grupos metoxila, hidroxila, cadeia alílica e à carbonila, respectivamente. Neste caso, o carbono ligado à metoxila possui um deslocamento químico maior do que o carbono ligado à hidroxila, porque ele está na posição meta ao aldeído, sendo mais desblindado por ressonância. Tal efeito é mais sentido na posição *meta*.

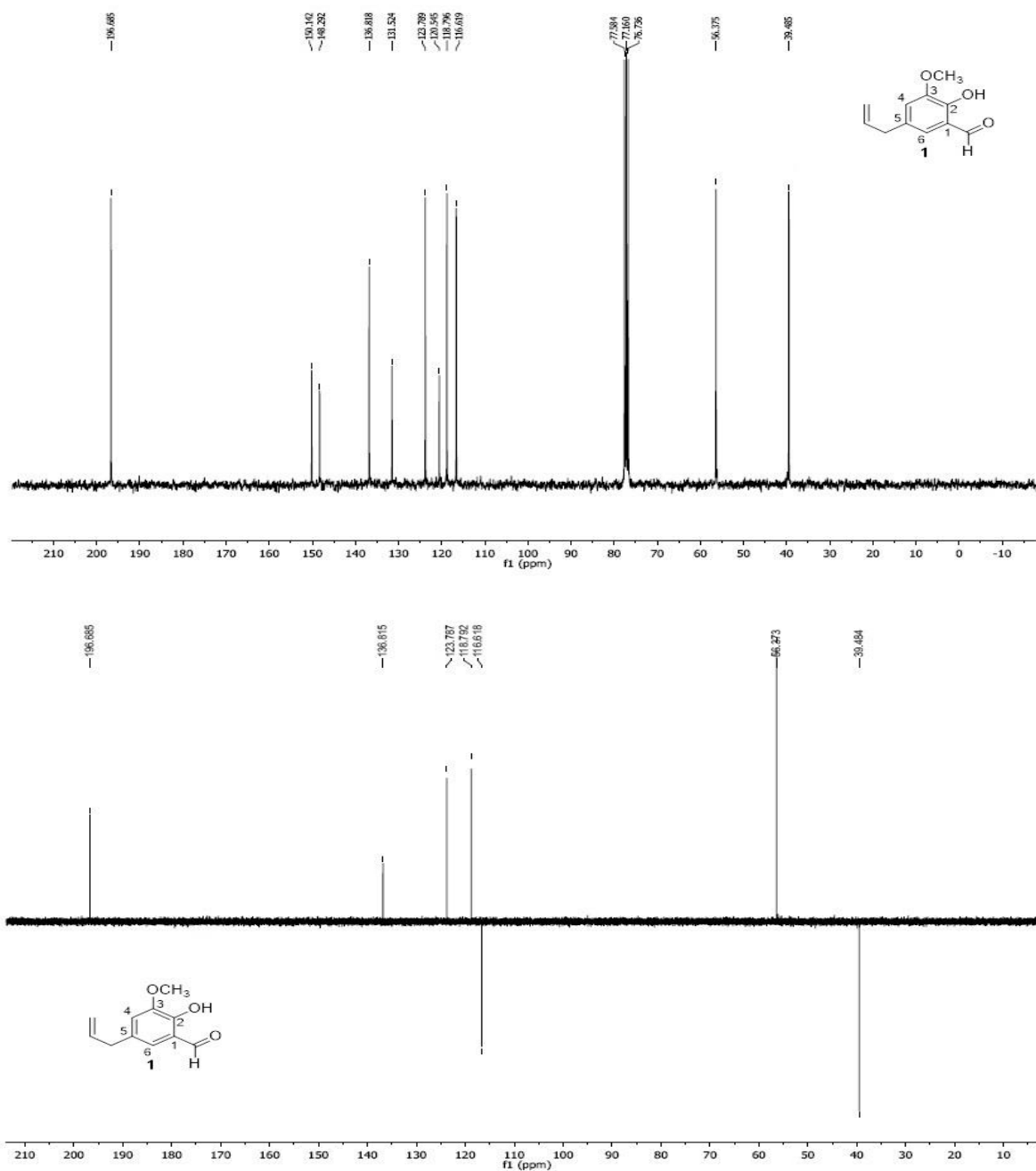
Figura 17 - Espectro de RMN de ^1H do composto **1** (CDCl_3 , 300 MHz).



Fonte: do autor.

Pelo subspectro DEPT-135 (FIGURA 18), pode-se confirmar parte das atribuições feitas anteriormente, com destaque para os sinais de carbonos metilênicos a δ 116,61 e 39,48, que possuem o sinal em fase oposta. Além disso, a metoxila a δ 56,98, carbonos aromáticos a δ 118,88 e 123,78, o carbono alílico em 136,24 e o carbono aldeídico em 196,68.

Figura 18 - Espectro de RMN de ^{13}C e subespectro DEPT-135 de **1** (CDCl_3 , 75 MHz).



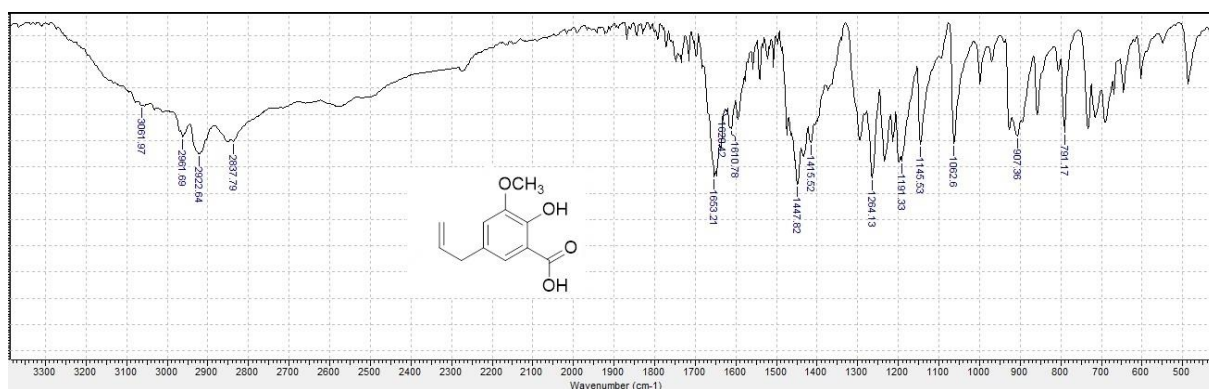
Fonte: do autor.

Para a oxidação do aldeído a ácido carboxílico foram avaliadas algumas técnicas a fim de se escolher a melhor, porém duas não apresentaram resultados satisfatórios: a que emprega H_2O_2 e nitrato de prata (CHAKRABORTY, et al., 2009) e a que utiliza H_2O_2 , hidroxilamina e HCl (BAHRAMI, 2008). O método escolhido (PEARL, 1963) usa óxido de prata em meio alcalino para promover a oxidação desejada.

Usando este método, a reação se desenvolveu em cinco horas, e o produto obtido foi purificado por cromatografia em coluna (hexano/acetato de etila 8:2 para remoção de um segundo produto mais polar que o ácido oriundo do eugenol, possivelmente gerado pela oxidação do seu grupo alila. Reações de adição e oxidação de alcenos utilizando prata já são bem conhecidas (TORRES et al, 2005). Ainda, os rendimentos descritos para diversos compostos obtidos por essa técnica são bem altos, um pouco maiores do que aqueles obtidos nesse trabalho.

Dos dados obtidos pela análise em espectrômetro no IV, destacam-se a presença de uma banda em 1653 cm^{-1} , característica de vibrações de deformação axial de carbono carbonílico (C=O) de ácido carboxílico e outra em 1447 e 1264 cm^{-1} , aparecem duas bandas de deformação axial, devido ao acoplamento da deformação angular no plano da ligação O-H e a banda de deformação axial da ligação C-O de ácidos carboxílicos em 1191 cm^{-1} . Uma banda centrada em 3061 cm^{-1} que corresponde ao grupo hidroxila (OH). Essa banda possui uma intensidade e uma frequência menor porque ela interage por ligação de hidrogênio com a carbonila do ácido carboxílico em *orto*; duas bandas a 1610 e 1447 cm^{-1} , representando deformação axial das ligações duplas do anel aromático.

Figura 19 - Espectro no IV do composto **2**.

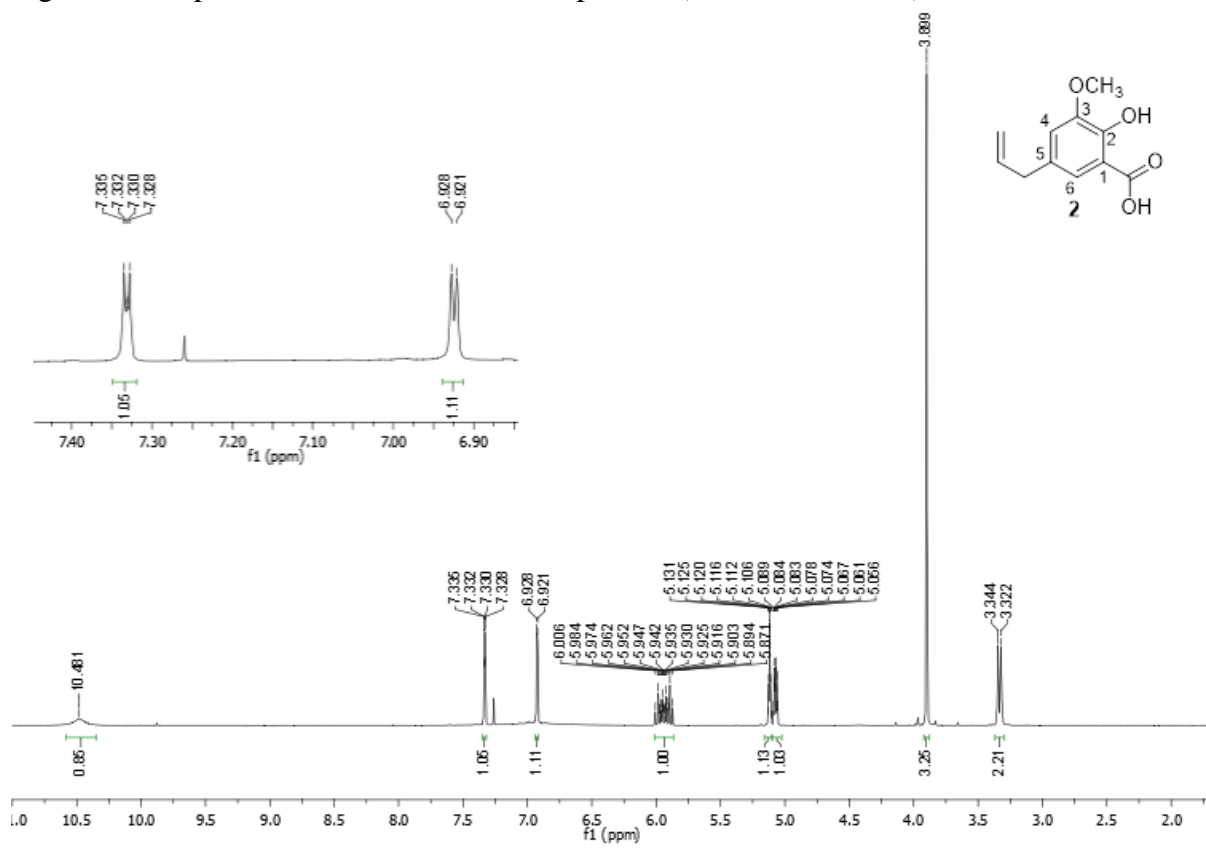


Fonte: do autor.

No espectro de RMN de ^1H (Figura 20), podem-se notar algumas pequenas diferenças nesse espectro quando comparamos com o RMN do composto **1**. A diferença está no valor de δ do hidrogênio aromático *orto* a carbonila do ácido carboxílico, o valor foi de δ 6,9 para δ 7,3. Dentre os hidrogênios aromáticos, aquele que apresenta menor valor de δ é o que está mais distante do grupo carbonila, ou seja, aquela na posição *para* ao C-1. Os dois hidrogênios aromáticos possuem um J de 2,1 Hz, o que mostra o acoplamento químico entre os mesmos.

O simpleto referente à hidroxila fenólica pode ser observado em δ 10,48. Não foi observado o simpleto com deslocamento químico em δ 9,86 característico de hidrogênio formílico, o que caracteriza a oxidação do mesmo a ácido carboxílico.

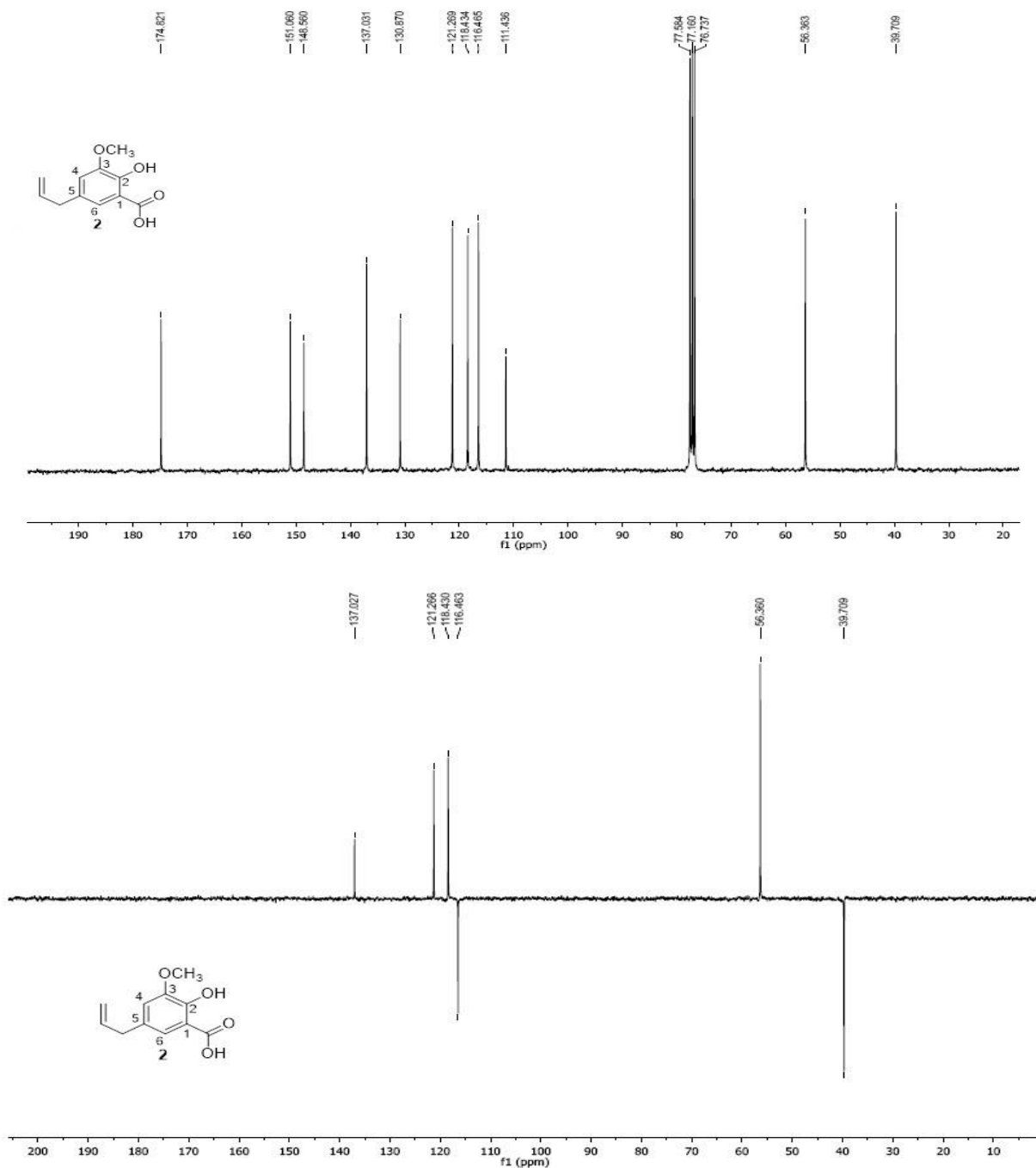
Figura 20 - Espectro de RMN de ^1H do composto **2** (CDCl_3 , 300 MHz).



Fonte: do autor.

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 21) também apresentou pequenas diferenças em relação ao espectro obtido para o **1**. A δ 151,06, 148,56 e 130,87 nota-se o carbono aromático ligado aos grupos metoxila, hidroxila e a cadeia alílica, respectivamente. O carbono aromático ligado ao grupo carbonila do ácido carboxílico é visualizado a δ 111,43 (C-1). Pode notar uma mudança acentuada no deslocamento químico do C-1 quando se compara o derivado formilado e o ácido carboxílico. O deslocamento químico do C-1 no formileugenol (**1**) é de δ 120,54 e no derivado que possui um ácido carboxílico (**2**) é de δ 111,43. Esse decaimento se dá pelo fato do carbono carbonílico do aldeído ser mais eletrofílico do que o do ácido e por efeito indutivo desblinda mais o carbono ligado diretamente a ele. O sinal do carbono carbonílico é de δ 174,82 (C=O), região característica de carbonilas de ácidos carboxílicos. O subspectro DEPT-135 (Figura 21) auxiliou na atribuição dos sinais de RMN- ^{13}C .

Figura 21 - Espectro de RMN de ^{13}C e subspectro DEPT-135 de **2** (CDCl_3 , 75 MHz).



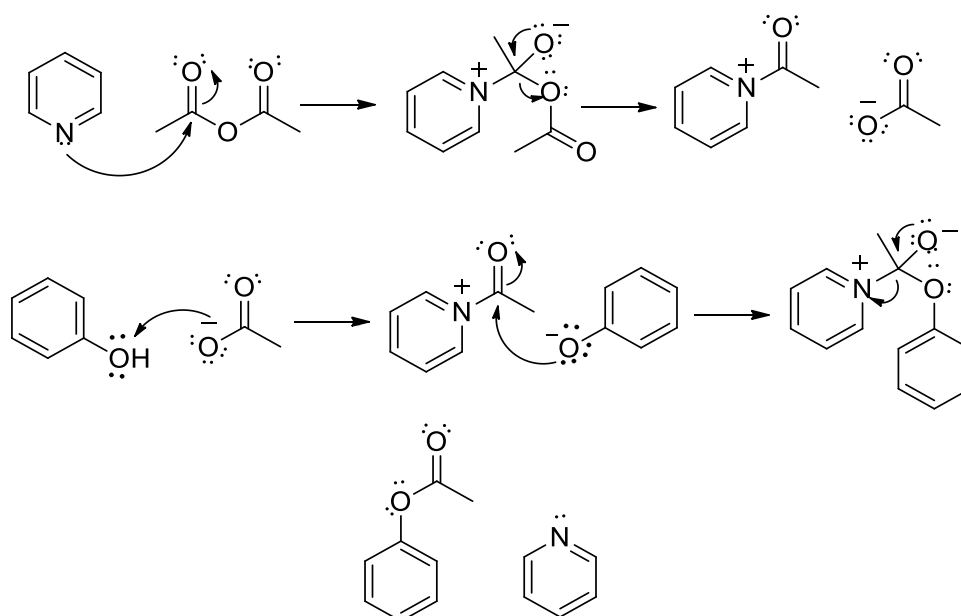
Fonte: do autor.

Para a acetilação dos fenóis **2** e **3** optou-se pelo método que emprega anidrido acético para promover a acilação do fenol (KURTI, L. et al. 2005). O uso de anidridos se justifica principalmente pela sua grande estabilidade em relação aos cloretos de ácido respectivos. Além disso, esse método é bastante seletivo, não afetando o ácido carboxílico presente na

molécula. Utilizou-se piridina como catalisador e a reação se mostrou limpa e de fácil elaboração.

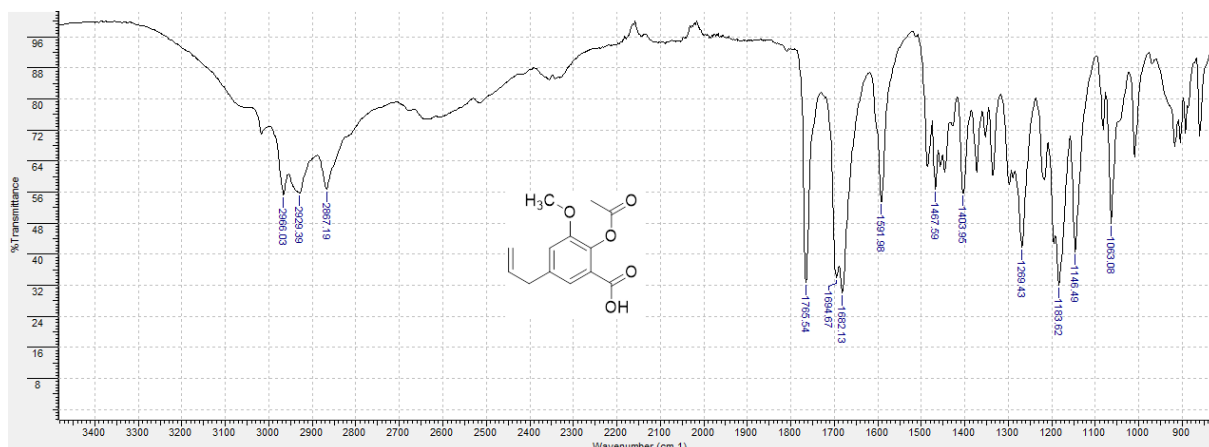
O mecanismo reacional se desenvolve primeiramente pelo ataque nucleofílico da piridina ao anidrido acético, formando um intermediário carregado altamente reativo. A carbonila desse íon acetil piridínico é posteriormente atacada pela hidroxila fenólica do fenol em questão, formando um intermediário instável que após reconstituir a dupla ligação da carbonila, expulsa a piridina, que é o melhor grupo abandonador. O resultado final é a hidroxila fenólica acetilada.

Figura 22 - Mecanismo da reação de acetilação de fenóis.



Fonte: do autor.

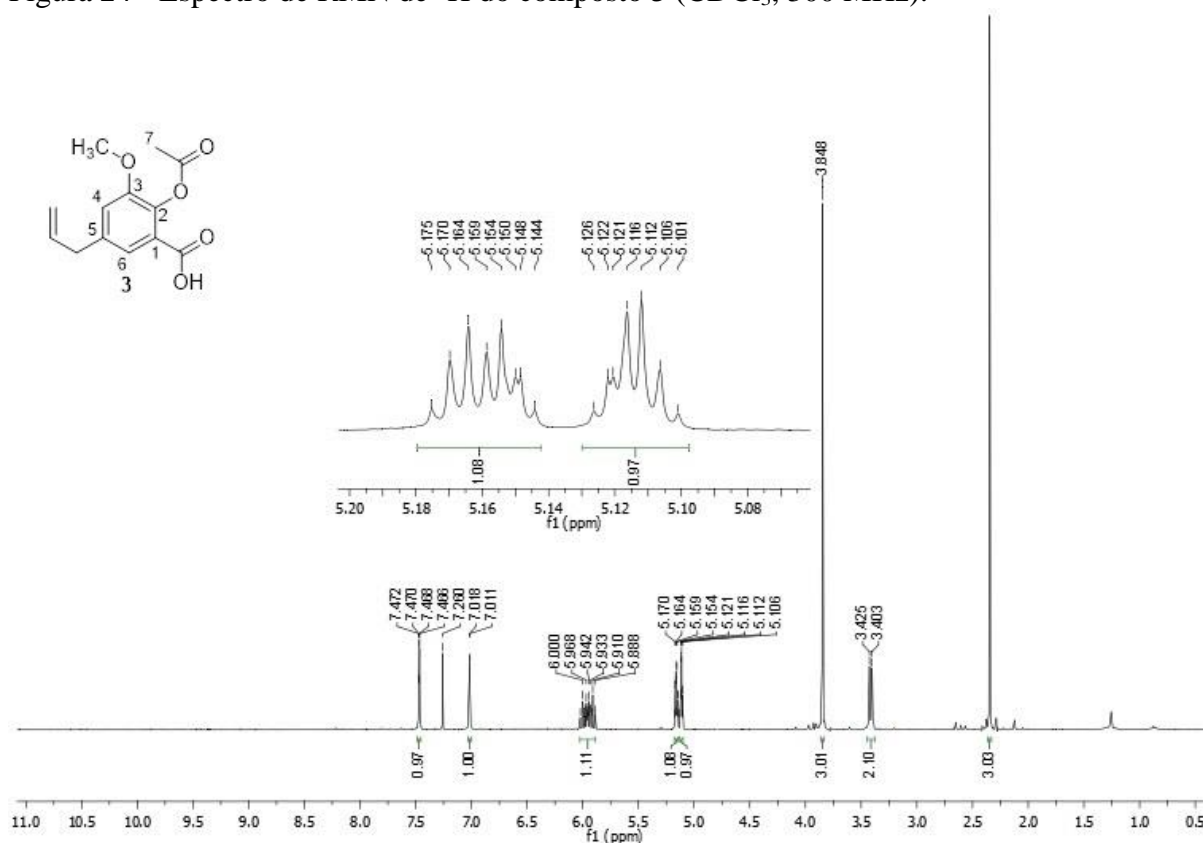
O ácido 5-álil-2-hidroxi-3-metoxibenzóico foi acetilado e os dados mais relevantes obtidos pela análise do espectro no IV dessa substância (Figura 23) são a presença de uma segunda banda referente à deformação axial da carbonila da acetila a 1765 cm^{-1} , característica da ligação C=O; uma banda a 1694 cm^{-1} que corresponde à carbonila do ácido carboxílico ligado diretamente ao anel aromático; uma banda a 1682 cm^{-1} referente à ligação C=C da cadeia alílica; duas banda a $\bar{\nu}$ 1269 e 1118 cm^{-1} , relacionada à deformação axial C-O; e ainda uma banda em 1591 cm^{-1} , correspondente às ligações duplas entre os carbonos do anel aromático (C=C).

Figura 23 - Espectro no IV do composto **3**.

Fonte: do autor.

No espectro de RMN de ^1H (Figura 24), Nota-se a presença de um simpleto em δ 2,34 referente à metila da acetila. Os sinais referentes aos dois hidrogênios aromáticos são observados em δ 7,47 H-6 e 7,01 H-4. Os sinais desses hidrogênios possuem um deslocamento químico maior que os apresentados pela substância **2**, porque houve a inserção de uma acetila à hidroxila fenólica. Esses hidrogênios se localizam na posição *meta* em relação à hidroxila acetilada, que possui um discreto efeito retirador de densidade eletrônica por indução.

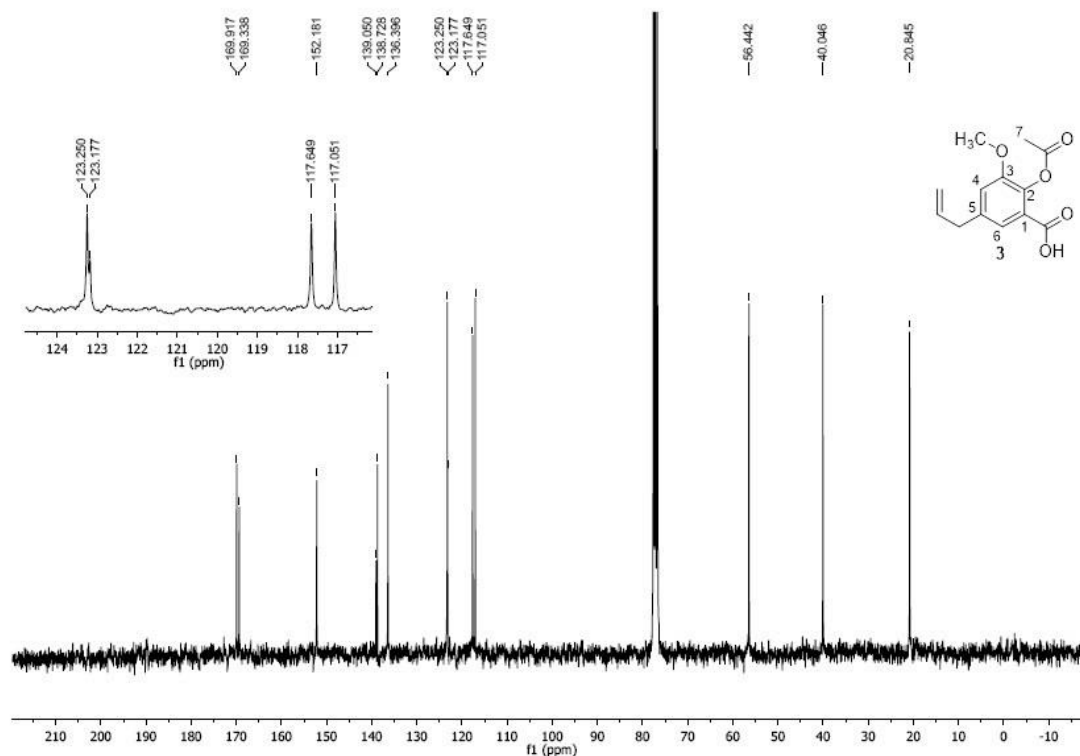
Figura 24 - Espectro de RMN de ^1H do composto **3** (CDCl_3 , 300 MHz).



Fonte: do autor.

No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 25) pode ser observada uma mudança no deslocamento químico do carbono ligado ao oxigênio acetilado. Quando a molécula possuía a hidroxila livre o deslocamento químico do carbono a ela ligado era de 148,56 (C-2), após a acetilação o valor passou a ser δ 139,05 (C-2). Em δ 20,84 encontra-se o sinal referente à metila da acetila. Finalmente, em δ 169,91 e 169,33 observam-se os carbonos carbonílicos da carbonila ligada diretamente ao anel aromático e da acetila.

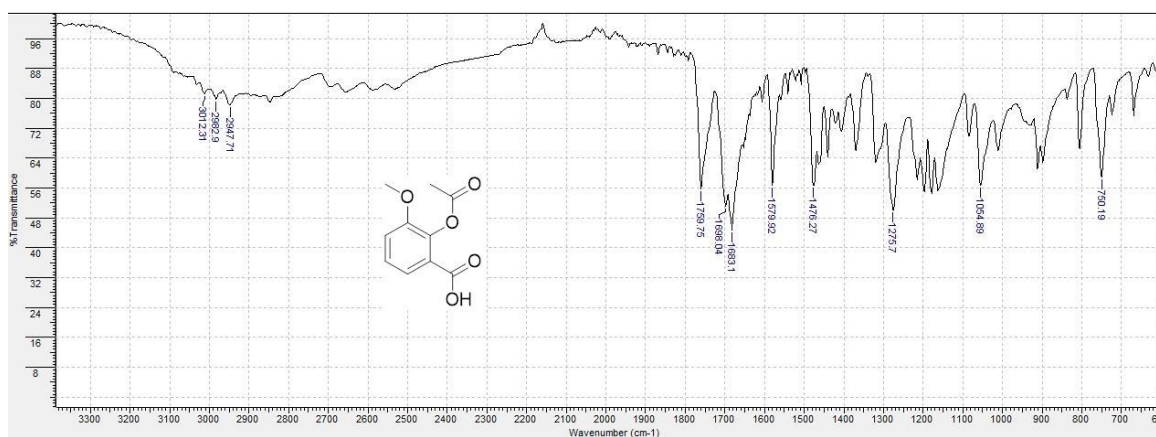
Figura 25 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto **3** (CDCl_3 , 75 MHz).



Fonte: do autor.

O ácido 2-hidroxi-3-metoxibenzóico foi acetilado e os dados obtidos pela análise em espectrômetro no IV (Figura 26), destacam-se a presença de duas bandas de deformação axial em 1698 e 1759 cm^{-1} , que correspondem às carbonilas do ácido carboxílico e do éster, respectivamente. Uma banda a 1275 cm^{-1} , característica da ligação C-O de ésteres e ainda bandas a 1603, 1579 e 1473 cm^{-1} , referentes às ligações duplas do anel aromático (C=C).

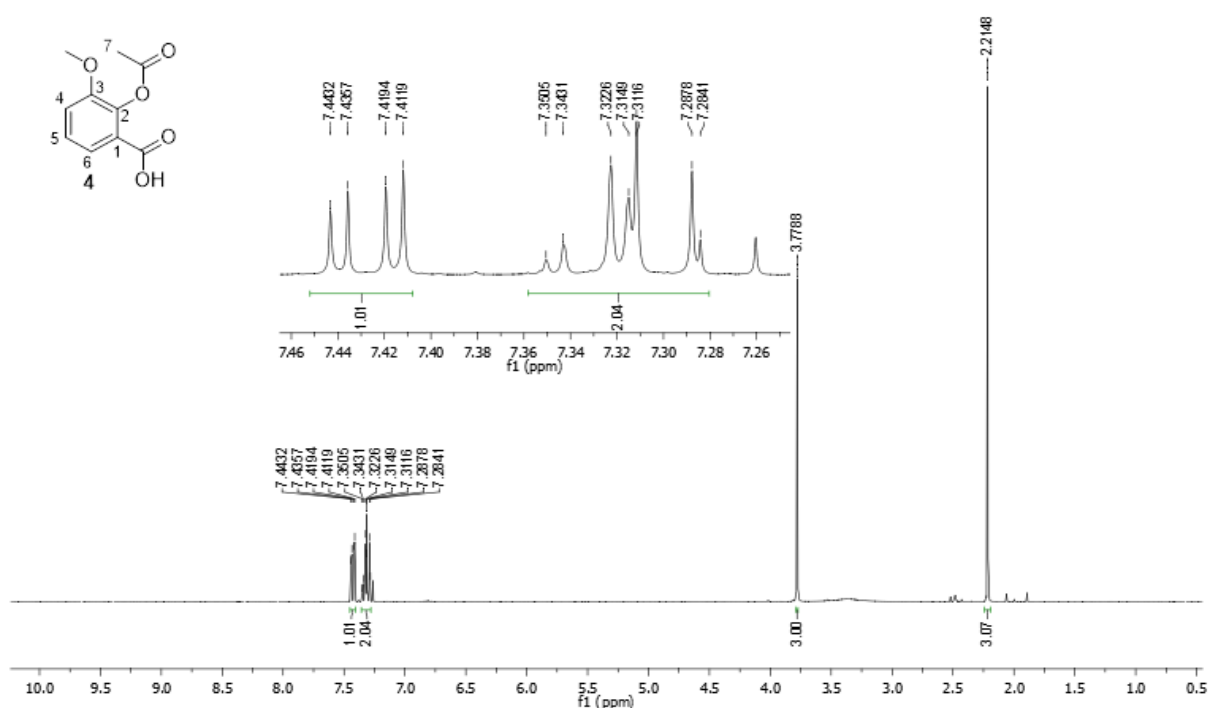
Figura 26 - Espectro no IV do composto **5**.



Fonte: do autor

No espectro de RMN de ^1H (Figura 27), os sinais pertencentes aos hidrogênios aromáticos correspondem a um duplete duplo e um multipeto. O duplete duplo com deslocamento químico de 7,42 é relativo ao hidrogênio vizinho à carbonila do ácido carboxílico (C-6). O multipeto em δ 7,36-7,28 foi atribuído aos hidrogênios aromáticos *orto* e *meta* à metoxila (C-4 e C-5). É possível notar dois simpletos referentes à metila da acetoxila e à metoxila em δ 2,21 e 3,78, respectivamente. Os hidrogênios da metoxila possuem um deslocamento químico maior, porque estão ligados a um carbono que por sua vez está ligado a um átomo mais eletronegativo.

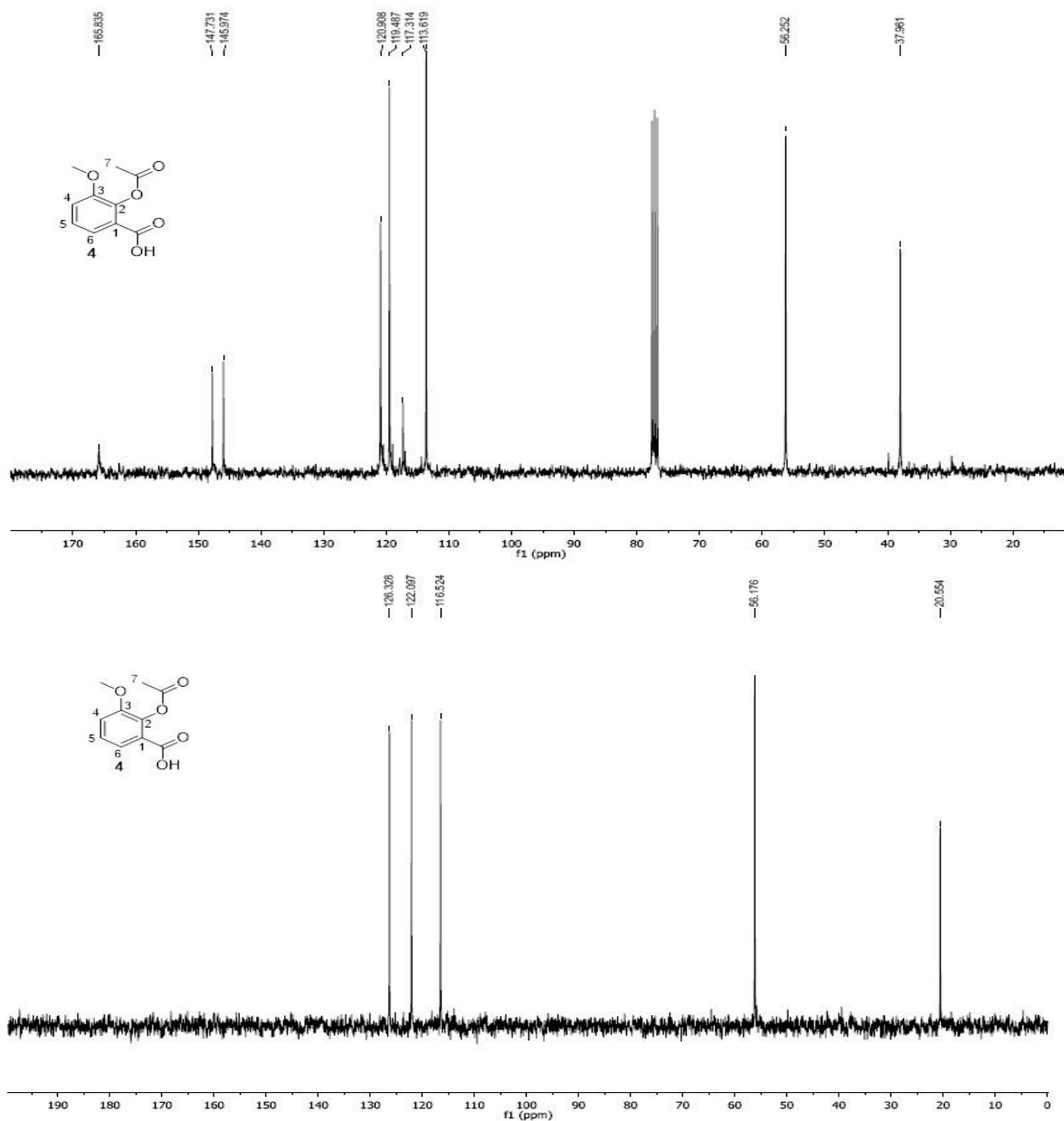
Figura 27 - Espectro de RMN de ^1H do composto **5** (DMSO- d_6 , 300 MHz).



Fonte: do autor.

Já no espectro de RMN de ^{13}C (Figura 28), observam-se dois sinais de carbonos metílicos em δ 37,96 (C-7) e 58,18 (OCH₃), este último referente à metoxila. Com ajuda do subspectro DEPT foi possível localizar os sinais referentes aos carbonos aromáticos hidrogenados em δ 116,52 (C-4), 126,33 (C-5), 125,18 (C-6) e dos não hidrogenados em δ 122,10 (C-1), 139,24 (C-2), 151,81 (C-3). Finalmente, em δ 168,44 nota-se o sinal do carbono carbonílico da acetila (C=O) e em δ 165,68 o carbono carbonílico do ácido ligado diretamente ao anel aromático.

Figura 28 - Espectro de RMN de ^{13}C e subspectro DEPT-135 de **5** ($\text{DMSO-}d_6$, 75 MHz).

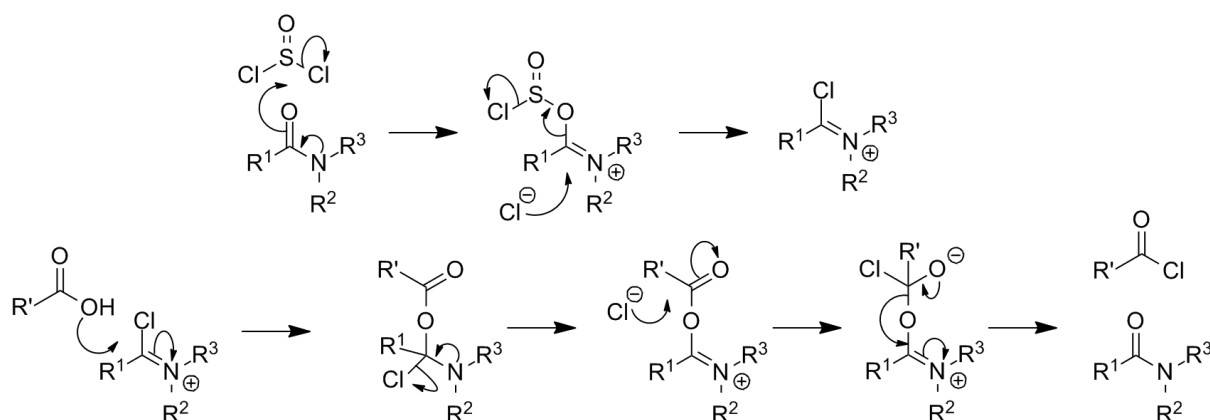


Fonte: do autor.

Na sequência, foram sintetizados os cloretos de acila (ou cloreto de ácido). Como parte de sua estrutura, a presença de um átomo de cloro ligado ao carbono da carbonila produz um eletrófilo muito bom, aumentando a reatividade dele frente a nucleófilos. Isto significa também que um fraco nucleófilo pode atacar esse carbono. Como o íon cloreto é um bom abandonador, ele irá prontamente ser substituído pelo nucleófilo. Os cloretos de acila podem ser usados para preparar qualquer derivado de ácido carboxílico, inclusive os ácidos hidroxâmicos propostos nesse trabalho.

O método escolhido para a obtenção dos cloretos de acila foi o descrito por Khalikov e colaboradores (2006) que utiliza condições reacionais brandas e estáveis, não apresentando produtos de degradação ou reações paralelas, fazendo dele um método químico e regioselectivo. A DMF atua como catalisador da reação (Figura 29), pois reage com o cloreto de tionila, formando um intermediário mais reativo frente ao ácido carboxílico, aumentando a velocidade reacional e eliminando a necessidade de aquecimento sob refluxo. Assim, o cloreto de tionila reage com a DMF resultando em um íon cloroimínio que é um bom eletrófilo. Uma vez formado o íon imínio, a hidroxila do ácido ataca o carbono eletrofílico dele e libera um íon cloreto no meio. Esse íon cloreto ataca a carbonila resultando em um intermediário tetraédrico zwitteriônico que se dissocia formando o cloreto de ácido e reconstituindo a dimetilformamida.

Figura 29 - Mecanismo de formação de cloretos de ácido catalisados por DMF.



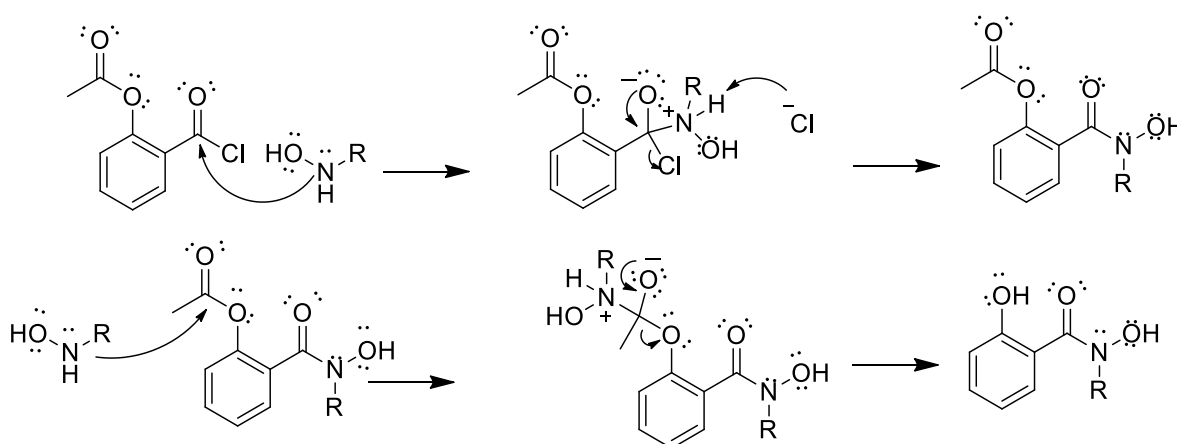
Fonte: do autor.

Devido à alta reatividade do cloreto de ácido formado, os solventes e reagentes utilizados na síntese e manipulação desses cloretos foram cuidadosamente secos. O acompanhamento por CCD da reação não foi satisfatório, pois o cloreto de ácido retorna ao ácido de origem por reagir com os grupos hidroxila da sílica. Por essa questão de alta reatividade, a reação não é elaborada e o rendimento adotado é de 100%, utilizando-se o produto bruto na etapa seguinte.

Os ácidos hidroxâmicos foram sintetizados a partir do cloreto de ácido e de hidroxilaminas *N*-substituídas através de uma reação de substituição à carbonila. Essa reação consiste em um ataque nucleofílico do nitrogênio da hidroxilamina, resultando em um intermediário tetraédrico. Subsequentemente, há a reconstituição da carbonila e eliminação do cloreto, que geralmente é um bom abandonador.

Os ácidos hidroxâmicos correspondem a um grupo de substâncias em que a hidroxilamina é ligada a uma carbonila, com estrutura geral R_1CONR_2OH . São geralmente utilizados como agentes quelantes de metais ou como precursores sintéticos de heterociclos. A reação se desenvolve em duas etapas, *one-pot* (JING et al., 2013). Primeiro, há a formação do ácido hidroxâmico *O*-acetilado (Figura 30). Essa etapa é rápida, pois o cloreto de ácido é muito reativo e o nitrogênio é um nucleófilo muito hábil. Na segunda etapa, a *N*-metilhidroxilamina em excesso no meio reacional desacetila esse produto regenerando a hidroxila fenólica *orto* ao ácido hidroxâmico. Por outro lado, devido a menor nucleofilicidade do nitrogênio *N*-fenilhidroxilamina, poderia se prever uma reação incompleta de desacetilação, como mostrado mais a diante.

Figura 30 - Mecanismo de formação dos ácidos *N*-metilhidroxâmicos e subsequente desacetilação.



Fonte: do autor.

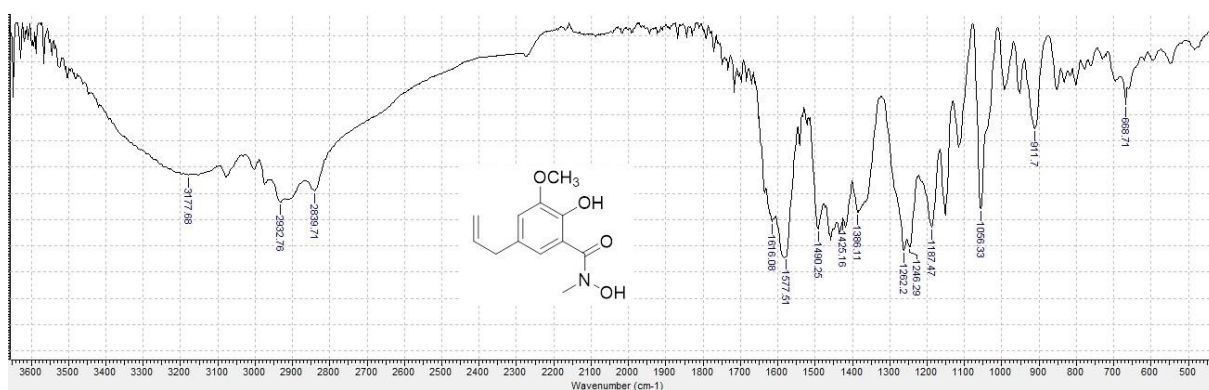
A reação foi realizada a baixa temperatura, uma vez que, o cloreto de ácido sendo muito reativo pode sofrer ataque nucleofílico do grupo NH e também do grupo OH do reagente. Diminuindo a temperatura, o ataque do NH é favorecido, pois o mesmo é um nucleófilo mais forte. Com isso a formação do produto de interesse é favorecida em detrimento do produto *O*-acilado.

Os estágios de formação do ácido hidroxâmico e a sua posterior desacetilação são facilmente visualizados na monitorização da reação por CCD utilizando como revelador uma

solução de cloreto férrico. O cloreto férrico é capaz de diferenciar o derivado ácido acetilado do desacetilado. Quando a hidroxila na posição *orto* ao ácido está desacetilada, o composto adquire uma coloração azul quando uma solução de cloreto férrico é borrifada na placa. Quando a hidroxila na posição *orto* ao ácido está acetilada, o composto não exibe nenhuma coloração ao entrar em contato com o cloreto férrico. Isso ocorre porque os fenóis formam complexos coloridos com íon Fe^{3+} . Da mesma forma é possível detectar a formação do ácido hidroxâmico com essa técnica, uma vez que o mesmo adquire uma coloração castanha ao entrar em contato com o cloreto férrico na placa de CCD. Primeiro, há a formação de um produto mais apolar e consumo do cloreto de ácido e da *N*-metil-hidroxilamina. Algum tempo depois, nota-se a formação de um produto mais polar.

A análise do espectro no IV desse composto (FIGURA 31) permite visualizar uma banda de deformação axial em 3177 cm^{-1} referente à hidroxila fenólica; uma banda em 1616 cm^{-1} correspondente a ligação $\text{C}=\text{O}$ de ácido hidroxâmico, que possui frequência menor, semelhante à de carbonilas de amidas; uma banda em 1262 cm^{-1} , característica de ligações C-N.

Figura 31 - Espectro no IV do composto **9**.



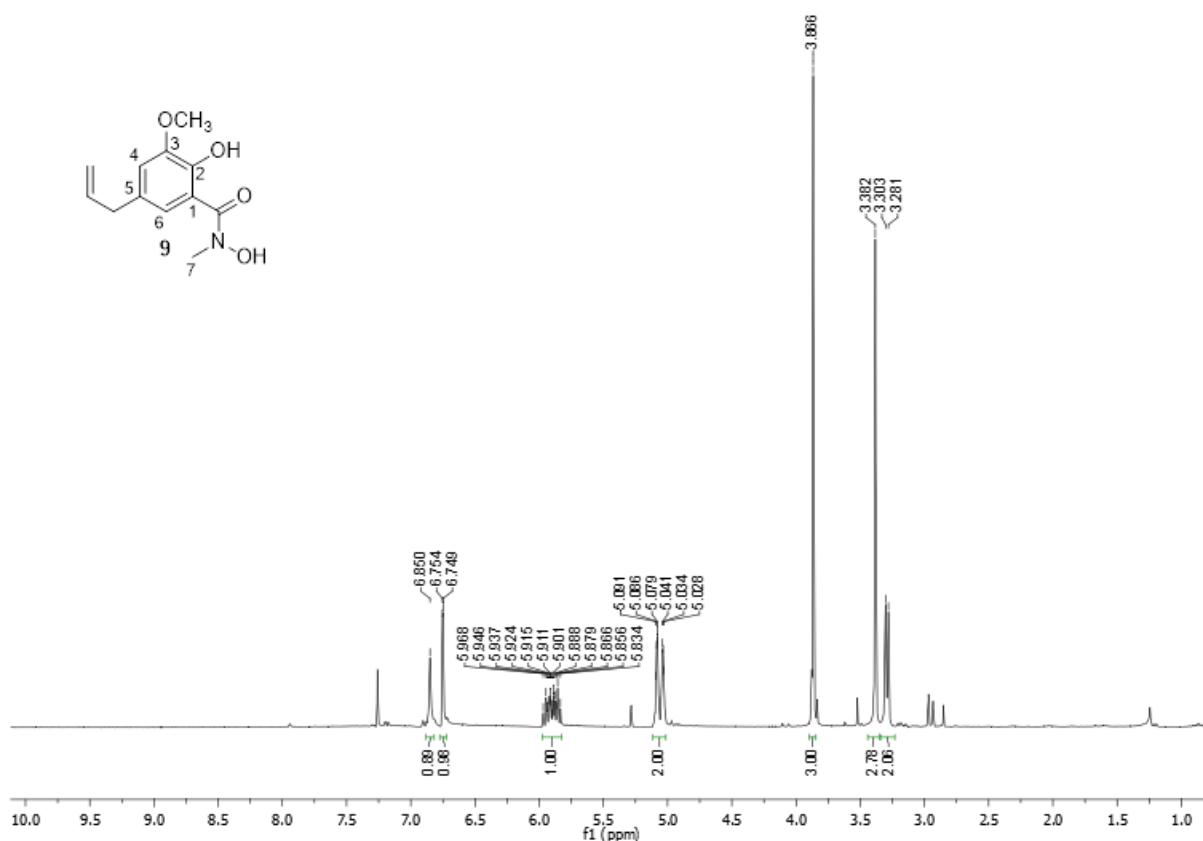
Fonte: do autor.

A reação se baseia no método de JING e colaboradores, descrito acima, porém ao contrário dos demais compostos sintetizados o **9** apresenta um R_f muito próximo dos seus subprodutos, o ácido hidroxâmico acetilado e o produto do ataque da hidroxila da hidroxilamina. Por essa razão a purificação foi realizada por CCS.

No espectro de RMN de ^1H (Figura 32), os sinais referentes aos dois hidrogênios aromáticos são observados em δ 6,75 (H-6) e 6,85 (H-4), ambos possuindo um deslocamento

químico menor do que o apresentado no precursor, que apresentava um ácido carboxílico. Isso se deve ao efeito retirador de elétrons do ácido carboxílico que é mais pronunciado do que o apresentado pelo ácido hidroxâmico. Em δ 3,38 nota-se um simpleto referente aos três hidrogênios da metila (N-CH₃), que possui um deslocamento químico um pouco acima da região de carbonos metílicos por estar ligado diretamente a um átomo eletronegativo.

Figura 32 - Espectro de RMN de ¹H do composto **9** (CDCl₃, 300 MHz).

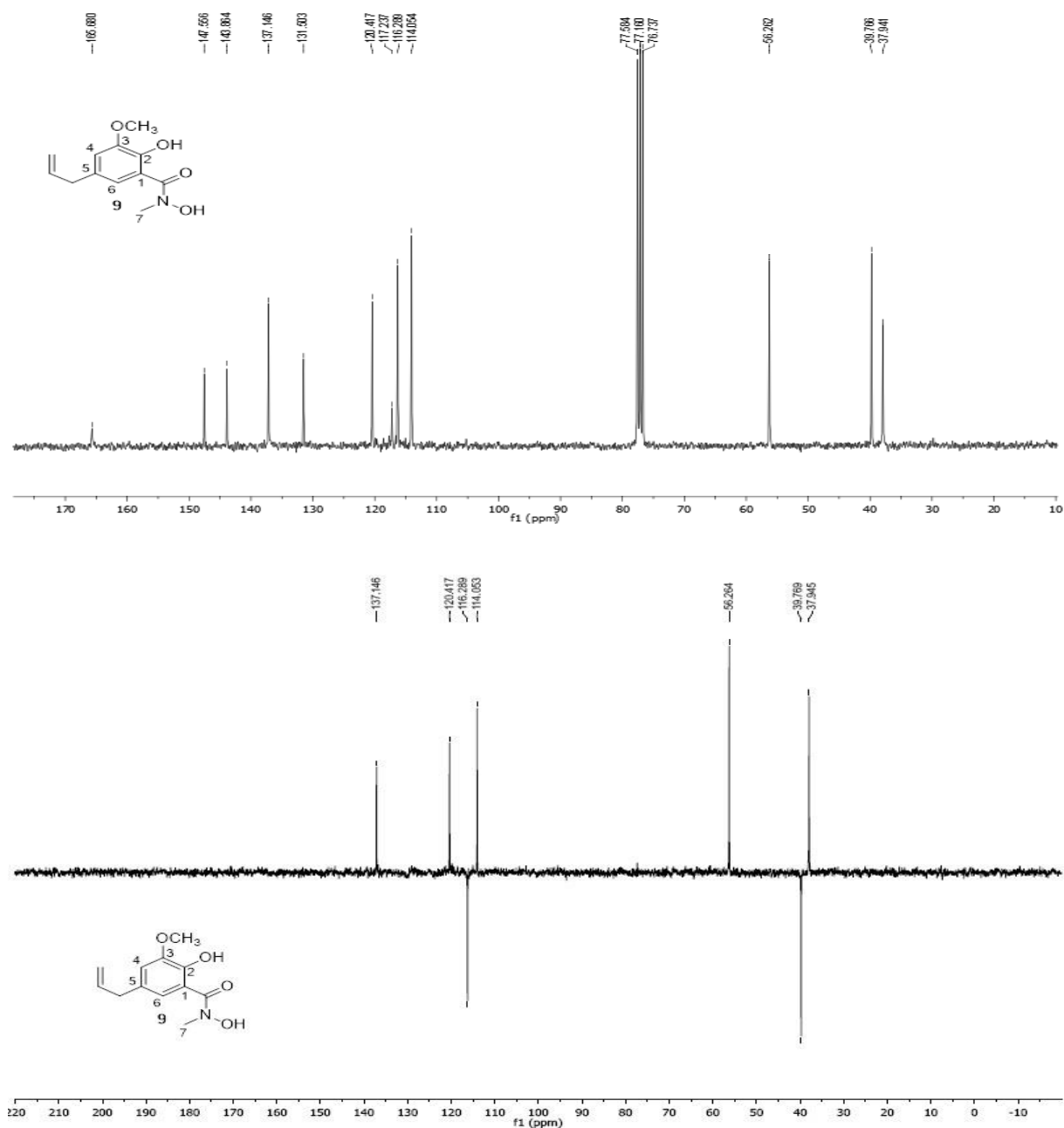


Fonte: do autor.

No espectro de RMN de ¹³C (FIGURA 363, os carbonos aromáticos hidrogenados podem ser notados a δ 120,41 C-6 e 114,05 C-4. A δ 147,55, 131,50, 117,23 nota-se os carbonos aromáticos ligados aos grupos metoxila, cadeia alílica e à carbonila, respectivamente. Todos os sinais tiveram um decréscimo nos seus valores de δ quando comparado com o ácido carboxílico precursor, uma vez que a carbonila de ácido carboxílico possui uma maior capacidade de retirar densidade eletrônica do anel aromático se comparado ao ácido hidroxâmico. Somente o carbono aromático ligado à hidroxila fenólica teve seu valor de deslocamento químico aumentado de 139,05 (C-2) do precursor **3** para 143,86 (C-2) ácido hidroxâmico **9**, uma vez que o mesmo se encontra agora desacetilado. Finalmente, em δ

165,68 pode-se notar o carbono carbonílico, cujo deslocamento químico está na região de carbonila de ácido hidroxâmico. O subspectro DEPT-135 (Figura 33) auxiliou na atribuição dos sinais de RMN- ^{13}C .

Figura 33 - Espectro de RMN de ^{13}C e subspectro DEPT-135 de **9** (CDCl_3 , 75 MHz).

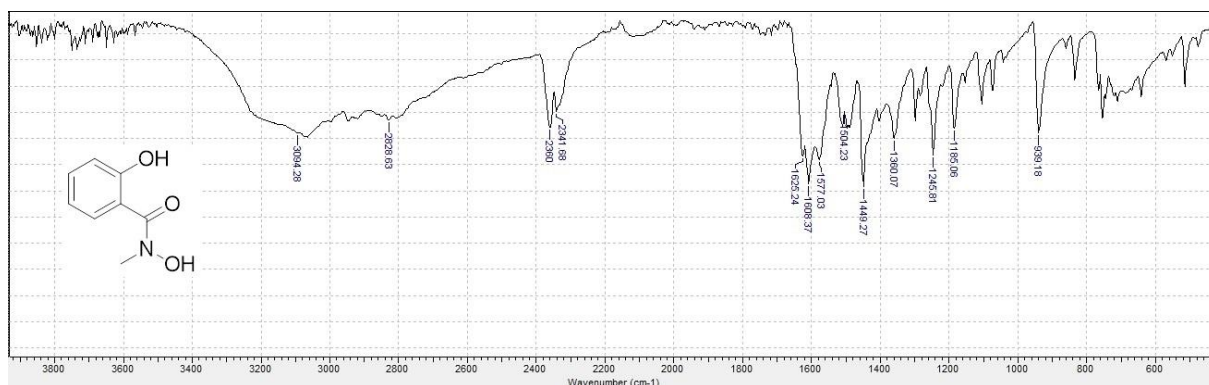


Fonte: do autor.

Dos dados obtidos pela análise por espectroscopia no IV para a substância **10** (Figura 34) exibiu como principais sinais uma banda em 3094 cm^{-1} referente à hidroxila fenólica

associada; uma banda em 1625 cm^{-1} correspondente à ligação C=O de ácidos hidroxâmicos; bandas em 1608 , 1504 e 1449 cm^{-1} representando as vibrações C=C do núcleo aromático.

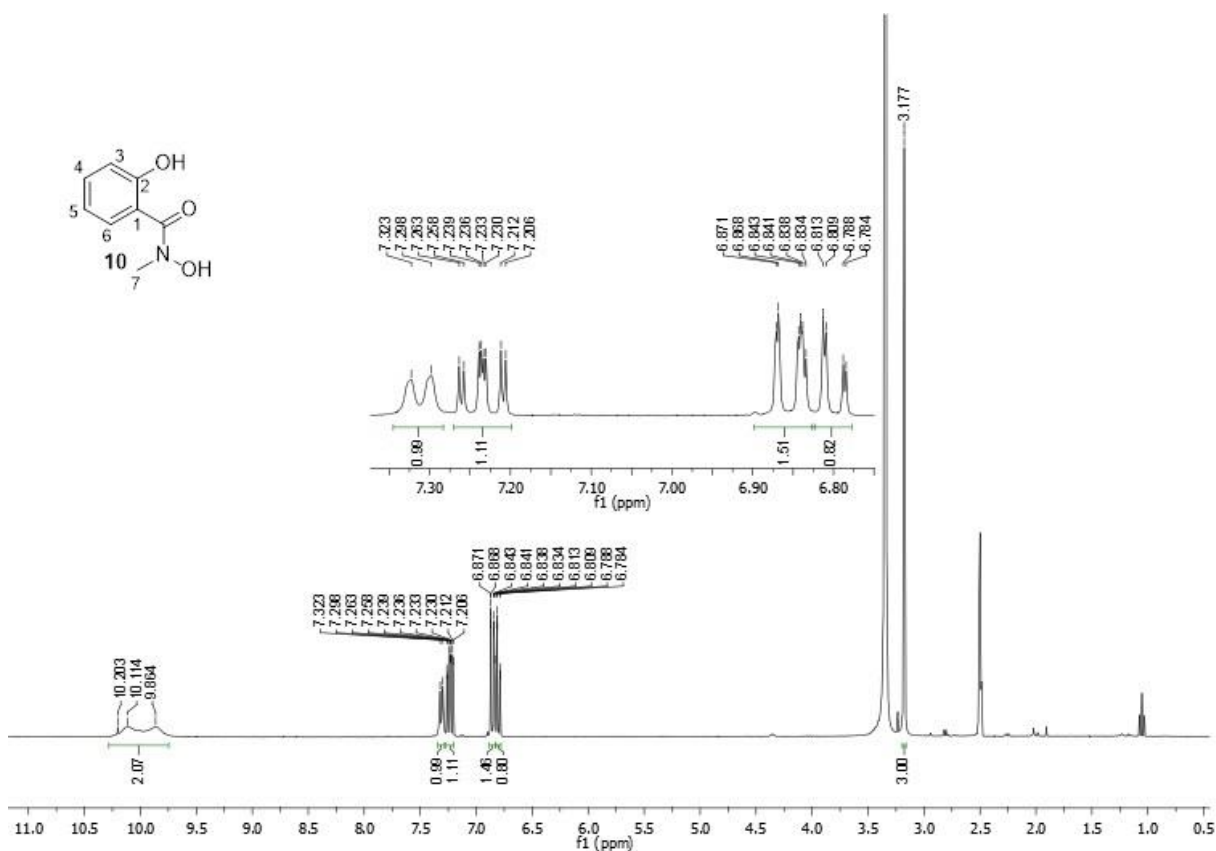
Figura 34 - Espectro no IV do composto **10**.



Fonte: do autor.

No espectro de ^1H (Figura 35), em δ 7,30 pode-se notar um duplete relativo ao hidrogênio aromático H-6, esse hidrogênio apresenta um deslocamento químico maior que os demais pelo fato de estar na posição *orto* à carbonila do ácido hidroxâmico, que deixa esse hidrogênio mais desblindado. Em δ 7,26-7,20 se vê um multiplete referente ao hidrogênio aromático ligado ao carbono H-4. Esse hidrogênio apresenta como um de seus acoplamentos um J de 7,5Hz, que corresponde ao mesmo valor de J do hidrogênio *orto* à carbonila. Isso indica que esse sinal é referente ao hidrogênio meta à carbonila. Também se observa um tripleto duplo em δ 6,88-6,78 referente ao hidrogênio H-5 que está *para* em relação à carbonila e ao hidrogênio H-3, que possui o menor deslocamento químico dentre os aromáticos, pois está localizado na posição *orto* à hidroxila fenólica que o blinda. É possível observar também um simpleto em 3,18, esse sinal é atribuído à metila do ácido hidroxâmico, o que revela a formação do mesmo. Finalmente, notam-se dois sinais alargados em δ 10,11 e 9,86 correspondendo às hidroxilas fenólica e hidroxâmica, respectivamente. Os sinais da metila e da hidroxila são indícios da formação do ácido hidroxâmico.

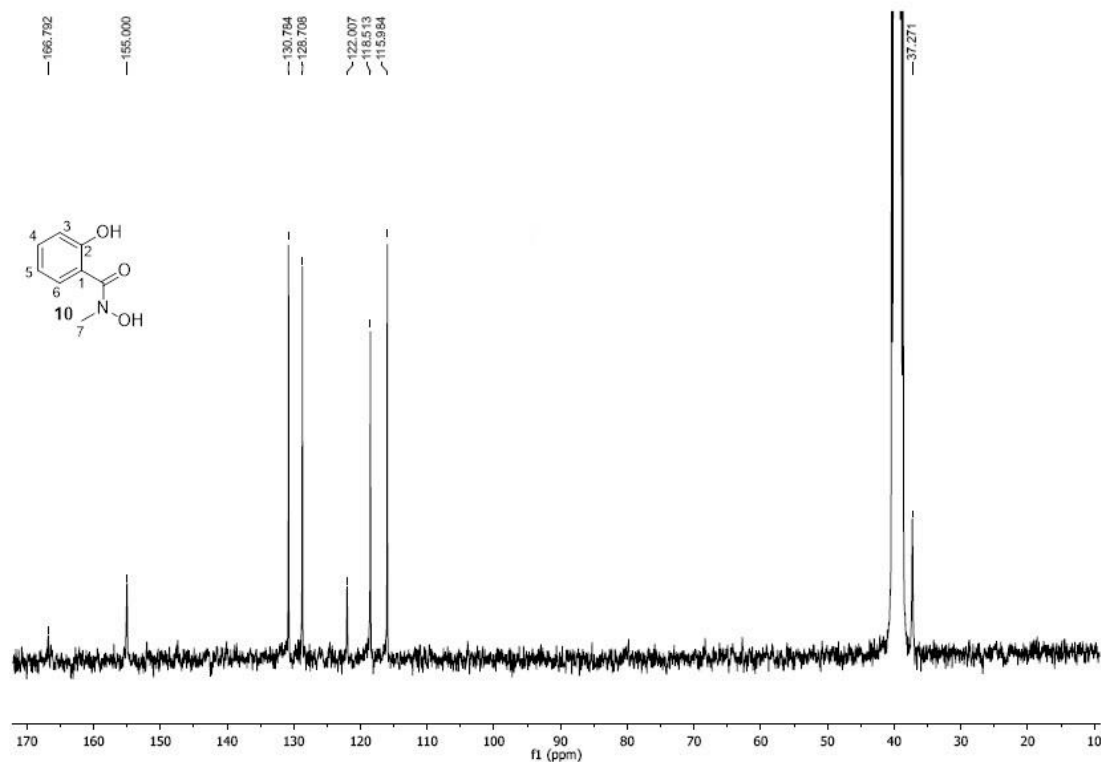
Figura 35 - Espectro de RMN de ^1H do composto **10** (DMSO- d_6 , 300 MHz).



Fonte: do autor.

No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 36), pode-se observar um sinal relativo ao carbono de metila C-7 em δ 37,27, característico de grupos metil ligado a átomos eletronegativos. Em δ 115,98, 118,51, 128,70, 130,78 se referem aos carbonos hidrogenados do anel aromático sendo o de menor deslocamento químico o carbono *orto* a hidroxila e o com maior deslocamento o carbono *orto* à carbonila. Isso se deve aos efeitos já explanados anteriormente. Os sinais dos carbonos aromáticos não hidrogenados são δ 122,00 e 155,00 que correspondem aos carbonos C-1, que é ligado à carbonila e o C-2, ligado à hidroxila fenólica. O sinal do carbono carbonílico, como já era esperado, apresentou um δ de 166,79 que é relativamente baixo para carbonilas, característico de carbonos carbonílicos de ácido hidroxâmicos.

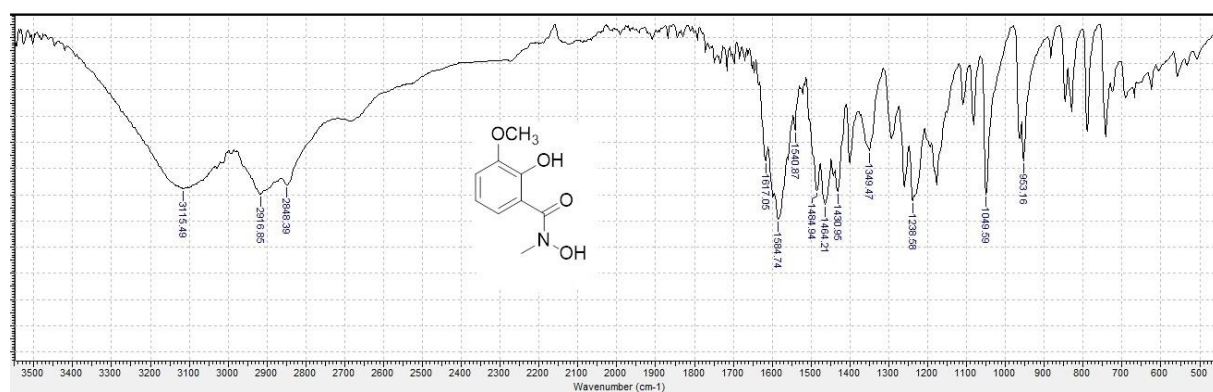
Figura 36 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto **10** (DMSO- d_6 , 75 MHz).



Fonte: do autor.

Dos dados obtidos pela análise do composto **9** em espectrometria no IV (Figura 37), destacam-se a presença de uma banda a 3115 cm^{-1} , característica de hidroxila fenólica; uma banda a 1617 cm^{-1} , que corresponde a deformação axial da ligação $\text{C}=\text{O}$ de ácidos hidroxâmicos; duas bandas a 1584 e 1540 cm^{-1} , representando ligações oriundas das vibrações $\text{C}=\text{C}$ do anel aromático.

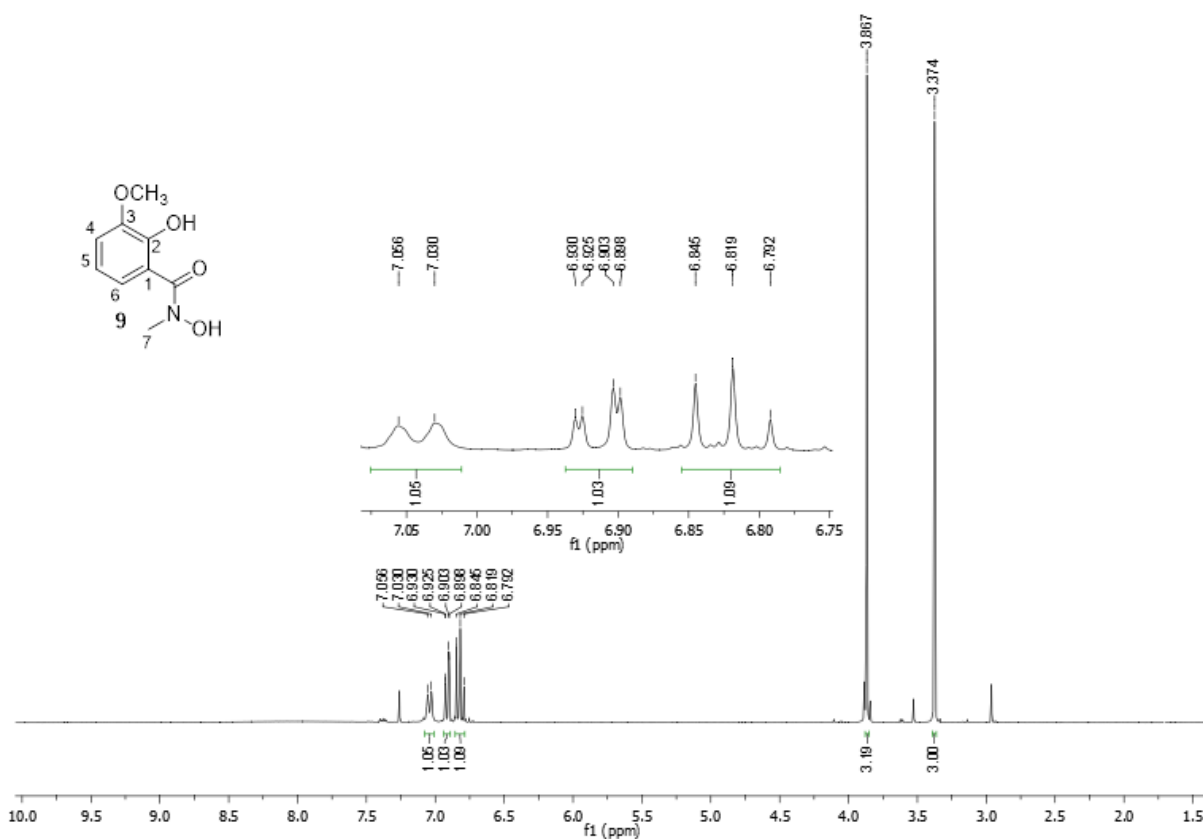
Figura 37 - Espectro no IV do composto **11**.



Fonte: do autor.

No espectro de RMN de ^1H (Figura 38), os sinais pertencentes aos hidrogênios aromáticos correspondem a um duplete, um duplete duplo e um triplete. O duplete com deslocamento químico de 7,42 ppm pertence ao hidrogênio H-6, vizinho à carbonila do ácido hidroxâmico. Esse hidrogênio possui uma constante de acoplamento de 7,8 Hz a mesma constante do triplete em δ 6,01 que pertence ao hidrogênio H-5. O duplete duplo em δ 6,82 pertence ao hidrogênio aromático *orto* à metoxila (H-4). É possível notar dois simpletos referentes à metila e à metoxila em δ 3,37 e 3,87, respectivamente.

Figura 38 - Espectro de RMN de ^1H do composto **11** (CDCl_3 , 300 MHz).

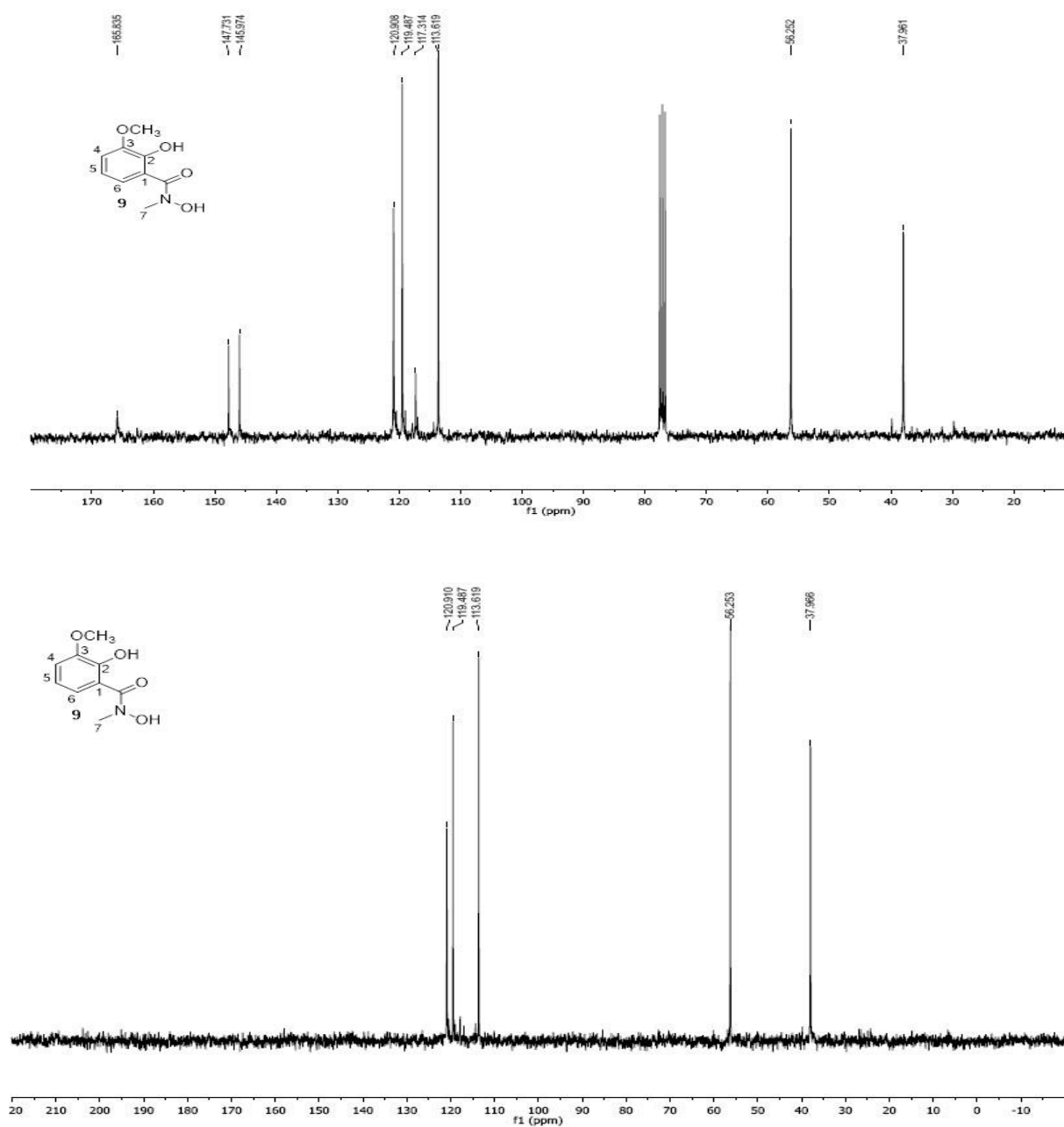


Fonte: do autor.

Já no espectro de RMN ^{13}C (Figura 39), observam-se dois sinais com carbonos metílicos em δ 37,96 e 56,25, sendo que o de sinal mais baixo corresponde a *N*-metila. Com ajuda do subespectro DEPT foi possível localizar os sinais referentes aos carbonos aromáticos hidrogenados em δ 113,61 C-4, 119,48 C-5, 120,90 C-6 e dos não hidrogenados em δ 117,31

C-1, 145,97 C-2, 147,731 C-3. Finalmente, em δ 165,83 nota-se o sinal do carbono carbonílico do ácido hidroxâmico.

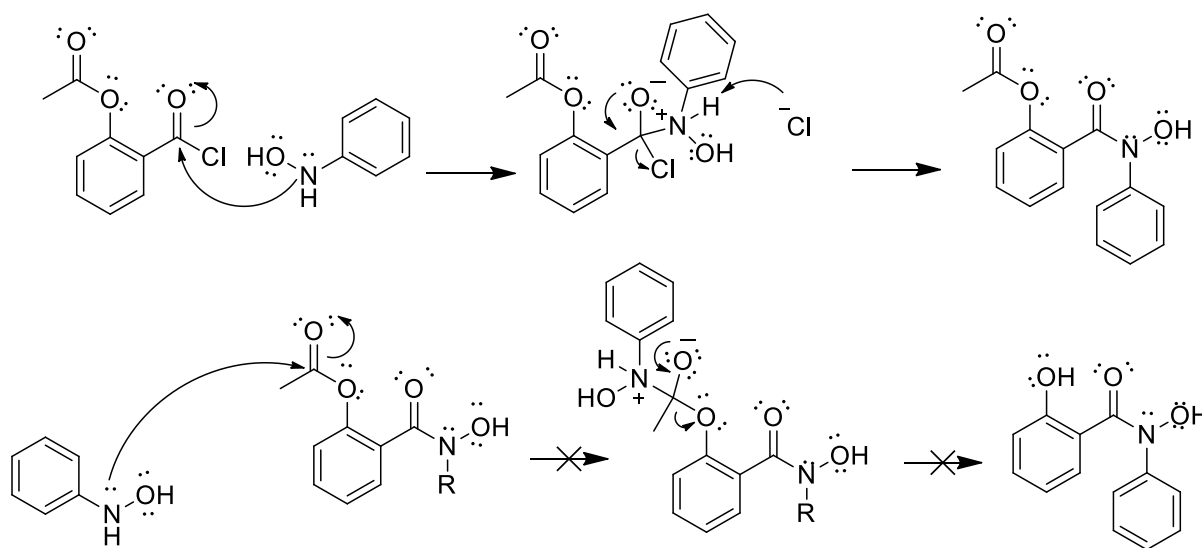
Figura 39 - Espectro de RMN de ^{13}C e subspectro DEPT-135 de **11** (CDCl_3 , 75 MHz).



Fonte: do autor.

Na reação de síntese dos ácidos *N*-fenilhidroxâmicos foi possível isolar e caracterizar somente os derivados acetilados. Isso possivelmente ocorreu pelo fato de a *N*-fenilhidroxilamina possuir um nitrogênio menos nucleofílico que aquele da *N*-metilhidroxilamina. Seu nitrogênio está conjugado a um anel aromático, o que deixa seu par de elétrons menos disponível para o ataque nucleofílico. Em contrapartida, o grupo metila da *N*-metilhidroxilamina doa densidade eletrônica para o nitrogênio, deixando-o mais nucleofílico. Somado aos efeitos eletrônicos, o anel benzênico proporciona um impedimento estérico maior que a metila. Por esses fatos, o ataque do nitrogênio da *N*-fenilhidroxilamina à carbonila não é tão efetivo, podendo gerar compostos onde o oxigênio é o nucleófilo (Figura 40). Outro fato decorrente dessa deficiência nucleofílica é a incapacidade da *N*-fenilhidroxilamina desacetilar efetivamente a hidroxila fenólica da substância em questão. Por essa razão o ácido hidroxâmico acetilado isolado da reação permaneceu acetilado.

Figura 40 - Mecanismo de formação dos ácidos *N*-fenilhidroxâmicos.



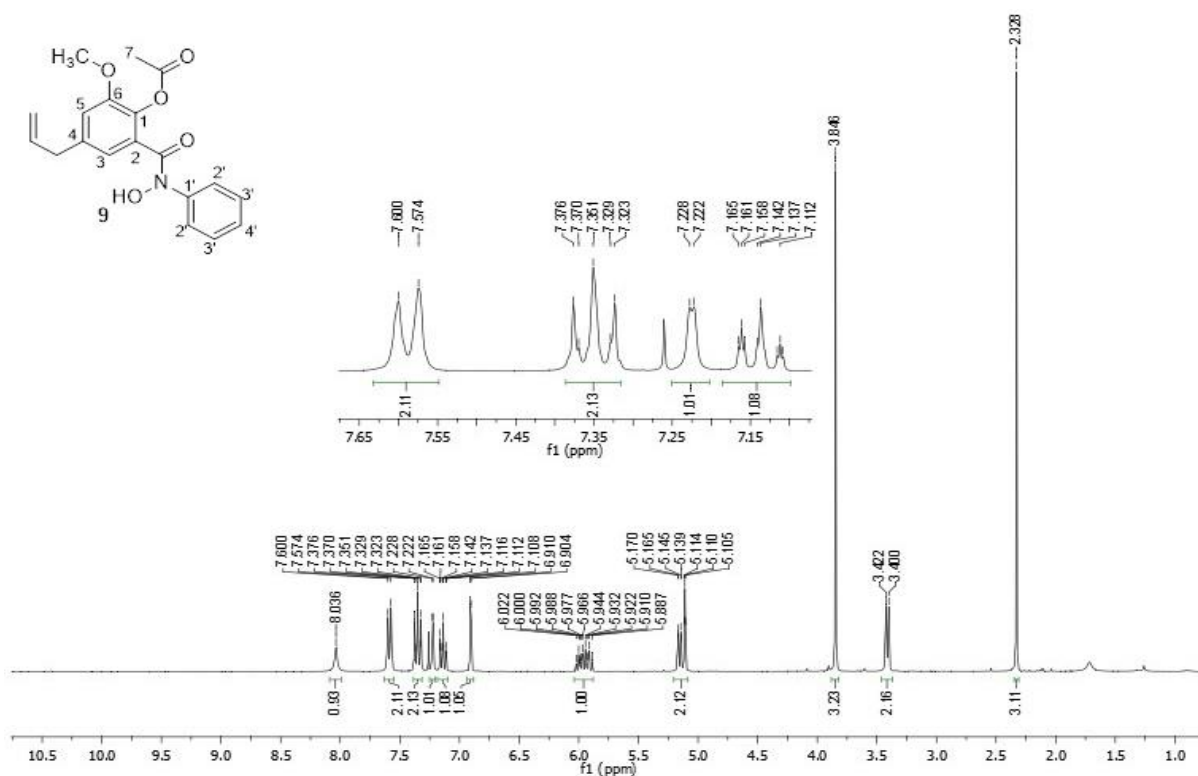
Fonte: do autor.

Por esse motivo, após a obtenção deste derivado acetilado foi empregada uma técnica de desacetilação seletiva, uma vez que o método empregado deve ser capaz de retirar apenas o grupo acetila, sem interferir com a carbonila do ácido hidroxâmico. A carbonila do ácido hidroxâmico se assemelha à carbonila de uma amida, tendo assim uma resistência intrínseca devido à ressonância com o nitrogênio. Porém, esse par de elétrons do nitrogênio também está

compartilhado com o anel aromático, deixando a carbonila mais reativa. Desse modo, o reagente escolhido para desacetilar a hidroxila fenólica foi uma solução aquosa de NaOH como já mencionado nos métodos. A desacetilação foi acompanhada por CCD e o produto não pode ser caracterizado sendo utilizado na etapa reacional seguinte.

No espectro de ^1H (Figura 41) é representado o espectro do acetato de 4-alil-2-(hidroxi(fenil)carbamoil)-6-metoxifenila, pode-se notar três simpletos em δ 8,03, 3,48, 2,32 correspondendo aos sinais da hidroxila hidroxâmica (N-OH), da metoxila (OCH_3) e da metila da acetila (C-7), respectivamente. O primeiro sinal é característico de hidroxila e está na região correspondente à mesma. Na região dos hidrogênios aromáticos, pode-se observar os hidrogênios oriundos do eugenol, são eles dois dupletos em δ 7,22 e 6,91, que correspondem ao hidrogênio vizinho à carbonila (H-3) e ao hidrogênio vizinho à metoxila (H-5). Essa atribuição é possível ao verificarmos os valores da constante de acoplamento desses dois hidrogênios que é de 1,8, mostrando a vizinhança dos mesmos. Nota-se um duplete integrando para dois hidrogênios em δ 7,59, que corresponde aos hidrogênios do anel aromático ligado ao nitrogênio do ácido hidroxâmico. Esses hidrogênios estão ligados aos carbonos (C-2' e C-3') que se situam na posição *orto* ao nitrogênio. Há um tripleto em δ 7,35 correspondendo a dois hidrogênios, esse sinal pertence aos dois hidrogênios aromáticos na posição *para* ao nitrogênio. Tanto o duplete como o tripleto possui uma constante de acoplamento de 7,5 Hz, o que indica que realmente se tratam de hidrogênios vizinhos. Finalmente, nota-se um multiplete com deslocamento químico de 7,14 ppm referente ao hidrogênio na posição *para* ao nitrogênio do ácido hidroxâmico H-4'.

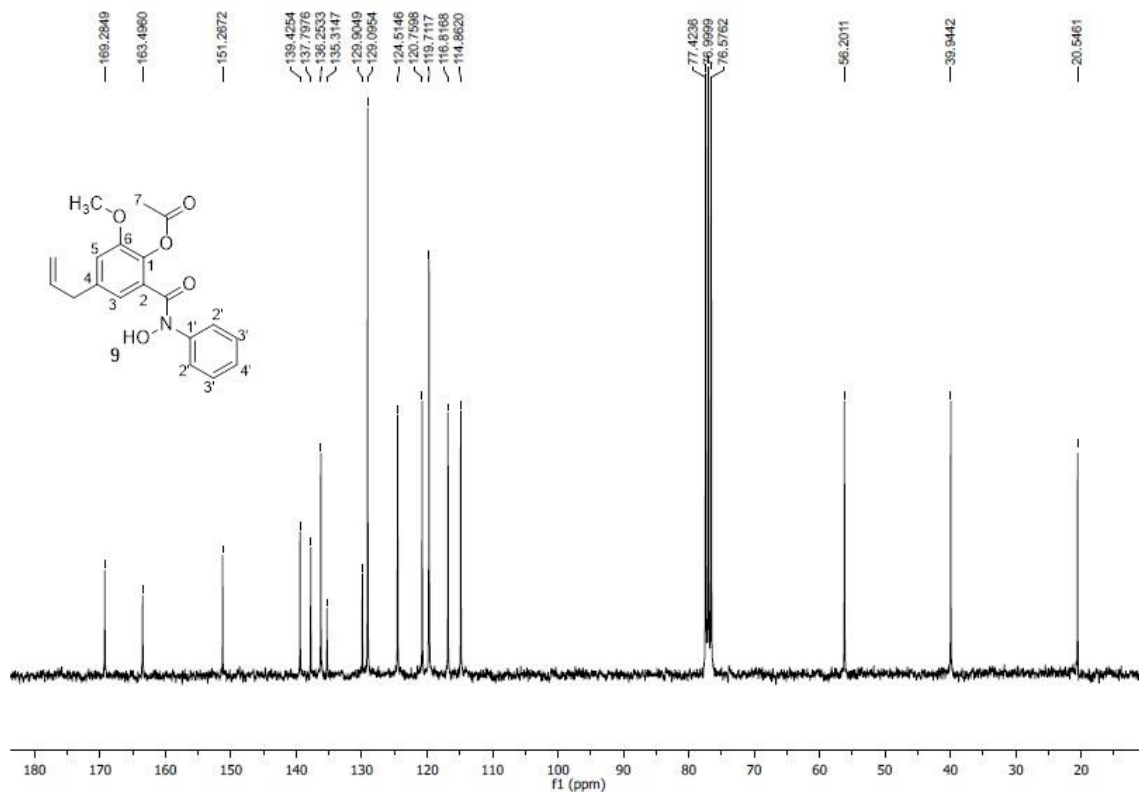
Figura 41 - Espectro de RMN de ^1H do composto **12a** (CDCl_3 , 300 MHz).



Fonte: do autor.

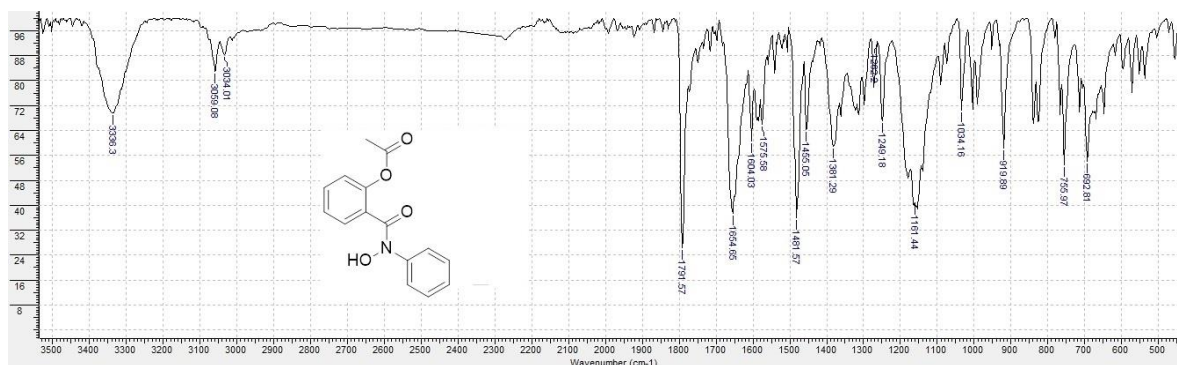
No espectro de ^{13}C (Figura 42), observou-se que **12a** apresenta 2 sinais que correspondem aos carbonos da metoxila δ 56,20 e da metila da acetila em δ 20,54. Já a δ 151,26 C-6, 139,42 C-1, 137,79 C-4, 129,90 C-2, notam-se os carbonos aromáticos não hidrogenados ligados aos grupos metoxila, hidroxila acetilada, cadeia alílica e à carbonila, respectivamente. Como já era de se esperar, o carbono ligado ao oxigênio acetilado apresentou um deslocamento químico semelhante ao apresentado anteriormente no ácido 2-acetoxi-5-alil-3-metoxibenzóico, quando a hidroxila fenólica estava acetilada. Foi possível localizar inequivocamente os carbonos do anel aromático ligado ao nitrogênio hidroxâmico em δ 119,71 (C-2') e 129,09 (C-3'), uma vez que os carbonos das posições *orto* e os carbonos da posição *para* se comportam de forma igual ao serem irradiados e dão origem a dois sinais de intensidade maior. Ainda, pode ser observado em δ 124,51 e 135,31 o carbono hidrogenado C-4' e o carbono não hidrogenado C-1', que possui um deslocamento químico maior por estar ligado diretamente a um átomo eletronegativo. Finalmente, em δ 163,49 e 169,28 observam-se os carbonos carbonílicos da acetila e da carbonila do ácido hidroxâmico, este último, sabidamente possui um deslocamento químico menor se comparado a ésteres.

Figura 42 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto **12a** (CDCl_3 , 75 MHz).



Fonte: do autor.

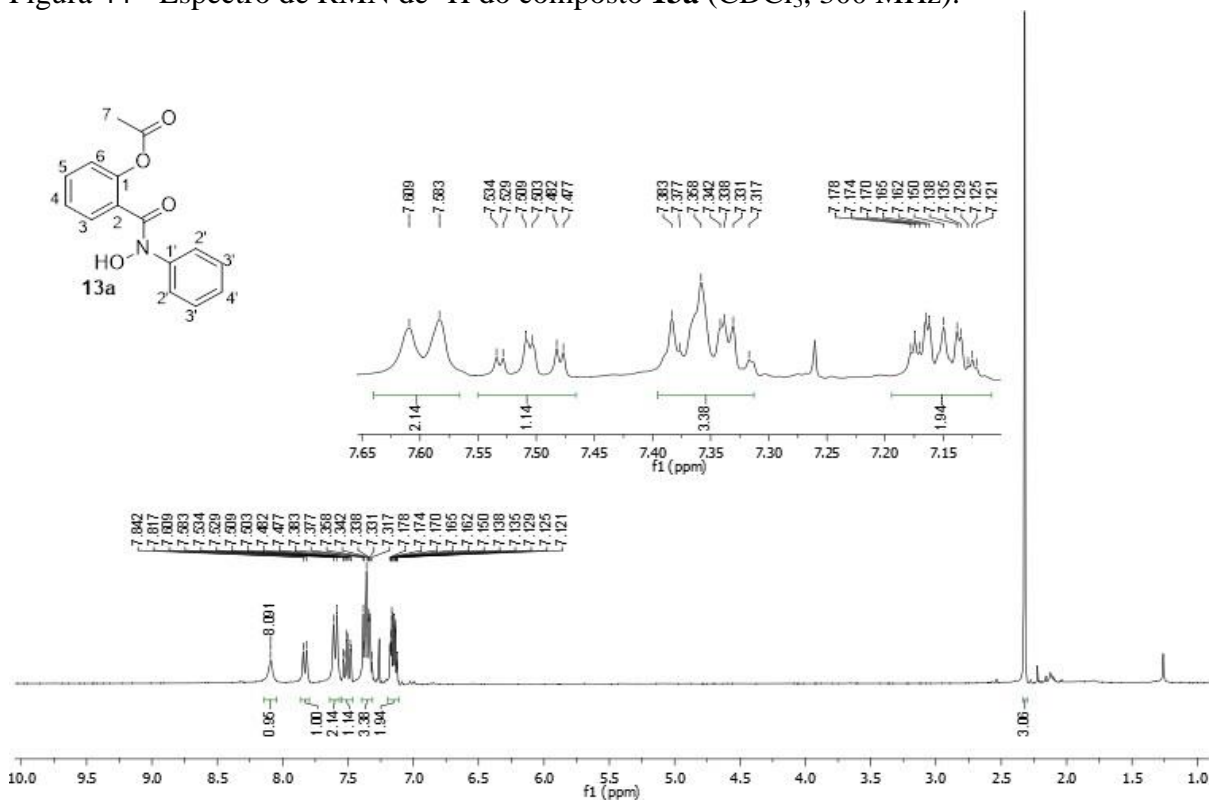
Na reação de formação do acetato de 2-(hidroxi(fenil)carbamoil)fenila também foi isolado o derivado acetilado, as bandas mais importantes no espectro de IV (Figura 43), destacam-se a presença de bandas de grande intensidade centradas a 1791 cm^{-1} , característica de carbonilas alifáticas de éster; uma banda de deformação axial a 1654 cm^{-1} referente a carbonila de ácido hidroxâmico. É possível notar também uma banda em 3338 referente a hidroxila ligada ao nitrogênio. Uma banda a 1604 cm^{-1} de intensidade média correspondente às ligações $\text{C}=\text{C}$ de do anel aromático; e uma banda característica $\text{C}-\text{O}$ de éster, a 1161 cm^{-1} .

Figura 43 - Espectro no IV do composto **13a**.

Fonte: do autor.

No espectro de ^1H (Figura 44), pode-se notar dois simpletos em δ 8,08 e 2,32 correspondendo aos sinais da hidroxila (N-OH) e da metila (H-7), respectivamente. Pode-se observar os 9 os sinais dos hidrogênios aromáticos na região pertinente, sendo um o duplete em δ 7,83 (H-3) e um multiplete em δ 7,50 (H-5), correspondentes aos hidrogênios *orto* e *para* à carbonila. Verificou-se J 7,5 Hz, o que configura um acoplamento de hidrogênios vizinhos. Nota-se um duplete integrando para dois hidrogênios em δ 7,6 que corresponde aos hidrogênios aromáticos H-2'. Há um multiplete em δ 7,31, esse sinal pertence aos hidrogênios da fenila ligada ao nitrogênio hidroxâmico H-3' e ao hidrogênio aromático H-4 que se encontra na posição *meta* à carbonila; esses hidrogênios tiveram sinais sobrepostos. Outro multiplete pode ser observado em δ 7,17-7,12 e corresponde ao deslocamento químico do hidrogênio aromático H-6 *orto* ao oxigênio acetilado e do hidrogênio aromático H-4' *para* ao nitrogênio.

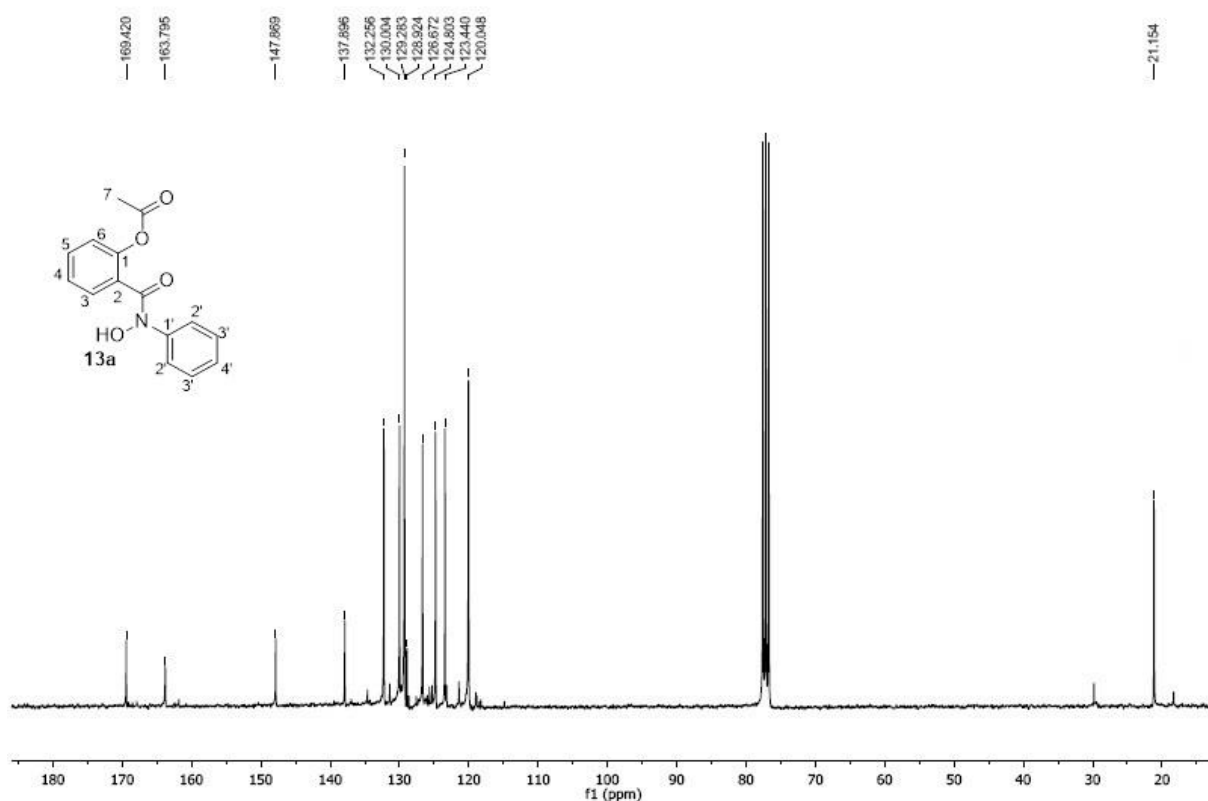
Figura 44 - Espectro de RMN de ^1H do composto **13a** (CDCl_3 , 300 MHz).



Fonte: do autor.

No espectro de ^{13}C (Figura 45) observou-se que o **13a** possui um sinal com deslocamento químico de 21,15 (C-7) referente à metila do grupo acetil. Já a δ 147,86, 137,89 e 128,92, notam-se os carbonos aromáticos não hidrogenados (C-1, C-1' e C-2) ligados ao oxigênio acetilado, ao nitrogênio e à carbonila, respectivamente. Seus deslocamentos químicos já foram discutidos anteriormente. Os carbonos aromáticos hidrogenados podem ser notados a δ 132,25 (C-3), 130,00 (C-5), 124,80 (C-4) e 123,44 (C-6). O deslocamento químico do carbono C-3 é maior, por estar localizado na posição *orto* à carbonila que é um grupo retirador de elétrons, já o carbono C-6, é o de menor deslocamento pois está na posição *orto* à acetoxila. Foi possível localizar inequivocamente os carbonos aromáticos hidrogenados do anel *N*-fenílico em δ 119,71 (C-2') e 129,09 (C-3'). Os carbonos C-2' têm um deslocamento químico menor pelo fato de estarem na posição *orto* ao nitrogênio, que é um doador de densidade eletrônica por ressonância. Finalmente, em δ 163,49 e 169,28 observam-se os carbonos carbonílicos da acetila e da carbonila do ácido hidroxâmico, que sabidamente possui um deslocamento químico menor se comparado a carbonila de ésteres.

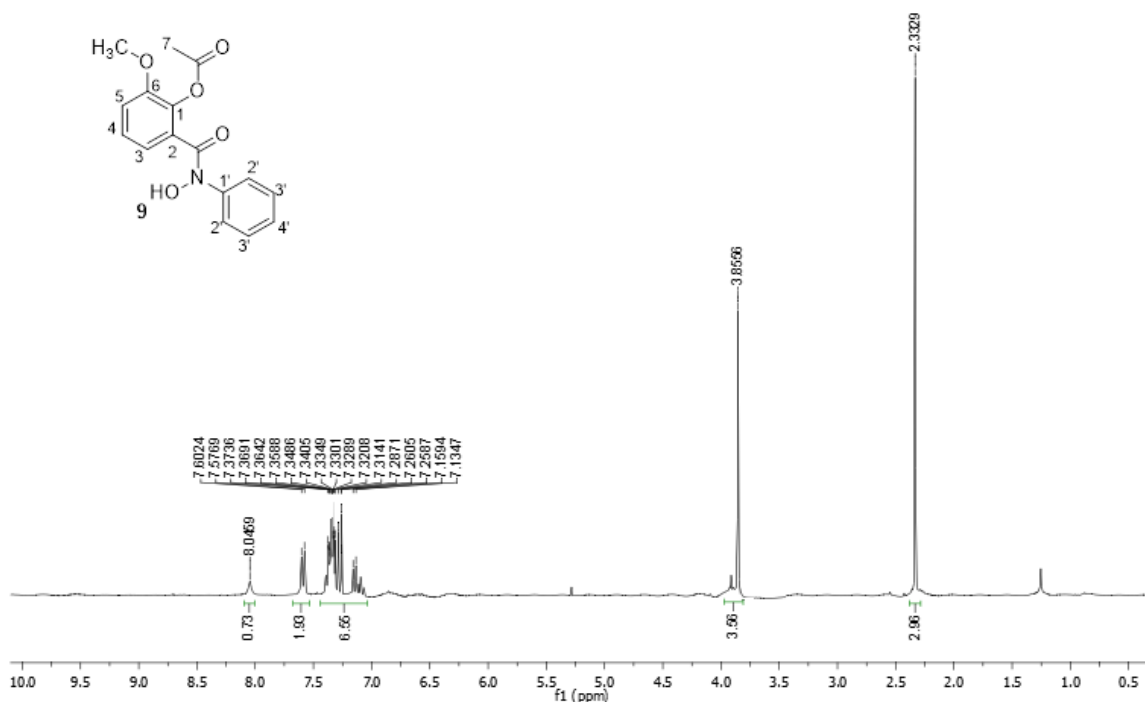
Figura 45 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto **13a** (CDCl_3 , 75 MHz).



Fonte: do autor.

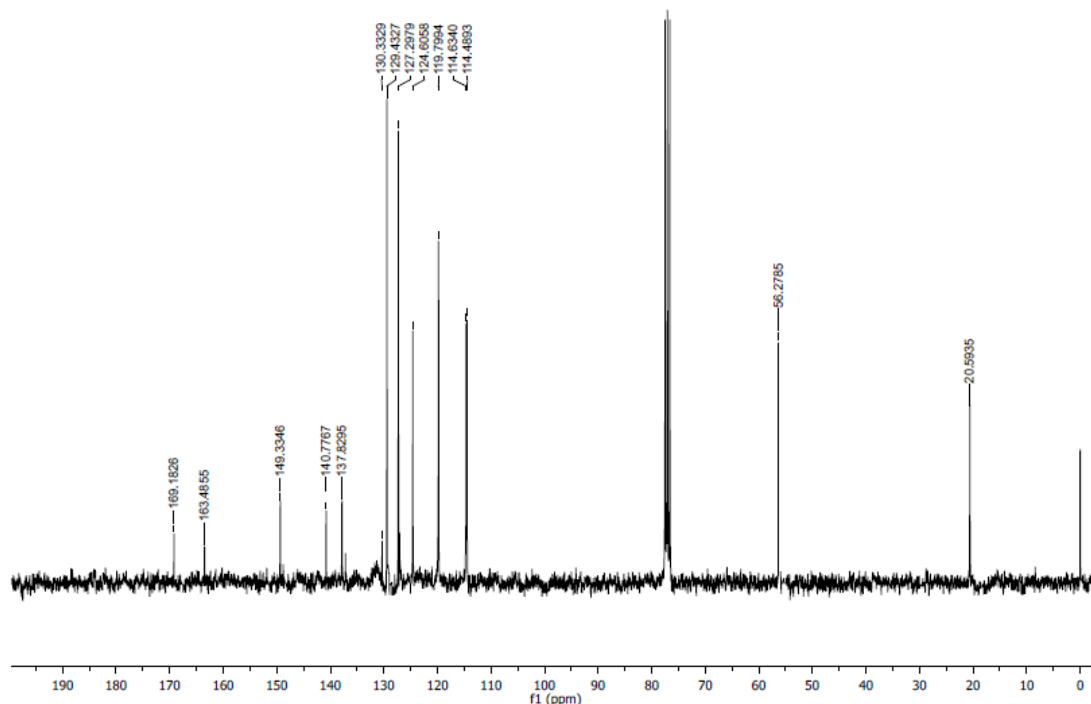
O ácido fenil-hidroxâmico derivado do ácido **5**, também foi enviado para análise de espectrometria de RMN na forma acetiladas. No espectro de RMN de ^1H (Figura 46), os sinais pertencentes aos hidrogênios aromáticos correspondem a um duplete e um multiplete. O duplete com deslocamento químico de 7,58 ppm pertence ao hidrogênio H-2'. Esse hidrogênio possui uma constante de acoplamento de 7,8 Hz. O multiplete entre δ 7,37-7,13 pertence aos seis hidrogênios aromáticos restantes. É possível notar dois simpletos referentes à metila e à metoxila da acetila em δ 2,33 e 3,85, respectivamente. Podemos observar também um simpleto em 8,04 que corresponde a hidroxila hidroxâmica.

Figura 46 - Espectro de RMN de ^1H do composto **14a** (CDCl_3 , 75 MHz).



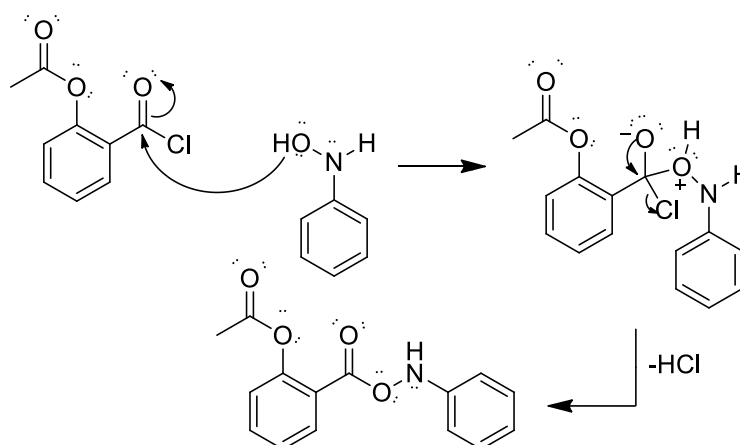
Fonte: do autor.

No espectro de ^{13}C (Figura 47), observou-se que molécula **14a** apresenta 2 sinais que correspondem aos carbonos da metoxila δ 56,27 e da metila da acetila em δ 20,59. Foi possível localizar inequivocamente os carbonos do anel aromático ligado ao nitrogênio hidroxâmico em δ 127,29 (C-2') e 129,43 (C-3'), uma vez que os carbonos das posições *orto* e os carbonos da posição *para* se comportam de forma igual ao serem irradiados e dão origem a dois sinais de intensidade maior. Ainda, pode ser observado em δ 130,33 e 137,62 o carbono hidrogenado C-4' e o carbono não hidrogenado C-1'. Já a δ 149,33 C-6, 140,77 C-1 e 114,63 C-2, notam-se os carbonos aromáticos não hidrogenados ligados aos grupos metoxila, hidroxila acetilada e à carbonila, respectivamente. Finalmente, em δ 163,49 e 169,28 observam-se os carbonos carbonílicos da acetila e da carbonila do ácido hidroxâmico.

Figura 47 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto **14a** (CDCl_3 , 75 MHz).

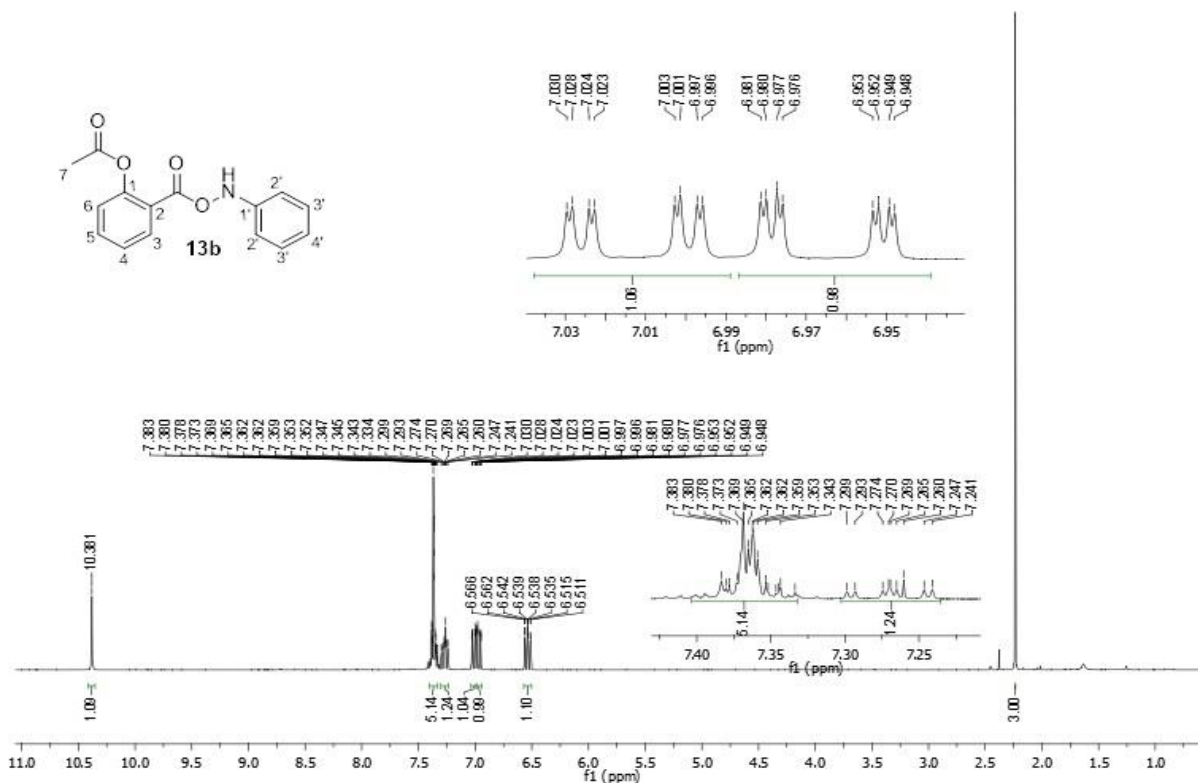
Fonte: do autor.

Da reação de formação dos ácidos *N*-fenilidroxâmicos foi isolado também um produto *O*-acilado **13b** da *N*-fenilidroxilamina, resultante do ataque da hidroxila da fenilidroxilamina. O produto se encontrava acetilado, isso ocorreu pelo fato da fenilidroxilamina possuir um nitrogênio menos nucleofílico se comparado ao nitrogênio da metilidroxilamina (Figura 48). O nitrogênio da hidroxilamina está conjugado a um anel aromático, o que deixa seu par de elétrons menos disponível para o ataque nucleofílico. Somado aos efeitos eletrônicos, o anel benzênico bloqueia estericamente o nitrogênio e, em contrapartida, expõe a hidroxila hidroxilamínica.

Figura 48 - Mecanismo de formação do produto de *O*-acilação.

Fonte: do autor.

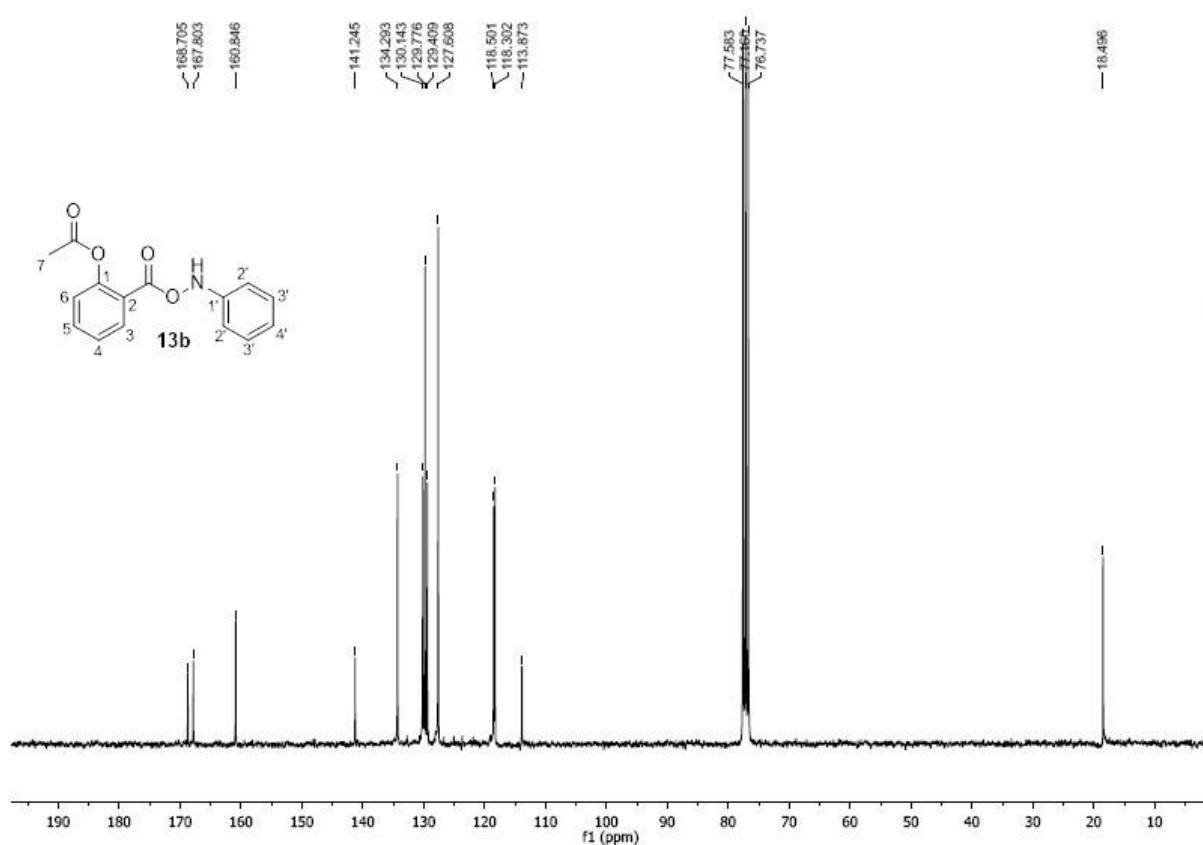
No espectro de RMN de ^1H (Figura 49) podemos visualizar os sinais referentes ao acetato de 2-(hidroxi(fenil)carbamoil)fenila, que é produto do ataque nucleofílico da hidroxila da *N*-fenilidroxilamina. O simpleto em δ 10,38 referente ao hidrogênio ligado ao nitrogênio anilínico. Na região dos aromáticos há quatro multipletos com deslocamento químico de 6,57-6,50, 7,03-6,94, 7,29-7,24 e 7,38-7,34 ppm correspondentes aos 9 hidrogênios aromáticos.

Figura 49 - Espectro de RMN de ^1H do composto **13b** (CDCl_3 , 300 MHz).

Fonte: do autor.

No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 50) são observados os sinais dos carbonos da acetila, em δ 18,49 (C-7) e o carbono carbonílico (C=O) em 168,70 ppm. Notam-se os carbonos aromáticos substituídos do núcleo acetilsalicílico em δ 118,87 (C-2) e 141,24 (C-1) e também dos não substituídos em 118,30 (C-6), 118,50 (C-3), 130,14 (C-5) e 134,29 (C-4). Além desses sinais, podemos notar os 6 carbonos oriundos do anel *N*-fenil-hidroxiâmico como dois sinais em δ 127,60 (C-2') e 129,77 (C-3'), de maior intensidade. Os pares de carbonos que se situam na posição *orto* ao nitrogênio possuem menor deslocamento químico, porque o nitrogênio doa densidade eletrônica e blinda os carbonos nessa posição. O carbono carbonílico do núcleo salicílico possui um deslocamento químico característico de carbonilas de éster, um pouco acima dos valores de carbonilas de ácidos hidroxiâmicos. Isso nos dá indícios que o derivado aqui apresentado é um (fenilamino)oxi)carbonil) resultante de um ataque nucleofílico da hidroxila hidroxiâmica.

Figura 50 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto **13b** (CDCl_3 , 75 MHz).

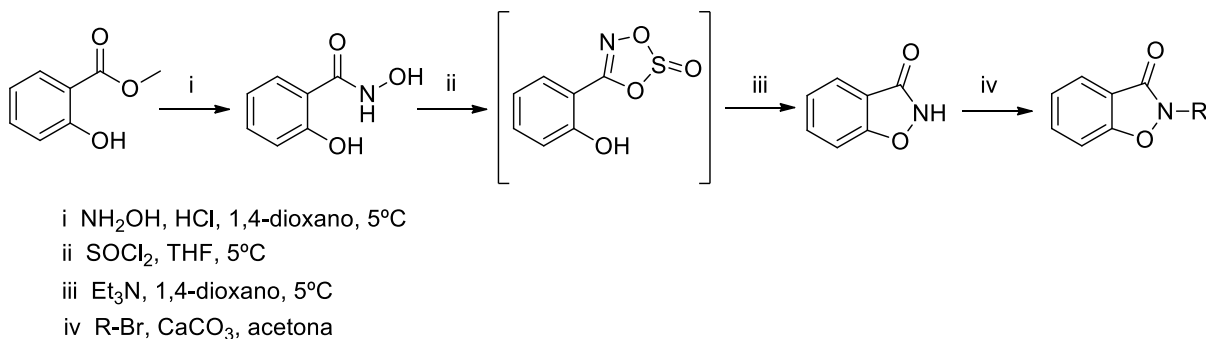


Fonte: do autor.

Os derivados benzisoxazolinônicos foram sintetizados através da reação de Mitsunobu a partir dos derivados hidroxâmicos obtidos na etapa anterior. O mecanismo proposto para a reação de Mitsunobu é bastante complexo. A identidade dos intermediários e os papéis que eles desempenham têm sido objeto de debate. Essa reação ganhou grande aceitação na síntese orgânica devido a sua eficácia e versatilidade. Descoberta em 1967, esta reação converte um grupo hidroxila de ácidos ou álcoois em um bom grupo de saída que é capaz de ser deslocado por uma grande variedade de nucleófilos (HUGHES, 2009).

Existem outras metodologias para a síntese de benzisoxazolinonas, como aquela utilizada por Anand e colaboradores (2014). Essa metodologia também utiliza o ácido hidroxâmico como intermediário chave que, colocado para reagir com cloreto de tionila em THF, forma um intermediário que é ciclizado e o heterociclo formado possui o nitrogênio não-substituído, passível a reações de substituição nucleofílica com inúmeros brometos de alquila, o que possibilita a formação de derivados *N*-alquílicos.

Figura 51 - Esquema reacional de formação de *N*-alquil-benzisoxazolinonas.



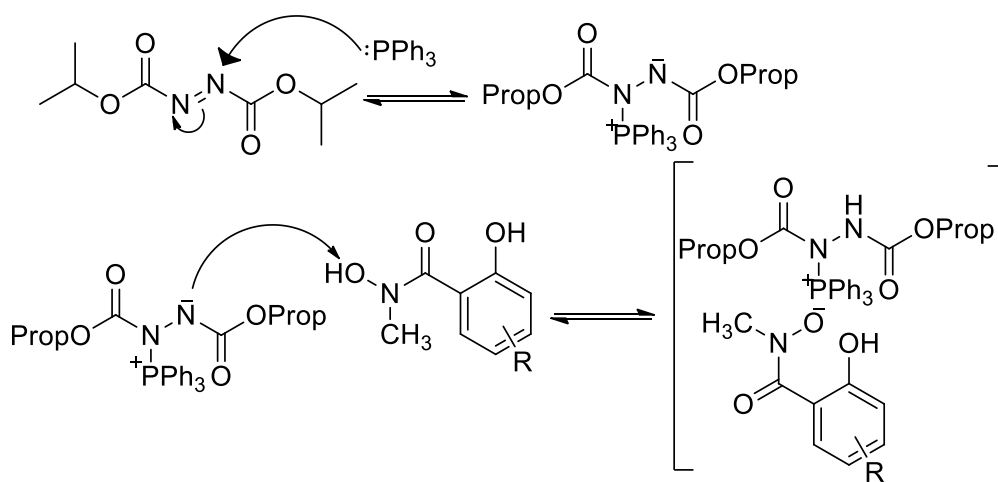
Fonte: Anand, et al., 2014.

A metodologia usada para síntese desses heterociclos foi à aplicada por Shi (2000) e utilizou DIAD e Ph_3P em THF seco. Um passo muito importante para o sucesso da síntese é a secagem efetiva do THF, uma vez que traços de água podem provocar reações paralelas indesejadas. A ordem de adição dos reagentes na reação de Mitsunobu também é importante. Nessa reação, dissolveu-se primeiro o ácido hidroxâmico e trifenilfosfina em THF a 0°C utilizando um banho de gelo, e adicionou-se lentamente o DIAD para que seja favorecida a reação intramolecular. Os produtos ciclizados foram purificados por CCS, porém alguns terão que passar por uma purificação adicional, pois os espectros de RMN revelaram a presença de

diisopropil hidrazina-1,2-dicarboxilato que é um produto de redução do DIAD (HUGHES, et al., 1988).

Inicialmente, a trifenilfosfina ataca o nitrogênio do grupo azo do DIAD e leva à formação de um intermediário, que por sua vez desprotona o ácido hidroxâmico respectivo para formar o par iônico mostrado na Figura 52.

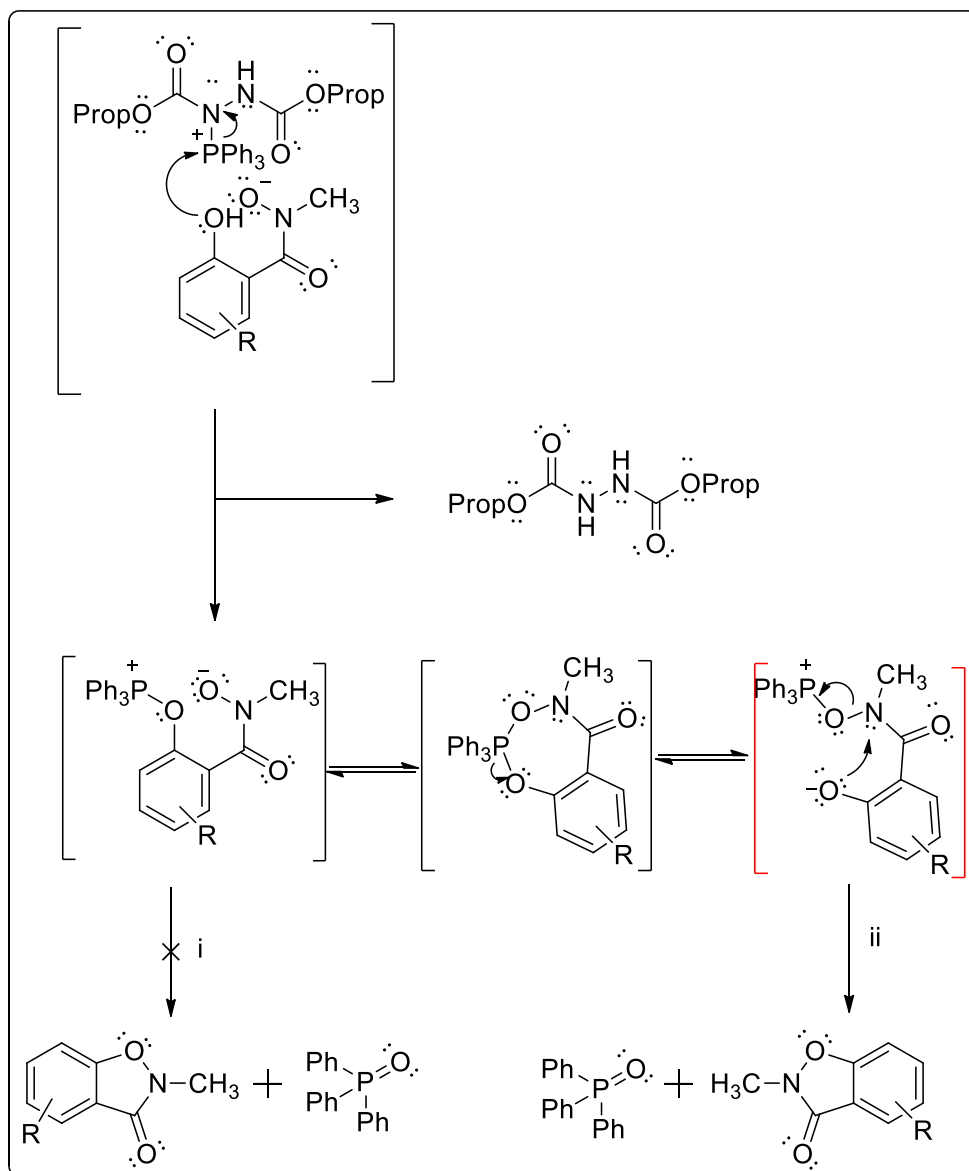
Figura 52 - Proposta de mecanismo de formação do par iônico na reação para a síntese dos derivados benzisoxazolinônicos.



Fonte: do autor.

Na sequência, a hidroxila fenólica ataca o átomo de fósforo do par iônico, dando origem ao íon oxifosfônio e ao diisopropil hidrazina-1,2-dicarboxilato derivado não reativo do DIAD. A proporção e a interconversão dos intermediários seguintes vão depender do pKa do ácido hidroxâmico, da natureza dos substituintes nesses substratos e da polaridade do solvente (GROCHOWSKI, D. et al, 1982; CAMP, E. et al, 1989). Apesar dos vários intermediários de fósforo possíveis no meio reacional, somente o estágio do par iônico destacado na figura 46 é de interesse. Isso acontece porque o oxigênio do íon fenóxido (caminho ii), em reações de Mitsunobu, atua somente como nucleófilo e não como um grupo abandonador mesmo na forma de oxifosfônio, uma vez que o carbono aromático ligado ao oxifosfônio não se comporta satisfatoriamente como bom eletrófilo nessas condições reacionais. O ataque nucleofílico ao carbono ligado ao oxifosfônio seria energeticamente desfavorável, pois haveria a perda da aromaticidade, o que é representado pelo caminho **i** (CAMP, E. et al, 1989;). Assim, o ataque nucleofílico do fenóxido ao nitrogênio é o único caminho produtivo **ii**, dando origem, ao ciclo desejado e ao óxido de trifenilfosfina (Figura 53).

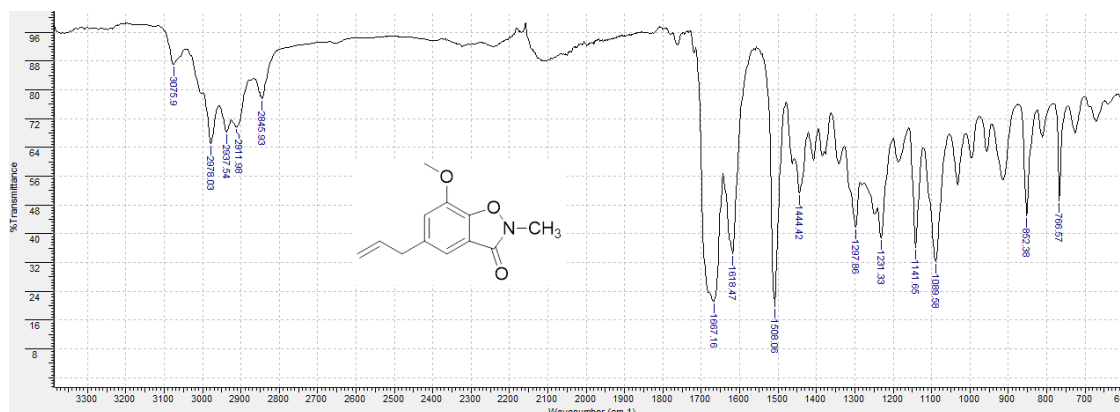
Figura 53 - Proposta de mecanismo de formação do núcleo bezisoxasolinônico.



Fonte: do autor.

Dos dados obtidos pela análise do produto 5-alil-7-metoxi-2-metilbenzo[d]isoxazol-3(2H)-ona em espectrometria no IV (Figura 54), destaca-se uma banda mais intensa que corresponde à ligação C=O em 1667 cm^{-1} correspondente a carbonila do heterociclo, duas banda a $\bar{\nu}$ 1231 e 1069 cm^{-1} , relacionada à deformação axial C-O; a ausência de uma banda de O-H de fenol, indica assim, que houve a ciclização; duas bandas a $\bar{\nu}$ 1618 e 1508 cm^{-1} , oriunda das vibrações das ligações C=C do anel aromático.

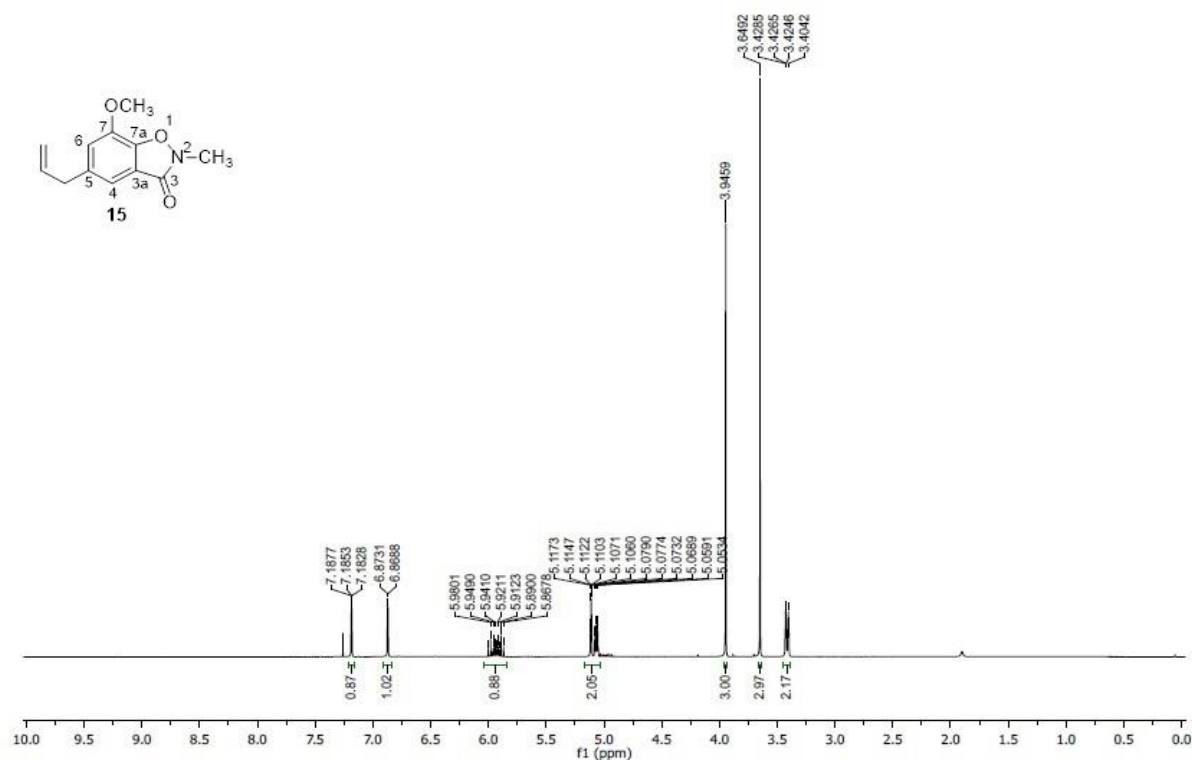
Figura 54 - Espectro no IV do composto **15**.



Fonte: do autor.

No espectro de RMN de ¹H (Figura 55), pode-se observar o sinal relativo ao hidrogênio do grupo OCH₃ em δ 3,94. Os sinais referentes aos dois hidrogênios aromáticos são observados em δ 7,18 (H-4) e 6,86 (H-6), comparando com o seu precursor observa-se uma mudança substancial no deslocamento químico do hidrogênio H-4 que está *orto* a carbonila. Esse decaimento no δ pode ser resultado da ciclização. Em δ 3,64 nota-se um simpleto referente aos três hidrogênios da metila H-2, que possui um deslocamento químico um pouco acima da região de carbonos metílicos por estar ligado diretamente a um átomo eletronegativo. Os sinais referentes à cadeia alílica estão preservados.

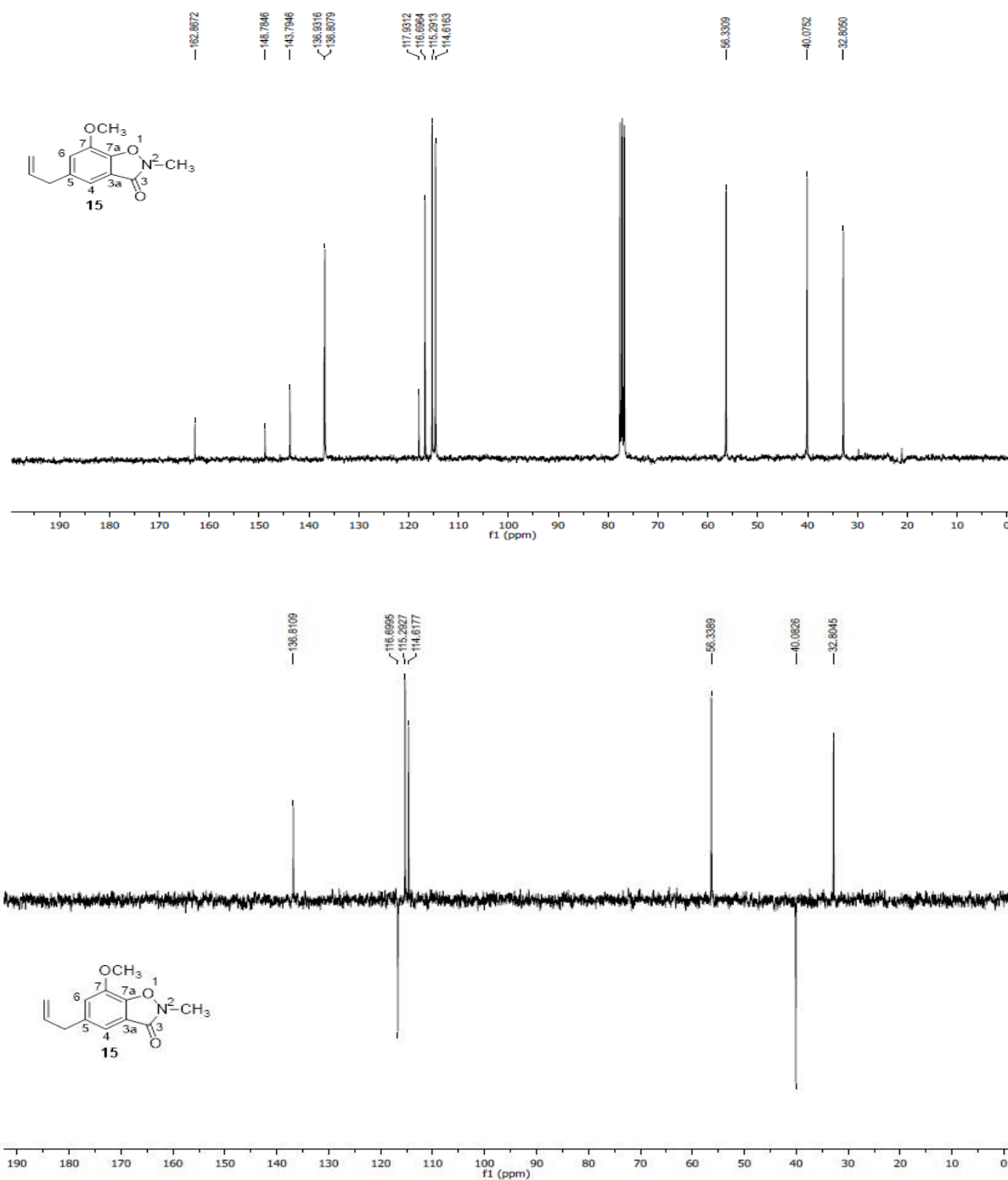
Figura 55 - Espectro de RMN de ^1H do composto **15** (CDCl_3 , 300 MHz).



Fonte: do autor.

No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 56), os carbonos aromáticos hidrogenados podem ser notados a δ 123,25 (C-4) e 115,29 (C-6). A δ 148,77, 143,78, 136,93, 117,93 notam-se os sinais dos carbonos aromáticos ligados aos grupos metoxila, ao oxigênio, a cadeia alílica e à carbonila, respectivamente. Finalmente, em δ 162,86 pode-se notar o sinal de carbono carbonílico (C=O). O subspectro DEPT-135 (Figura 56) auxiliou na atribuição dos sinais de RMN- ^{13}C .

Figura 56 - Espectro de RMN de ^{13}C e subspectro DEPT-135 de **15** (CDCl_3 , 75 MHz).

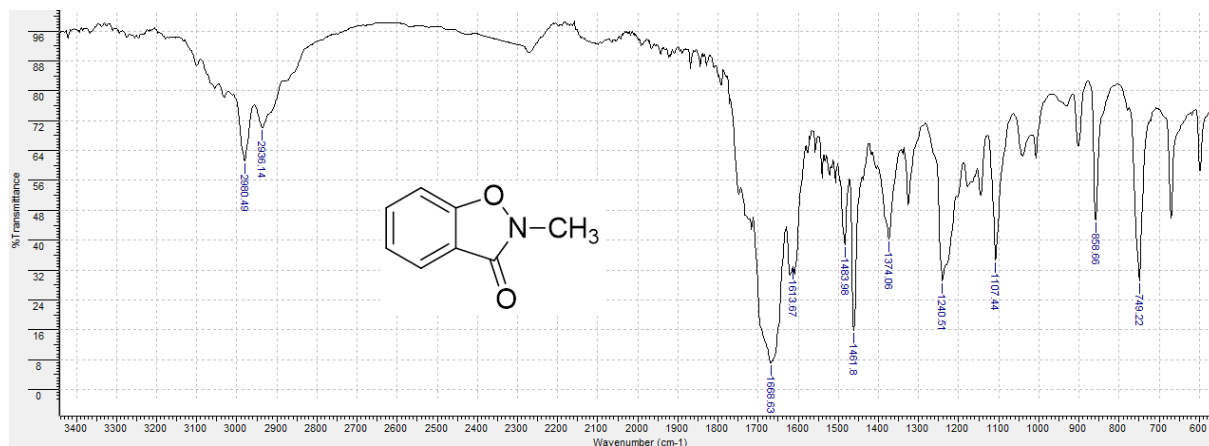


Fonte: do autor.

A caracterização por espectrometria no IV para o produto 2-metilbenzo[d]isoxazol-3(2H)-ona (Figura 57) exibiu como principal característica a ausência da banda de O-H do fenol, fato que sugere a ciclização. Uma banda de estiramento axial em 1668 cm^{-1} , correspondente à ligação C=O do ciclo, duas bandas a $\bar{\nu}$ 1240 e 1107 cm^{-1} , relacionada à

deformação axial C-O. Foi observada também de uma banda em $\bar{\nu}$ 1613 cm^{-1} típica de ligação de C=C do anel aromático.

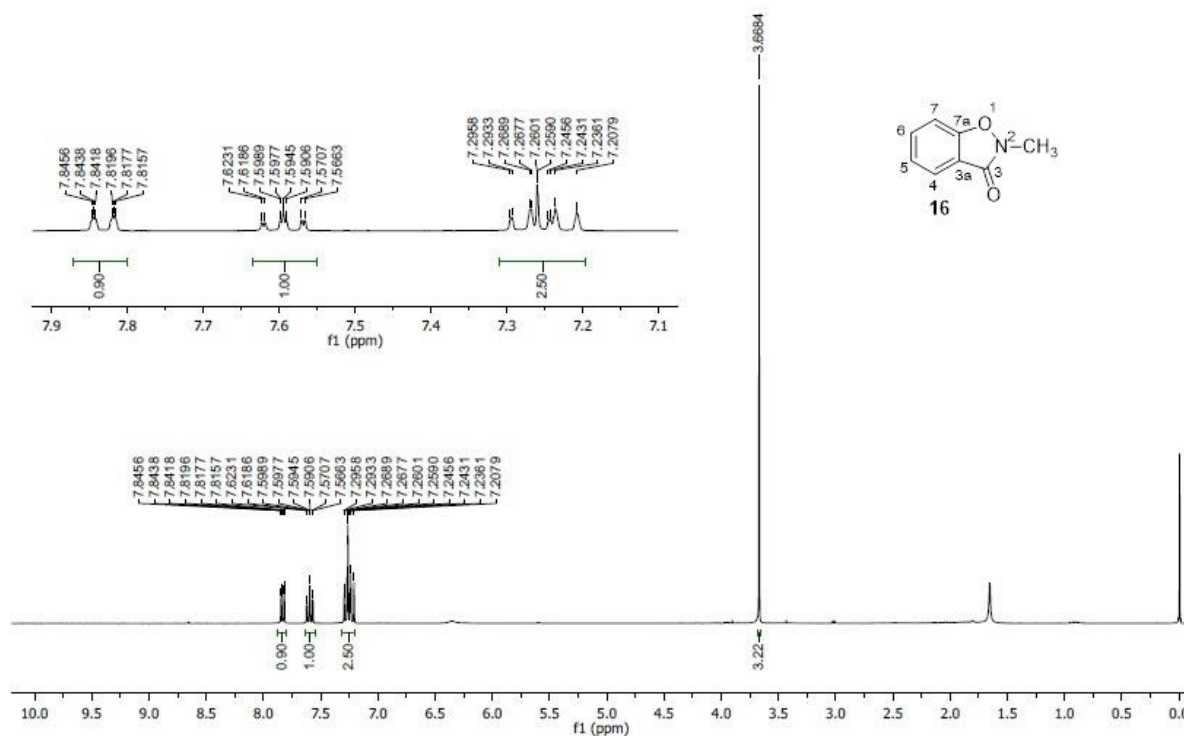
Figura 57 - Espectro no IV do composto **16**.



Fonte: do autor.

No espectro de RMN de ^1H (Figura 58), podemos notar um sistema de sinais semelhantes ao seu precursor, um multipeto em δ 7,84-7,81 relativo ao hidrogênio aromático H-4, este por sua vez mais desblindado por estar *orto* a carbonila do ciclo. Em δ 7,60 se vê um multipeto referente ao hidrogênio aromático H-6. Também se observa um segundo multipeto em δ 7,29-7,20 referente aos hidrogênios H-5 e H-7. Os valores dos deslocamentos químicos dos hidrogênios aromáticos do ciclo são maiores quando comparados aos de seu precursor. É possível observar também um simpleto em 3,66 ppm, atribuído à metila ligada ao nitrogênio. Não se podem visualizar os dois sinais correspondendo às hidroxilas fenólica e hidroxâmica, o que é condizente com a formação do produto.

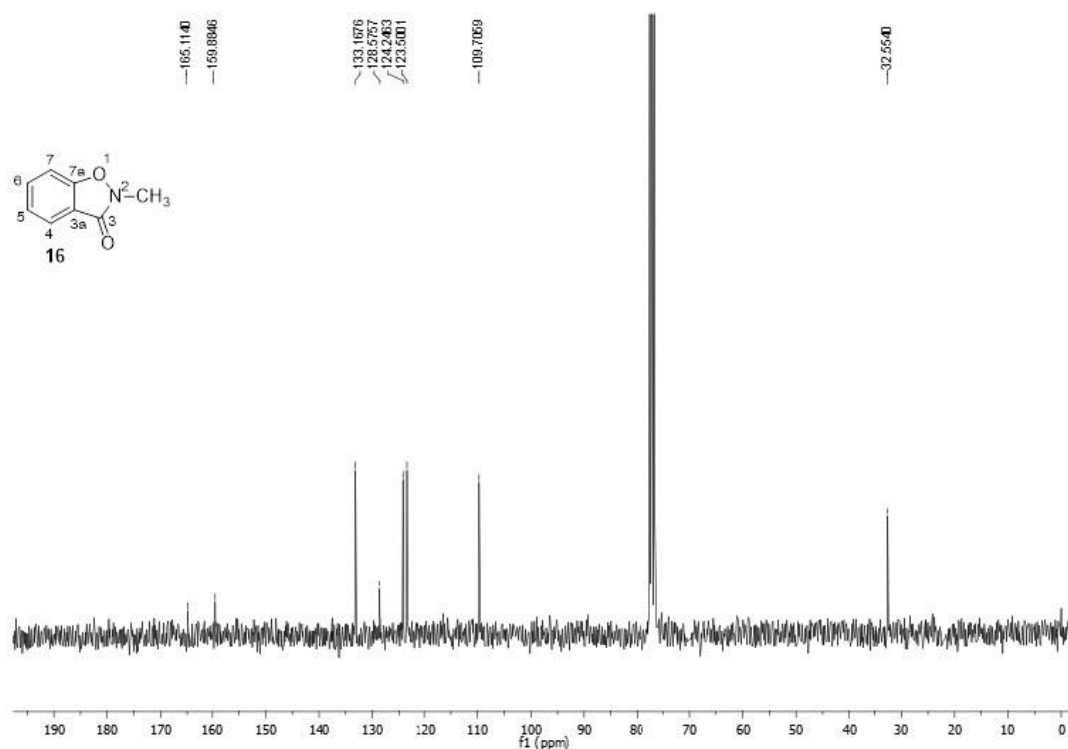
Figura 58 - Espectro de RMN de ^1H do composto **16** (CDCl_3 , 300 MHz).



Fonte: do autor.

No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 59), pode-se observar um sinal relativo ao carbono de metila C-2 em δ 32,55, característico de grupos metil ligado a átomos eletronegativos. Em δ 133,16 (C-6), 124,24 (C-5), 123,50 (C-3a), 109,70 (C-7) se referem aos carbonos hidrogenados do anel aromático sendo o de menor deslocamento químico o carbono *orto* a ao oxigênio do ciclo e o com maior deslocamento o carbono *orto* à carbonila. Isso se deve aos efeitos já explanados anteriormente. Os sinais dos carbonos aromáticos não hidrogenados são δ 128,57 e 159,88 que correspondem aos carbonos C-4 que é ligado à carbonila e o C-7a, ligado ao oxigênio, respectivamente. O sinal do carbono carbonílico, como já era esperado, apresentou um δ de 165,11. Houve um decréscimo no deslocamento químico se comparado ao ácido hidroxâmico precursor, isso acontece porque a carbonila integra agora um ciclo.

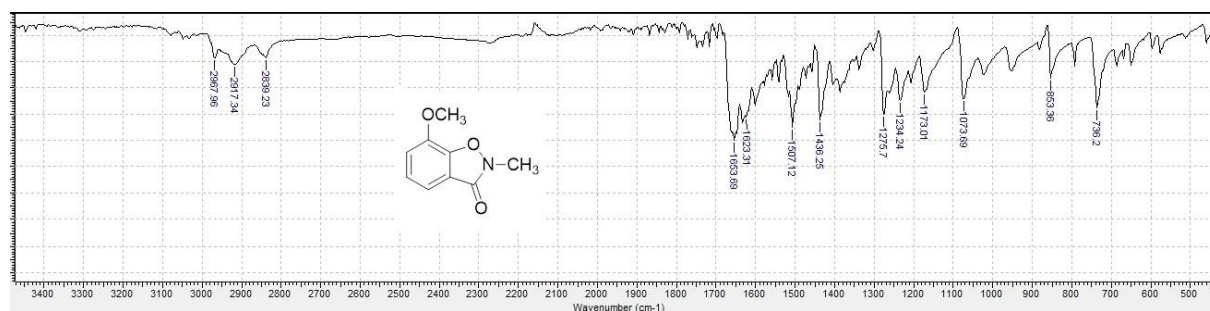
Figura 59 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto **16** (CDCl_3 , 75 MHz).



Fonte: do autor.

A análise do espectro no IV do 7-metoxi-2-metilbenzo[d]isoxazol-3(2H)-ona (Figura 60) nos permite visualizar uma banda em 1653 cm^{-1} referente a deformação axial da ligação $\text{C}=\text{O}$ do ciclo, duas bandas uma em $\bar{\nu}$ 1275 e outra 1073 cm^{-1} referente a estiramento axial da ligação $\text{C}-\text{O}$ de éter e duas bandas em $\bar{\nu}$ 1623 e 1507 cm^{-1} , característica de ligações $\text{C}=\text{C}$ do anel aromático. Não existe sinal de hidroxila fenólica.

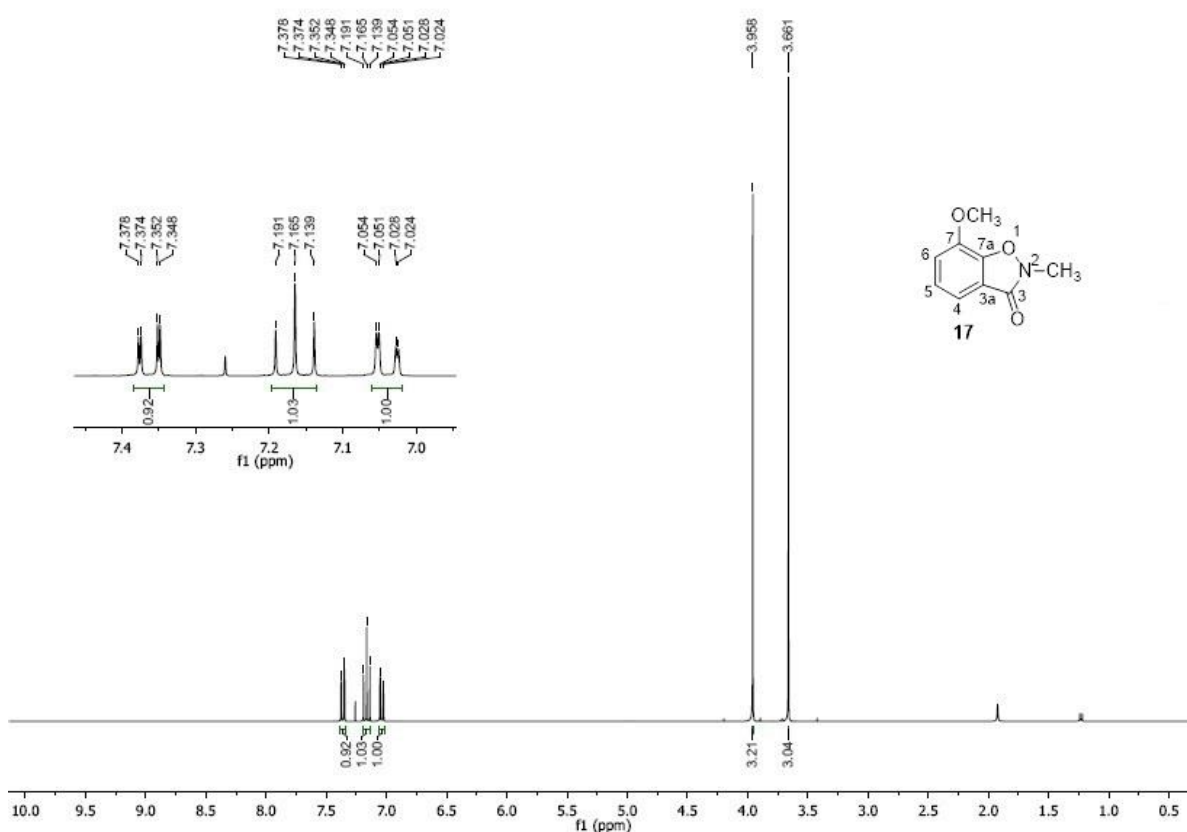
Figura 60 - Espectro no IV do composto **17**.



Fonte: do autor.

No espectro de RMN de ^1H (Figura 61), os sinais pertencentes aos hidrogênios aromáticos correspondem a dois dupletos duplos e um triplete. O dupletto duplo com deslocamento químico de 7,36 ppm foi atribuído ao H-4, vizinho a carbonila do ciclo. Esse possui J de 7,8 Hz a mesma constante do triplete em δ 7,16 que se relacionou ao H-5. O hidrogênio H-5 possui um deslocamento de 7,165 ppm que é maior que o δ do hidrogênio H-6 (δ 7,04), diferentemente do que ocorria com seu precursor, onde a situação era inversa. O dupletto duplo em δ 7,04 pertence ao hidrogênio aromático *orto* a metoxila. É possível notar dois simpletos referentes à metila e a metoxila em δ 3,37 e 3,86, respectivamente.

Figura 61 - Espectro de RMN de ^1H do composto **17** (CDCl_3 , 300 MHz).

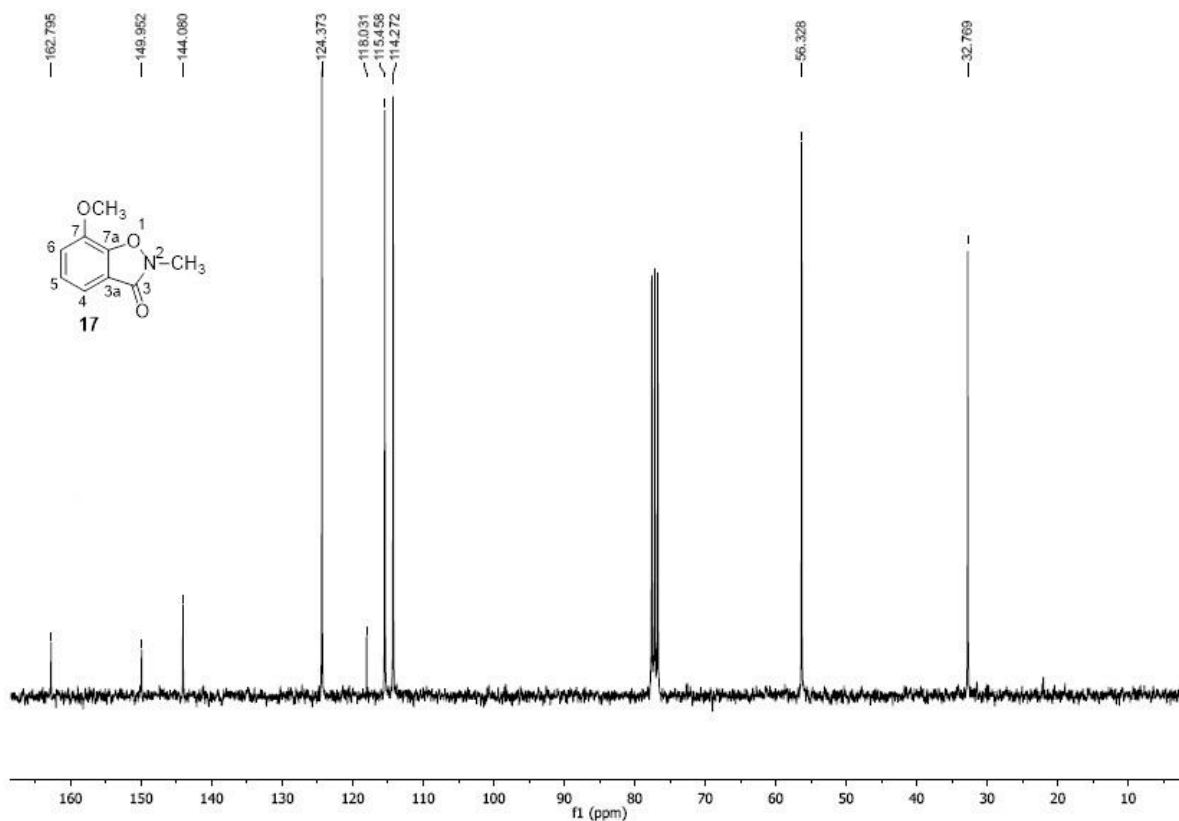


Fonte: do autor.

Já no espectro de RMN de ^{13}C (Figura 62), observam-se dois sinais com carbonos metálicos em δ 32,76 e 56,32. Foi possível localizar os sinais referentes aos carbonos aromáticos hidrogenados em δ 114,27 (C-6), 115,45 (C-5) e 124,37 (C-4) e dos não

hidrogenados em δ 118,03 (C-3a), 144,08 (C-7a) e 149,95 (C-7). Finalmente, em δ 162,79 nota-se o sinal do carbono carbonílico do núcleo benzisoxazolinônico (C=O).

Figura 62 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto **17** (CDCl_3 , 75 MHz).

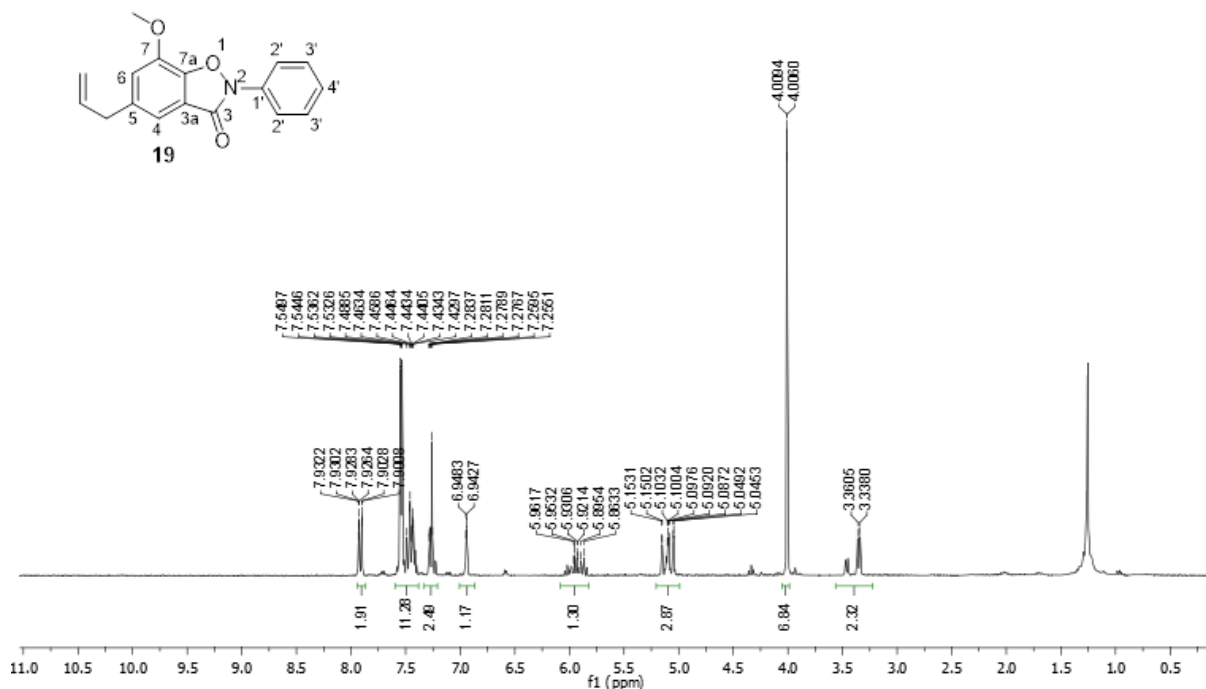


Fonte: do autor.

O espectro de RMN do 5-alil-7-metoxi-2-metilbenzo[d]isoxazol-3(2H)-ona (**18**) mostrou que após a primeira purificação por coluna cromatográfica o produto estava contaminado com material de partida. A mistura passou por uma segunda coluna para a depuração do produto e obtenção do mesmo puro. Por problemas técnicos ainda não foi possível enviar o mesmo para uma nova análise de RMN.

No espectro de RMN de ^1H (Figura 63), podem-se notar os sinais característicos dos substituintes oriundos do eugenol, os dois multipletos e o duplete referentes aos hidrogênios da cadeia alílica a δ 5,96 – 5,86 ($\underline{\text{H}}\text{C}=\text{CH}_2$), δ 5,15 – 5,04 ($\text{HC}=\underline{\text{C}}\text{H}_2$) e δ 3,35 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-CH}$) com uma constante de acoplamento de 6,6 Hz. Também é possível notar o sinal referente a metoxila em δ 4,00. Esses sinais estão duplicados ou com a integral excedendo o seu valor normal, revelando a presença do precursor. Na região dos aromáticos podemos notar a presença dos 14 hidrogênios aromáticos.

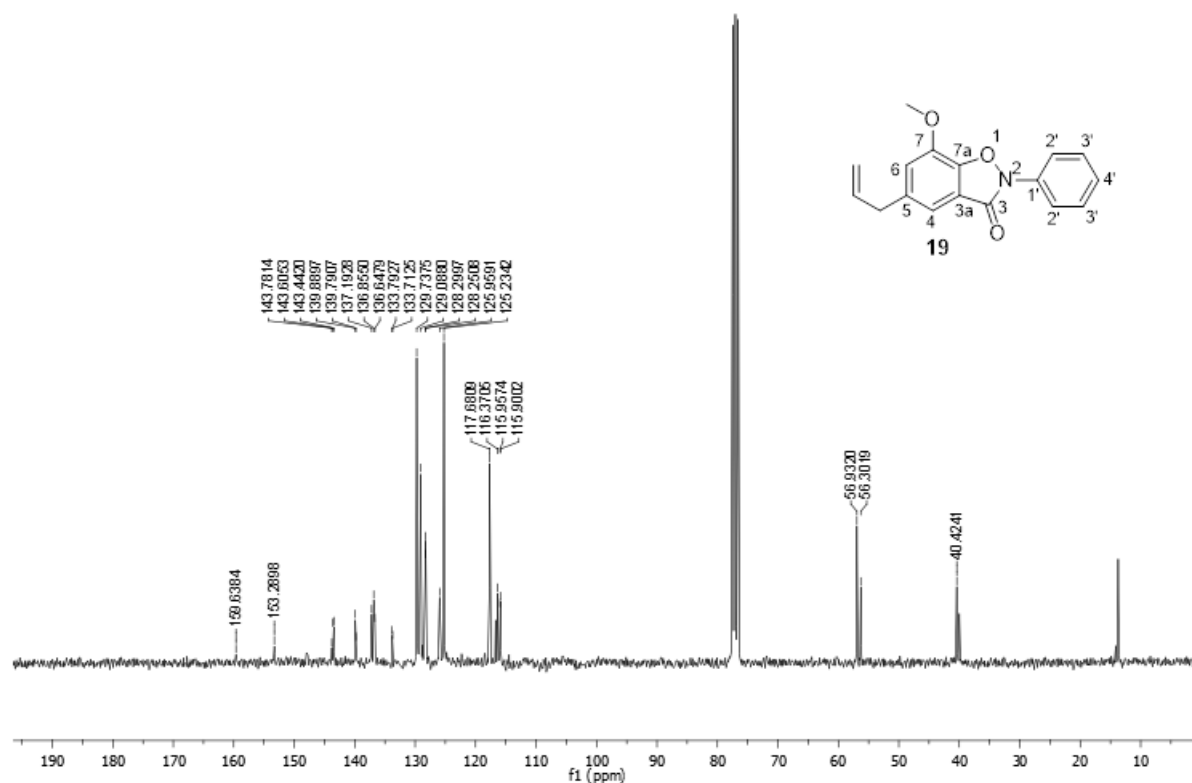
Figura 63 - Espectro de RMN de ^1H do composto **18** (CDCl_3 , 75 MHz).



Fonte: do autor.

No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 64), pôde-se observar o sinal relativo ao carbono da metoxila a δ 56, bem como os sinais referentes aos carbonos da cadeia lateral alílica a δ 40,42 ($\text{H}_2\text{C}-\text{CH}=\text{CH}_2$), 115,61 ($\text{HC}=\text{CH}_2$) e 136,8 ($\text{HC}=\text{CH}_2$). Os carbonos aromáticos podem ser notados entre δ 143,78 e 115,90, podendo destacar os sinais deferentes aos carbonos C-2' e C-3' do substituinte fenílico em δ 125 e 129, respectivamente. É possível notar também os carbonos C-7 e C-7a. Todos os sinais referidos estão duplicados, pois a amostra analisada apresentava-se contaminada com seu precursor. Uma errata será apresentada com a análise de RMN e IV do produto purificado.

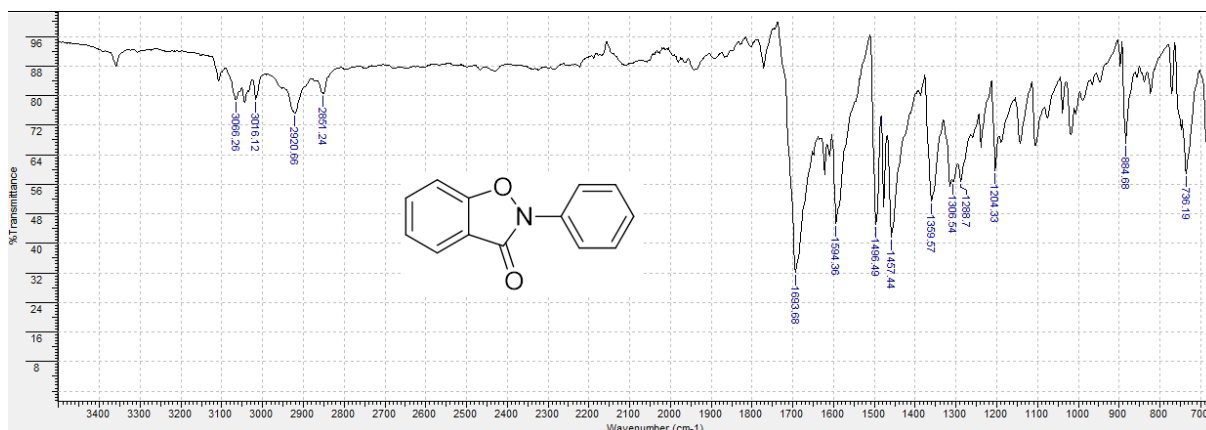
Figura 64 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto **18** (CDCl_3 , 75 MHz).



Fonte: do autor.

Os dados obtidos pela análise do produto 2-fenilbenzo[d]isoxazol-3(2H)-ona em espectrômetro no IV (Figura 65), destacam-se a presença de uma banda em 1694, que corresponde à carbonila do ciclo benzisoxazolinônico; em 1204 cm^{-1} banda de deformação axial característica da ligação C-O; e ainda bandas a 1594 e 1496 cm^{-1} , referentes as vibrações axiais das ligações duplas (C=C) do anel aromático.

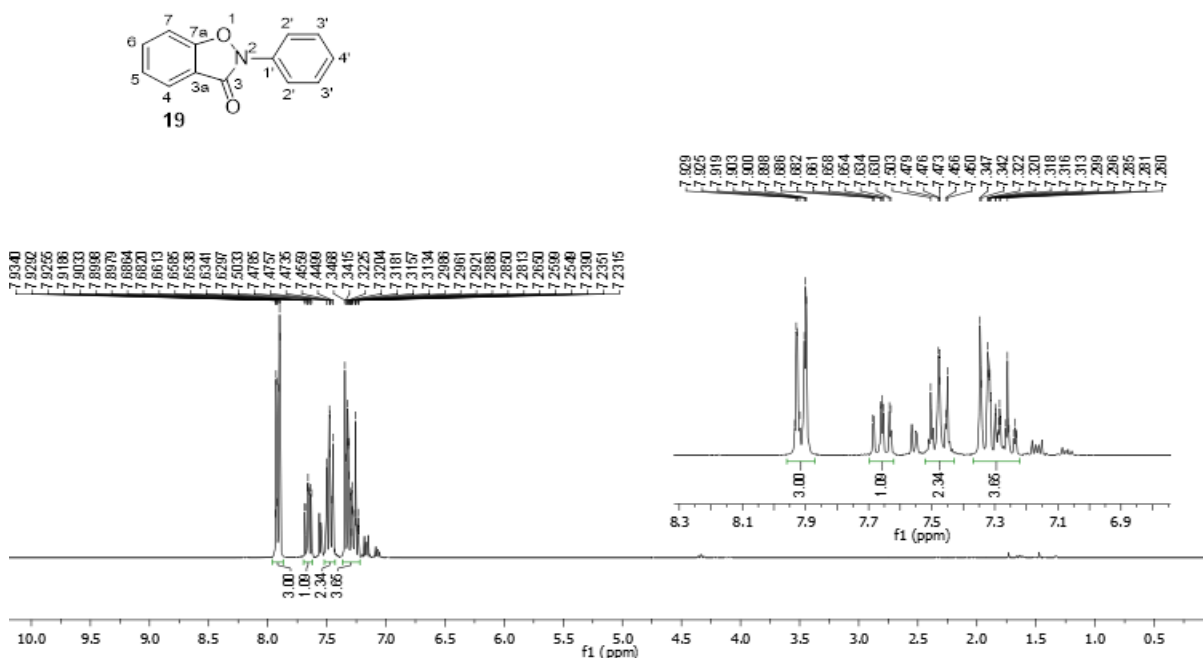
Figura 65 - Espectro no IV do composto **19**.



Fonte: do autor.

No espectro de RMN de ^1H (Figura 66) podemos notar um multipeto entre δ 7,92 – 7,89 relativo aos hidrogênios aromáticos H-4 e H-2', este primeiro por sua vez mais desblindado por estar *orto* a carbonila do ciclo. Em δ 7,68 – 7,62 se vê um multipeto referente ao hidrogênio aromático H-6. Também se observa um segundo multipeto em δ 7,50 – 7,44 referente aos hidrogênios H-3'. Também se observa um terceiro multipeto em δ 7,34 – 7,25 referente aos hidrogênios H-5, H-7, H-4'.

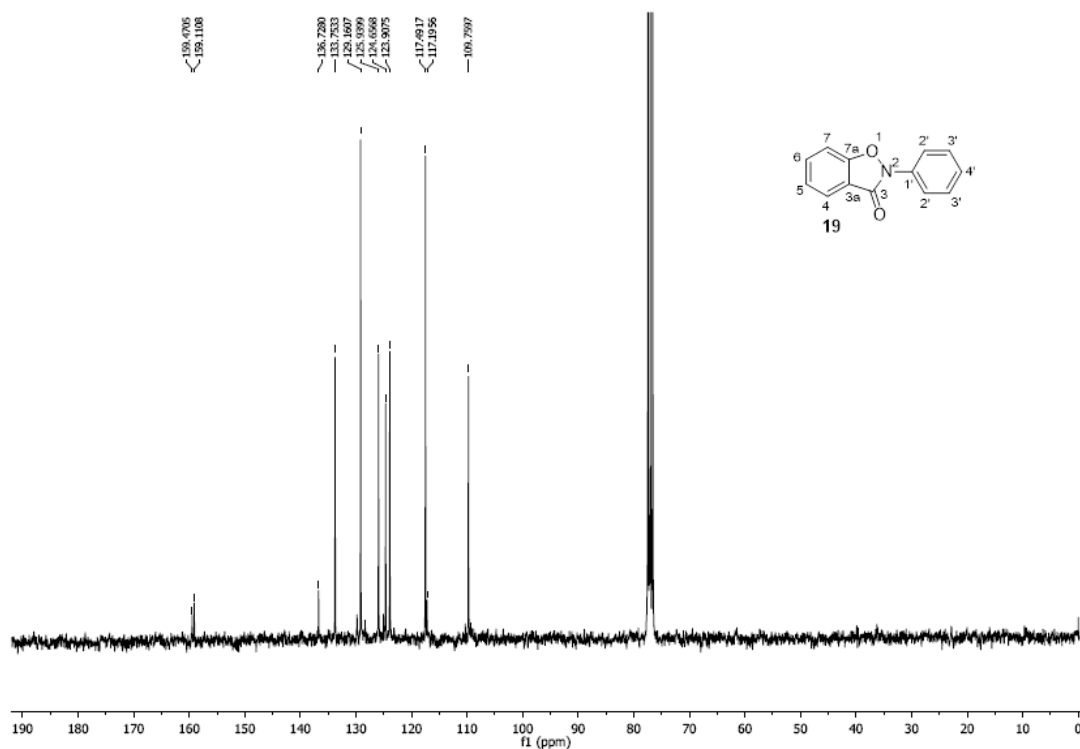
Figura 66 - Espectro de RMN de ^1H do composto **19** (CDCl_3 , 300 MHz).



Fonte: do autor.

No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 67), pode-se observar um sinal relativo ao carbono de metila C-3 em δ 159,57, característico de grupos carbonila ligados a um átomo de nitrogênio. Os sinais em δ 136,84, 129,27, 126,04, 117,58 se referem aos carbonos do grupo fenila, esse fato nos indica que a inserção do mesmo foi efetiva. Os sinais dos carbonos aromáticos não hidrogenados são δ 129,27 e 159,21 que correspondem aos carbonos C-3a, que é ligado à carbonila e o C-7a, ligado ao oxigênio, respectivamente. Os demais sinais dos carbonos aromáticos do ciclo benzisoxazolinônico se encontram em δ 133,86, 129,91, 124,75, 109,87.

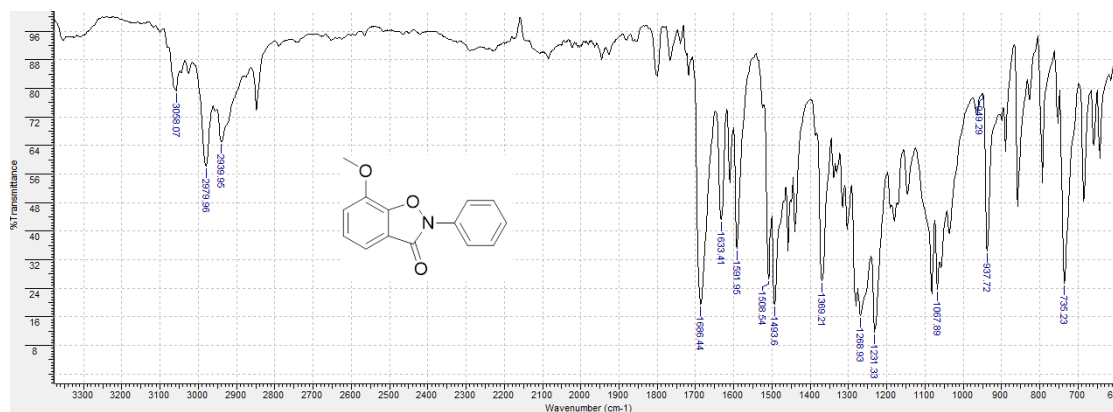
Figura 67 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto **19** (CDCl_3 , 75 MHz).



Fonte: do autor.

A análise do espectro no IV do 7-metoxi-2-fenilbenzo[d]isoxazol-3(2H)-ona (Figura 68) nos permite visualizar uma banda em 1666 cm^{-1} referente a deformação axial da ligação $\text{C}=\text{O}$ do ciclo, duas bandas uma em $\bar{\nu}$ 1231 e outra 1067 cm^{-1} referente a estiramento axial da ligação $\text{C}-\text{O}$ de éter e duas bandas em $\bar{\nu}$ 1633 e 1508 cm^{-1} , característica de ligações $\text{C}=\text{C}$ do anel aromático. Não existe sinal de hidroxila fenólica.

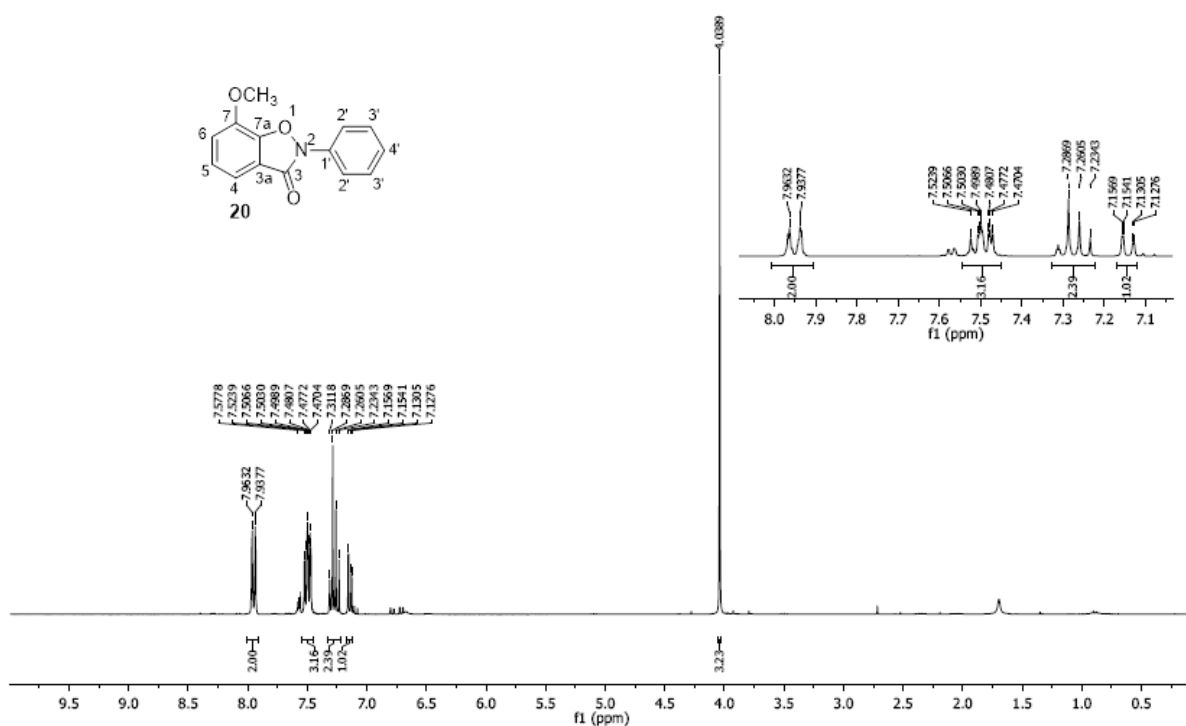
Figura 68 - Espectro no IV do composto **20**.



Fonte: do autor.

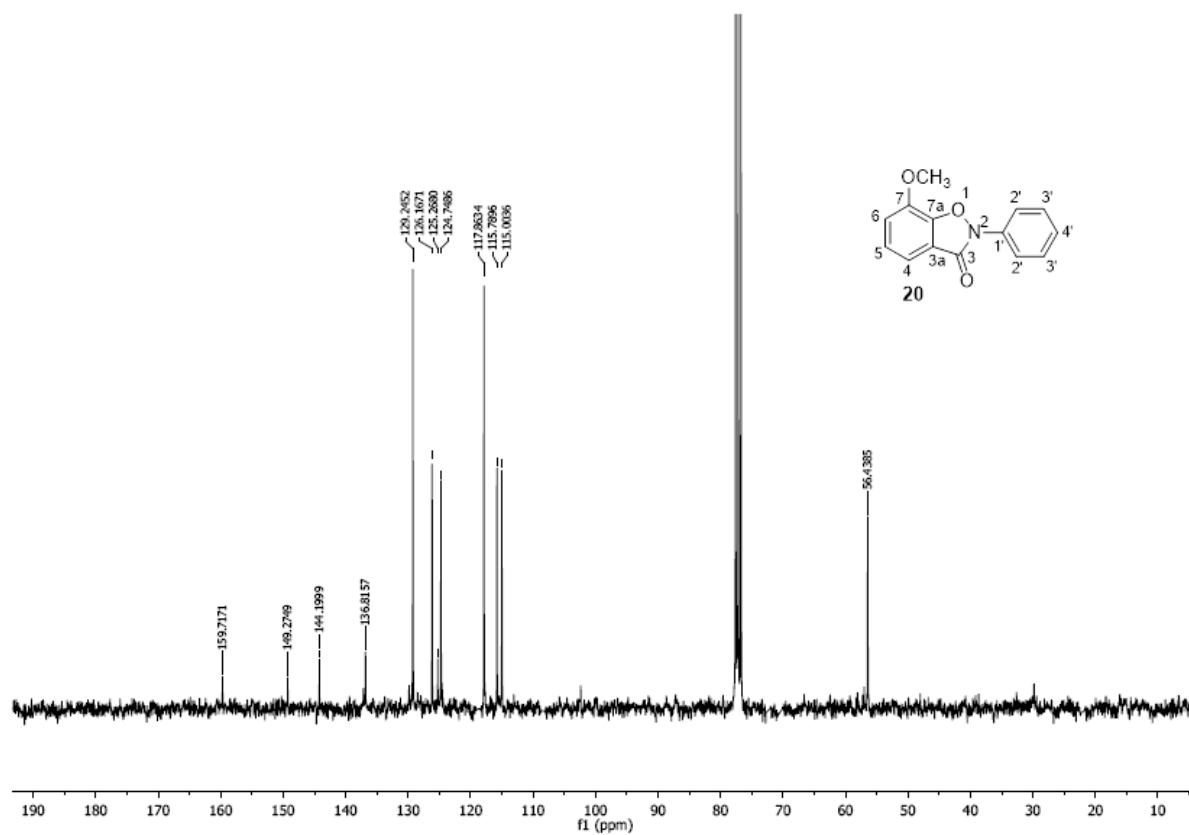
No espectro de RMN de ^1H (Figura 69), os sinais pertencentes aos hidrogênios aromáticos correspondem um multipletto com deslocamento químico entre 7,95 – 7,89 ppm foi atribuído ao H-2' da fenila. Os hidrogênios H-3' e H-4 possuem um δ entre 7,49 – 7,44 ppm. O um terceiro multipletto em δ 7,24 pertence aos hidrogênios aromáticos 4'-H, 5-H. o hidrogênio H-6 possui o valor mais baixo de deslocamento químico porque está na posição *orto* a metoxila, esse hidrogênio se apresenta sob a forma de um dupletto duplo com δ 7,11 ppm. É possível notar um simpleto referente à metila em δ 4,01 ppm.

Figura 69 - Espectro de RMN de ^1H do composto **20** (CDCl_3 , 300 MHz).



Fonte: do autor.

Já no espectro de RMN de ^{13}C (Figura 70), observa-se um sinal do carbono metílico em δ 56,30. Foi possível localizar os sinais referentes aos carbonos aromáticos hidrogenados do biclico em δ 114,27 (C-6), 124,61 (C-5) e 125,13 (C-4) e da fenila em δ 129,11 (C-3'), 126,403 (C-4') e 117,72 (C-2'). Os carbonos não hidrogenados se encontram em δ 149,14 (C-7), 144,06 (C-1'), 136,66 (C-7a) e 115,65 (C-3a).

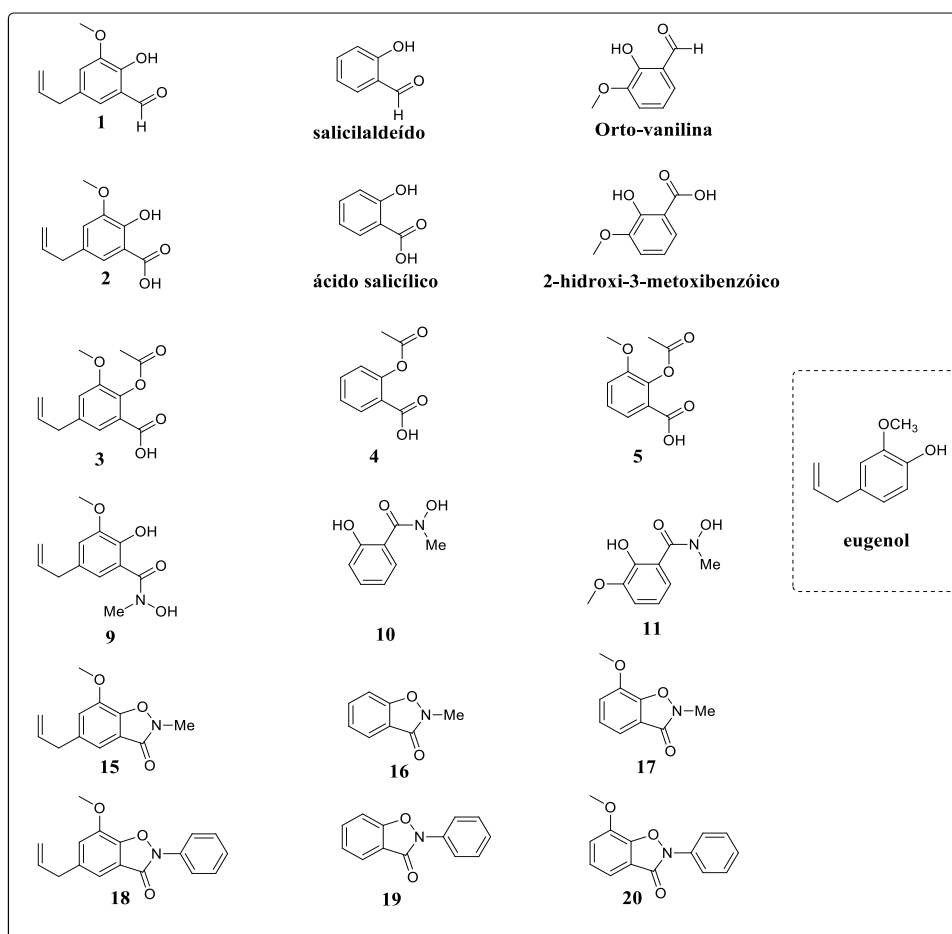
Figura 70 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto **20** (CDCl_3 , 75 MHz).

Fonte: do autor.

4.2 AVALIAÇÃO BIOLÓGICA

Os seis derivados benzisoxazolinônicos sintetizados (**14-20**) foram, inicialmente, avaliados quanto à atividade antifúngica contra *C. albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*. Além disso, incluiu-se nesta avaliação precursores empregados na obtenção dos produtos finais, com o intuito de comparar a atividade biológica em função das modificações graduais realizadas (Figura 71). Os resultados do teste antifúngico podem ser vistos na Tabela 1. O fármaco usado como controle positivo foi o fluconazol, o qual apresenta atividade fungistática, o que explica a determinação apenas de seu valor de CI₅₀. Deste modo, as proposições e comparações com este fármaco somente se darão frente à atividade fungistática e não terão relação com a atividade fungicida mostrada por algumas substâncias avaliadas.

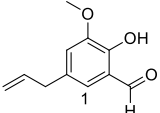
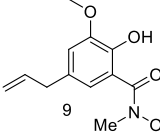
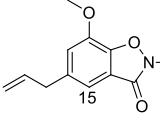
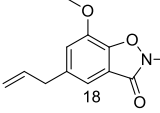
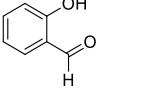
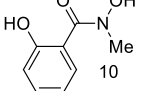
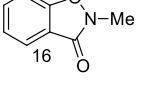
Figura 71 - Estruturas das substâncias avaliadas no teste de atividade antifúngica.

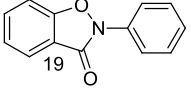
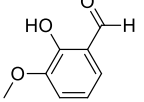
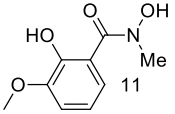
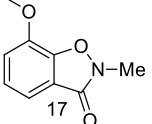
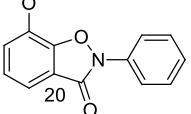
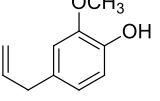


Fonte: do autor.

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. Essas concentrações não foram testadas por diferir muito daquelas encontradas para as substâncias de referência em seu uso clínico sendo, portanto, sem utilidade prática à primeira vista.

Tabela 1 – Resultados da avaliação da atividade antifúngica *in vitro* dos derivados benzisoxazolinônicos e de seus precursores (CI₅₀ e CI₉₀, µM).

Substância		CA	CT	CK	CG	CP
		ATCC 10231	ATCC 750	ATCC 6258	ATCC 22019	ATCC 90030
Fluconazol	CI ₅₀	1,6	3,3	104	52	3,3
	CI ₉₀	i	310	155	77	310
	CI ₅₀	310	518	310	155	518
	CI ₉₀	i	i	i	i	i
	CI ₅₀	i	i	i	i	i
	CI ₉₀	i	i	i	i	i
	CI ₅₀	456	456	273	456	i
	CI ₉₀	i	i	i	i	i
	CI ₅₀	213	i	355	53	355
	CI ₉₀	i	i	i	i	i
	CI ₅₀	122	245	819	245	491
	CI ₉₀	245	491	i	491	i
	CI ₅₀	i	i	i	598	i
	CI ₉₀	i	i	i	i	i
	CI ₅₀	i	i	671	i	i
	CI ₉₀	i	i	i	i	I

	CI ₅₀	284	284	142	142	142
	CI ₉₀	473	473	284	284	284
	CI ₅₀	197	394	394	197	394
	CI ₉₀	394	657	i	394	657
	CI ₅₀	i	507	i	i	i
	CI ₉₀	i	i	i	i	i
	CI ₅₀	i	558	558	i	i
	CI ₉₀	i	i	i	i	i
	CI ₅₀	i	414	414	i	i
	CI ₉₀	i	i	i	i	i
	CI ₅₀	i	i	609	i	i
	CI ₉₀	i	i	i	i	i

Fonte: do autor

CA: *Candida albicans*, CT: *Candida tropicalis*, CK: *Candida krusei*, CP: *Candida parapsilosis*, CG: *Candida glabrata*.
i- inativo até 100 µg.mL⁻¹

De acordo com os resultados obtidos para os testes realizados contra as cepas destes fungos, nenhum derivado contendo o ácido carboxílico *orto* à hidroxila fenólica, seja ela acetilada ou desacetilada, foi capaz de inibir o crescimento nas concentrações avaliadas. Por esse motivo e para uma representação mais clara, seus resultados foram omitidos das tabelas.

Com esta série de derivados, pretendeu-se avaliar a influência na atividade antifúngica da cadeia lateral alílica e do grupo metoxila ligados ao anel aromático dos sistemas bicíclicos, bem como dos substituintes metila ou fenila ligados diretamente ao nitrogênio do núcleo isoxazolinônico. Pelos dados apresentados, pode-se notar que há uma relação clara entre as modificações dos substituintes quando se avalia a potência e espectro de ação das substâncias.

Os derivados que possuem o grupo fenila ligado diretamente ao nitrogênio benzisoxazolinônico (**18**, **19** e **20**) foram em geral mais ativos quando comparados aos que possuem grupo metila (**15**, **16** e **17**). O derivado **18**, híbrido do eugenol e do ebselen e que foi alvo do planejamento neste trabalho, mostrou-se ativo frente a quase todas as cepas testadas,

diferente do eugenol, o qual só foi ativo contra *C. krusei*. Além disso, é importante notar que este híbrido teve um perfil de atividade contra a *C. glabrata* igual ao do fármaco padrão, com CI_{50} de 53 μ M. Diferentemente dos outros derivados do eugenol, mesmo possuindo a cadeia lateral alílica, o composto **18** apresentou atividade contra *C. albicans*, talvez por uma mudança no mecanismo de ação. Entretanto, o derivado **18** não apresentou atividade fungicida contra nenhuma das espécies avaliadas.

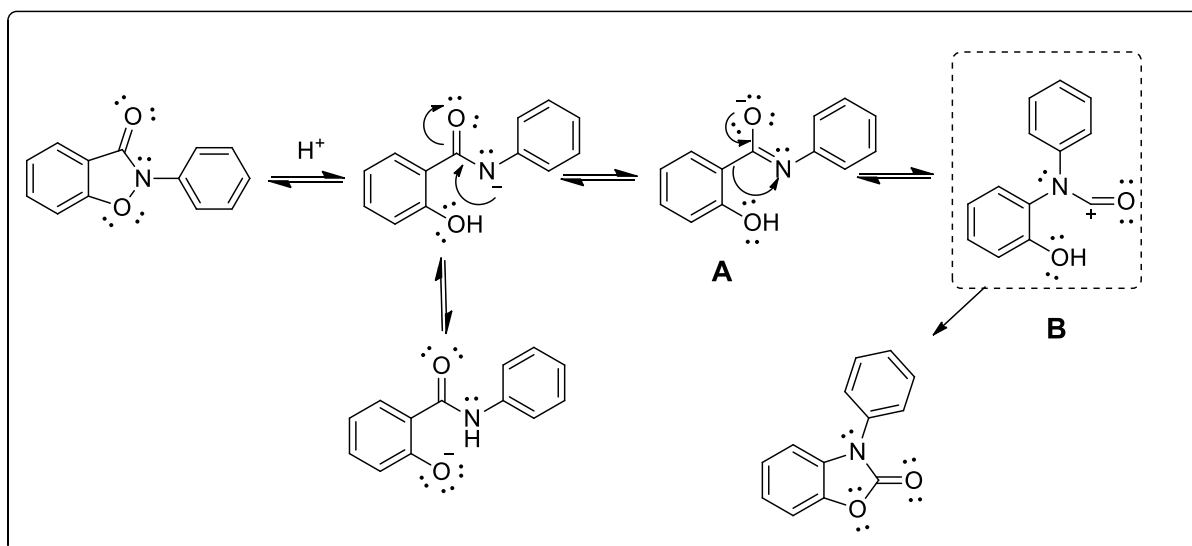
Ainda considerando as substâncias **18**, **19** e **20**, a mais ativa foi a molécula que não apresenta nenhum dos substituintes já mencionados (composto **19**). Foi a única substância dentre aquelas da classe das benzisoxazolinonas que apresentou atividade fungicida contra todas as cepas testadas, além da atividade fungistática. Mostrou valor de CI_{50} de 142 μ M frente *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, apresentando atividade semelhante à do fluconazol (CI_{50} de 104 μ M) contra *C. krusei*. O composto **20**, que possui apenas o grupo metoxila como substituinte, não apresentou atividade antifúngica satisfatória, o que mostra que este grupo provavelmente não possui qualquer influência positiva na atividade antifúngica, pelo contrário, podendo em alguns casos diminuí-la, como observado neste trabalho.

Todos os derivados *N*-metílicos apresentaram alguma atividade frente a *C. krusei*, sendo que o derivado mais ativo contra essa espécie foi a benzisoxazolinona oriunda do eugenol (**15**) com CI_{50} de 273 μ M. Este derivado ainda apresentou o maior espectro de ação frente as espécies testadas. Todavia, nenhum produto *N*-metílico foi ativo contra *C. parapsilosis* ou apresentou atividade fungicida contra as espécies de fungo testadas.

O fato de os derivados *N*-fenílicos terem apresentado atividade antifúngica superior aos análogos *N*-metílicos revela que a atividade em questão pode não advir apenas da presença do heterociclo e sim pelas interações favoráveis deste substituinte volumoso com o alvo molecular ou mesmo pela ocorrência de alguma transformação química que estes derivados venham a sofrer no meio antes de sua ação propriamente dita. Estudos mostram que benzisoxazolinonas podem isomerizar-se em pH ácido ou redutor, gerando os regioisômeros benzoxazolinônicos (SHERADSKY e AVRAMOVICI, 1978). O mecanismo dessa reação parece envolver a clivagem da ligação fraca entre o N-O levando a um intermediário aniônico **A** (Figura 72) seguido por um rearranjo de Curtius para produzir o intermediário carbocatiônico **B**. Este mecanismo é similar ao da ciclização intramolecular via isocianato para a formação de benzoxazolinonas, conhecido como rearranjo Lossen-like (LOSSEN, 1874) ou reação Schmidt-like (SCHMIDT, 1924).

O intermediário carbocatiônico formado durante a isomerização é altamente reativo, mas tem a sua reatividade sensivelmente modulada pelo substituinte ligado diretamente ao nitrogênio do heterociclo (SHERADSKY e AVRAMOVICI, 1978; UNO e KUROKAWA, 1978). O substituinte fenílico pode estabilizar com maior eficiência tanto o estado de transição quanto o intermediário reativo, se comparado ao derivado metílico. Reações envolvendo migrações alquílicas são mais comuns em amidas e ácidos hidroxâmicos, assim como são viáveis também em sistemas benzisoxazolinônicos (DARLAGTEH, et al. 1971; BAUER, 1974).

Figura 72 - Isomerização da benzisoxazolinona a benzoxazolinona.



Fonte: KUROKAWA, 1978.

Essa espécie reativa, ou mesmo as benzoxazolinonas finais, pode estar relacionada às atividades antifúngicas observadas. Benzoxazolinonas correspondem a uma classe de compostos que ocorrem naturalmente em plantas, nas quais cumprem funções distintas e vitais, como a defesa contra bactérias, fungos e insetos (MODIYA e PATEL, 2012). Como exemplo, Jiang e colaboradores (2008) descreveram a actividade antifúngica de parnafunginas naturais, produtos em que este anel é fundamental para a atividade anti-*Candida* spp., portanto, poderiam ser também responsáveis pela ação contra patógeno. Mais estudos serão necessários para descobrir qual substância efetivamente é a responsável pela atividade antifúngica dos compostos **18**, **19** e **20**, bem como seu mecanismo de ação.

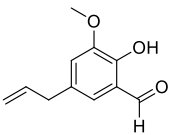
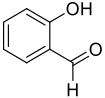
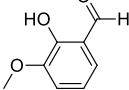
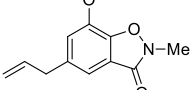
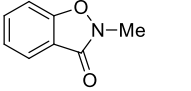
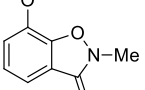
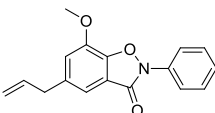
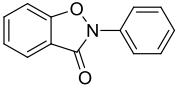
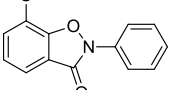
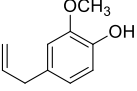
Uma análise da atividade antifúngica dos precursores permitiu perceber que os intermediários ácidos hidroxâmicos **9**, **10** e **11** não apresentaram atividade antifúngica de destaque, apenas após a ciclização dos mesmos às benzisoxazolinonas respectivas. Estes resultados estão de acordo com dados encontrados na literatura, indicando que ácidos hidroxâmicos não possuem atividade antifúngica relevante (FOMSGAARD et al. 2004; MODIYA and PATEL, 2012).

Os precursores dotados de grupo formílico também foram ativos frente aos fungos e exibiram um espectro de ação abrangente frente às cepas avaliadas. Todos tiveram ação contra as quatro cepas de fungos testadas, sendo que a espécie que se mostrou mais susceptível a ação desses compostos foi *C. glabrata*. A substância **1**, que é produto de formilação do eugenol, foi capaz de inibir o crescimento de *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*. Vale ressaltar que quando se compara CI_{50} da substância **1** e do fluconazol, frente a *C. glabrata*, os valores são praticamente os mesmos. A substância **1** apresentou, ainda, atividade fungicida, sendo mais ativa novamente frente a *C. glabrata*, com um valor de CI_{90} de 77 μ M. Quando se comparam *orto*-vanilina, o salicilaldeído e a substância **1**, a fim de avaliar a influência dos substituintes alila e metoxila na atividade antifúngica, é possível observar que o substituinte alila parece realmente ser importante na atividade contra *C. krusei*. Uma vez que não possuindo o substituinte alila, a *orto*-vanilina e o salicilaldeído apresentaram valores de CI_{50} de atividade fungistática menores e não apresentar atividade fungicida contra a *C. krusei*. Para corroborar isso, neste teste, o único fungo contra o qual o eugenol teve atividade, ainda que discreta, foi *C. krusei*.

Na sequência, as substâncias mais promissoras como antifúngicos tiveram avaliados os seus perfis de citotoxicidade frente a células mononucleares sanguíneas, como modelo de célula saudável do organismo hospedeiro. A partir daí, pode-se calcular o índice de seletividade cada substância, o que traduz sua toxicidade seletiva. Na Tabela 2 estão indicados os dados obtidos nesse experimento.

Quando analisamos o índice de seletividade das substâncias testadas, verificamos que os valores de CI_{50} e IS mais promissores foram os observados frente ao fungo *Candida glabrata* (Tabela 2). A atividade dessas moléculas contra esta cepa se destaca por sempre apresentar uma concentração inibitória mínima menor que a concentração citotóxica em alguns casos, os valores de CI_{50} dessas moléculas foram próximos ou iguais ao fármaco padrão usado como controle. Com exceção do derivado formilado do eugenol, todos os compostos exibiram maior índice de seletividade que o eugenol.

Tabela 2 - Resultados da avaliação da atividade citotóxica *in vitro* dos derivados benzisoxazolinônicos e de seus precursores sobre células sanguíneas mononucleares.

Substância	CI ₅₀ (µM)/IS					CC ₅₀ (µM)
	CA ATCC 10231	CT ATCC 750	CK ATCC 6258	CG ATCC 22019	CP ATCC 90030	
	i	310/0,27	155/0,54	77/1,07	310/0,27	82,81
	122/6,9	245/3,5	819/1,04	245/3,5	491/1,1	853,22
	197/5,4	394/2,7	394/2,7	197/5,4	394/2,7	1069,87
	456/1,2	456/1,2	273/1,9	456/1,2	i	521,64
	i	i	671/1,24	i	i	838,92
	i	558/1,09	558/1,09	i	i	610,50
	213/0,85	i	355/0,5	53/3,4	355/0,5	181,13
	284/1,05	284/1,05	142/2,1	142/2,1	142/2,1	298,05
	i	414/0,6	414/0,6	i	i	249,58
	i	i	610/0,9	i	i	549

Fonte: do autor

CA: *Candida albicans*, CT: *Candida tropicalis*, CK: *Candida krusei*, CG: *Candida glabrata*, CP: *Candida parapsilosis*.

IS: Índice de seletividade, dado pela razão CC₅₀/CI₅₀.

i- inativo até 100 µg.mL⁻¹

Considerando-se as substâncias que exibiram atividade antifúngica relevante, vale destacar, esta discussão de citotoxicidade, os derivados benzisoxazolinônicos. Os derivados *N*-metílicos **15**, **16** e **17** possuem índice médio de seletividade de 1,2. Pode-se ressaltar, ainda,

que híbrido derivado do eugenol **15** aparenta ser mais seletivo, além de o mais ativo da classe metilada. Frente a *C. krusei*, o composto **15** apresentou índice de seletividade 1,9.

Quando são comparados os análogos *N*-fenilbenzisoaxazolinônicos **18**, **19** e **20**, observa-se que o derivado **19** é o mais promissor. Ele possui a maior atividade antifúngica, a menor toxicidade e, conseqüentemente, o melhor índice de seletividade para as espécies de fungos testadas (IS de 2,1 frente a *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. glabrata*). Já o híbrido **18**, alvo principal do planejamento desse projeto, exibiu uma CC₅₀ cerca de três vezes maior que a CI₅₀ frente à *C. glabrata* (IS 3,4), além do fato de sua concentração inibitória se equivaler à do fluconazol, como já comentado.

Se forem levados em conta os valores absolutos de concentração citotóxica dos análogos fenil e metilbenzisoaxazolinônicos, constata-se que os derivados fenílicos possuem toxicidade maior que os derivados metílicos. Uma possível explicação é a possibilidade, já explicada anteriormente, da formação *in situ* de espécies reativas derivadas da isomerização do heterociclo em questão. Isso talvez interfira em algum processo bioquímico comum ao fungo e às células humanas, abrindo a possibilidade para se avaliar seu potencial antiproliferativo de células tumorais e, conseguinte, permitir o desenvolvimento de candidatos a fármacos antineoplásicos.

Embora o precursor formulado **1** tenha apresentado atividade antifúngica superior aos seus análogos salicilaldeído e *orto*-vanilina, ele foi cerca de 10 vezes mais tóxico que os demais aldeídos. Pela observação dos dados da Tabela 2, pode-se perceber uma constância de toxicidade com os derivados que possuem o grupamento alila nas classes dos aldeídos e dos derivados *N*-metil e *N*-fenilbenzisoaxazolinônicos. Assim, mesmo esse substituinte não tendo modulado diretamente a atividade antifúngica global dos compostos, teve influência na toxicidade dos mesmos.

Por fim, conclui-se que a estratégia de hibridização para formação do núcleo benzisoaxazolinônico é interessante, pois resultou em moléculas ativas frente às cepas de fungos testadas. Outras modificações estruturais podem ser feitas nas substâncias obtidas, a fim de se obter produtos com maior potência e menor toxicidade. Além disso, é necessária também a elucidação do mecanismo de ação dessa classe, a fim de verificar se a atividade antifúngica advém da ação direta na H⁺-ATPase ou em outro alvo molecular.

5 CONCLUSÃO

Nesse trabalho foram planejados e sintetizados seis derivados benzisoxazolidinônicos a partir da hibridização molecular entre o ebselen e o eugenol (ou correlatos), substâncias com reconhecidas atividades antifúngicas. A preparação dos mesmos se deu por síntese e ciclização de ácidos hidroxâmicos aromáticos *N*-substituídos. Esses heterociclos e seus precursores, ao serem avaliados frente a espécies de *Candida* spp., apresentaram atividade antifúngica que variou em espectro e potência. Destacam-se as *N*-fenilbenzisoxazolinonas **18**, **19** e **20**, as quais apresentaram, em certos casos, valores de CI_{50} próximos ou até iguais aos do fármaco de referência fluconazol contra as espécies *C. krusei*, *C. glabrata*. O derivado (**19**) ainda apresentou atividade fungicida, contra todas as espécies testadas, essa atividade não é observada com o fármaco controle empregado, fluconazol. Os testes mostraram um perfil variado de citotoxicidade entre as classes de moléculas testadas, sendo destaque o padrão apresentado pelo substituinte alila na diminuição dos valores de CC_{50} . Baseado nestes resultados, novos análogos benzisoxazolinônicos podem ser planejados a fim de se obter derivados mais otimizados e que possam prosseguir em testes mais específicos.

REFERÊNCIAS

- 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, 2010c.
- AMBESI, A. et al. Biogenesis and function of the yeast plasma-membrane H⁺-ATPase. **The Journal of Experimental Biology**. v. 203, p. 155–160, 2000.
- 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.
- ANTONY, S.; BAYSE, C. A. Modeling the mechanism of the glutathione peroxidase mimic ebselen. **Inorganic Chemistry**., v. 50, p. 12075-12084, 2011.
- ALCAZAR, F. L. et al. Probing the role of point mutations in the cyp51A gene from *Aspergillus fumigatus* in the model yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Medical Mycology**., v. 49, n. 3, p. 276-284, 2010.
- ARINO, J.; RAMOS, J.; SYCHROVA, H. Alkali metal cation transport and homeostasis in yeasts. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 74, p. 95-120, 2010.
- AZAD, G. K. et al. Ebselen induces reactive oxygen species (ROS)-mediated cytotoxicity in *Saccharomyces cerevisiae* with inhibition of glutamate dehydrogenase being a target. **FEBS Open Bio**. v. 4, p. 77–89, 2014.
- BAÑUELOS, M. A. et al. The Nha1 antiporter of *Saccharomyces cerevisiae* mediates sodium and potassium efflux. **Microbiology**. v. 144, n. 10, p. 2749–2758, 1998.
- BARBOSA, J. et al. Structure–activity relationships of eugenol derivatives against *Aedes aegypti*. **Published online in Wiley Online Library**. 2012.
- BAUER, L.; EXNER, O. The Chemistry of Hydroxamic Acids and N-Hydroxyimides. **Angewandte Chemie International Edition**. v. 13, n. 6, p. 376-384, 1974.
- BECK-SAGUÉ, C.; JARVIS, W. R. Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the United States, 1980-1990. National Nosocomial Infections Surveillance System. **Journal of Infectious Diseases**, v. 167, p. 1247-1251, 1993.
- BHABAK, K. P.; MUGESH, G. Synthesis, characterization, and antioxidant activity of some ebselen analogues. **Chemistry - A European Journal**v. 13, p. 4594-4601, 2007.

BILLACK, B. et al. Evaluation of the antifungal and plasma membrane H⁺-ATPase inhibitory action of ebselen and two ebselen analogs in *S. cerevisiae* cultures. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**. v. 25, n. 3, p. 312–317, 2010.

BLUM, G. et al. Potential basis for amphotericin B resistance in *Aspergillus terreus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 52, n. 4, p. 1553-1555, 2008.

BUDAVARI, S. **The merck index. Merck & Co. Inc.**, Rahway, N.J., 1996.

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

CANUTO, M. M.;RODERO,F.G. Antefungal drug resistance to azoles and polienes. **Infectious Diseases**. v. 2, p. 550-562, 2002.

CARRASCO, H. et al. Antifungal Activity of Eugenol Analogues. Influence of Different Substituents and Studies on Mechanism of Action. **Molecules**. v. 17, p. 1002-1024, 2012.

CAUSTON, H. C.; REN, B.; KOH, S. S. et al. Remodeling of yeast genome expression in response to environmental changes. **Molecular Biology of the Cell**. v. 12, n. 2, p. 323–337, 2001.

CHAN, G. et al. Evaluation of the Antimicrobial Activity of Ebselen: Role of the Yeast Plasma Membrane H⁺-ATPase. **J Biochemical and Molecular Toxicology**. v. 21, n. 5, 2007.

CHEN, S. C. A.; SORRELL, T. C. Antifungal agents. **Medical Journal of Australia**, v. 187, n. 7, p. 404–409, out. 2007.

COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T.; SILVA, L. R.; et al. Prospective observational study of candidemia in São Paulo, Brazil: incidence rate, epidemiology, and predictors of mortality. **Infection Controlling & Hospital Epidemiology**, v. 28, p. 570-576, 2007.

CRAVEIRO, A. C. et al. **Óleos essenciais de plantas do Nordeste**. Edições UFC, Fortaleza, Ce, 1981.

CUESTA, I. et al. Evaluation by data mining techniques of fluconazole breakpoints established by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) and comparison with those of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 54, n. 4, p. 1541-1546, 2012.

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.

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.

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

- DIAS, K. S. et al. Semisynthesis and antimicrobial activity of novel guttiferone-A derivatives. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 8, p. 2713–2720, 2012.
- DIOMEDI, A. P. Nuevos antifúngicos: Las equinocandinas. **Reviews Childre Infection** v. 21, n. 2, p. 89-101, 2004.
- ELSHARBINI, M. et. al. Synthesis and Antioxidant Activities of Novel Chiral Ebselen Analogues. **Heteroatom Chemistry**, v. 25, p. 320- 325, 2014.
- ENGMAN, L.; HALLBERG, A. Expedient synthesis of ebselen and related compounds. **J. The Journal of Organic Chemistry**, v. 54, p. 2964-2966, 1989.
- ESCOBAR, R. G. Eugenol: Propriedades farmacológicas y toxicológicas. Ventajas y desventajas de su uso. **Cubana Estomatol**, v. 39, 2002.
- FARAGO, P. V. et al. Atividade antibacteriana de óleos essenciais de *Ocimum selloi* Benth. (Lamiaceae). **Publicatio UEPG: Ciências Biológicas e da Saúde**, Ponta Grossa, v. 10, n. 3/4, p. 59-63, 2004.
- GALET, V. et al. Benzoselenazolinone Derivatives Designed to Be Glutathione-Peroxidase Mimetics Feature Inhibition of Cyclooxygenase/5-Lipoxygenase Pathways and Antiinflammatory Activity. **Journal of Medicinal Chemistry**. v.37, p. 2903-2911, 1994.
- GARBER G. An overview of fungal infections. **Drugs**. v. 61, p. 1-12, 2001.
- GARCIADÉBLAS, B.; RUBIO, F.; QUINTERO, F. J. et al. Differential expression of two genes encoding isoforms of the ATPase involved in sodium efflux in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular & General Genetics** v. 236, n. 2-3, p. 363–368, 1993.
- 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.
- IMAI, H. et al. Ebselen protects both gray and white matter in a rodent model of focal cerebral ischemia. **Stroke**, v. 32, n. 9, p. 2149-2154, 2001.
- JIANG, B. et al. PAP inhibitor with in vivo efficacy identified by candida albicans genetic profiling of natural products. **Chemistry & Biology**. v. 15, n. 4, p. 363–374, 2008.
- JING, M.; XIU-XIAO, S.; DIAN, H. Synthesis and Crystal Structure of N-phenyl-N-[(o-nitrophenylacetyl)oxy]benzamide. **Chinese Journal of Structural Chemistry**. v. 32, p. 1749–1753, 2013.
- KHALIKOV, S. K.; KODIROV, M.; ALIEVA, S. V. Synthesis and anti-inflammatory activity of acetylsalicylamino acids and peptides. **Chemistry of Natural Compounds**. v. 42 p. 204-207, 2006.

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, p. 6953-6981, 2012.

KATHIRAVAN, M. K. et al. The biology and chemistry of antifungal agents: A review. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 19, p. 5678–5698, out. 2012.

KIM, H. M. et al. Antianaphylactic properties of eugenol. **Journal of Pharmacy Research**. v 48, p. 3620-3632, 1997.

KONG X.; LIU, X.; YANG, Y. Advances in Pharmacological Research of Eugenol. **Current Opinion Complement Alternative Medicine**. v. 1, p. 8-11, 2014.

KONTOYIANNIS, D. P.; Lewis, R. E. Antifungal drug resistance of pathogenic fungi. **Lancet**. v. 359, p. 1135-44, 2002.

KOTHARI, S.K; BHATTACHRYA, A.K; RAMESH. S. Essential oil yield quality of methyl eugenol rich *Ocimum tenuiflorum* L.f. (syn. *O. sanctum* L.) grown in south India as influenced by method of harvest. **Journal of Chromatography**. v. 1054, p. 67-72, 2004.

KURTI, L.; CZAKO, B. Strategic Applications of Named Reactions in Organic Synthesis. **Elsevier Academic Press**. 2005.

LESSER, R.; WEISS, R. Aromatic compounds containing selenium. **VI. Ber. dtsh. chemistry Ges.**, v. 57, p. 1077-1082, 1924.

LOSSEN, W. Ann. v. 175, p. 271, 1874.

MADEIRA, S. V. F. et al. Temporal variation of chemical composition and relaxant action of the essential oil of *Ocimum gratissimum* L. (Labiatae) on guinea-pig ileum. **Phytomed.**, v. 12, p.506- 509, 2005.

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.

MARKOWITZ, K. et al. Biologic properties of eugenol and zinc oxide-eugenol. A clinically oriented review. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology.**, v. 73, n. 6, p. 729-37, 1992.

MARTINEZ, R. Atualização no uso de agentes antifúngicos. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 32, n. 5, p. 449–460, 2006.

MEOTTI, F. C. et al. Potential renal and hepatic toxicity of diphenyl diselenide, diphenyl ditelluride and Ebselen for rats and mice. **Toxicology Letters**. v. 143, p. 9-16, 2003.

MÉAN, M; MARCHETTI, O.; CALANDRA, T. Bench-to-bedside review: *Candida* infections in the intensive care unit. **Critical Care**. v. 12, p. 204, 2008.

MIORELLI, S. T. et al. Antioxidant and anti-mutagenic effects of ebselen in yeast and in cultured mammalian V79 cells. **Mutagenesis**. v. 23, n. 2, p. 93–99, 2008.

MODIYA, P. R.; PATEL, C. N. Synthesis and screening of antibacterial and antifungal activity of 5-chloro-1,3-benzoxazol-2 (3 h)-one derivatives. **Organic and Medicinal Chemistry Letters**. v. 2, n. 1, p. 29-39, 2012.

MONK, B. C. et al. The yeast plasma membrane proton pumping ATPase is a viable antifungal target. I. Effects of the cysteine-modifying reagent omeprazole. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1239, p. 81-90, 1995.

MORSCHHAUSER, J. Regulation of multidrug resistance in pathogenic fungi. **Fungal Genetics and Biology**, v. 47, n. 2, p. 94-106, 2013.

MORRISON, R.; BOYD, R. Organic Chemistry. Boston: Allyn and Bacon, Inc., 1961.
SENANAYAKE, U. M.; WILLS, B. H.; LEE, T. H. Biosynthesis of eugenol and cinnamic aldehyde in *Cinnamomum zeylanicum*. **Phytochemistry**, v.16, p-2032-2033, 1977.

MONK, B. C. et al. The yeast plasma membrane proton pumping ATPase is a viable antifungal target. I. Effects of the cysteine-modifying reagent omeprazole. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1239, p. 81-90, 1995.

MULLER, A. et al. A novel biologically active seleno-organic compound – I. Glutathione peroxidase-like activity in vitro and antioxidant capacity of PZ 51 (Ebselen). **Biochemical Pharmacology**, v. 33, p. 3235-3239, 1984.

MUTHU, K. K. et al. The biology and chemistry of antifungal agents: A review. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. 2012.

NOGUEIRA, C. W.; ROCHA, J. B. Toxicology and pharmacology of selenium: emphasis on synthetic organoselenium compounds. **Archives of Toxicology**. v. 85, p. 1313-1359, 2011.

NOBRE, M. O. et al. Fármacos antifúngicas para pequenos e grandes animais. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, n. 1, p. 175–184, jan./fev. 2002.

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.

PACULA, J. A.; SCIANOWSKI, J.; ALEKSANDRZAK, K. B. Highly efficient synthesis and antioxidant capacity of N-substituted benzisoselenazol-3(2H)-ones. **RSC Advances**, v. 4, p. 48959-48962, 2014.

PARNHAM, M. J.; SIES, H. The early research and development of ebselen. **Biochemical Pharmacology**. v. 86, p. 1248–1253, 2013.

PARNHAM, M. J. Biological activities and clinical potential of ebselen. **Advances in Experimental Medicine and Biology**. v. 264, p. 193-197, 1990.

PASQUALOTTO, A. C. et al. Risk factors and outcome for nosocomial breakthrough candidaemia. **Journal of Infection**. v. 52, p. 216-222, 2006.

PAULA, S. B.; BARTELLI, T. F.; RAIMO, V. Efeito do Eugenol na Superfície Hidrofobicidade celular, adesão e biofilme de *Candida tropicalis* e *Candida dubliniensis* isoladas da cavidade bucal de patients infectados cabelo HIV. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. p. 505,204, 2014.

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.

PFALLER, M. A; DIEKEMA, D. J. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 20, p. 133-163, 2007.

PEARL, I. A. Vanillic acid silver oxide method. **Organic Syntheses**. v. 4, p. 972, 1963.

PICHERSKY, E.; NOEL, J. P.; DUDAREVA, N. Biosynthesis of plant volatiles: nature's diversity and ingenuity. **Science**. v. 311, n. 5762, p. 808-811, 2006.

PIPER, P. et al. Acid adaptation: the stress response that confers yeast with resistance to organic acid food preservatives. **Microbiology**. v. 147, p. 2635-2642, 2001.

PORTILLO, F. Regulation of plasma membrane H⁺-ATPase in fungi and plants. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1469, n. 1, p. 31–42, 2000.

PRIOR, C. et al. Characterization of the NHA1 gene encoding a Na⁺/H⁺-antiporter of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS letters**. v. 387, n. 1, p. 89–93, 1996.

RANGEL-FRAUSTO, M. S. et al. Nationalepidemiology of mycoses survey (NEMIS): variations in rates of bloodstream infections due to *Candida* species in seven surgical intensive care units and six neonatal intensive care units. **Clinical Infectious Diseases**, v.29, p.253-258,1999.

RAO, K. V.; SESHADRI, T. R.; THIRUVENGADAM, T. R. Nuclear oxidation in flavones and related compounds. **Synthesis of Myristicin and Elemicin**. v. 13, p. 114-119, 1949.

RAO, A.; ZHANG, Y.; MUEND, S; RAO, R. Mechanism of Antifungal Activity of Terpenoid Phenols Resembles Calcium Stress and Inhibition of the TOR Pathway. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. p. 5062–5069, 2010.

RAO, R. et al. Structure and function of the yeast plasma-membrane H⁺-ATPase. **Annals of the New York Academy of Sciences**. v. 671, p. 195–203, 1992.

REX, J.H.;COOPER, C.R.;MERZ,W.G et al. Detection of amphotericin B-resistant *Candida* isolates in a broth-based system. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 39, n. 4, p. 906-909, 1995.

ROMPELBERG, C. J. et al. Inhibition of rat, mouse, and human glutathione S-transferase by eugenol and its oxidation products. **Chemico-Biological Interactions**. v. 99, p. 85-97, 1996.

RUIZ-CAMPS, I.; CUENCA-ESTRELLA, M. Antifungals for systemic use. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.**, v. 27, n. 6, p. 353-362, 2009.

SALUK, J. et al. Evaluating the antioxidative activity of diselenide containing compounds in human blood. **Bioorganic Chemistry.** v. 50, p. 26-33, 2013.

SANDVEN, P. Epidemiology of candidemia. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 17, p. 73-81, 2000.

SANGLARD, D.; ODDS, F. C. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. **Lancet Infectious Diseases**, v. 2, p. 73- 85, 2002.

SATHEESHKUMAR, K.; MUGESH, G. Synthesis and Antioxidant Activity of Peptide-Based Ebselen Analogue. **Chemistry - A European Journal.** v. 17, p. 4849-4857, 2011.

SCHEWE, T. Molecular actions of ebselen - an antiinflammatory antioxidant. **General Pharmacology.** v. 26, p. 1153-1169, 1995.

SCHMIDT, K. F. Über den Imin-Rest. **Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft (A and B Series).** v. 57, p. 704-723, 1924.

SERRANO, R.; KIELLAND-BRANDT, M. C.; FINK, G. R. Yeast plasma membrane ATPase is essential for growth and has homology with (Na⁺ + K⁺), K⁺- and Ca²⁺-ATPases. **Nature.** v. 319, n. 6055, p. 689-693, 1986.

SHAO, P. L.; HUANG, L. M.; HSUEH, P. R. Recent advances and challenges in the treatment of invasive fungal infections. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 30, p. 487- 495, 2007.

SHERADSKY, T.; AVRAMOVICI, G. S. 1,2-aryl migration onto acylnitrenium ions. **Tetrahedron Letters.** n. 26, p. 2325-2326, 1978.

SHI, G. Q. The first general synthesis of *N*-substituted 1,2-benzisoxazolin-3-ones. **Tetrahedron Letters.** v. 41, p. 2295-2298, 2000.

SIES, H. Ebselen: a glutathione peroxidase mimic. **Methods Enzymol.**, v. 234, p. 476-482, 1994.

SIES, H. Ebselen, a selenoorganic compound as glutathione peroxidase mimic. **Free Radical Biology & Medicine.**, v. 14, p. 313-323, 1993.

SOTEROPOULOS, P. et al. Molecular Characterization of the Plasma Membrane H1-ATPase, an Antifungal Target in *Cryptococcus neoformans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy.** p. 2349-2355, 2000.

SPELLBERG, B. J.; FILLER, S. G.; EDWARDS, J. E. JR. Current treatment strategies for disseminated candidiasis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 42, p. 244-251, 2006.

SWOBODA, S. M.; MERZ, W. G; LIPSETTA, P. A. Candidemia: the impact of antifungal prophylaxis in a surgical intensive care unit. **Surgical Infections.** v. 4, p. 345- 354, 2003.

- SYCHROVÁ, H.; RAMÍREZ, J.; PEÑA, A. Involvement of Nha1 antiporter in regulation of intracellular pH in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS microbiology letters**, v. 171, n. 2, p. 167–172, 1999.
- TAKASAGO, T. et al. Neuroprotective efficacy of ebselen, an anti-oxidant with anti-inflammatory actions, in a rodent model of permanent middle cerebral artery occlusion. **Br. J. Pharmacol.**, v. 122, n. 6, p. 1251-1256, 1997.
- THOMAS, A. G. et al. Kinetic characterization of ebselen, chelerythrine and apomorphine as glutaminase inhibitors. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 438, p. 243-248, 2013.
- THOMAS, A. G. et al. Kinetic characterization of ebselen, chelerythrine and apomorphine as glutaminase inhibitors. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 438, p. 243-248, 2013.
- UEDA- NAKAMURA, T. et al. Antileishmanial activity of Eugenolrich essential oil from *Ocimum gratissimum*. **Parasitology International**. v. 55, p. 99-105, 2006.
- UNO, H.; KUROKAWA, M. Studies on 3-substituted 1,2-benzisoxazole derivates. Rearrangement of N-substituted 2H-1,2-benzisoxazolin-3-one to 2-substituted 2H-1,3-benzoxazin-4-one. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**. v. 26, n. 2, p. 549-555, 1978.
- USTA, J. et al. In vitro effect of eugenol and cinnamaldehyde on membrane potential and respiratory chain complexes in isolated rat liver mitochondria. **Food and Chemical Toxicology**. v. 40, p.935-940, 2002.
- WANG, C. et al. Antifungal activity of eugenol against *Botrytis cinerea*. **Tropical Plant Pathology**. v. 35, n. 3, p. 137-143, 2010.
- WILSON, S. R., et al. Development of Synthetic Compounds with Glutathione-Peroxidase Activity. **Journal of the American Chemical Society**. v.111, p. 5936- 5939, 1989.
- YOKOTA, H. et al. Enhancement of UDP-glucuronyltransferase, UDP-glucose dehydrogenase, and glutathione S-transferase activities in rat liver by dietary administration of eugenol. **Biochem Pharmacol.** v. 37, n. 5, p. 799-802, 1988.
- ZADE, S. S.; PANDA, S.; SINGH. Synthesis of diaryl selenides using the in situ reagent SeCl_2 . **Tetrahedron Lett.**, v. 46, p. 665-669, 2005.
- ZADE, S. S. et al. Convenient synthesis, characterization and GPxlike catalytic activity of novel ebselen derivatives. **European Journal of Organic Chemistry**. p. 3857-3864, 2004.
- ZEPELIN BORG-VON, M.; KUNZ, L.; RÜCHEL, R.; et al. Epidemiology and antifungal susceptibilities of *Candida* spp. to six antifungal agents: results from a surveillance study on fungaemia in Germany from July 2004 to August 2005. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 60, p. 424-428, 2007.

RAO, K. V.; SESHADRI, T. R.; THIRUVENGADAM, T. R. Nuclear oxidation in flavones and related compounds. **Synthesis of Myristicin and Elemicin**. v. 13, p. 114-119, 1949.